

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

**ABORDAGEM ESTATÍSTICA E COMPUTACIONAL NA  
OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE  
ANTIBIÓTICOS: O CASO DA CEFALOSPORINA C.**

Amauri Alves Ferreira

São Carlos -SP  
2003

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

**ABORDAGEM ESTATÍSTICA E COMPUTACIONAL NA  
OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE  
ANTIBIÓTICOS: O CASO DA CEFALOSPORINA C.**

Amauri Alves Ferreira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

Orientador:

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo

São Carlos - SP

2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F383ae

Ferreira, Amauri Alves.

Abordagem estatística e computacional na otimização de meios de cultura para produção de antibióticos: o caso da cefalosporina C / Amauri Alves Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2003.

191 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Engenharia bioquímica. 2. Fermentação. 3. *Cephalosporium acremonium*. 4. Cefalosporina C. 5. Planejamento fatorial. 6. Redes neurais. I. Título.

CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
**AMAURI ALVES FERREIRA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 10 DE OUTUBRO DE 2003.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo  
**Orientador, PPG-EQ/UFSCar**

Prof.Dr. José Geraldo da Cruz Pradella  
**IPT**

Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro  
**DEQ/UFU**

Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz  
**PPG-EQ/UFSCar**

Prof<sup>ª</sup>. Dr. Carlos Osamu Hokka  
**PPG-EQ/UFSCar**

**Aos meus pais, Moysés e Iranila, e aos meus irmãos, que em mais uma etapa de minha vida estiveram presentes, incentivando-me a continuar caminhando.**

*Em hora alguma proclame seus méritos individuais, porque qualquer qualidade excelente é muito problemática no quadro de nossas aquisições. Lembre-se de que a virtude não é uma voz que fala, e, sim, um poder que irradia (Francisco Cândido Xavier).*

## SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas.....	vii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A Cefalosporina: Histórico, Estrutura Química e Biossíntese.....	4
2.2 Metabolismo Primário e Secundário.....	8
2.3 Regulação do Metabolismo.....	13
2.4 Processos de Produção.....	18
2.5 Meios de Cultura para Processos de Produção de Antibióticos.....	25
2.6 Fatores que Afetam a Produção de Cefalosporina C.....	30
2.7 Modelagem e Simulação de Bioprocessos para a Produção de $\beta$ -Lactâmicos..	33
2.8 Técnicas Alternativas para a Modelagem e Otimização de Bioprocessos .....	38
2.8.1 Planejamento Estatístico de Experimentos.....	38
2.8.2 Redes Neurais em Bioprocessos.....	44
2.9 Comentários Gerais.....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Materiais.....	51
3.1.1 Microrganismo.....	51
3.1.2 Meios de Cultura.....	51
3.1.2.1 Meio Sólido de Esporulação.....	51
3.1.2.2 Meio de Germinação e de Preparo do Inóculo.....	52
3.1.2.3 Meio de Cultura para o Cultivo do <i>Cephalosporium</i> <i>acremonium</i> Frascos Agitados e Fermentador.....	53
3.1.2.4 Meio de Cultura para Realização dos Experimentos Previstos no Planejamento Fatorial .....	54

3.1.2.5 Meio de Cultura utilizado nos Experimentos Batelada Alimentada para Validação do Estudo de Otimização com Planejamento Fatorial.....	54
3.1.3 Equipamentos.....	56
3.2 Metodologia.....	57
3.2.1 Métodos Analíticos.....	57
3.2.1.1 Concentração Celular.....	57
3.2.1.2 Concentração de Glicose e Sacarose.....	57
3.2.1.3 Concentração de Nitrogênio.....	57
3.2.1.4 Concentração de Fósforo.....	58
3.2.1.5 Concentração de Cefalosporina C.....	58
3.2.2 Procedimento Experimental.....	58
3.2.2.1 Conservação do Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATC 48272.....	58
3.2.2.2 Preparação de Germinado.....	59
3.2.2.3 Preparação e Acompanhamento do Inóculo.....	59
3.2.2.4 Experimentos de Fermentação com <i>Cephalosporium</i> <i>acremonium</i> em Erlenmeyer e em Fermentador .....	60
3.2.3 Métodos Computacionais.....	61
3.2.3.1 Fundamentos Teóricos: Planejamento Fatorial.....	61
3.2.3.1.1 Análise do Efeito da Composição do Meio na Velocidade Específica Máxima de Crescimento ( $\mu_{max}$ ).....	69
3.2.3.1.2 Análise do Efeito da Composição do Meio na Velocidade Específica de Produção de Antibiótico ( $\mu_p$ ).....	75
3.2.3.2 Fundamentos Teóricos: Redes Neurais.....	77
3.2.3.3 Fundamentos Teóricos e Métodos de Cálculo sobre a Velocidade Específica Máxima de Crescimento do Microrganismo ( $\mu_{max}$ ).....	80
3.2.3.4 Fundamentos Teóricos e Métodos de Cálculo sobre	



a Velocidade Específicade Produção de Cefalosporina C ( $\mu_p$ ).....	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	83
4.1 Ensaio Preliminares.....	83
4.1.1 Crescimento do <i>Cephalosporium acremonium</i> no Preparo do Inóculo.....	83
4.1.2 Ensaio em Frascos Agitados e em Reator Convencional de Tanque Agitado .....	85
4.2 Otimização do Crescimento do Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> e Produção de Antibiótico Utilizando Planejamento Estatístico .....	87
4.2.1 Estudo do Crescimento do Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> em Meio Específico I.....	87
4.2.1.1 Estimativa dos Efeitos.....	88
4.2.1.2 Ajuste e Análise do Modelo Matemático.....	92
4.2.1.3 Análise da Superfície de Resposta Para o Crescimento Celular ( $\mu_{max}$ ) .....	95
4.2.2 Estudo do Crescimento do Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> em Meio Específico II.....	98
4.2.2.1 Estimativa dos Efeitos das Variáveis Independentes em $\mu_{max}$ .....	99
4.2.2.2 Ajuste e Análise do Modelo Matemático.....	100
4.2.2.3 Análise da Superfície de Resposta para o Crescimento Celular ( $\mu_{max}$ ) .....	103
4.2.3 Estudo do Crescimento do Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> em Meio Específico III.....	106
4.2.4 Estudo do Crescimento do Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> em Meio Específico IV.....	110
4.2.4.1 Ajuste e Análise do Modelo Matemático.....	111

4.2.4.2 Análise da Superfície de Resposta para o Crescimento Celular ( $\mu_{\max}$ ) .....	114
4.2.5 Estudo da Produção de Cefalosporina C pelo Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> em Meio Específico I.....	117
4.2.6 Estudo da Produção de Cefalosporina C pelo Fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> em Meio Específico II.....	120
4.2.6.1 Ajuste e Análise do Modelo Matemático.....	121
4.2.6.2 Análise da Superfície de Resposta para Produção Antibiótico ( $\mu_p$ ) .....	123
4.2.7 Ensaio em Fermentador de Tanque Agitado em Regime Batelada Alimentada para Validação do Modelo Estatístico .....	125
4.3 Redes Neurais.....	128
4.3.1 Base de Dados para Treinamento e Simulação do Modelo.....	128
4.3.2 Arquitetura da Rede Neural .....	130
4.3.3 Análise da Superfície de Resposta obtida pela Rede Neural .....	135
5 CONCLUSÕES .....	141
6 SUGESTÕES.....	143
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	144
Apêndice A.....	155
Apêndice B.....	164
Apêndice C.....	176
Apêndice D .....	181
Apêndice E .....	185
Apêndice F .....	188

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1:	Estrutura química da penicilina N.....	5
Figura 2.2:	Estrutura química da cefalosporina C .....	5
Figura 2.3:	Estrutura química dos intermediários para a produção das penicilinas, 6-APA, e cefalosporinas semi-sintéticas, 7-ACA .....	6
Figura 2.4:	Rota biossintética da formação de cefalosporina C .....	7
Figura 2.5:	Resultados experimentais de um ensaio do processo de produção de cefalosporina C com células livres de <i>C. acremonium</i> C-10, em mesa rotativa a 250 rpm, temperatura de 26 °C (Araujo, 1996) .....	11
Figura 2.6:	Resultados experimentais de um ensaio do processo de produção de cefalosporina C com células livres de <i>C. acremonium</i> C-10, em Fermentador no regime batelada convencional a 250 - 500 rpm, temperatura de 26 °C (Silva, 1998) .....	12
Figura 2.7:	Resultados experimentais da porcentagem molar de CO <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> presentes nos gases de saída de um fermentador operado no regime batelada convencional para produção de cefalosporina C com células livres de <i>C. acremonium</i> C-10 a 250-500 rpm, temperatura de 26 °C (Silva, 1998) .....	12
Figura 2.8:	Resultados experimentais da variação do pH referentes a um ensaio do processo de produção de cefalosporina C com células livres de <i>C. acremonium</i> C-10, em fermentador no regime batelada convencional a 250-500 rpm, temperatura de 26 °C (Silva, 1998) .....	13
Figura 2.9:	Resultados experimentais de biomassa em ensaio com células livres de <i>C. acremonium</i> C-10, em fermentador a 250-500 rpm e temperatura de 26 °C, operando no regime batelada alimentada com três diferentes vazões de meio suplementar contendo sacarose hidrolisada (Silva, 1998) .....	22
Figura 2.10:	Resultados experimentais do processo de produção de cefalosporina C com células livres de <i>C. acremonium</i> C-10, em fermentador a 250-500 rpm e temperatura de 26 °C, operando no regime batelada alimentada com três diferentes vazões de meio suplementar contendo sacarose hidrolisada (Silva, 1998) .....	22
Figura 2.11:	Ajuste do modelo cinético proposto aos dados experimentais do	

	processo de produção de cefalosporina C em frascos agitados no modo batelada com células imobilizadas de <i>C. acremonium</i> ATCC 48272, em suporte gel e alumina a 26 °C (Araujo, 1996) .....	38
Figura 3.1:	Rede Neural de múltiplas camadas ("Feedforward"), com uma camada oculta, onde $x_i$ são as variáveis de entrada, $f(.)$ é a função de ativação, $v_{ij}$ e $w_{ij}$ pesos das conexões dos neurônios entre as camadas e $y_i$ a resposta desejada .....	78
Figura 4.1:	Comportamento do crescimento celular, consumo de glicose, acetato de amônio e fósforo pelo fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272, realizada a 28°C e 250 rpm .....	83
Figura 4.2:	Dados experimentais de concentração celular, cefalosporina C, glicose e sacarose realizada em frascos agitados pelo fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272, a 28°C e 250 rpm .....	85
Figura 4.3:	Dados experimentais do consumo de acetato de amônio, fósforo e a variação do pH na produção de cefalosporina C, realizada em frascos agitados, pelo fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272, a 28°C e 250 rpm .....	86
Figura 4.4:	Dados experimentais de concentração celular, cefalosporina C, glicose, sacarose e acetato de amônio, obtidos em ensaio realizado em fermentador no regime batelada pelo fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272, a 28°C, pH 7,0 e 250-700 rpm .....	87
Figura 4.5:	Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> com as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina .....	94
Figura 4.6:	Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de fósforo e de DL-metionina em 2,016 e 4,5 g/L, respectivamente .....	96
Figura 4.7:	Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de acetato de amônio e de DL-metionina em 5,0 e 1,5 g/L, respectivamente .....	96
Figura 4.8:	Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de acetato de amônio e	

	de fósforo em 5,0 e 1,344 g/L, respectivamente .....	96
Figura 4.9:	Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de glicose e de DL-metionina em 15,0 e 1,5 g/L, respectivamente .....	96
Figura 4.10:	Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de glicose e de fósforo em 5,0 e 1,344g/L, respectivamente .....	96
Figura 4.11:	Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de glicose e de acetato de amônio em 15,0 e 5,0 g/L, respectivamente .....	96
Figura 4.12:	Gráfico de Pareto ilustrando o efeito da concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na velocidade específica máxima de crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	100
Figura 4.13:	Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> com as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina .....	102
Figura 4.14:	Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina em 1,1 e 0,5 g/L respectivamente .....	103
Figura 4.15:	Contornos da equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, fixando a conc. de fósforo e DL-metionina em 1,1 e 0,5 g/L respectivamente .....	103
Figura 4.16:	Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina em 0,82 e 0,5 g/L respectivamente .....	104
Figura 4.17:	Contornos da equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, fixando a conc. de fósforo e DL-metionina em 0,82 e 0,5 g/L respectivamente .....	104
Figura 4.18:	Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina em 0,54 e 0,5 g/L respectivamente .....	104

Figura 4.19:	Contornos da equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio fixando a conc. de fósforo e DL-metionina em 0,54 e 0,5 g/L respectivamente .....	104
Figura 4.20:	Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de fósforo e DL-metionina, mantendo a concentração de glicose e acet. de amônio em 10,0 e 5,0 g/L respectivamente .....	105
Figura 4.21:	Contornos da equação 4.1 em função da conc. de fósforo e DL-metionina, fixando a conc. de glicose e acet. de amônio em 10,0 e 5,0 g/L respectivamente .....	105
Figura 4.22:	Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 com as variáveis concentração de glicose e de acetato de amônio .....	108
Figura 4.23:	Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 2ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> com as variáveis concentração de glicose e acetato de amônio .....	109
Figura 4.24:	Gráfico de probabilidade normal dos erros associados ao modelo polinomial de 2ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> com as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio .....	113
Figura 4.25:	Superfície de resposta de $\mu_{\max}$ , equação 4.5, em função da conc. de glicose e acetato de amônio .....	114
Figura 4.26:	Contornos da superfície de resposta de $\mu_{\max}$ , equação 4.5, em função da concentração de glicose e acetato de amônio .....	115
Figura 4.27:	Gráfico de probabilidade normal dos erros associados ao modelo polinomial de 2ª ordem, que relaciona a velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> com as variáveis concentração de sacarose e DL-metionina .....	122
Figura 4.28:	Superfície de resposta de $\mu_p$ , equação 4.7, em função da conc. de sacarose e DL-metionina .....	123
Figura 4.29:	Contornos da superfície de resposta de $\mu_p$ , equação 4.7, em função	

	da concentração de sacarose e DL-metionina .....	124
Figura 4.30:	Resultados experimentais de concentração e massa celular e de cefalosporina C (CPC), obtidos para um ensaio realizado em fermentador de tanque agitado (Bioflo III) em batelada alimentada utilizando uma vazão de alimentação exponencial para a solução de glicose e acetato de amônio no período inicial de 48 horas e após, alimentação exponencial de solução de sacarose e DL-metionina .....	126
Figura 4.31:	Resultados experimentais obtidos para um ensaio realizado em em fermentador de tanque agitado (Bioflo III) em batelada alimentada utilizando uma vazão de alimentação exponencial para a solução de glicose e acetato de amônio no período inicial de 48 horas e após, alimentação exponencial de solução de sacarose e DL-metionina .....	126
Figura 4.32:	Ajuste dos resultados de massa celular e de cefalosporina C (CPC), a equação 3.30 e 3.32, para determinação da velocidade específica máxima de crescimento e velocidade específica de produção de antibiótico, respectivamente, obtidos de um ensaio batelada alimentada .....	127
Figura 4.33	Figura 4.32: Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.2.....	129
Figura 4.34	Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.9, com os pontos axiais mostrados no Apêndice B.....	129
Figura 4.35	Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.12.....	129
Figura 4.36	Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.15.....	129
Figura 4.37	Domínio global utilizado para o treinamento da rede, para as variáveis concentração de glicose e acetato de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.2, 4.9, 4.12 e 4.15 com os pontos adicionais mostrados na Tabela 4.26.....	130
Figura 4.38	Soma do Quadrado dos Erros (SQE) obtido após 10.000 apresentações da base de dados à rede, para simulação destes e correlação obtida entre os dados simulados e experimentais, relativos	

	aos ensaios nos pontos axiais dos planejamentos.....	131
Figura 4.39	Soma do Quadrado dos Erros (SQE) obtida, por uma rede com 22 neurônios na camada oculta, no treinamento e para a simulação, a correlação entre os dados simulados e experimentais, relativos aos pontos axiais, em função do números de apresentações da base dados à rede.....	132
Figura 4.40	Relação entre velocidade específica máxima de crescimento obtida a partir de dados experimentais ( $\mu_{exp}$ ) e a prevista pela rede neural ( $\mu_{rede}$ ), representada pela reta real, e reta ideal onde $\mu_{rede}=\mu_{exp}$ .....	133
Figura 4.41	Relação entre velocidade específica máxima de crescimento obtida a partir de dados experimentais ( $\mu_{exp}$ ) e a prevista pela rede neural ( $\mu_{rede}$ ), relativos aos pontos axiais .....	134
Figura 4.42	Perfis da velocidade específica máxima de crescimento em função da concentração de glicose, mantendo a de acetato de amônio fixa, obtidos na simulação através da rede neural.....	136
Figura 4.43	Perfis da velocidade específica máxima de crescimento em função da concentração de acetato de amônio, mantendo a de glicose fixa, obtidos na simulação através da rede neural.....	136
Figura 4.44	Superfície de resposta da velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ), obtidas pela simulação, em rede neural, para os vários domínios de concentrações de glicose e de acetato de amônio.....	137
Figura 4.45	Contornos das superfícies de resposta da velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ), obtidos pela simulação, em rede neural, para os vários domínios de concentrações de glicose e de acetato de amônio.....	138
Figura 4.46	Superfícies de resposta de velocidade específica de crescimento celular, obtidos pela simulação, em rede neural, em função das concentrações de glicose e de acetato de amônio, numa ampla faixa, para duas rotações diferentes, (A) e (B).....	139
Figura 4.47	Contorno da velocidade específica máxima de crescimento no espaço das variáveis concentrações de glicose e de acetato de amônio obtida pela simulação em rede neural.....	140



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1:	Resultados dos ensaios realizados com diversas combinações de glicose (G), frutose (F) e sacarose (S) na produção de cefalosporina C (CPC) em frascos agitados por linhagens de <i>C. acremonium</i> ATCC48272, após 72 horas de processo (Araujo <i>et al.</i> , 1994).....	28
Tabela 3.1:	Composição do meio de Cultura empregado para preservação do <i>C. acremonium</i> .....	52
Tabela 3.2:	Composição do meio de Cultura empregado para preparo do germinado e inóculo do fungo <i>C. acremonium</i> .....	52
Tabela 3.3:	Composição do meio de cultura empregado nos experimentos com <i>C. acremonium</i> em frascos agitados e fermentador de tanque agitado.....	53
Tabela 3.4:	Composição do meio de cultura empregado para a fase inicial dos experimentos para acompanhamento da produção de antibiótico.....	54
Tabela 3.5:	Composição do meio de cultura empregado no experimento de fermentação em regime batelada alimentada.....	55
Tabela 3.6:	Composição do meio de cultura suplementar empregado no experimento de fermentação em regime batelada alimentada .....	55
Tabela 3.7:	Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados. $n_i$ = número de repetições no nível $i$ ; $m$ = número de níveis distintos; $n = \sum n_i$ = número total de observações; $p$ = número de parâmetros do modelo (Barros Neto, 1996).....	67
Tabela 3.8:	Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo <i>Cephalosporium. acremonium</i> ATCC 48272 ....	69
Tabela 3.9:	Matriz Planejamento Fatorial Fracionário $2_{IV}^{6-2}$ realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	70
Tabela 3.10:	Relações entre os contrastes da fração $2_{IV}^{6-2}$ .....	71

Tabela 3.11:	Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272 .....	71
Tabela 3.12:	Matriz Planejamento fatorial completo $2^4$ realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, na velocidade específica máxima de crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	72
Tabela 3.13:	Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272 .....	73
Tabela 3.14:	Matriz Planejamento composto central realizado para estudo influência das variáveis concentração de glicose = G e de acetato de amônio = N do crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 ...	74
Tabela 3.15:	Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272 .....	74
Tabela 3.16:	Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências na produção de cefalosporina C pelo fungo <i>Cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272 .....	75
Tabela 3.17:	Matriz Planejamento fatorial composto central realizado para estudo influência das variáveis concentração de sacarose = S e de DL-metionina = Met na produção de cefalosporina C pelo fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	76
Tabela 3.18:	Parâmetros cinéticos, estimados por vários autores na literatura .....	81
Tabela 4.1:	Valores de concentração celular, glicose, acetato de amônio e fósforo; média e respectivos intervalos de confiança do crescimento do inóculo pelo fungo <i>cephalosporium acremonium</i> ATCC 48272, realizada a 28°C e 250 rpm, por um período de 24 horas .....	84
Tabela 4.2:	Planejamento Fatorial Fracionário $2_{IV}^{6-2}$ realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	88
Tabela 4.3:	Contrastes estimados para a concentração de glicose = G, acetato de	

	amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na variável resposta $\mu_{\max}$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial fracionário $2_{IV}^{6-2}$ .....	89
Tabela 4.4:	Contrastes estimados para a concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na variável resposta $\mu_{\max}$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial fracionário $2_{IV}^{6-2}$ .....	90
Tabela 4.5:	Efeitos principais e de interações entre fatores para a concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na variável resposta $\mu_{\max}$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo $2^4+3$ .....	92
Tabela 4.6:	Parâmetros do modelo linear considerando a influência dos fatores concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na variável resposta $\mu_{\max}$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo $2^4+3$ .....	93
Tabela 4.7:	Análise da variância para um ajuste polinomial de 1ª ordem com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6 estimados a partir dos dados da Tabela 4.5 .....	94
Tabela 4.8:	Valores de $\mu_{\max\text{PRED}}$ (preditos pelo modelo) e $\mu_{\max\text{EXP}}$ determinados para cada ensaio, com respectivos valores de concentração de nutrientes, mantendo-se a concentração de ácido oléico, DL-metionina e solução de sais em, 0,5 g/L, 0,5g/L 20,0mL/L, respectivamente .....	97
Tabela 4.9:	Planejamento Fatorial Completo realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N,	

	fósforo = P e DL-metionina = Met, na velocidade específica máxima de crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> .....	99
Tabela 4.10:	Parâmetros do modelo linear considerando a influência dos fatores concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na variável resposta $\mu_{\max}$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo $2^4+4$ .....	101
Tabela 4.11:	Análise da variância para o ajuste da equação 4.1 a partir dos dados experimentais da Tabela 4.9 .....	102
Tabela 4.12:	Resultados de um Planejamento Fatorial Composto Central realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na velocidade específica máxima de crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	107
Tabela 4.13:	Análise da variância para ajuste da equação 4.3 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.12 .....	108
Tabela 4.14:	Análise da variância para ajuste da equação 4.4 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.12 .....	109
Tabela 4.15:	Resultados obtidos de um Planejamento Fatorial Composto Central realizado para o estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na velocidade específica máxima de crescimento do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	111
Tabela 4.16:	Parâmetros do modelo quadrático, considerando a influência dos fatores concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na variável resposta $\mu_{\max}$ do fungo <i>C. acremonium</i> com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial composto central $2^2+4+3$ .....	112
Tabela 4.17:	Análise da variância para ajuste da equação 4.5 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.15 .....	113
Tabela 4.18:	Valores otimizados das variáveis concentrações de glicose e acetato de amônio na velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{\max}$ a partir da equação 4.5 .....	116

Tabela 4.19:	Planejamento Fatorial completo realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N na velocidade específica de produção de antibiótico cefalosporina C (CPC), pelo fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	117
Tabela 4.20:	Parâmetros do modelo de 1ª ordem, que considera a influência dos fatores concentração de sacarose = S e DL-metionina = Met na variável resposta $\mu_p$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo $2^2+2$ .....	118
Tabela 4.21:	Análise da variância para ajuste da equação 4.6 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.20 .....	119
Tabela 4.22:	Planejamento Fatorial composto central realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N na velocidade específica de produção de antibiótico cefalosporina C (CPC), pelo fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272 .....	120
Tabela 4.23:	Parâmetros do modelo quadrático, considerando a influência dos fatores concentração de sacarose = S e DL-metionina = Met na variável resposta $\mu_p$ do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial composto central $2^2+4(\text{duplicatas})+3(\text{ponto central})$ .....	121
Tabela 4.24:	Análise da variância para ajuste da equação 4.3 com os parâmetros ajustados com os dados apresentados na tabela 4.22 .....	122
Tabela 4.25:	Valores otimizados das variáveis concentrações de sacarose e DL-metionina na velocidade específica de produção de cefalosporina C, $\mu_p$ a partir da equação 4.7 .....	124
Tabela 4.26:	Condições experimentais utilizadas no treinamento da rede para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo <i>C. acremonium</i> ATCC 48272.....	129
Tabela 4.27:	Análise de variância para o modelo de redes neurais, utilizado na simulação do conjunto de dados utilizados no treinamento da rede.....	133
Tabela 4.28:	Análise de variância para o modelo de redes neurais, utilizado na	

	simulação do conjunto de dados referentes aos ensaios nos pontos axiais.....	134
Tabela 4.29:	Valores da velocidade específica máxima de crescimento, simulados na rede neural ( $\mu_{rede}$ ), pelo modelo estatístico ( $\mu_{est}$ ) e experimental ( $\mu_{exp}$ ), em função da concentração de glicose (G) e de acetato de amônio (N).....	140

## RESUMO

Neste trabalho verificou-se o efeito das variáveis concentração de glicose, acetato de amônio, DL-metionina, fósforo, ácido oléico e solução de sais na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), assim como sacarose e DL-metionina na velocidade específica de produção do antibiótico cefalosporina C ( $\mu_p$ ), pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, usando como ferramenta estatística a técnica de planejamento experimental e a análise por superfície de resposta. Na otimização destas variáveis, os ensaios foram conduzidos de acordo com os planejamentos fatoriais, fracionário, completo e composto central, em fermentações em incubador rotatório, variando as concentrações iniciais dos nutrientes do meio, a 28 °C, pH 7,0±0,1, com agitação de 250 rpm. Para ambos os casos, um modelo ajustado de 2ª ordem foi o que melhor correlacionou as variáveis. Os resultados da otimização mostraram que uma velocidade máxima de crescimento de 0,22 h<sup>-1</sup> pode ser atingida para uma concentração de glicose e acetato de amônio em torno de 4,20 e 2,5 g/L, respectivamente, e uma velocidade específica de produção de cefalosporina C de 1,12 mg<sub>CPC</sub>/g<sub>cel</sub>.h para uma concentração de sacarose de 10,5 g/L e DL-metionina 2,5 g/L com uma massa celular média, para produção, de 14,0 g/L. O planejamento estatístico mostrou-se uma ferramenta bastante eficiente para avaliação do bioprocesso, pois com a realização dos ensaios propostos, foi possível obter valores de  $\mu_{\max}$  e  $\mu_p$  superiores aos encontrados na literatura.

Desenvolveu-se um modelo baseado na técnica de redes neurais para a simulação de todo o domínio das concentrações de glicose, acetato de amônio, DL-metionina, fósforo, ácido oléico e solução de sais na velocidade específica máxima de crescimento. A rede que melhor representou os valores experimentais foi uma do tipo "feedforward", com três camadas e 22 neurônios na camada oculta, treinada com o algoritmo de retropropagação, por um conjunto de resultados obtidos através de ensaios do planejamento estatístico. As superfícies obtidas pela simulação em amplo domínio de concentrações de glicose e acetato de amônio, mostraram que o crescimento do microrganismo segue um modelo cinético de inibição por estes dois nutrientes, prevendo altos valores de  $\mu_{\max}$  para concentrações de glicose e acetato de amônio, comparáveis com os obtidos pelo modelo estatístico.

## ABSTRACT

The scope of the current work was to investigate the effect of glucose, ammonium acetate, DL-methionine, phosphorus, oleic acid and salt solution on the maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ), as well as the effect of sucrose and DL-methionine on the specific cephalosporin C production rate ( $\mu_p$ ), by *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, using factorial design and response surface techniques. The initial medium of fermentation was used according to factorial design and the experiments were carried out in shaker flasks at controlled temperature at 28 °C, initial pH of 7,0±0,1 and agitation speed 250 rpm. For both specific rate the variables involved were correlated by a fitted second order model. The canonic and surface response analysis showed a maximum specific growth rate of 0.22 h<sup>-1</sup> obtained when glucose and ammonium acetate concentration, were 4.2 , 2.5 g/L, respectively, and specific cephalosporin C production rate of 1.12 mg<sub>CPC</sub>/g<sub>cel</sub>.h when sucrose and DL-methionine concentration, were 10.5, 2.5 g/L, respectively, for a cellular concentration of 14.0 g/L. The experimental design showed to be very efficient in evaluating the bioprocess, as long as high values of  $\mu_{\max}$  e  $\mu_p$  were obtained in comparison with literature data.

The feedforward neural network (FNN) was employed for modelling and simulation the effect of glucose, ammonium acetate, DL-methionine, phosphorus, oleic acid and salt solution on the maximum specific growth rate. The network topologies were used with 6 neurons in the input layer, 22 hidden layer and 1 output layer. The data base for training the FNN was obtained from results of the factorial designs processed with a backpropagation learning algorithm. The surfaces response obtained by simulations for all range of glucose and ammonium acetate concentrations showed inhibitory effect for the two substrates on the maximum specific growth rate. The results of the simulation are in good agreement with the experimental and statistical model results.



## 1 INTRODUÇÃO

Antibióticos são metabólitos secundários sintetizados através de bioprocessos envolvendo microrganismos. Foi na década de 50 que os antibióticos começaram a ser amplamente utilizados, passando então a apresentar uma significativa atividade comercial. Produtos como as penicilinas, tetraciclinas, eritromicinas, cefalosporinas e, mais recentemente, o ácido clavulânico passaram a desempenhar um papel vital no tratamento de infecções bacterianas na medicina moderna. Assim, a fermentação surge como uma meta importante no desenvolvimento de tecnologias de base biológica, através de pesquisas em melhoramento genético de microrganismos, uso de substratos alternativos, otimização do cultivo, novas concepções, automatização da operação e do controle do processo, tecnologia enzimática, recuperação dos produtos por técnicas mais eficientes e menos onerosas, entre outras.

A indústria farmacêutica se desenvolveu ao longo destes anos, principalmente na fabricação de antibióticos. Entre estes  $\beta$ -lactâmicos, as penicilinas e as cefalosporinas são os mais importantes clinicamente. As cefalosporinas industriais são derivadas principalmente da cefalosporina C, que são produzidas por mutantes altamente produtivos do fungo estritamente aeróbio *Cephalosporium acremonium*. A cefalosporina C apresenta baixa atividade antibiótica, mas se torna imprescindível na fabricação de cefalosporinas semi-sintéticas, que são de grande utilização clínica (Bayer *et al.*, 1989).

Na indústria, a cefalosporina C é usada atualmente como matéria prima para a produção das chamadas cefalosporinas semi-sintéticas, as quais representam um mercado mundial de 9 bilhões de dólares. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos representam aproximadamente 60% dos 23 bilhões de dólares do mercado mundial de antibióticos (Demain e Elander, 1999). Segundo Palma *et al.* (2001), uma lista dos 20 produtos farmacêuticos mais vendidos nos últimos anos, mostra que o CECLOR, uma cefalosporina produzida pela Ely Lilly, tem vendas anuais da ordem de US\$ 837 milhões e o ROCEPHIN, outra cefalosporina, produzida pela Roche, possui vendas anuais da ordem de US\$ 665 milhões.

Desse modo, tornam-se relevantes os estudos que apontem para o desenvolvimento de tecnologias nacionais de produção de cefalosporina C, principalmente aqueles que incluam avanços tecnológicos e redução de custos, bem como pesquisas que explorem e otimizem os bioprocessos de produção desse antibiótico. A produção industrial de

cefalosporina C, assim como a de outros metabólitos secundários sintetizados por fungos filamentosos, normalmente é realizada através de culturas submersas em reatores convencionais de tanque agitado e aerado. Processos em batelada alimentada têm sido amplamente utilizados com o objetivo de otimizar a produção de metabólitos secundários minimizando os efeitos repressivos comumente encontrados nestes processos (Matsumura *et al.*, 1980; Silva *et al.*, 1998).

A produção de cefalosporina C é um cultivo caro, em que a matéria prima, especialmente a fonte de carbono, representa um componente de elevado custo no processo. As principais fontes de carbono utilizados pelas células para a produção de cefalosporina C são a glicose e a sacarose, e quando ambas estão presentes no meio provocam o fenômeno de diauxia, que se caracteriza pelo consumo desses carboidratos em duas etapas. Na primeira, a glicose é metabolizada priorizando o crescimento celular. Na segunda, após exaustão da glicose, a sacarose passa a ser consumida gerando como produto principal do seu metabolismo o antibiótico cefalosporina C (Calam, 1984).

Um meio de cultura otimamente balanceado é necessário para se alcançar boas produtividades de antibiótico, juntamente com valores ótimos de temperatura, pH, agitação e aeração. Portanto faz-se necessário correlacionar quantitativamente estes parâmetros, nesse tipo de bioprocessos, onde várias das múltiplas variáveis envolvidas são interdependentes. Um recurso utilizado quando vários parâmetros estão envolvidos, é fazer um planejamento fatorial que permita tratar grande número de variáveis com um número mínimo de ensaios. A metodologia do planejamento fatorial associada à análise de superfície de resposta é um ferramenta fundamentada na teoria estatística, fornecendo informações mais seguras do processo, minimizando o empirismo que envolvem técnicas de tentativa e erro (Box *et al.*, 1978).

Outra técnica que vem se tornando uma ferramenta importante na engenharia química é a computação neural. A razão para seu crescimento nesta área é a perspectiva de que as redes neurais resolvam problemas difíceis de serem resolvidos com a tecnologia disponível da computação digital (Lau, 1990). A principal característica de uma rede é sua capacidade de reproduzir com fidelidade o comportamento de sistemas não-lineares, demandando tempos de processamento muito reduzidos. Além disso, dispensa a elaboração de modelos matemáticos baseados em equações fundamentais e constitutivas as quais, muitas vezes, pressupõem a adoção de grande número de hipóteses simplificadoras para se

tornarem tratáveis, principalmente em se tratando de bioprocessos de produção de um metabólito secundário (Baughman e Liu, 1995).

Segundo Bulsari (1995), com as diversas estruturas neurais e algoritmos de aprendizagem propostos pôr vários pesquisadores, redes neurais possuem certas características que beneficiam o seu uso em sistemas biológicos. Os atributos de uma rede neural, tais como aprender através de exemplos, generalizações redundantes e tolerância a falhas, proporcionam fortes incentivos para a escolha de redes neurais como uma escolha apropriada para aproximação na modelagem de sistemas biológicos.

Desde o ponto de vista de engenharia de bioprocessos um meio de cultura ideal além de ser estequiometricamente balanceado para evitar desperdícios ou insuficiências de substratos deve favorecer altas taxas de crescimento de células e de biossíntese do produto. Conseguir definir um meio de cultura com essas características é uma tarefa complexa já que a utilização de um meio com composição estequiometricamente balanceada não implica na obtenção de taxas de crescimento celular e/ou de biossíntese de produto otimizadas. A elucidação das características cinéticas do crescimento e da formação do produto são essenciais para a definição, tanto da composição do meio, como da estratégia de adição dos nutrientes ao biorreator durante o andamento do bioprocessos. Assim, neste trabalho utilizou-se este conceito na otimização da composição do meio de cultura para produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*..

Os objetivos deste trabalho foram:

**1** - Identificar os componentes do meio de cultivo mais importantes, concentração de glicose, acetato de amônio, DL-metionina, fósforo, ácido oléico e solução de sais na fase de crescimento celular, sacarose e DL-metionina na fase de produção de cefalosporina C pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, bem como correlacioná-los com a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e a velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ), objetivando altos rendimentos na obtenção de biomassa e produção de antibiótico mediante o uso da ferramenta estatística de planejamento fatorial e a análise por superfície de resposta:

**2** - Utilizar a técnica de redes neurais para correlacionar as concentrações dos componentes do meio de cultivo mais importantes para a fase de crescimento celular do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 com a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), objetivando a obtenção de um modelo cinético representativo com capacidade preditiva para um amplo domínio de composições do meio de cultura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Cefalosporina: Histórico, Estrutura Química e Biossíntese

Alguns pesquisadores (Cooney, 1979; Swartz, 1985) adotam o ano de 1929, quando Alexander Fleming relatou a descoberta da penicilina, como sendo o início de uma série de eventos que desencadearam o desenvolvimento dos processos biotecnológicos.

O início da produção industrial das penicilinas foi em 1941, nos Estados Unidos, empregando meio sólido onde crescia o fungo *Penicillium notatum*, atingindo uma produção equivalente a 0,006-0,012 mg de benzil penicilina (Swartz, 1985). Em 1942, Monod estabeleceu uma relação entre concentração de substrato limitante e parâmetros cinéticos dos processos bioquímicos, utilizando um sistema envolvendo bactérias. Nos anos 50 iniciou-se nos Estados Unidos os estudos empregando culturas submersas em meio líquido e trabalho como o de Soltero e Johnson (1953) foi de grande importância para que no futuro as operações em batelada alimentada fossem amplamente utilizadas nos processos onde ocorre inibição pelo substrato.

A Cefalosporina foi descoberta em 1945 na Sardenia, quando Giuseppe Brotzu examinando a flora microbiana da água do mar próxima a um despejo de águas residuárias em Cagliari, isolou o fungo *Cephalosporium acremonium*. Brotzu observou que este microrganismo semeado em meio sólido com ágar segregava um material que inibia uma variedade de bactérias Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>. O isolamento de uma linhagem resultou na produção significativa de material antibiótico quando cultivado em meio contendo glicose e amido. Brotzu realizou uma série de estudos com o composto secretado pelo fungo, salientando a importância em prosseguir os estudos. Desta forma, uma cultura deste microrganismo foi enviada a Oxford em 1948. Os primeiros estudos resultaram na descoberta da cefalosporina P (1949), extraída dos fluidos da cultura por meio de solventes orgânicos. Esse composto apresentava atividade somente contra bactérias Gram<sup>+</sup>, não sendo, portanto, o antibiótico descrito por Brotzu. No mesmo ano foi descoberto um segundo antibiótico, a Cefalosporina, N que agia contra bactéria Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup> e que permanecia na fase aquosa do fluido da cultura após a extração da Cefalosporina P, provavelmente os descritos pelas observações de Brotzu (Abraham e Loder, 1972).

A cefalosporina N foi renomeada penicilina N, após a descoberta de que sua molécula era composta de um anel  $\beta$ -lactâmico fundido a um anel tiazolidina,

característico das penicilinas. Durante o estudo da estrutura química da penicilina N, Abraham e Newton (1954, *apud* Abraham e Loder, 1972), descobriram um segundo antibiótico hidrofílico entre os metabólitos produzidos pelo microrganismo enviado por Brotzu. Esta substância foi denominada cefalosporina C e era obtida na forma de cristais de sal sódico após sua separação do caldo da cultura. Assim, em 1953 iniciava-se um novo capítulo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com a descoberta da cefalosporina C.

A Figura 2.1 ilustra a estrutura química da penicilina N, onde observa o sistema bicíclico de anéis característicos da penicilina (grupo penam) (Abraham e Loder, 1972).

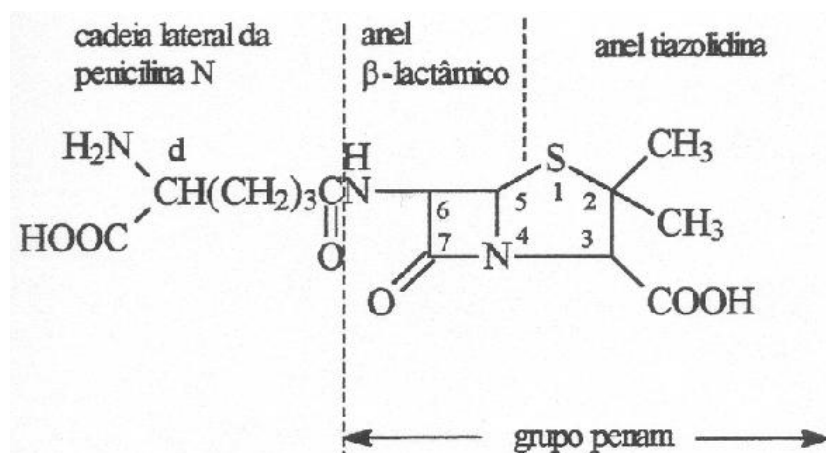


Figura 2.1: Estrutura química da penicilina N.

A estrutura química da molécula de cefalosporina C é representada na Figura 2.2, onde se observa que este composto difere da penicilina N pela presença de um anel dihidrotiazina no lugar do anel tiazolidina e pela presença de um grupo acetoximetila ligado ao C-3 do sistema de anéis da cefalosporinas. Este conjunto de anéis é denominado grupo cefem (Abraham e Loder, 1972).

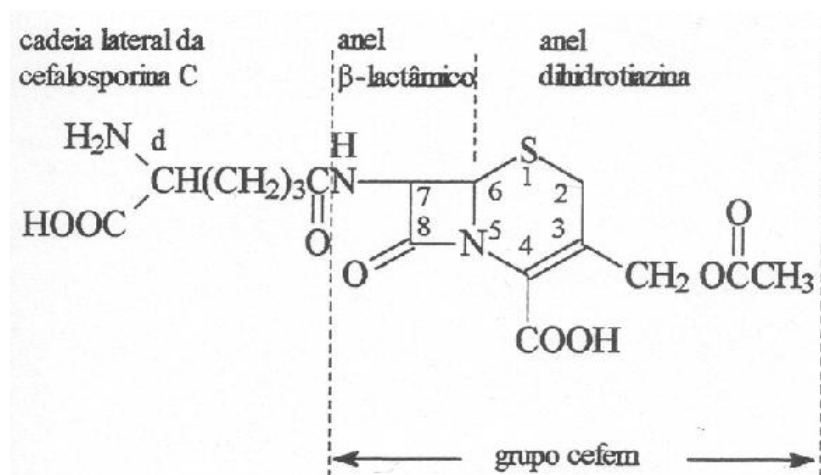


Figura 2.2: Estrutura química da cefalosporina C.

O isolamento e caracterização do núcleo da penicilina, o ácido 6-aminopenicilâmico (6-APA), no final dos anos cinquenta, abriu caminho para a produção das chamadas penicilinas semi-sintéticas (Vandamme, 1984). Seguindo a mesma linha, anos mais tarde produziu-se o ácido cefalosporânico (7-ACA) a partir da cefalosporina, sendo este, intermediário chave para a produção das cefalosporinas semi-sintéticas (Savidge, 1984). A Figura 2.3 apresenta a estrutura química do 6-APA e 7-ACA.

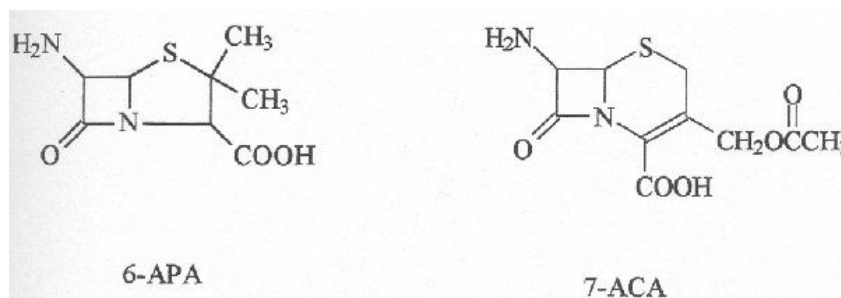


Figura 2.3: Estrutura química dos intermediários para a produção das penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, 6-APA e 7-ACA.

Um problema que tem sido enfrentado é o do aumento da resistência das bactérias aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Pesquisas têm sido feitas no sentido de aumentar a resistência das cefalosporinas semi-sintéticas às  $\beta$ -lactamases. As cefalosporinas semi-sintéticas são classificadas como de primeira, segunda e terceira geração dependendo do seu espectro de ação e sua resistência à degradação enzimática. A quarta geração inclui moléculas com um espectro similar à da terceira, mas com um notável aumento da estabilidade à hidrólise por  $\beta$ -lactamases (Marzo e Bo, 1998; Demain e Elander, 1999).

A rota biossintética de produção de cefalosporina C mostrada na Figura 2.4, está diretamente relacionada a biossíntese de três aminoácidos: ácido  $\alpha$ -aminoadípico ( $\alpha$ -AAA), valina e cisteína, e atualmente encontra-se bem caracterizada química e cineticamente (Weil *et al.*, 1995). Ela começa com a reação do ácido L- $\alpha$ -aminoadípico, o qual reage com L-cisteína para fazer o  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína que são catalisados pela enzima aminoadipil-cisteinil-valina sintetase (ACV sintetase ou ACVS). ACVS também catalisa a adição de L-valina à  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína para formar  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (LLD-ACV).

Sabe-se que este tripeptídeo é o precursor obrigatório da cefalosporina e penicilina (Vining *et al.*, 1990). O LLD-ACV sofre uma ciclização oxidativa do anel pela enzima isopenicilina N sintetase (IPNS), a ciclase, para formar isopenicilina N. Esta última é

epimerizada à penicilina por meio da enzima isopenicilina epimerase. A enzima desacetoxicefalosporina C sintetase (DAOCS), a expandase, converte penicilina N para deacetoxicefalosporina C (DAOC) via uma expansão oxidativa do anel. Esta mesma enzima também realiza a hidroxilação de DAOC para deacetilcefalosporina C (DAC) e esta atividade é chamada de acetilhidrolase (DAOCH). Finalmente DAC reage com acetil-coenzima A para formar cefalosporina C (CPC) por meio da enzima deacetilcefalosporina C acetiltransferase. Outra enzima, uma acetilhidrolase, está presente no *C. acremonium* e pode converter cefalosporina C de volta a DAC, um acontecimento normalmente indesejado.

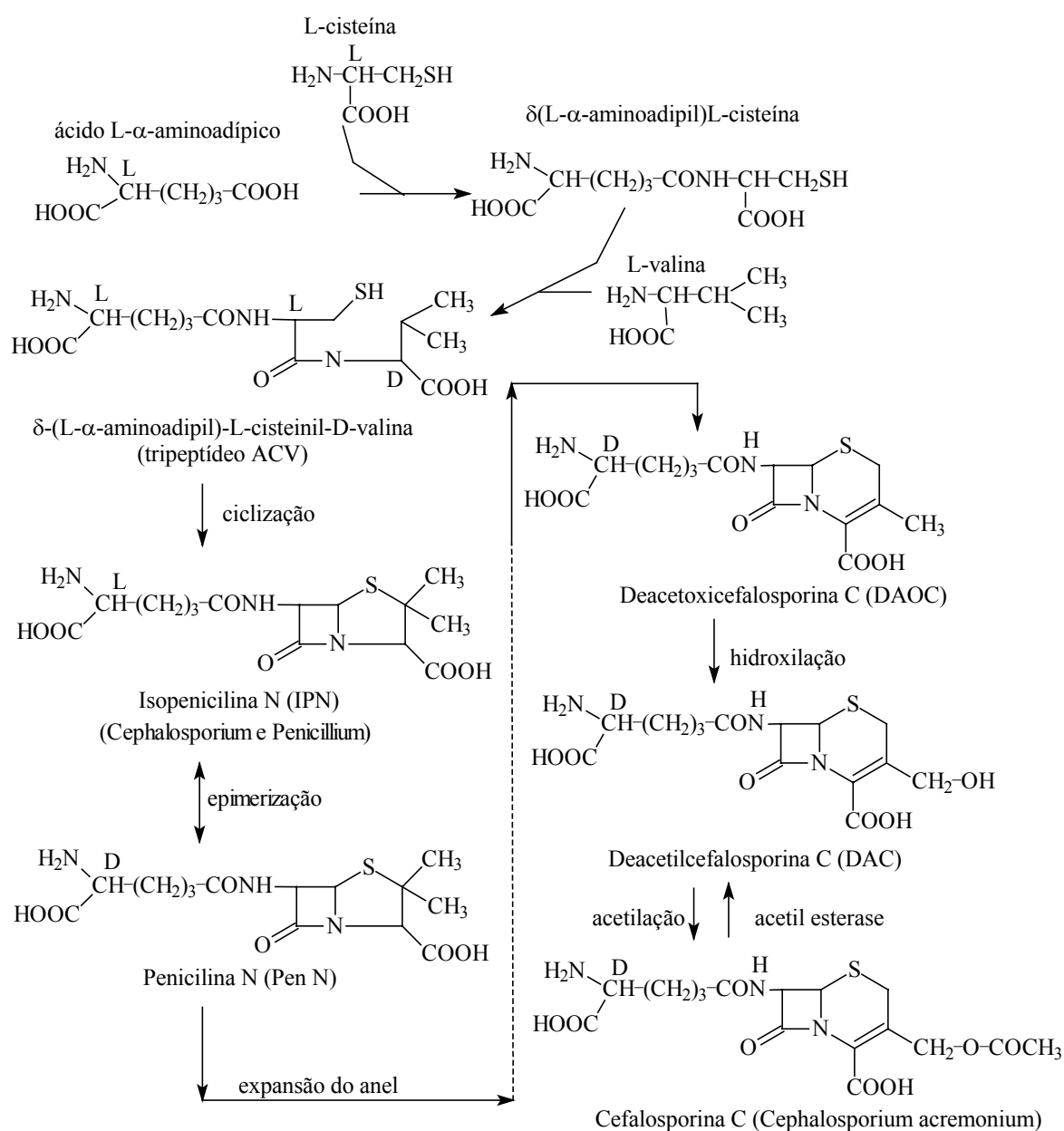


Figura 2.4: Rota biossintética da formação de cefalosporina C (Smith, 1985; Weil *et al.*, 1995).

Como já mencionado, a cefalosporina C é produzida principalmente por linhagens mutantes de *Cephalosporium acremonium* com altas capacidades produtivas. As linhagens da espécie *Cephalosporium* sp do gênero *Acremonium* reproduzem-se principalmente por esporulação assexuada, através da qual são formados pequenos conídios. Estes conídios são normalmente unicelulares, elipsoidais ou cilíndricos com extremidades arredondadas, ocasionalmente, curvos ou quase esféricos com dimensões em torno de 3-7  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1-2  $\mu\text{m}$  de largura e mantidos em grupos, na extremidade da célula conidiogênica, adjacente ao seu septo basal. As células conidiogênicas são longas e estreitas, normalmente não septadas, variando de comprimento de acordo com a linhagem. Assim como ocorre com outros fungos superiores, a estrutura vegetativa desta espécie apresenta-se sob a forma micelial, compostas por longos e finos filamentos denominados hifas (Moss, 1987).

O *Cephalosporium acremonium* cresce em uma ampla faixa de temperatura (20 - 35 °C) e pH (4,0 - 9,0). Contudo, uma significativa esporulação ocorre dentro de uma faixa de pH de 6,0 a 7,0 (Nash *et al.*, 1985). A morfologia deste microrganismo, durante o bioprocessamento, depende das condições em que este é conduzido e da linhagem do microrganismo utilizado e varia entre as formas pelletizada e dispersa. A forma dispersa é a mais comum nas fermentações industriais de antibióticos e consiste de hifas ramificadas ou não (livremente dispersa) e agregadas (Tucker e Thomas.,1992).

O *Cephalosporium acremonium* é heterotrófico e aeróbio. No bioprocessamento de produção de cefalosporina C por este fungo são usados meios sintéticos e complexos como água de maceração de milho, extrato de carne, sacarose, glicose e acetato de amônio. As fermentações são conduzidas em pH 7,0, temperaturas de 25 a 28 °C e concentração de oxigênio dissolvido em torno de 30% do valor da saturação (Calam, 1987).

## **2.2 Metabolismo Primário e Secundário**

No processo de fermentação de cefalosporina existem duas fases distintas de crescimento: a trofofase, quando altas taxas de crescimento resultam num rápido desenvolvimento de biomassa e a idiofase, em que aparece o produto no meio de cultura com nenhum ou pouco aumento na quantidade de biomassa (Demain, 1971).

O processo de crescimento é extremamente complexo. Ele envolve: a formação de proteína, carboidratos e outras substâncias que compõem a célula; um mecanismo para a



extensão de paredes e hifas por meio do qual esses componentes são inseridos no lugar; o estabelecimento de um sistema enzimático ordenado dentro das células; o estabelecimento de um mecanismo formador de energia para suprir as operações químicas envolvidas com esses processos; o desenvolvimento de organelas celulares tanto quanto ramificações e produção de esporos e a formação de metabólitos secundários. A energia suprida na forma de ATP é requerida para o crescimento celular e manutenção, é também usada para a biossíntese dos produtos metabólitos secundários. Os principais responsáveis pela biossíntese são as próprias células, que contém todas as enzimas requeridas para esse propósito. Então, para altos rendimentos, uma boa concentração de células trabalhando eficientemente é necessária (Calam, 1984).

Podemos considerar como metabólitos secundários, aqueles compostos cuja formação não estão diretamente integradas aos processos biossintéticos básicos de formação da biomassa. Aparentemente não tem importância para o desenvolvimento na fase proliferativa dos microrganismos. O papel do metabolismo secundário parece ser uma parte essencial do metabolismo celular, freqüentemente junto com um mecanismo que capacita a célula a resistir a uma auto-intoxicação (Cunha, 1975).

Apesar dos metabólitos secundários diferirem dos primários tanto na estrutura quanto na atividade metabólica, seus processos biossintéticos não são mutuamente exclusivos, interagindo de maneira complexa através da competição por intermediários metabólicos chaves. Embora se tenha conhecimento de uma grande quantidade de metabólitos secundários, geralmente estes são sintetizados a partir de um pequeno número de precursores chaves através de etapas que compreendem relativamente poucas reações desviadas do metabolismo primário em um número limitado de pontos da rota biossintética (Demain *et al.*, 1983).

A dissociação existente entre a fase de crescimento e a fase de produção é devido ao retardamento dos mecanismos de produção de metabólitos secundários durante a trofofase. Nos estágios iniciais, muitos organismos são sensíveis ao seu próprio antibiótico, no entanto, após a fase de rápido crescimento, tornam-se fisiologicamente resistentes ao antibiótico externo (Drew e Demain, 1977). Os mesmos autores concluíram que o atraso na formação do produto secundário é um dos mais importantes mecanismos, através do qual os microrganismos produtores de antibióticos protegem-se dos efeitos danosos do mesmo.

Demain *et al.* (1963), por meio de vários experimentos elaboraram um meio sintético, do qual obteve-se uma produção de aproximadamente de 500 µg de cefalosporina

por mL de caldo. O meio de cultura continha 3,6% de sacarose e 2,7% de glicose como fontes de carbono, DL-metionina como fonte de enxofre, sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, além de outros componentes e sais. Esta relação entre os açúcares mostrou ser muito eficiente na promoção da síntese de cefalosporina C.

Matsumura *et al.* (1978), registraram o comportamento característico do consumo dos açúcares glicose e sacarose, pelo *Cephalosporium acremonium* M8650 em um biorreator agitado de 30 L em batelada. Os resultados mostraram que primeiramente ocorreu o rápido consumo da glicose ao mesmo tempo em que o crescimento celular era intenso. Após exaustão da glicose iniciou-se a utilização da sacarose e a biossíntese de Cefalosporina C. Pequeno incremento na concentração celular foi observado durante a produção. Os autores ainda verificaram mudanças características na morfologia do microrganismo, observaram microscopicamente hifas finas na trofofase e hifas entumescidas e altamente fragmentadas durante a idiofase que passavam a artrosporos ao final da fermentação.

Araujo (1996), estudou o processo de produção de cefalosporina C na forma livre em frascos agitados em mesa rotativa a 250 rpm, temperatura de 26 °C e pH inicial de 7,0 utilizando células de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. A Figura 2.5 ilustra os resultados experimentais do processo em meio contendo glicose e sacarose. Pode-se observar o comportamento diáuxico através do qual a glicose é preferencialmente consumida à sacarose, e o bom rendimento celular no açúcar mais facilmente metabolizável. O autor observou diferentes formas celulares no decorrer do processo; hifas finas, fragmentos de hifas entumescidas e artrosporos para amostras recolhidas em 24, 96 e 144 horas de processo em meio de produção, respectivamente.

Silva (1998), realizou experimentos em biorreator no regime batelada convencional por um período de 144 horas com 4,5 litros de meio de fermentação, tendo como fontes de carbono a glicose 27 g/L e a sacarose 36 g/L. O fermentador foi inoculado com 300 mL de inóculo e controlou-se o oxigênio dissolvido em 27% da saturação através da variação automática da velocidade de agitação entre 250 e 500 rpm, temperatura de 26 °C e uma vazão de ar mantida em 3 L/min. A Figura 2.6 ilustra os resultados obtidos pelo autor, evidenciando o fenômeno da diauxia, com o consumo de toda a glicose, com acelerada formação de biomassa, até aproximadamente 47 horas e, em seguida, pela lenta assimilação da sacarose e a formação do antibiótico, com manutenção ou pequeno incremento na biomassa. Na Figura 2.7 pode-se observar a grande demanda de oxigênio e a

crecente produção de dióxido de carbono durante a fase de formação de biomassa e consumo de glicose. No início da assimilação da sacarose ocorreu uma inversão, caracterizada por queda na formação de  $\text{CO}_2$  e no consumo de  $\text{O}_2$ . A Figura 2.8 mostra a variação do pH na qual observa-se uma diminuição no valor deste durante a assimilação da glicose para o crescimento celular, seguido de um aumento a partir do início do metabolismo da sacarose e estabilização da biomassa.

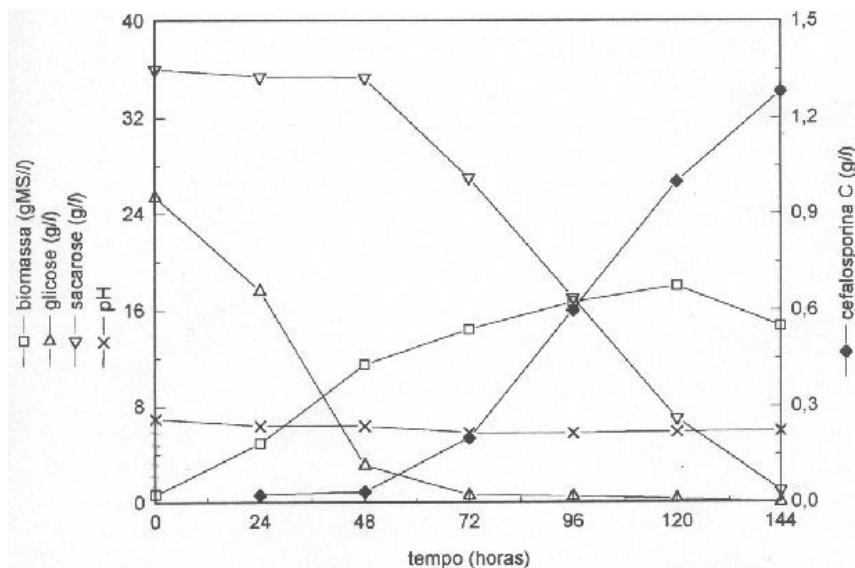


Figura 2.5: Resultados experimentais de um ensaio do processo de produção de cefalosporina C com células livres de *C. acremonium* C-10, em mesa rotativa a 250 rpm, temperatura de 26 °C (Araujo, 1996).

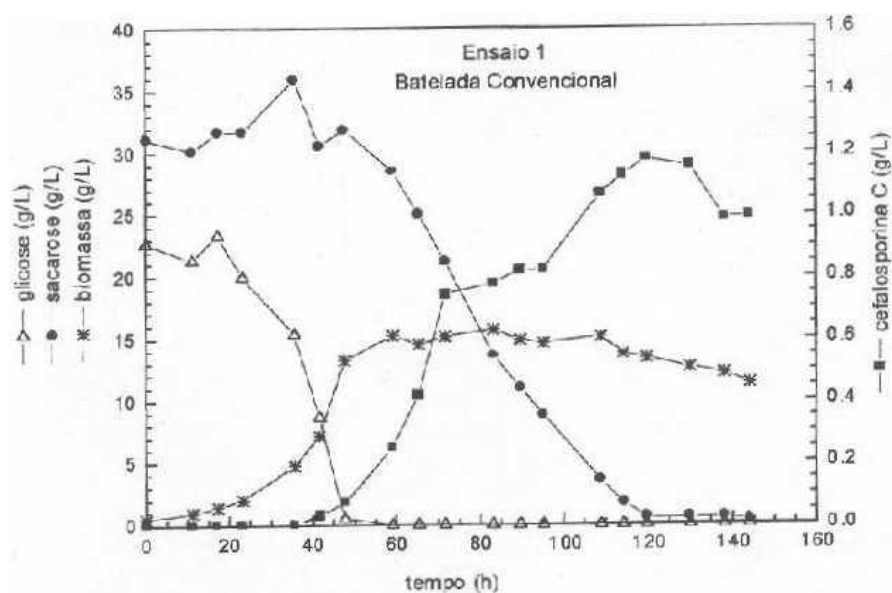


Figura 2.6: Resultados experimentais de um ensaio do processo de produção de cefalosporina C com células livres de *C. acremonium* C-10, em fermentador no regime batelada convencional a 250-500 rpm, temperatura de 26 °C (Silva, 1998).

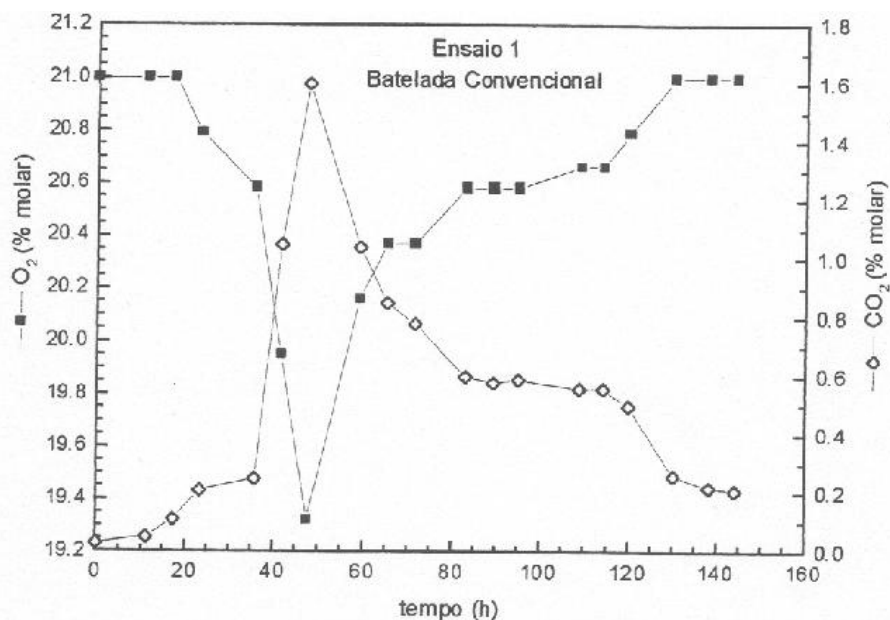


Figura 2.7: Resultados experimentais da porcentagem molar de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> presentes nos gases de saída de um fermentador operado no regime batelada convencional para produção de cefalosporina C com células livres de *C. acremonium* C-10 a 250-500 rpm, temperatura de 26 °C (Silva, 1998).

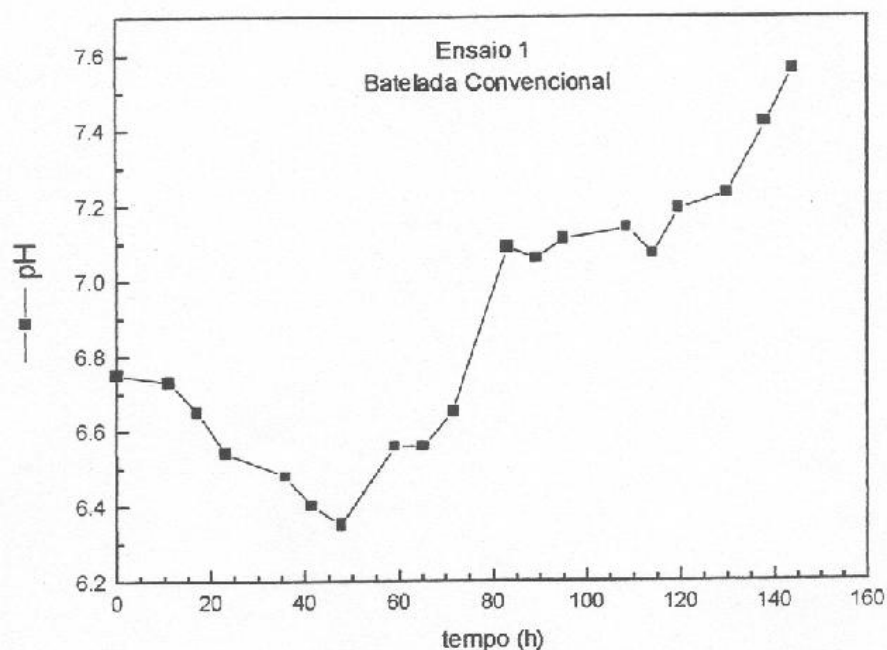


Figura 2.8: Resultados experimentais da variação do pH referentes a um ensaio do processo de produção de cefalosporina C com células livres de *C. acremonium* C-10, em fermentador no regime batelada convencional a 250-500 rpm, temperatura de 26 °C (Silva, 1998).

### 2.3 Regulação do Metabolismo no Crescimento e na Produção de Antibiótico

A elucidação das rotas biossintéticas de produção das penicilinas e cefalosporinas, mostrou que a produção destes compostos envolvia complexos mecanismos de indução, regulação por retroalimentação e regulação catabólica (Drew e Demain, 1977; Vining *et al.*, 1990). A dificuldade em atuar diretamente nestes mecanismos de regulação dificultava o avanço na área, pois sem o completo entendimento destes, era possível somente manipular o ambiente extracelular, esperando que este atuasse de modo positivo otimizando o processo, através da ação nos mecanismos intracelulares (Lim e Lee, 1991).

Segundo Drew e Demain (1977), a resposta a aditivos estimulatórios em certas fermentações de metabólitos secundários assemelha-se ao fenômeno de indução enzimática no metabolismo primário, embora não se conheçam precisamente os mecanismos através dos quais certos metabólitos primários induzem as enzimas do metabolismo secundário. Segundo os mesmos autores, num processo em batelada, normalmente a molécula responsável pela indução do metabolismo secundário deve ser adicionada antes da síntese do produto, ou seja, durante a fase de crescimento celular. Ainda, o metabólito primário

indutor deve exercer um papel estimulatório independente de qualquer outra função tal como a de um precursor do metabólito secundário em questão. Moléculas com estruturas análogas à molécula indutora devem ser capazes de substituí-la na função reguladora. Finalmente, como todos os fenômenos regulatórios são dependentes da concentração, deve ocorrer um aumento na concentração de indutor no interior da célula num breve período antecessor ao aparecimento das enzimas responsáveis pela síntese do metabólito secundário. Demain *et al.* (1983), ressalva ainda que em muitos casos os precursores não apresentam nenhuma atividade quando suas velocidades de formação não são as limitantes do processo e, desta forma, o processo de seleção de aditivos revela efeitos extremos, estimulatórios e até inibitórios, das moléculas precursoras "não-chave" sobre a produção de metabólitos secundários.

Alguns aspectos têm sido mais estudados em relação à síntese da cefalosporina: a indução da produção de cefalosporina pela metionina e a repressão catabólica por açúcares de rápida assimilação.

Demain *et al.* (1963), investigaram o papel estimulatório da metionina, um aminoácido contendo enxofre, para produção de cefalosporina C e verificaram que a ausência da DL-metionina no meio de fermentação provocava uma redução da produção de cefalosporina. Esses autores verificaram também, que a D-metionina era mais ativa que a forma L, mas que a ação da DL-metionina era praticamente a soma dos efeitos individuais dos isômeros D e L.

Caltrider e Niss (1966), constataram que a metionina não era essencial para o crescimento celular, mas exercia um efeito positivo quando adicionada durante a trofofase. Assim propuseram que o átomo de enxofre da molécula de cefalosporina era proveniente da metionina, apesar de haverem outras fontes de enxofre no meio. Esses autores concluíram também que a metionina é primeiramente, convertida em cisteína um dos precursores da cefalosporina C, e então é incorporado à rota biossintética. Drew e Demain (1977), mostraram que a metionina, no entanto, não atua apenas como doadora do átomo de enxofre, uma vez que a norleucina, um composto semelhante à metionina sem o átomo de enxofre também tem um efeito estimulatório na produção de cefalosporina. Esses dois compostos, tanto a metionina quanto a norleucina, agem através de mecanismos comuns a ambas. Por isso, a metionina, é não só o doador preferencial de enxofre, mas também estimula a produção do antibiótico por outros mecanismos. Demain *et al.* (1983), mostraram que as atividades das enzimas na ciclização e expansão do anel são maiores em

culturas contendo metionina, explicando assim, mais uma influência desta no mecanismo regulatório.

Kitano *et al.* (1977), realizaram estudos comparativos do efeito da metionina na produção de cefalosporina C por vários fungos e foi verificado que a metionina estimula a síntese do antibiótico em apenas algumas linhagens de *C. acremonium*. Em outras linhagens, a metionina tem efeito nulo ou até, efeito inibitório. Lewandowska e Paszewski (1988), investigaram a relação entre a produtividade de cefalosporina, com o metabolismo do enxofre de cada linhagem, examinaram os níveis de várias enzimas deste metabolismo em algumas linhagens *C. acremonium*. Os resultados obtidos indicaram que as linhagens estudadas apresentaram diferentes níveis de algumas enzimas que responderam diferentemente às várias fontes de enxofre. A linhagem que apresentou maior produtividade foi a que exibiu maiores níveis das enzimas que favorecem a síntese da cisteína. Os autores concluíram que, era necessário adicionar tanto sulfato quanto metionina para que se possa assegurar uma maior produção de cefalosporina.

Lemke e Nash (1972), observaram quatro tipos morfológicos distintos de *C. acremonium* durante a fermentação em culturas submersas utilizando-se meio sintético: hifas finas, fragmentos de hifas entumescidas (artrosporos), conídios e conídios em fase de germinação. Os dados obtidos com várias linhagens de *C. acremonium* revelaram que a maioria delas são capazes de se transformar em artrosporos, morfologia induzida pela metionina, apresentando uma maior capacidade produtiva. Porém foi também verificada a diferenciação morfológica em um mutante não produtor, eliminando-se portanto a obrigatoriedade da relação entre a morfogênese e a síntese de antibiótico.

Matsumura *et al.* (1980), realizaram um estudo comparativo entre as linhagens de *C. acremonium* M8650 e CW19 em processo no modo batelada para a produção de cefalosporina C. Observaram que a linhagem mais produtiva CW19 apresentou uma maior capacidade de acumular a metionina intracelularmente após a exaustão da glicose, ou seja, ao final da fase de crescimento e um pouco antes da fase de síntese da cefalosporina C. Ainda, estes autores verificaram que a maior atividade do complexo enzimático responsável pela síntese da cefalosporina C coincidiu com a presença, no meio de cultura, de fragmentos de hifas entumescidas e altamente septadas que apresentavam uma grande concentração endógena de metionina.

Um outro tipo de regulação do metabolismo secundário, inclusive a cefalosporina C, é a regulação por retroalimentação ou por catabólitos presentes no meio reacional cujos

mecanismos básicos compreendem a repressão ou a inibição. A repressão age em nível genético e controla a síntese de uma ou mais enzimas; a inibição age em nível molecular, diminuindo a atividade dessas enzimas. A ocorrência da regulação por retroalimentação, tanto através do mecanismo de inibição como de repressão, normalmente depende da concentração de um produto final do metabolismo primário. Uma forma deste tipo de regulação comum à síntese de muitos antibióticos é a repressão ou inibição que estes metabólitos exercem sobre uma ou mais sintetases responsáveis por sua própria formação (Demain, 1984).

Segundo Zanca e Martin (1983), a repressão catabólica é exercida por fontes de carboidratos facilmente assimiláveis, como é o caso da glicose, principalmente, da frutose e da maltose, o que não acontece quando se utilizam açúcares de metabolismo mais lento como a sacarose. A glicose é uma excelente fonte de carbono e de energia para o crescimento celular, mas quando estão em altas concentrações reprime a produção da maior parte dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inclusive de cefalosporina C. No processo de produção desse antibiótico, em altas concentrações de glicose, ocorre a repressão das enzimas responsáveis pelas etapas de ciclização e expansão do anel tiazolidina da penicilina N.

Behmer e Demain (1983), utilizando extratos de células de *Cephalosporium acremonium*, estudaram a regulação catabólica pelo carbono na síntese de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e verificaram que o maior efeito de altas concentrações de glicose está sobre a formação de cefalosporina, enquanto que o efeito sobre a produção de Penicilina N é praticamente nulo, quando comparado com meio padrão glicose-sacarose. Foi verificado que a enzima de expansão do anel, a expandase, foi reprimida pela glicose, mesmo a concentrações relativamente baixas. Por outro lado, a inibição da produção da Penicilina N requer concentração de glicose alta, concentração baixa (abaixo de 6%) teve pequeno ou nenhum efeito inibitório sobre a produção.

Heim *et al.* (1984), em fermentações realizadas em frascos agitados confirmaram a conclusão de Behmer e Demain (1983) de que o efeito de repressão da síntese da cefalosporina pela glicose é resultado da repressão da expandase. No meio padrão (2,7% glicose e 3,6% sacarose), ciclase e expandase apareceram seqüencialmente. O posterior aparecimento da expandase coincide com a depleção de glicose do meio. Alimentando mais glicose a 2,7% em 54 horas, resultou na ausência da formação da expandase sem, porém, afetar a ciclase.



Durante a fase de produção de cefalosporina, deve-se evitar ao máximo a repressão catabólica, mantendo-se a concentração de glicose abaixo de um valor crítico. Por outro lado, Bayer *et al.* (1989) verificaram que, se a concentração de glicose estiver muito baixa, diminuirá muito a produtividade. Assim, segundo esses autores, a concentração de glicose deve ser mantida em um valor ótimo de 50 a 100 mg/L, o que pode ser conseguido através de análise "on-line" da glicose e por operações semicontínuas como batelada alimentada.

Zanca e Martin (1983), em experimentos para avaliar a formação seqüencial de penicilina N (Pen N) e cefalosporina C (CPC), sugeriram a ocorrência do sistema de expansão do anel durante a reação de conversão de Pen N em CPC. Quando os níveis de substrato foram mantidos altos por repetidas adições de glicose, ocorreu pouca produção de antibiótico. A desrepressão seria obtida pela alteração no nível de certo ativador intracelular, em resposta a um decréscimo da concentração de glicose a partir de um determinado valor no caldo de cultura. Os pesquisadores cogitaram que a formação seqüencial dos sistemas Pen N sintetase seria resultado de uma desrepressão diferencial da formação de enzimas resultante dos efeitos de diferentes níveis de glicose no meio, abaixo dos quais elas começariam a fazer efeitos. Nestes experimentos observou-se que a síntese de cefalosporina C foi fortemente reduzida pela glicose, enquanto houve acúmulo de penicilina N. O incremento de Pen N na presença de glicose foi mais provavelmente o resultado do decréscimo na conversão de Pen N em CPC do que devido ao estímulo da formação de Pen N de seus precursores. Desta forma, verificou-se que a repressão, mais que a inibição, foi a regulação mais relevante exercida pela glicose na síntese de cefalosporina C.

Kennel (1977, *apud* Drew e Demain, 1977), verificou que a presença de açúcares rapidamente assimiláveis nos meios de cultura (glicose, maltose, frutose) resultaram numa menor produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos do que açúcares de metabolismo mais lento (sacarose, galactose). Este autor também observou que baixas concentrações de glicose no meio de cultura permitem a obtenção de uma maior produção de  $\beta$ -lactâmicos do que altas concentrações do açúcar e, apesar de não ter evidenciado a repressão catabólica pela glicose, detectou um tipo de inibição catabólica combinada da glicose e amônia sobre as sintetases dos antibióticos.

## 2.4 Processos de Produção

Em comparação com a indústria química, a qual freqüentemente trabalha com altos rendimentos nas suas reações, a indústria bioquímica opera ainda a rendimentos muitos baixos. Isto é algo natural, uma vez que os processos empregando microrganismos envolvem mecanismos regulatórios complexos, e muitas vezes, ainda não elucidados completamente. Muitos progressos com relação ao melhoramento da produção são resultados da compreensão da fisiologia e interação deste microrganismo com o meio ambiente em fermentadores, assim como da habilidade de manipular fluxos metabólicos usando biologia molecular. O desenvolvimento de linhagens mutantes altamente produtivas, a aplicação da tecnologia do DNA-recombinante, melhoramentos na transferência de oxigênio, desenvolvimento de meios de fermentação e estratégias de alimentação de nutrientes, tem proporcionado significativos aumentos de produtividade (Skatrud *et al.*, 1997).

Geralmente, a produção de antibióticos é realizada convencionalmente através de culturas submersas dos fungos em tanques providos de agitação mecânica e aeração. Numa fermentação típica, a maior parte da biomassa requerida para uma velocidade ótima de síntese de antibiótico é obtida durante as primeiras 60 - 80 horas de fermentação. O período total do processo é de aproximadamente 160 horas e utiliza-se uma grande variedade de meios para se obter uma produção ótima. Além da otimização dos meios de cultura, uma maior produção pode ser obtida aumentando-se a velocidade máxima de transferência de oxigênio gás-líquido através de melhorias nos sistemas de agitação e aeração. Isto resulta, porém, num aumento da massa celular e seus decorrentes problemas (Calam, 1984; Elander, 1989).

Os processos em regime batelada alimentada com suplementação contínua ou intermitente de nutrientes tem sido empregadas para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem: o controle da quantidade de nutrientes no início da fermentação para garantir que a demanda de oxigênio durante a fase de crescimento não exceda a capacidade de transferência de oxigênio do fermentador; evitar altas concentrações de alguns nutrientes que sejam inibidores ou causem precipitações indesejáveis; regular o metabolismo do microrganismo para aumentar a formação do produto. O regime em batelada alimentada é empregado também em fermentações onde são distintos os nutrientes necessários para as

fases de crescimento e de formação de produto (Bailey e Ollis, 1986; Schmidell *et al.*, 2001).

Os processos fermentativos semicontínuos se referem a cultivos que se iniciam em batelada e passam a ser alimentados continuamente com o meio de cultura durante a fase de produção. Esta metodologia já vem sendo utilizada há algum tempo, principalmente em processos em que ocorre inibição do crescimento ou formação de produtos indesejáveis pelo excesso de substrato. Atualmente, essa técnica vem sendo muito valorizada devido ao desenvolvimento de processos em que se utilizam linhagens auxotróficas, para evitar os fenômenos de inibição e repressão catabólica. O fermentador deve ser operado com uma vazão de alimentação de substrato, de forma a se controlar o crescimento celular através da adição de substrato. A fermentação semicontínua, além de extensamente aplicada na indústria, é de grande utilidade em estudos teóricos sempre que a fermentação contínua não for possível, pois pode manter o cultivo em um estado que se aproxima do estacionário (Hokka e Moraes, 1978).

Matsumura *et al.* (1981), simularam o processo de produção de cefalosporina C, utilizando um modelo cinético com seus parâmetros derivados dos dados de um cultivo em batelada realizada só com glicose, e aplicado a culturas em batelada alimentada. Os autores observaram três condições que resultaram em aumento da produção do antibiótico: sucessivas formações de fragmentos de hifas entumescidas, manutenção de uma alta concentração de metionina endógena e minimização da repressão catabólica pela glicose. Na simulação do processo em batelada alimentada em baixas vazões de meio, o crescimento celular foi proporcional à quantidade de substrato suplementado, entretanto em altas vazões houve um decréscimo no crescimento celular e o acúmulo de glicose causando a repressão da produção de cefalosporina, levando a uma discrepância em relação aos dados experimentais. Para contornar este problema foi adicionado ao modelo um termo de inibição da taxa de consumo de glicose e, ao realizar o cálculo da produção em batelada alimentada, observou-se que em baixas taxas de alimentação a formação do antibiótico é antecipada alcançando baixas concentrações. Ainda para testar o modelo, resultados experimentais de uma fermentação realizada em regime batelada alimentada a uma taxa de alimentação de substrato de 1,02 g/L.hr contendo glicose, metionina e sulfato de amônia, mostrou que a taxa de produção inicial foi um pouco menor do que a fermentação em batelada. Apesar desta constatação, a produção prolongou-se por mais tempo, proporcionando uma produção 30% maior do que a cultura em batelada.

Para analisar o efeito da glicose sobre a biossíntese dos  $\beta$ -lactâmicos totais, penicilina N e cefalosporina C, Zanca e Martin (1983), realizaram experimentos em batelada, alterando as concentrações de glicose no início da fermentação (27,0; 35,0; 45,0; 55,0 g/L), e verificaram que sob altas concentrações ocorreu a diminuição da produtividade específica de antibiótico. Experimentos em batelada com um pulso de glicose (25,0 g/L), em 48 horas de fermentação resultaram em redução na produção do antibiótico com relação à batelada sem a adição. Os resultados de diversos experimentos com adição de diferentes concentrações de glicose no momento da inoculação indicaram que o crescimento do *Cephalosporium acremonium* aumentou linearmente com a concentração do carboidrato, mas a produção específica de  $\beta$ -lactâmicos (Penicilina N e cefalosporina C), foi maior para uma concentração de aproximadamente 20,0 g/L. Concentrações abaixo desta, causou redução da biossíntese do antibiótico devido ao baixo crescimento. Estes resultados mostram que a produção de  $\beta$ -lactâmicos é maior com concentrações de glicose que limitam o crescimento celular, e é menor em concentrações deste carboidrato que possibilitam um alto crescimento.

Vicik *et al.* (1990), realizaram experimentos cujos resultados indicaram que a adição de metionina em batelada, sob concentrações de 3,0 g/L, antes do início da alimentação com sacarose, interferiu no consumo do carboidrato, retardando o crescimento e limitando a síntese de cefalosporina. A adição simultânea de metionina com sacarose diminuiu este efeito inibitório. Através da alimentação exponencial de metionina com sacarose o crescimento foi limitado resultando em um aumento significativo na produção, se comparado ao cultivo em que a metionina foi adicionada na batelada inicial.

Gomes *et al.* (1996), utilizou o processo em batelada alimentada para a produção de cefalosporina, utilizando *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. Os ensaios foram conduzidos em um reator convencional, contendo no início glicose e após sua exaustão, suplementadas a vazão constante com meio contendo sacarose como principal fonte de carbono e mesmas concentrações dos demais componentes no meio inicial. Quando comparado com batelada convencional o processo em batelada alimentada não apresentou vantagens com relação à produtividade específica, apresentando ainda pequeno acúmulo de sacarose ao longo da fermentação.

Silva *et al.* (1998), investigaram o efeito da velocidade de alimentação na produção de cefalosporina C em reator tipo tanque aerado e agitado usando sacarose hidrolisada no meio suplementar. O uso da sacarose é uma boa estratégia para obter altas concentrações

de antibiótico no processo em batelada convencional, porém, o seu uso em processos operados no regime batelada alimentada é limitado devido à tendência a se acumular no meio de cultura. Uma alternativa viável investigada pelos autores foi utilização de sacarose hidrolisada no meio suplementar para processo em batelada alimentada uma vez que o custo deste açúcar no mercado brasileiro é menor do que o de glicose ou frutose. Os autores realizaram cultivos em biorreator tipo tanque aerado e agitado no regime batelada alimentada com três diferentes vazões de meio suplementar contendo sacarose invertida. Os dados experimentais de produção de cefalosporina C estão mostrados nas Figuras 2.9 e 2.10.

No primeiro cultivo o meio suplementar contendo a sacarose invertida foi adicionado ao meio de fermentação durante a fase de produção na vazão de 15,4 mL/h. Nesta vazão a sacarose hidrolisada era alimentada na mesma velocidade em que ocorria o seu consumo no cultivo em regime batelada convencional e obteve-se uma produtividade específica de 1,2 mg<sub>CPC</sub>/g<sub>cel.</sub>·h. Os dois ensaios seguintes foram realizados com velocidades de alimentação de sacarose invertida 30% maior e 33% menor em relação ao primeiro experimento em batelada alimentada. A manutenção das maiores velocidades de síntese de antibiótico foi verificada com a menor vazão de meio suplementar o que, segundo os autores, foi provavelmente devido à redução da repressão catabólica. Os autores conseguiram desta forma aumentar a produção de cefalosporina C pela adição de sacarose invertida em uma velocidade de alimentação adequada, mostrando ser esta uma estratégia vantajosa frente ao processo batelada convencional com sacarose.

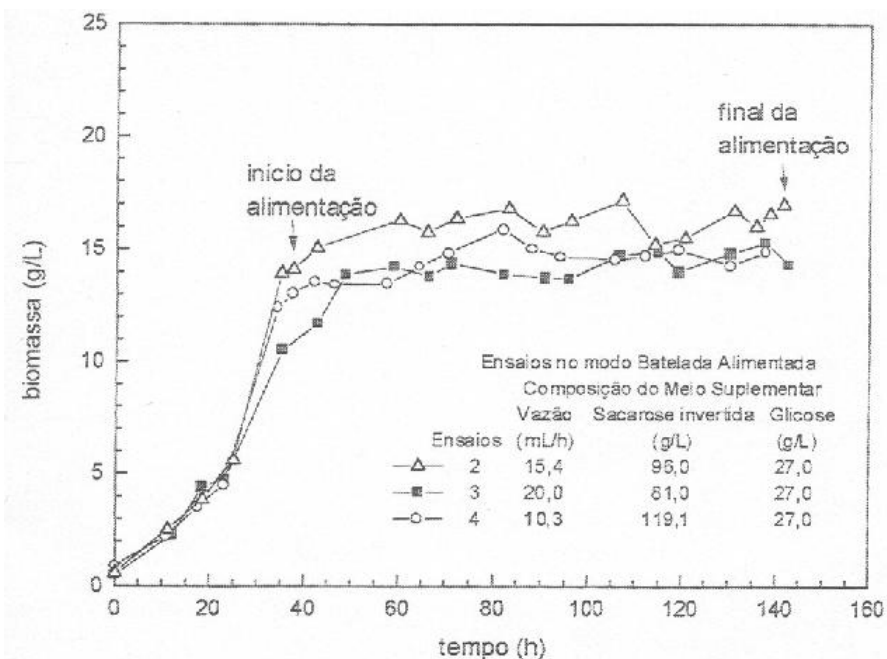


Figura 2.9: Resultados experimentais de biomassa em ensaio com células livres de *C. acremonium* C-10, em fermentador a 250-500 rpm e temperatura de 26 °C, operando no regime batelada alimentada com três diferentes vazões de meio suplementar contendo sacarose hidrolisada (Silva, 1998).

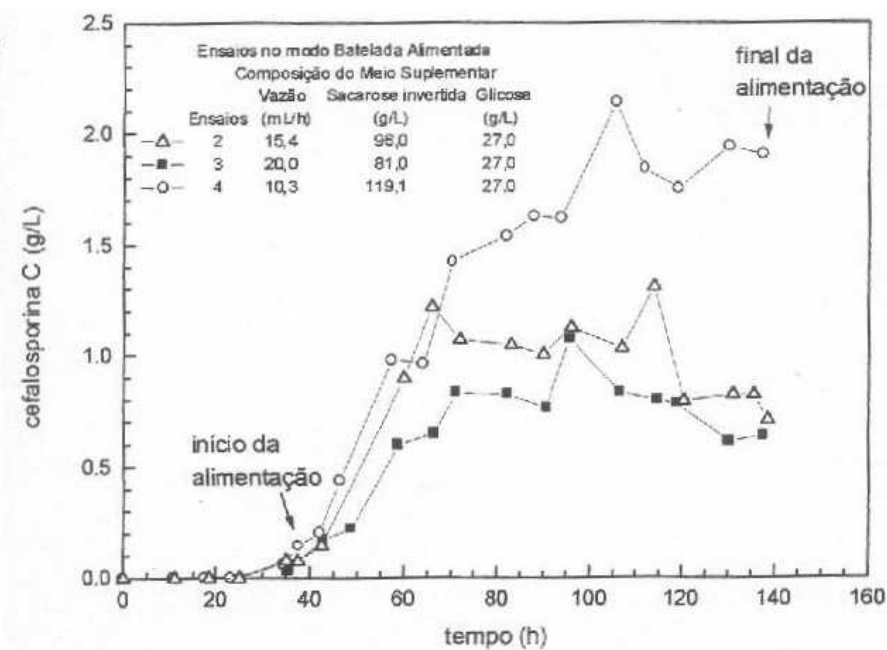


Figura 2.10: Resultados experimentais do processo de produção de cefalosporina C com células livres de *C. acremonium* C-10, em fermentador a 250-500 rpm e temperatura de 26 °C, operando no regime batelada alimentada com três diferentes vazões de meio suplementar contendo sacarose hidrolisada (Silva, 1998).

Baseados nos dados obtidos por Silva (1998), Cruz *et al.* (1999), desenvolveram um modelo matemático não estruturado para representar o processo de produção em batelada alimentada e otimizar a produção de cefalosporina C. O modelo estimou que a redução da vazão mássica de glicose de 0,92 g/h para 0,75 g/h permitiria uma produção ótima do antibiótico e representaria um aumento de aproximadamente 23% na produção de cefalosporina C em 120 horas de processo.

Sándor *et al.* (2001), em um estudo sobre a relação entre fragmentação, crescimento e produção de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum* ATCC 46117 classificaram as células em dispersadas ou peletizadas. A forma dispersa é dividida em dois grupos nomeados, forma dispersa livres e agregados de micélios. Este último não está empacotado forte o suficiente para serem considerados pellets. Análises de células em cultura realizada em regime batelada alimentada com glicose e sacarose e após o consumo sequencial destes açúcares, adição de glicose, mostraram que a presença de fonte de carbono rapidamente assimilada, a glicose e conseqüentemente altas velocidades de crescimento, coincidiu com um aumento nos tamanhos das hifas e dos agregados e a repressão da síntese de cefalosporina C. Por outro lado a exaustão da glicose e o crescimento em sacarose, um açúcar mais lentamente assimilado, levou a altas velocidades de fragmentação e à produção de antibiótico. Essa elevação na fragmentação pode ter sido causada pelo decréscimo na produção de biomassa ou pela exaustão da fonte de carbono rapidamente assimilado. Como é impossível discriminar estes efeitos em culturas em batelada alimentada, foram realizadas culturas em processos semi contínuos, onde a velocidade de crescimento específico foi ajustada à velocidade de diluição e a glicose residual foi mantida perto de zero em todos os casos. As velocidades de produção de cefalosporina C não foram afetadas por mudanças nas velocidades de crescimento específicas, porém, níveis mais altos de fragmentação foram verificados em baixas velocidades de crescimento, indicando que a exaustão da glicose não seria um iniciador, mas talvez um pré-requisito para a fragmentação por meio do interrompimento do crescimento. Portanto a velocidade de crescimento pareceu ter tido uma relação com a causa da fragmentação. Pelos dados em processos semi contínuos, não encontrou uma relação entre cultura em batelada alimentada uma vez que a produção de cefalosporina C e fragmentação parecem estar relacionadas entre si pelas condições de alimentação, porque ambas dependem de maneira idêntica da disponibilidade das fontes de carbono.

Estudos de processos utilizando células imobilizadas de diversos tipos de microrganismos têm evidenciado, conforme cada caso, vantagens como o aumento da estabilidade biológica das células, a obtenção de altas concentrações celulares, melhoras significativas na transferência de massa gás-líquido, efeitos de partição que estabelecem um micro ambiente favorável às células, o aumento no rendimento e na estabilidade dos produtos da fermentação, possibilidade de integração com as etapas de obtenção do produto final, interações favoráveis entre as células devido à proximidade entre elas, aumento da seletividade de reação e versatilidade na seleção de reator (Devarkos e Webb, 1991).

Bayer *et al.* (1989), testaram um biorreator tipo torre para a produção de cefalosporina C. Os resultados, quando comparados com o reator de tanque agitado e aerado mostraram que o coeficiente de rendimento específico de produto, com relação concentração celular, foi o mesmo para os dois reatores, mas o coeficiente de rendimento de produto com relação ao consumo de substrato, obtido para o reator torre, foi o dobro do obtido para o reator de tanque agitado e aerado.

Barbosa (1994), realizou experimentos em reator do tipo torre operando nos modos batelada e batelada alimentada para a produção de penicilina com biopartículas naturais (diâmetros entre 0,3 e 4,0 mm) da linhagem de *P. chrysogenum* IFO 8644 .O autor investigou a dependência do coeficiente volumétrico de transferência de massa com a viscosidade aparente e a difusividade efetiva do oxigênio nos "pellets" foi estimada. O autor investigou ainda que a transferência do oxigênio extraparticular líquido-sólido pôde ser considerada desprezível frente à relevância das transferências de massa gás-líquido e intraparticular gás-sólido.

Araújo *et al.*(1996), estudaram o processo de produção de cefalosporina C por células de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, imobilizadas em biopartículas de alginato de cálcio contendo alumina em um biorreator tipo torre. O biorreator foi operado no regime batelada convencional com concentrações iniciais de glicose e sacarose de 27 g/L e 36 g/L, respectivamente. O meio reacional se apresentou menos viscoso que nos ensaios realizados em fermentadores tipo tanque agitado e aerado utilizando-se células livres. Para uma velocidade superficial de ar média de operação de 0,025 m/s, no reator tipo torre, valores de  $k_L a$  obtidos foram cerca de quatro vezes maiores do que no processo convencional, na faixa de frequência de agitação de 250 a 440 rpm. Obtiveram no processo não convencional uma concentração celular na fase estacionária de ca. 10  $g_{células}/L$ , menor



que a obtida no processo com células livres (ca. 15 g<sub>células</sub>/L), porém, a produtividade específica média no processo, com biopartículas, foi de aproximadamente 0,7 mg<sub>CPC</sub>/g<sub>células</sub>.h, cerca de 1,3 vezes maior que a obtida no processo convencional (0,55mg<sub>CPC</sub>/g<sub>células</sub>.h).

Almeida (1999) e Cruz *et al.* (2001), utilizaram um biorreator tipo torre para a produção de cefalosporina C com células imobilizadas do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 em gel alginato e alumina. Este processo mostrou-se mais lento que o processo em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado utilizando células livres. No entanto, o cultivo de células imobilizadas em biorreator tipo torre tem outras vantagens como menor gasto de energia por não possuir agitação mecânica e fácil recuperação do produto.

Embora apresentando muitas vantagens, a técnica de imobilização celular apresenta dois problemas associados à imobilização de microrganismos aeróbios que ainda são difíceis de superar. São eles: a retenção das células no interior do suporte e os problemas da resistência à transferência de massa pelo suporte. Com o aumento da concentração celular, a resistência à transferência de massa também aumenta, influenciando na distribuição das células através da biopartícula. Em culturas aeróbias, a restrição à transferência do oxigênio no interior do suporte limitará o aumento na produtividade do processo.

## 2.5 Meios de Cultura para Processos de Produção de Antibióticos

A escolha de um bom meio de cultura é tão essencial para o sucesso de um processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. O meio deve fornecer os nutrientes necessários para o crescimento e a energia necessária para a síntese de material celular, além de fornecer o material exigido para a biossíntese e acúmulo de antibiótico que se deseja produzir. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento de microrganismo favorece a formação do produto de interesse. O meio ideal é aquele que garante a melhor produção, num mínimo de tempo e sendo sobretudo, econômico (Aiba *et al.*, 1973; Bailey e Ollis, 1986).

Segundo Cunha (1975), o meio deve ter capacidade adequada de tamponamento, permitir o mínimo de formação de espuma, contribuir para a estabilidade genética do agente de fermentação, permitir agitação e aeração vigorosa, fácil recuperação do produto,

ser passível de esterilização, conter precursores necessários à formação do antibiótico e não apresentar impurezas que poderão dificultar a recuperação do produto.

Os nutrientes presentes no meio fornecem carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre como os principais constituintes da célula, juntamente com substâncias inorgânicas e precursores ou fatores de crescimento em quantidades pequenas (Posten e Cooney, 1981).

Quando um microrganismo é inoculado em um meio nutritivo, começará a crescer, desde que as condições físicas (agitação, temperatura e pH) sejam adequadas. Os principais fatores que afetam o processo são: a disponibilidade das fontes de carbono tais como açúcares ou outros carboidratos e fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, íons inorgânicos tais como fosfato, magnésio, ferro, cobre, manganês e zinco, que são necessários para o crescimento; e a disponibilidade de oxigênio em quantidade suficiente para o desenvolvimento da biomassa (Calam, 1984).

Os carboidratos são a mais importante classe de nutrientes carbonáceos para fermentações e, pode-se notar, que quase todo carboidrato ou composto relacionado é consumido por algum microrganismo. Sob uma dada série de condições, o fator que mais afeta a velocidade do bioprocessamento é a natureza do carboidrato utilizado no meio (Bailey e Ollis, 1986).

Depois do carbono, o nitrogênio é o constituinte mais importante da célula, correspondendo a aproximadamente 10% do peso da mesma sendo, portanto, um elemento extremamente necessário na composição do meio de cultura (Cunha, 1975).

Quando são requeridos produtos com um alto teor de nitrogênio, quanto maior a quantidade de nitrogênio que pode ser assimilada pelo organismo, tanto maior a oportunidade de se obter um alto rendimento de produto, desde que o organismo tenha o potencial genético para formar o mesmo. O nitrogênio pode ser suprido industrialmente à maioria dos microrganismos, por meio de amônia ou de sais, embora o crescimento possa ser mais rápido quando se utiliza nitrogênio orgânico (Aiba *et al.*, 1973; Bailey e Ollis, 1986).

Matsumura *et al.* (1978), estudaram o efeito da velocidade de consumo de açúcares sobre a produção de cefalosporina C pelo fungo *Cephalosporium acremonium* M 8650, com experimentos realizados em mesa rotativa e observaram que fontes de carbono rapidamente metabolizáveis como a glicose e frutose reprimiram a produção do antibiótico, enquanto o uso de açúcares lentamente assimiláveis (sacarose, lactose) resultou em

maiores produções. Os resultados de experimentos realizados com adição de glicose, mostraram ainda que a redução da taxa de adição causou um aumento da produção atingindo aproximadamente a produção obtida no ensaio em que sacarose foi totalmente adicionada de uma só vez. A produção de cefalosporina realizada em regime contínuo com *Cephalosporium acremonium* M 8650, utilizando glicose como único substrato limitante apresentou uma elevação da produção do antibiótico e queda na concentração celular ao ser diminuída a taxa de diluição. As mudanças observadas na morfologia com a alteração da taxa de diluição foram: hifas fragmentadas em altas taxas de diluição, formação de fragmentos entumescidos e/ou artrosporos quando a taxa de diluição era diminuída.

Os mesmos autores investigaram se a adição extra de DL-metionina após a fase de crescimento incentivaria a síntese do antibiótico. Foram estudadas as formas de alimentação após 36 horas de cultivo: adição simples de alta concentração (5 g/L em 36, 48 e 60 horas), e adição intermitente de baixa concentração (1,0, 0,5 e 0,25 g/L/12 hrs). Os cultivos eram iniciados com 0,5% (p/v) de DL-metionina e nas duas condições de alimentação estudadas não foi verificado nenhum estímulo à síntese do antibiótico.

Araujo *et al.* (1994), estudaram a influência de várias fontes de carbono na produção de cefalosporina C em frascos agitados por linhagens de *C. acremonium* ATCC 48272. Os autores constataram o consumo preferencial, em ordem decrescente, pela glicose, frutose e sacarose. Nas condições em que a sacarose constituiu a única fonte de carbono e energia verificou-se um baixo crescimento celular que foi, segundo o autor, devido à baixa velocidade de hidrólise da sacarose levando a um lento consumo do substrato. Nas condições em que utilizou os açúcares glicose e frutose o crescimento celular foi satisfatório, conforme mostra a Tabela 2.1. Os ensaios com glicose e/ou frutose apresentaram produtividades específicas semelhantes, com ligeiras diferenças favoráveis à frutose. Nos ensaios em que a sacarose era a única fonte de carbono e energia a produtividade específica foi superior aos demais, exceto nos experimentos em que foi utilizada a proporção padrão 2,7%/3,6% em glicose e sacarose proposta por Demain *et al.* (1963), que resultou em produtividades específicas superiores a todas as outras condições.

Tabela 2.1: Resultados dos ensaios realizados com diversas combinações de glicose (G), frutose (F) e sacarose (S) na produção de cefalosporina C (CPC) em frascos agitados por linhagens de *C. acremonium* ATCC48272, após 72 horas de processo (Araujo *et al.*, 1994).

Condição (*)	pH	Conc. Celular (g/L)	Conc. Glicose (g/L)	Conc. Frutose (g/L)	Conc. Sacarose (g/L)	Conc. CPC (mg/L)	Produtividade Específica (mg <sub>CPC</sub> /g <sub>cél.</sub> .h)
G → G	6,0	29,5	7,1	-	-	133	0,064
G → S	6,5	22,1	1,1	2,4	19,3	124	0,081
G → G + F	5,8	28,3	3,4	3,4	-	130	0,066
G → G + S	5,8	24,2	1,0	-	14,3	304	0,180
G → F	6,2	29,7	-	10,2	-	145	0,070
S → G	6,1	27,6	12,2	-	1,1	66	0,034
S → S	7,7	10,7	0,6	1,7	46,9	32	0,043
S → G + F	6,2	25,3	0,3	14,9	0,2	64	0,036
S → G + S	6,3	23,0	1,1	-	9,5	111	0,068
S → F	6,4	26,2	-	12,9	0,8	140	0,076
G + F → G	5,8	30,3	5,4	1,9	-	129	0,060
G + F → S	6,2	19,5	0,2	0,5	28,5	148	0,110
G+F→G+F	5,8	27,1	-	2,8	-	132	0,070
G+F→G+S	5,8	21,4	0,6	-	19,9	264	0,137
G + F → F	6,0	28,0	-	9,5	-	193	0,099

(\*) Açúcar do inóculo → açúcar do meio de produção.

Shen *et al.* (1984), analisaram a influência do cloreto de amônia, uréia, sulfato de amônia e nitrato de potássio, na produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com *Cephalosporium acremonium*, obtendo um pior resultado utilizando o  $\text{KNO}_3$ . Verificaram a influência de L-asparagina e L-arginina, que são fontes orgânicas, e obtiveram uma produção três vezes maior que a obtida com  $\text{KNO}_3$ . A comparação dos efeitos dos aminoácidos e do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sobre a formação da ciclase e expandase, revelou que a utilização dos primeiros promoveu o dobro da atividade específica da expandase, e pequeno decréscimo na atividade da ciclase. Os autores compararam fermentações com 0,75% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e com 1,2% de L-asparagina, e verificaram que ocorreu maior repressão da expandase pelo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tanto em fermentações cuja concentração de

sacarose no meio era de 6,3%, como em meios com a combinação padrão de 2,7% de glicose e 3,6% sacarose. Alterando a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 0,75% para 3% ocorreu maior crescimento celular e inibição da produção do antibiótico pela alta produção de  $\text{NH}_4^+$ . Não se verificou a formação de antibiótico até a total exaustão da glicose e fim do crescimento celular. Os resultados mostraram que a expandase sofreu maior repressão pelo  $\text{NH}_4^+$  do que a ciclase, causando a diminuição da produção de cefalosporina, mas não a de penicilina N, indicando desta forma, que a expandase é extremamente suscetível à repressão por fontes de carbono e nitrogênio.

Jarvis e Johnson (1947), citado por Pulitano (1998), observaram que o íon amônio é mais facilmente utilizado pelo microrganismo *Penicillium chrysogenum* como fonte de nitrogênio do que o íon nitrato. A velocidade de utilização do íon amônio varia diretamente com a utilização de carboidratos presentes no meio. Desse modo, é rápida quando se usa glicose ou sacarose e muito lenta com lactose. Em meios do tipo lactose-glicose, os resultados indicaram um rápido consumo do íon amônio durante a fase de crescimento, seguido por uma lenta utilização durante a produção de penicilina.

Compostos inorgânicos de fósforo também interferem no metabolismo secundário, porém, de maneiras mais complexas, onde verificam vários tipos de regulação. Estudos de formulação de meios de cultivo objetivando o aumento da produção de vários antibióticos revelaram que altas concentrações de fosfato inorgânico estimulam o crescimento celular, mas inibem a formação do produto. Muitas fermentações têm que ser realizadas em meios de cultura contendo quantidades sub ótimas de fosfatos inorgânicos para o crescimento celular. O fósforo inorgânico pode agir inibindo ou mesmo reprimindo as fosfatases que participam da síntese de compostos fosforilados intermediários da rota biossintética da produção de alguns antibióticos ou podem inibir alguma etapa que envolve a regulação pelo ATP. Nestes processos a concentração de ATP aumenta durante o crescimento celular e depois declina rapidamente mantendo-se à concentrações bem baixas durante a fase de produção (Martin, 1977).

Zhang *et al.* (1988), investigaram os efeitos repressivos e inibitórios do fosfato sobre as sintetases das  $\beta$ -lactamas da linhagem C10 de *C. acremonium*. Observaram que altas concentrações de fosfato (100 - 215 mM) reduziram a produção dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e que a concentração ótima de fosfato foi de 25 mM. As três sintetases examinadas, (ACV sintetase, ciclase e expandase), foram afetadas, tanto pela repressão

como inibição pelo fosfato, porém a expandase foi a enzima mais susceptível a ambos os tipos de regulação.

Embora a necessidade de controlar o fosfato durante o período de fermentação seja reconhecida como crucial em muitos processos de produção de antibiótico, as tentativas ou esforços para usar a regulação de fosfato como um instrumento para o controle do processo, são muito raras na literatura. Em muitos processos de fermentação para produção de antibiótico, foi registrado que a presença de fosfato no meio de cultura afeta fortemente tanto o crescimento celular, quanto a síntese de produto (Oh *et al.*, 1988).

Além de carbono, nitrogênio e fósforo os microrganismos exigem uma série de outros elementos, sob a forma de compostos inorgânicos. Entre eles destacam-se: enxofre que é necessário como componente dos aminoácidos cisteína e metionina e de algumas vitaminas; potássio, como ativador de enzimas (co-fator), regulador da pressão osmótica celular e componente central em muitos processos de transporte; cálcio, componente de várias estruturas celulares, estabilizador de certas enzimas extracelulares e fator importante na esporulação; magnésio um co-fator essencial (ativador) de várias enzimas e é importante para transferir grupos fosfatos (Posten e Cooney, 1981).

Podemos ainda citar como importante o ferro, cobre, manganês, cobalto e zinco. Alguns destes macronutrientes são encontrados em quantidades significativas nas células e devem ser supridas ao meio de cultura. Já os elementos-traço cobalto, zinco e cobre, são essenciais, mas estão geralmente presentes como impurezas nos demais ingredientes do meio de cultura (Bailey e Ollis, 1986; Lima *et al.*, 1975).

Calam (1987) afirmou que as células contêm aproximadamente 10% de resíduo mineral, principalmente sódio, potássio, fósforo e magnésio e que o crescimento poderia ser limitado por qualquer um desses componentes, incluindo as matérias inorgânicas.

## **2.6 Fatores que Afetam a Produção de Cefalosporina C**

Tão importante quanto o meio de cultura, tem-se os fatores ambientais. Tanto o pH quanto temperatura, apresentam um valor ótimo para a fase de crescimento e para a fase de biossíntese. A literatura disponível revela que as faixas de pH e temperatura, que propiciam um ótimo crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* e produção de cefalosporina C são amplos, variam de 6,8 - 8,0, e 22,8 - 30° C, respectivamente.

Chu e Constantinides (1988), estudaram a otimização da produção de cefalosporina C pelo *C. acremonium* CW-19 em um processo em batelada pelo controle de pH e temperatura. Com valores de pH e temperatura constantes nas faixas de 6,2 a 7,4 e 24 a 32 °C, respectivamente, obtiveram uma função de correlação e estimaram o perfil de pH e temperatura ótimos para culturas com 90, 96 e 100 horas de fermentação. Para os três casos os perfis de pH e temperatura ótimos tiveram basicamente o mesmo padrão entre 5 e 80 horas. Para a cultura de 100 horas, o perfil de pH e temperatura ótimos foi de 7 e 24 °C, respectivamente, para as primeiras 48 horas de fermentação, compreendendo a fase de crescimento. Em seguida foram elevados para um pH de 7,16 e uma temperatura de 28,3 °C até o fim da fermentação, compreendendo a fase de produção, exceto em cerca de 84 horas quando ocorreu uma breve elevação para um pH de 7,4 e a temperatura de 24 °C. A aplicação dos perfis de pH e temperatura ótimos para uma cultura de 100 horas resultou em uma concentração final de cefalosporina C de 550 µg/mL. Em um pH constante de 6,2 e uma temperatura constante de 24 °C, os autores obtiveram uma concentração de cefalosporina C de 480 µg/mL em 180 horas de fermentação. Ainda, em um pH constante de 7,0 e uma temperatura constante de 28 °C, os autores obtiveram uma concentração de cefalosporina de 446 µg/mL em 116 horas de fermentação.

Quando se trabalha com um processo fermentativo aeróbico, como a produção de Cefalosporina, existe a necessidade de se ter um eficiente sistema de agitação e aeração, cuja função principal é suprir o microrganismo com uma quantidade suficiente de oxigênio para a realização de suas atividades metabólicas. Uma outra função é manter o microrganismo em suspensão, propiciando uma uniformidade do caldo fermentativo e garantindo o acesso ao substrato e nutrientes, além de auxiliar na transferência de massa e calor dentro do fermentador (Wang *et al.*, 1979).

O oxigênio deve ser considerado como um reagente indispensável semelhante a outros presentes no meio reacional. A diferença entre o oxigênio e os demais nutrientes como açúcares é sua baixa solubilidade, menos de 10 mg/L em água a 25° C, em comparação com os outros que estão na ordem de grandeza de gramas/litro (Bailey e Ollis, 1986).

A utilização de fungos filamentosos e estritamente aeróbios em culturas submersas para a obtenção dos antibióticos β-lactâmicos (entre eles a cefalosporina C) apresenta como principais problemas, limitações na transferência de oxigênio, alta viscosidade

devido ao crescimento do microrganismo e baixa solubilidade do oxigênio no caldo. Dessa forma torna-se necessário a utilização de aspersores para o suprimento de oxigênio e de agitadores mecânicos promovendo a agitação do meio de cultivo para que a concentração de oxigênio não alcance níveis críticos que prejudiquem o processo. Para manter essa exigência, altos gastos de energia são necessários (1 a 5 Watts/L), embora elevados valores de velocidade de agitação não possam ser utilizados por causarem danos ao microrganismo (Smith, 1985).

Zhou *et al.* (1992), determinaram, cultivando uma linhagem altamente produtiva de *C. acremonium* W53.2.53, em um biorreator tipo tanque agitado e aerado no regime batelada alimentada, que um nível de oxigênio dissolvido de 20% do seu valor de saturação seria um limite crítico e que abaixo deste valor resultaria no acúmulo de penicilina N devido à repressão da etapa em que ela é convertida em deacetoxicefalosporina C, levando à queda na produção de cefalosporina C. Isto foi observado em ensaios com 10% e 5% de oxigênio dissolvido embora nesta faixa de concentração o fungo ainda não tenha parado de crescer. Por outro lado maiores concentrações de oxigênio dissolvido proporcionaram maiores rendimentos de antibiótico.

Sendo o fungo *Cephalosporium acremonium* estritamente aeróbio, torna-se necessário o suprimento ininterrupto de oxigênio que, aliado ao fato dos meios de cultura utilizados, conterem normalmente substâncias como proteínas e sais, promovem a formação indesejável de espuma, que deve ser controlada, pois há risco de contaminação da cultura. Também poderá interferir na eficiência da fermentação, impedindo a transferência de massa gasosa dentro do líquido e conseqüente acesso ao oxigênio pelo microrganismo. Decorrente disto há a necessidade do uso de agentes antiespumante impedindo a formação da espuma (Calam, 1987).

Konig *et al.* (1981), estudaram o efeito da velocidade de agitação sobre o crescimento de *Penicillium chrysogenum* para a produção de penicilina e concluíram que: misturar as culturas de microrganismos favorece o transporte de nutrientes e oxigênio para o microrganismo e o transporte dos produtos metabólicos para fora dele. Por outro lado, a agitação pode resultar em danos para o microrganismo em velocidades de misturas muito altas. Ambos os efeitos sobrepõem-se no sistema; os mecanismos que influenciam a formação do produto pela agitação, podem ser diferentes daqueles que afetam o crescimento da biomassa microbiana; As condições ótimas tanto para o rendimento de um



produto desejado, quanto para o crescimento do microrganismo, variam para organismos diferentes e mesmo para linhagens diferentes de uma mesma espécie.

Forças hidromecânicas influenciam a morfologia dos microrganismos. A forma do micélio do fungo pode ser classificada em duas categorias: a filamentosa e a forma de pellet. Segundo Van Suijdam *et al.* (1982), hifas mais longas são observadas quando o micélio é cultivado em frascos agitados ou em meio sólido. Em reatores agitados, as hifas tornam-se mais curtas quando a velocidade de agitação é aumentada.

A produção industrial de cefalosporina C ainda é realizada em culturas submersas em reatores convencionais tipo tanque agitado, mas a potência necessária para a agitação é alta, em torno de  $5 \text{ KW/m}^3$ , por causa da suspensão altamente viscosa produzida por fungos. Esta elevada agitação necessária para garantir boa transferência de oxigênio para o caldo de fermentação resulta no surgimento de altas tensões de cisalhamento, o que pode exercer indesejáveis efeitos sobre a morfologia dos micélios, causando a destruição do microrganismo, geração de calor e o prejuízo na formação de produtos (Srivastava e Kundu, 1999).

## **2.7 Modelagem e Simulação de Bioprocessos para a Produção de $\beta$ -Lactâmicos**

A história dos modelos matemáticos de bioprocessos teve início com as famosas equações propostas por Monod (1942) e Teissier (1942). Muitos modelos já foram propostos na literatura para uma ampla faixa de fermentações empregando diferentes microrganismos. A maioria deles ainda contém expressões cinéticas, do tipo de Monod.

De um modo geral, a escolha do modelo cinético do processo depende do nível de complexidade com que se deseja caracterizar a população de células do sistema. As representações celulares multicomponentes são denominadas estruturadas e aquelas contendo um único componente, não estruturada. Quando as células de uma população são consideradas heterogêneas e singulares, tem-se um sistema segregado e se, ao contrário, a população celular é representada por suas propriedades médias, tem-se o sistema não segregado ou distributivo (Bailey e Ollis, 1986).

A cinética global de uma cultura microbiana é a representação da influência de muitas reações intracelulares de uma grande população de células individuais, e um modelo cinético nunca deveria ser interpretado como uma descrição mecanística do sistema. No entanto, por razões práticas muitas reações podem ser agrupadas, e

freqüentemente a população celular pode ser assumida homogênea. Assim um modelo cinético razoavelmente simples é obtido para a interpretação da influência de variáveis-chave do processo (Nielsen e Villadsen, 1993).

Dessa forma grandes simplificações precisam ser feitos para se obter um modelo representativo, embora as principais características das cinéticas de crescimento e formação do produto da fermentação, precisam ser mantidas no modelo. O grau de complexidade e as variáveis escolhidas para o modelo também dependem diretamente da intenção de uso. Uma boa prática na modelagem de processos biotecnológicos é manter o modelo celular o mais simples possível. Naturalmente, um modelo mais complexo contém mais variáveis e parâmetros, e conseqüentemente ele poderá se ajustar melhor aos dados experimentais. Mais isto não significa que modelos complexos sejam necessariamente mais precisos. A verificação experimental e a identificação dos parâmetros para os modelos complexos são mais difíceis e duvidosas, e se os resultados não forem avaliados com muito cuidado, o modelo provavelmente ajustará os erros das medidas experimentais. Modelos mais simples fornecem a base para os modelos mais complexos, os quais tem de ser construídos para responder a problemas mais complicados (Aris, 1993).

A complexidade do modelo deve ser escolhida em função da sua aplicação. Assim, se objetivo é obter um modelo que possa simular experimentos de crescimento transiente, freqüentemente é possível aplicar um modelo estruturado simples, enquanto se o objetivo é estudar a influência da produção de uma proteína no comportamento celular, um modelo mais detalhado é necessário. Se o objetivo é estudar a influência da distribuição de propriedades diferenciadas das células na cinética global da população, um modelo estruturado tem de ser aplicado (Nielsen e Villadsen, 1993).

Sob o ponto vista global, o complexo fenômeno do crescimento microbiano pode ser simplificado a uma única reação química representada por uma expressão matemática. A expressão mais comumente usada para descrever essa dependência é a relação de Monod (1942). O modelo relaciona a concentração de um substrato limitante à velocidade de crescimento do microrganismo, descrita por duas constantes: A velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e a constante de saturação,  $K_s$  (Bailey e Ollis, 1996).

Freqüentemente a velocidade de crescimento é inibida pelo substrato, pelo produto ou até pelas células. Expressões clássicas, derivadas do modelo de Monod utilizadas para avaliar a dependência da velocidade específica de crescimento com o substrato limitante e a concentração celular, considerando ou não efeitos de inibição por constituintes do meio,

são citados na literatura (Bailey e Ollis, 1986; Han e Levenspiel, 1988). Quando as condições de meio são favoráveis, ou seja, a concentração do substrato limitante é bem maior que o valor da constante de saturação, a velocidade específica de crescimento de Monod assume seu valor máximo.

Quando a velocidade de crescimento microbiano é expressa em termos da dependência de um substrato limitante, a análise de interação entre as condições de operação de reator e os parâmetros estequiométricos das reações cinéticas de determinado processo resulta em fatores de rendimento que correlacionam o consumo do substrato com a variação da concentração celular e de produto, tais como  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$ . Estes fatores pseudo-estequiométricos são incorporados às equações de velocidade de crescimento para definir as velocidades de consumo de substrato em função da velocidade de crescimento. Quanto à cinética de formação de produto, os modelos não estruturados mais simples referem-se a processos cujos balanços estequiométricos entre as reações permitam a obtenção de fatores de rendimento que relacionem a velocidade de produção com as velocidades de consumo de substrato ou de crescimento celular. Os modelos discutidos acima se referem a processos nos quais a produção é associada ao crescimento, como a produção de metabólitos primários. No caso de metabólitos secundários, cuja produção normalmente é dita não associada ao crescimento, um balanço estequiométrico simples resulta em expressões de velocidade de produção relacionadas à concentração celular ao invés da velocidade de crescimento (Schmidell *et al.*, 2001).

Em geral, a produção de metabólitos secundários como os antibióticos não são associados ao crescimento celular. Para explicar este fenômeno, Shu (*apud* Matsumura *et al.*, 1981) introduziu o conceito de distribuição de idade em seu modelo. Na prática, alguns microrganismos possuem uma diferenciação celular durante o cultivo, e diversos modelos cinéticos levando em conta a diferenciação de idade foram relatados. Contudo não é racional discutir o metabolismo secundário somente do ponto de vista de idade, uma vez que as atividades do microrganismo, incluindo a diferenciação celular, podem ser modificadas radicalmente pelo ambiente extracelular. Dessa forma, uma combinação da distribuição da idade, representando as capacidades inerentes do microrganismo, e o mecanismo biossintético global, que é regulado pelo ambiente exterior, levaria a uma melhor modelagem do processo.

Com relação ao processo de produção de cefalosporina C existem vários modelos descritos na literatura. Matsumura *et al.* (1981) desenvolveram um modelo cinético

considerando diferenciação morfológica do microrganismo *Cephalosporium acremonium* M8650, indução da produção de cefalosporina C pela metionina endógena, e repressão catabólica pela glicose. A diferenciação morfológica foi considerada, por estar relacionada com a produção do antibiótico. Com relação a metionina e à glicose, estes são compostos importantes, pois regulam enzimas relacionadas com a biossíntese da cefalosporina C, além de serem substratos limitantes no processo. Segundo os autores a assimilação da glicose e da metionina aumenta a diferenciação da hifa para os fragmentos de hifas entumescidas, enquanto a exaustão da glicose do meio acelera a formação dos artrosporos a partir das hifas entumescidas.

Os mesmos autores utilizaram o modelo cinético desenvolvido para realizar a simulação de um cultivo em batelada alimentada, com o objetivo de investigar a possibilidade de aumentar a produtividade atuando sobre a velocidade de adição de substrato. As simulações indicaram que a produção poderia ser melhorada, desde que três condições fossem satisfeitas: manter a formação de fragmentos de hifas entumescidas e a uma alta concentração de metionina endógena, enquanto se minimiza a repressão catabólica pela glicose. Os autores verificaram que durante a alimentação as células cresceram pouco e a concentração de glicose permaneceu próxima de zero. A velocidade de produção inicial de cefalosporina C foi ligeiramente menor que a verificada na fase batelada. A produção do antibiótico se prolongou por um maior período. Como consequência, a quantidade final de produto obtida no cultivo em batelada alimentada foi cerca de 30% maior que em batelada.

Chu e Constantinides (1988), realizaram experimentos com o microrganismo *Cephalosporium acremonium* CW-19 (ATCC 36225) em reator tipo tanque agitado e aerado. Propuseram um modelo cinético para o processo de produção de cefalosporina C considerando o crescimento do microrganismo, o consumo de substratos (glicose e sacarose), a formação de enzimas e de produto. O modelo também considerava a influência do pH e da temperatura, incorporada a parâmetros que foram estimados experimentalmente. A diferenciação morfológica do microrganismo e a repressão catabólica pela glicose foram consideradas no modelo. O modelo foi utilizado para simular o processo na faixa de valores de pH e temperatura estudados. Em seguida, os autores utilizando o modelo cinético proposto juntamente com o princípio de Pontryagin (técnica de otimização) estabeleceram os perfis ótimos de pH e temperatura que maximizariam a formação de cefalosporina C. O modelo foi simulado para um ensaio onde foram impostos

os perfis ótimos de pH e temperatura. De acordo com os autores, os resultados obtidos comparam-se muito bem com os resultados experimentais de ensaios realizados a pH e temperatura constantes. Em ensaios realizados, seguindo os perfis ótimos de pH e temperatura, obteve-se uma produção de cefalosporina C 17% maior em um tempo 44% menor.

Basak *et al.* (1995), estenderam o modelo previamente descrito por Chu e Constantinides (1988), considerando o efeito diáuxico do microrganismo *Cephalosporium acremonium* na presença de glicose e sacarose, para um sistema operado em batelada alimentada. As condições iniciais utilizadas nas simulações foram as mesmas do ensaio em batelada realizado por Chu e Constantinides (1988). Assumiu-se que as concentrações de nitrogênio e enxofre no meio de cultivo eram suficientes para o crescimento do microrganismo e que a agitação e a aeração não eram fatores limitantes. Nos resultados simulados obtidos por estes autores empregando glicose no meio de suplementação, a uma taxa de 0,27 g/L/h, atingiu-se uma produção de 600 µg/mL. De acordo com os autores, uma pequena diminuição na concentração de cefalosporina C em 105 horas ocorreu devido ao efeito de repressão pela glicose, pois neste momento inicia-se o fornecimento de glicose ao sistema durante 5 horas.

Araujo *et al.* (1996), propuseram um modelo matemático não estruturado para o processo de produção de cefalosporina C envolvendo o crescimento celular, consumo de açúcares (glicose e sacarose) e oxigênio, e a formação de produto. Na formulação do modelo considerou-se o comportamento diáuxico do microrganismo, verificado experimentalmente por vários autores e a hipótese de que o processo é limitado pela concentração de oxigênio dissolvido. Os experimentos foram realizados em frascos agitados em meio sintético contendo glicose e sacarose como principais fontes de carbono e energia. O microrganismo utilizado foi o *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. Com base na literatura e nestes ensaios, os autores propuseram um conjunto de equações estequiométricas simplificadas para representar as principais reações que ocorrem durante o processo. O modelo foi formulado assumindo-se que durante a fase de rápido crescimento na fonte de carbono de fácil assimilação, a glicose, as células estão submetidas ao efeito de repressão catabólica, e produzem essencialmente enzimas associadas à formação de biomassa, para rápido crescimento. Nesta fase não há significativa formação de cefalosporina C. A partir do momento em que a concentração de glicose atinge um valor abaixo do qual o efeito de repressão não prevaleça, as células do tipo 1 transformam-se em

células do tipo 2, as quais são ditas desreprimidas e capazes de consumir açúcares mais lentamente assimiláveis, tais como a sacarose. Durante esta fase ocorre a síntese de enzimas intracelulares responsáveis pela formação do antibiótico. O modelo assim elaborado constitui-se de 6 equações diferenciais contendo 17 parâmetros. Valores experimentais de um conjunto de 14 ensaios em frascos agitados foram utilizados para a obtenção de todos os dados e parâmetros para o modelo. Os autores, adaptaram o modelo proposto com células livres para o processo empregando células imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* em biopartículas esféricas de gel de alginato de cálcio e alumina. Termos relativos à difusão intraparticular foram incorporados ao sistema de equações diferenciais relativas aos balanços de massa dos componentes do sistema trifásico. Foram realizados experimentos em frascos agitados e em um biorreator tipo torre. A Figura 2.11 ilustra os resultados experimentais e simulados obtidos.

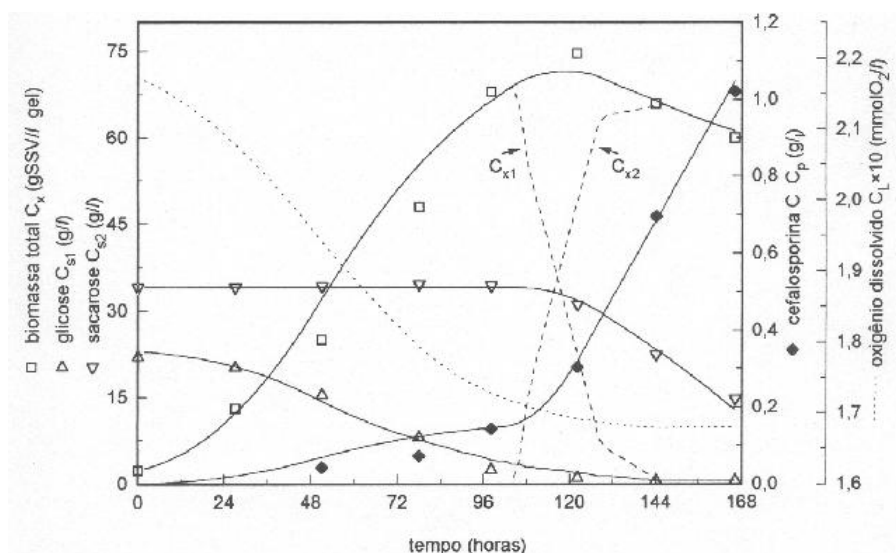


Figura 2.11: Ajuste do modelo cinético proposto aos dados experimentais do processo de produção de cefalosporina C em frascos agitados no modo batelada com células imobilizadas de *C. acremonium* ATCC 48272, em suporte gel e alumina a 26 °C (Araujo, 1996).

## 2.8 Técnicas Alternativas para a Modelagem e Otimização de Bioprocessos

### 2.8.1 Planejamento Estatístico de Experimentos

A necessidade crescente da otimização de processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade, pureza e melhor qualidade de produtos levam os engenheiros de processos, e particularmente os bioquímicos a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos.

A utilização de experimentos planejados estatisticamente, associada às técnicas de superfície de resposta, tem sido utilizada para a otimização do meio de fermentação e otimização de processos microbianos. O planejamento de experimentos é uma técnica cuja aplicação em processos químicos industriais vem crescendo continuamente, principalmente a partir da década de 80 com a evolução dos microcomputadores e a disponibilidade de "softwares" estatísticos que facilitaram os cálculos e a análise de dados.

O mais importante benefício do planejamento estatístico de experimentos é que ele pode dar mais informações por experimento do que ensaios não planejados, além de reduzir o tempo gasto e melhorar a eficiência das investigações, particularmente quando muitas variáveis são potencialmente importantes. Um segundo benefício é um ensaio organizado através da coleção e análise de informação. Frequentemente as conclusões de um experimento planejado são evidentes, sem análises estatísticas extensivas. Outra vantagem é a certeza de confiabilidade da informação à luz de variação experimental e analítica. Essa análise criteriosa dos resultados, quando apresentados em um trabalho, traz mais credibilidade às conclusões do pesquisador (Staeheli, 1987).

O planejamento dos experimentos, isto é, a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas, dependerá do objetivo particular que ele queira atingir. Cada objetivo irá requerer um planejamento diferente, para que possa ser alcançado de forma eficaz. Um planejamento de experimentos bastante utilizado é o planejamento fatorial de dois níveis, de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinadas variáveis têm ou não influência sobre a resposta, e não se está preocupado ainda com uma descrição muito rigorosa dessa influência. São planejamentos muito simples de executarem e podem ser ampliados para formarem um planejamento mais sofisticado, que é necessário quando se quer conhecer melhor a relação funcional existente entre as respostas e as variáveis. Por outro lado, quando se deseja fazer apenas uma triagem inicial das variáveis, é vantajoso começar pela execução de um planejamento fatorial incompleto, o chamado fatorial fracionário (Box *et al.*, 1978).

Através destas técnicas sistemáticas de condução de experimentos é possível avaliar o efeito principal de cada variável na resposta desejada, bem com as interações entre elas. A partir da análise de variância pode-se propor um modelo probabilístico adequado que correlacione as respostas em função das variáveis estudadas, construindo-se a superfície de resposta para determinar as faixas ótimas de operação. Nem sempre o objetivo do trabalho em estudo é a otimização do processo, mas sim um melhor conhecimento sobre as

respostas do sistema frente a variações ou perturbações que podem ocorrer dentro das faixas de operações estabelecidas. Assim, outra informação muito importante que pode ser obtida através do planejamento fatorial é a variação das variáveis que apresentam nenhuma ou pouca influência nas respostas, fornecendo subsídios fundamentais quanto à flexibilidade e robustez do sistema e conseqüentemente na definição da melhor estratégia de controle operacional (Rodrigues *et al.*, 1998).

Quando o número de variáveis aumenta, crescem as chances de que uma ou mais variáveis não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação. Então as opções, são os planejamentos fatoriais fracionados, que são úteis nas etapas prévias de desenvolvimento de processos. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve a partir de um planejamento fracionado otimizar o processo, pois os efeitos principais estão confundidos com interações de 2ª e 3ª ordem ou superiores, conforme o tipo de resolução do fracional (Box *et al.*, 1987, Myers *et al.*, 1976).

Os processos fermentativos, principalmente os aeróbios, como é o caso da produção de cefalosporina C, são muito complexos, envolvem muitas variáveis, tanto na fase de crescimento do microrganismo quanto na fase de obtenção do produto. Segundo Box *et al.* (1978), quando o número de variáveis envolvidas no processo é grande, torna-se praticamente impossível realizar todos os experimentos necessários para estudar a influência dessas variáveis através de métodos tradicionais. Todavia, escolhendo um método de planejamento adequado, torna-se possível programar os experimentos com a finalidade de se estudar um grande número de variáveis de maneira compacta e, então, selecionar aquelas que realmente são importantes para estudos mais minuciosos.

Apesar de constituir a classe mais simples de planejamentos fatoriais ortogonais, usando um número reduzido de experimentos por fator, os fatoriais  $2^k$  com pontos centrais indicam tendências e direções da pesquisa, e são extremamente úteis quando a situação experimental é representada adequadamente por um modelo de 1ª ordem, e possibilitam aumentar estes experimentos para formar planejamentos compostos ou trabalhar com frações destes planejamentos, além de utilizarem operações matemáticas simples. Se o modelo de 1ª ordem proposto não estiver bem correlacionado com os dados experimentais ou se outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial quiserem ser exploradas, faz-se necessário recorrer a um modelo de 2ª ordem (Box *et al.*, 1978, Myers *et al.*, 1976).



A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G. E. P. Box na década de 50, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (Box *et al.*, 1987).

Nos últimos 10 anos, a aplicação bem sucedida de planejamentos experimentais, metodologia por superfície de resposta para o desenvolvimento de meios ou melhoramento do bioprocessos, foram registrados por alguns pesquisadores.

MacDaniel *et al.* (1976), aplicaram técnicas de superfície de resposta para a otimização do meio em processos de fermentação de diferentes antibióticos (eritromicina e candidina, entre outros), usando entre duas e cinco variáveis. Uma otimização foi feita com cinco variáveis independentes, três nutrientes, a porcentagem de inóculo e o tempo de fermentação. O objetivo principal foi otimizar as concentrações de nutrientes em frascos agitados para subsequente produção em planta piloto ou trabalho experimental, com um número mínimo de experimentos em um curto espaço de tempo.

Araujo *et al.* (1993), imobilizou esporos da linhagem IFO 8644 de *P. chrysogenum* em partículas de diatomito e investigou fatores que influenciam no tamanho das biopartículas durante sua formação em frascos agitados através de um planejamento experimental. Com os resultados obtidos experimentalmente, correlacionaram a concentração de esporos na suspensão inicial, a concentração de fosfato e a velocidade de agitação com o diâmetro das partículas através da análise de superfície de resposta. Verificaram neste estudo que a concentração de fosfato e a velocidade de agitação influenciaram mais acentuadamente o diâmetro das biopartículas a baixas concentrações de esporos e que o fator de maior influência no diâmetro das biopartículas, em todos os ensaios, foi a concentração de esporos.

Ratusznej (1993) realizou experimentos em "shaker" a 26°C e pH 7,0 durante 60 horas, com o fungo *P. chrysogenum* seguindo um planejamento experimental com o objetivo de identificar e quantificar as variáveis importantes na indução do crescimento do fungo para a forma de pellets em meio complexo. Foram testadas como variáveis independentes, a velocidade de agitação, a diluição do meio e a concentração de esporos. As variáveis dependentes foram concentração celular e diâmetro das biopartículas. Os resultados possibilitaram identificar como variáveis independentes mais importantes, a velocidade de agitação (entre 210 e 340 rpm) e a concentração de esporos no inóculo (entre  $10^2$  e  $2 \times 10^3$  esporos/mL), enquanto a variável diluição do meio mostrou pouca influência

na formação de pellets. Uma superfície de resposta representada por um modelo de segundo grau foi a que melhor correlacionou as variáveis estudadas.

Sarra *et al.*(1993) estudaram a composição do meio líquido empregado para obtenção de antibiótico híbrido por linhagens recombinantes de *Streptomyces lividans* TK21. O crescimento celular e a produção de antibióticos foram avaliados em culturas batelada usando frascos erlenmeyer, mantidos em mesa rotativa (100 rpm) a 30°C durante 7 dias. Cinco compostos diferentes foram testados como fontes de carbono para o crescimento e a produção de antibiótico: glicose, lactose, sacarose, glicerol e amido. O amido foi a melhor fonte de carbono para o crescimento celular e a produção de antibiótico, na forma compacta de pellet. Três diferentes fontes de nitrogênio foram estudadas: NaNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e ácido glutâmico, em uma série de experimentos usando meio líquido com 2,5 mM de fosfato e 30 g/L de amido como fonte de carbono. Máximas quantidades de células e antibiótico foram obtidas com ácido glutâmico como fonte de nitrogênio. Desta forma, o ácido glutâmico e amido foram selecionados como fontes de nitrogênio e carbono. Em alguns ensaios os autores observaram que a produção de antibiótico não foi suprimida pelo excesso de amido, mas que os níveis iniciais de ácido glutâmico e fosfato influenciaram acentuadamente o processo fermentativo. Ensaio preliminares permitiram restringir o intervalo de concentração para estes compostos, a ser estudado na fase de otimização: 0,4 a 15 mM para o fosfato e 10 a 80 mM para o ácido glutâmico. Um planejamento experimental composto central foi usado para se obter a influência desses dois nutrientes sobre a biomassa final e a concentração de antibiótico em culturas em batelada, obtendo uma superfície de 2ª ordem. Com esta equação os autores obtiveram as concentrações ótimas que maximizavam a produção final de antibióticos: 10 mM de fosfato e 52,8 mM de ácido glutâmico.

Oprime e Suazo (1997) realizaram experimentos em "shaker" a 250 rpm, durante 24 horas, usando meio complexo, visando identificar e quantificar algumas variáveis importantes na etapa de crescimento do fungo *P. chrysogenum* para a otimização de produção de biomassa associada ao consumo de substrato. As variáveis independentes testadas foram: temperatura, concentração de água de maceração de milho, concentração de sulfato de amônio, concentração de sacarose e concentração de óleo de soja, tendo como variável dependente o coeficiente de rendimento celular  $Y_{x/s}$ . Os resultados obtidos foram analisados através da metodologia estatística de análise por superfície de resposta e mostraram que, dentro da região de experimentação definida, as variáveis mais importantes

foram: concentração da água de maceração de milho (fonte de nitrogênio) e concentração de sacarose (fonte de carbono). Uma superfície de segunda ordem foi a que melhor correlacionou as variáveis estudadas e um alto valor do coeficiente de rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ) foi obtido ao se trabalhar com concentrações baixas de sacarose (4 g/L) e altas concentrações de água de maceração de milho (57,4 g/L).

Pulitano (1998) estudou o efeito da agitação, temperatura, nitrogênio, açúcar e fósforo sobre o crescimento do fungo *P. chrysogenum* IFO-8644 e o efeito da temperatura, precursor e sacarose sobre a produção de penicilina pelo mesmo fungo, usando-se meio sintético e realizando-se ensaios em mesa rotativa com controle de temperatura e agitação. Primeiramente a autora realizou um planejamento fatorial  $2^5$  e concluiu que o fosfato não era significativo para a produção de biomassa, na faixa estudada. Um segundo planejamento foi executado e verificou-se que o fator agitação não era significativo, dentro da faixa estudada, na obtenção da resposta velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ). Um modelo ajustado de 2ª ordem correlacionou as variáveis significativas envolvidas. A análise canônica do modelo ajustado indicou duas possibilidades de obterem altos valores de  $\mu_{max}$ , trabalhando-se com temperaturas entre 25,5 e 28,5°C: associando-se uma alta concentração de glicose com uma baixa concentração de sulfato de amônio ou uma baixa concentração de glicose com uma alta concentração de sulfato de amônio. Um planejamento composto central  $2^3$  completo, mostrou que três variáveis, dentro da faixa estudada, eram significativas para a obtenção da velocidade específica de produção média de penicilina ( $\mu_p$ ), medida no início da fase produtiva do microrganismo. Um modelo de 2ª ordem correlacionou as variáveis envolvidas. Através de análise das superfícies de resposta, chegou-se a uma faixa ótima de concentração de precursor: entre 0,4 e 0,8 g/L para uma massa celular inicial em torno de 1 g/L e observou-se que um grande aumento no valor de  $\mu_p$  pode ser alcançado ao se trabalhar com uma baixa concentração de sacarose associada à temperatura entre 22 e 25,5°C. A autora ressalva que as faixas ótimas de temperatura obtidas para as etapas de crescimento celular e de produção de antibiótico foram diferentes e o planejamento estatístico de experimentos mostrou-se bastante eficiente para a avaliação do bioprocessos, pois permitiu atingir valores de  $\mu_{max}$  até 0,23 h<sup>-1</sup> e de  $\mu_p$  até 0,22 mg<sub>pen</sub>/g<sub>cel</sub>.h.

## 2.8.2 Redes Neurais em Bioprocessos

Na década de 40 iniciaram-se os primeiros estudos na tentativa de modelar neurônios empregando funções lógicas. McCulloch e Pitts foram os pesquisadores pioneiros, mostrando que um neurônio podia ser modelado por uma simples função degrau para realizar uma função lógica. Ao mesmo tempo, Wiener relacionava princípios de engenharia, realimentação e funções cerebrais; é o que por ele foi exposto como os Princípios da Cibernética, em seu livro "Cybernetics: Control and Communication in the Animal and the Machine", citado por Lau (1990). Alguns autores chegam a dividir o desenvolvimento dos estudos no campo em três fases. A primeira, de 1949 a 1969, teve o início com o surgimento de vários modelos como o "Perceptron" de Rosenblatt, "Adaline" de Widrow e Hoff e a "Matriz de Aprendizado" de Steinbuch. O modelo "Perceptron" teve vida curta, quando dois pesquisadores, Minsky e Papert, provaram matematicamente que esse modelo não poderia ser usado para representar funções lógicas complexas (Lau, 1990). Iniciava-se a segunda fase, com a técnica caindo praticamente no esquecimento. A terceira e atual fase teve seu início marcado no ano de 1986 com o lançamento de um livro por David E. Rumelhart *et al.* (1986), ("Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition"). Neste livro encontra-se descrito o algoritmo de aprendizado denominado retropropagação, revolucionando o uso da técnica e promovendo um forte impulso nas pesquisas de campo.

As redes neurais artificiais vêm se tornando uma importante ferramenta empregada na simulação e controle de processos. Esse fato é atribuído principalmente à sua característica de reproduzir com fidelidade o comportamento de sistemas não lineares, aliada ainda ao reduzido tempo de processamento necessário. Além disso, seu uso dispensa a elaboração de modelos matemáticos complexos baseados em equações fundamentais e constitutivas, que muitas vezes ainda pressupõem a adoção de várias hipóteses simplificadoras durante a etapa de elaboração (Baughman e Liu, 1995).

De acordo com Bhat e McAvoy (1990), as redes neurais são uma das áreas que mais tem crescido no campo da inteligência artificial e também uma das mais promissoras devido à sua capacidade de representar relações não lineares. As redes neurais têm sido usadas largamente em um grande número de aplicações de engenharia química como: simulação de processos químicos, análise de dados de sensores e detecção de falhas e identificação de processos não lineares.

De acordo com Van Can *et al.* (1997), dependendo da quantidade de conhecimento que é utilizado para desenvolver o modelo, as estratégias de modelagem podem ser classificadas em: caixa branca, caixa preta e caixa cinza. Na abordagem caixa branca, o desenvolvimento do modelo é realizado a partir dos primeiros princípios (balanços macroscópicos, relações termodinâmicas e assim por diante).

Nos processos bioquímicos, as redes neurais artificiais são usadas normalmente como caixa preta, em aplicações de modelagem de biorreatores. Na estratégia de modelagem caixa preta, o modelo é desenvolvido a partir da observação do comportamento de suas entradas e saídas. É o único método possível de se utilizar quando nenhum conhecimento do processo está disponível. A maior vantagem desta técnica de modelagem é que, dentro de um tempo razoável, pode-se obter um modelo matemático preciso do sistema sem um conhecimento detalhado dos fenômenos que ocorrem durante o processo. Mas a grande desvantagem desta abordagem é a sua incapacidade para realizar extrapolações (Thibault *et al.*, 1998; Di Massimo *et al.* 1992).

Uma outra alternativa é a estratégia de modelagem denominada "caixa cinza", que também é denominada de modelagem híbrida. Esta técnica combina princípios primários simples do modelo, os quais incorporam o conhecimento disponível "a priori" do processo que está sendo modelado, com a técnica das redes neurais que serve como um estimador de parâmetros desconhecidos do modelo fenomenológico do processo. As redes neurais podem ser treinadas para prever aqueles parâmetros do modelo fenomenológico ou substituir equações constitutivas complexas (Van Can *et al.* 1997).

Na engenharia química, a técnica de redes neurais começou a ser utilizada mais recentemente, com trabalhos em várias áreas (Hoskins e Himmelblau, 1988; Bhat e McAvoy, 1990; Kennedy *et al.*, 1992).

Thibault e Van (1990), introduziram a técnica na modelagem dinâmica de bioprocessos. A rede neural dinâmica foi empregada para prever as variáveis-chaves do bioprocessos. Este novo método foi comparado com uma técnica de predição mais tradicional, o filtro de Kalman estendido, para avaliar seu desempenho. O caso em estudo foi um fermentador contínuo perfeitamente agitado. Os estudos mostraram que a rede neural foi capaz de generalizar o comportamento dinâmico do processo com alto grau de precisão.

Pollard *et al.* (1992), descreveram uma série de testes em que uma rede neural "feedforward" (treinada com o algoritmo da retropropagação) foi empregada para

identificação de processo. Os autores propuseram uma modificação na função objetivo, empregada durante o treinamento e o uso da validação cruzada, para melhorar este processo de treinamento. Demonstrações são feitas empregando dados simulados e reais. Os autores discutem vantagens e desvantagens desta técnica em comparação com técnicas clássicas de identificação de processos.

O primeiro trabalho, a descrever o uso da técnica das redes neurais em bioprocessos envolvendo a produção de metabólitos secundários foi de Willis *et al.* (1991). Neste trabalho os autores empregaram uma rede neural do tipo "feedforward" tendo como variáveis de entrada a demanda de oxigênio e a idade do processo (tempo de cultivo), e como variável de saída, a biomassa. A rede especificada apresentava uma camada oculta, foram utilizados durante a fase de treinamento dados experimentais de duas bateladas e o desempenho da rede foi avaliado empregando dados de uma terceira batelada. A rede foi treinada com o auxílio do algoritmo "chemotaxis" (procedimento de busca aleatória dos pesos). Segundo os autores as estimativas obtidas para a concentração celular pela rede neural foram tão boas quanto às obtidas para os conjuntos utilizados durante a fase de treinamento.

Di Massimo *et al.* (1992), utilizaram dados industriais do processo de produção de penicilina G por *P. chrysogenum*. Foram utilizadas duas redes neurais do tipo "feedforward", contendo duas camadas ocultas. A primeira rede empregava como variáveis de entrada dados obtidos em linha: velocidade de evolução de dióxido de carbono, idade do caldo e concentrações de dois substratos empregados no meio suplementar durante a batelada alimentada. Como variável de saída era inferida a concentração celular. A segunda rede utilizava como entradas a velocidade de crescimento do microrganismo, a biomassa e a idade do caldo. O trabalho foi concentrado na modularização do processo, ou seja, empregaram uma rede neural para prever a velocidade de crescimento celular, a qual era utilizada como dado de entrada para uma segunda rede neural, que previa a produção de penicilina. Os resultados obtidos durante as etapas de treinamento e validação mostraram que as redes neurais empregadas foram capazes de capturar os complexos mecanismos envolvidos neste processo. Dessa forma, a rede poderia ser usada para fornecer informações em tempo real para ajudar na supervisão da produção industrial da penicilina.

Syu e Tsao (1993), aplicaram a técnica das redes neurais para prever o crescimento celular em cultivos empregando a bactéria *Klebsiella oxytoca* ATCC 13882 em batelada a partir dos experimentos realizados em frascos agitados, num total de 14 conjuntos,

empregando diferentes condições iniciais. Os dados foram divididos aleatoriamente em conjuntos e utilizados durante as fases de treinamento e validação. A rede empregada foi "feedforward" com topologia, 2-3-8. As variáveis de entrada foram concentrações iniciais de célula e glicose, e as de saída a concentração celular do cultivo ao longo do tempo. Uma nova função de transferência foi introduzida pelos autores, do tipo saturação. Os resultados obtidos mostraram que a rede neural foi capaz de fornecer bons resultados em situações de interpolação e extrapolação da base de dados.

Psichogios e Ungar (1992), apresentaram uma rede neural híbrida para modelagem de um biorreator batelada alimentada. O modelo neural híbrido combina equações de balanço que incorporam um certo conhecimento do processo que está sendo modelado com uma rede neural que estima parâmetros não conhecidos. A avaliação da rede neural híbrida é feita através da comparação com uma rede padrão e com outros estimadores, como filtro de Kalman estendido e programação não linear. A rede neural recebe como entrada as variáveis do processo e estima, neste caso, a velocidade de crescimento celular. A saída da rede serve como entrada para as equações de balanço, as quais geram as variáveis do processo no próximo instante. A combinação dos dois blocos produz a rede neural híbrida completa do sistema bioquímico.

Cruz (1996), desenvolveu um modelo matemático não estruturado para descrever o bioprocessamento de produção da penicilina G, pelo microrganismo *Penicillium chrysogenum* IFO 8644, em reator convencional operado em batelada alimentada. O modelo incorpora a influência da concentração do oxigênio dissolvido no caldo e das forças de cisalhamento devido à ação do impelidor sobre a produtividade do processo. Considera ainda uma cinética de inibição pelo excesso de substrato para a taxa de produção de antibiótico. O modelo descreveu bem o comportamento do processo, sendo capaz de prever um ponto de operação ótimo para a velocidade de agitação do biorreator. Uma rede de três camadas, do tipo "feedforward" foi empregada. Três configurações da rede foram testadas. A base de dados foi construída com o auxílio do modelo fenomenológico. Três técnicas de treinamento foram estudadas: Retropropagação, Busca Direta Aleatória e uma desenvolvida pelo autor (associando as características destas duas abordagens), sendo esta a que implicou em melhores resultados. As simulações realizadas mostraram excelentes ajustes aos dados em situações de interpolação, mesmo na presença de ruídos aleatórios simulados nas variáveis de operação. Resultados qualitativamente satisfatórios foram obtidos em extrapolações moderadas.

Kennedy *et al.* (1992), compararam redes neurais e planejamento fatorial como técnicas para a otimização do meio de cultura para a produção de lipídeos intracelulares por *Rhodotorula gracilis*. Investigaram três variáveis, melação, nitrato de amônio e extrato de levedura, em três níveis de concentrações e obtiveram como resposta, concentração celular, concentração de lipídios e concentração de açúcar residual. Foram requeridos 27 experimentos pelo planejamento fatorial completo para a análise das variáveis nas respostas. Por outro lado, utilizando uma rede com três camadas, 4 neurônios na camada oculta e utilizando uma base de 10 experimentos para o treinamento, foi possível estimar todas as demais situações que compreendem o planejamento fatorial completo. Isto significa que ao contrário dos 27 experimentos conduzidos pelo planejamento fatorial completo apenas 10 experimentos poderiam ter sido realizados e o resto das combinações serem estimados pela rede neural, representando, assim, 63% de redução dos experimentos a serem conduzidos.

Ferreira *et al.* (2000), utilizaram a técnica de redes neurais juntamente com a de planejamento fatorial para reduzir o número de ensaios requeridos por esta, no estudo da influência de algumas variáveis no crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum*. Investigando preliminarmente cinco fatores, em dois níveis, temperatura [20 e 30 °C], concentração de sacarose [12 e 28 g/L], concentração de sulfato de amônia [7 e 17 g/L], concentração de fosfato de potássio [10 e 20 g/L] e agitação em "shaker" [200 e 300 rpm],  $2^5+1$  ensaios foram requeridos pelo planejamento fatorial para estudar a influência destas variáveis na variação da concentração celular em 40 horas de fermentação. Utilizando uma rede neural de múltiplas camadas ("feedforward"), com 6 neurônios na camada oculta, um conjunto de 13 ensaios selecionados da matriz planejamento, para compor os dados a serem utilizados no treinamento da rede, foi possível simular os ensaios restantes do planejamento fatorial completo. Em um segundo estudo, onde se realizou um planejamento fatorial de quatro variáveis ( $2^4+1$  ensaios), em dois níveis, para analisar a influência das variáveis, temperatura [20 e 30 °C], concentração de glicose [15 e 35 g/L], concentração de sulfato de amônia [5,25 e 12,25 g/L] e agitação em shaker [200 e 300 rpm], na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) do fungo. Utilizaram uma rede neural de múltiplas camadas ("feedforward"), com 5 neurônios na camada oculta e com um conjunto de 9 ensaios selecionados da matriz planejamento, para compor os dados a serem utilizados no treinamento da rede, foi possível simular os ensaios restantes do planejamento fatorial completo. Portanto, nos dois casos estudados foi possível reduzir o número de ensaios do



planejamento fatorial utilizando redes neurais. Na primeira etapa uma redução de 60,6% e na segunda, 47% do número total de ensaios a serem conduzidos pelo planejamento fatorial. Portanto, para problemas com grande número de variáveis, como é o caso de um processo de fermentação, esta redução de tempo e material pode ser muito importante para conduzir um trabalho de otimização mais econômico, sem detrimento da confiabilidade.

## 2.9 Comentários Gerais

Os tópicos abordados durante esta revisão bibliográfica caracterizam o estado da arte em relação a vários aspectos sobre desenvolvimento dos bioprocessos de um modo geral, e em particular daqueles envolvendo a produção de compostos  $\beta$ -lactâmicos. Os trabalhos pesquisados, enfatizam o uso de biorreatores convencionais e não convencionais para cultivo de células livres e imobilizadas, utilizando para o desenvolvimento da biomassa e produção de cefalosporina C um meio de cultivo definido por Demain *et al.* (1963) e Shen *et al.* (1986).

No Laboratório de Engenharia Bioquímica de Departamento de Engenharia Química da UFSCar (São Carlos - SP), estudos com o microrganismo *C. acremonium* ATCC 48272, foram realizados e melhorias significativas no processo de produção de cefalosporina C foram obtidas. Araujo (1996), realizou estudos cinéticos do processo de produção de cefalosporina C empregando células livres e imobilizadas do microrganismo. Vários aspectos foram abordados, entre eles estudos com relação à limitação do processo pela transferência de massa (oxigênio). Tai (1996), realizou experimentos com o objetivo de avaliar algumas variáveis de operação do biorreator tipo torre na transferência de massa. Gomes *et al.* (1998), estudou a reologia do caldo de cultivo do microrganismo. Silva (1998), comparou o processo de produção do antibiótico cefalosporina C em biorreator convencional operado em batelada e em batelada alimentada, a diferentes vazões de meio suplementar contendo sacarose invertida. Almeida (1999), estendeu os estudos realizados por Silva (1998), ao biorreator tipo torre. Cruz (2000), estudou metodologias de inferência das variáveis de estado mais importantes do processo de produção de cefalosporina C a partir de dados disponíveis em linha. Para tanto implementou um sistema de aquisição de dados baseado em um controlador lógico programável e sistema supervisor. Estudos com biorreatores de membrana cerâmica para produção de cefalosporina C, foram realizados por Silva (2002) e Canto (2002). Trabalhos de modelagem e simulação, utilizando modelos

fenomenológicos encontram-se bem caracterizados com trabalhos de Araujo (1996), Cruz *et al.*(1999) e Cruz (2000) e utilizando redes neurais em trabalhos de Cruz (1996) e Cruz *et al.* (1998).

Nota-se pela revisão bibliográfica, que muitos estudos já foram realizados, mas nenhum especificamente priorizando o meio de cultivo ou estudos envolvendo os vários componentes que constituem esse meio. Isso significa que não há registro de estudos que considerem os efeitos de cada componente deste meio de cultivo, bem como as interações que podem existir entre estes componentes, no processo de produção de biomassa e de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. Daí a necessidade de se realizar um trabalho que envolva alguns componentes do meio de cultivo do processo de fermentação, de modo a identificar quais os componentes do meio de cultivo que apresentam efeitos mais significativos ou limitantes, estabelecer correlações entre eles e faixas de trabalho que conduzam a melhores resultados.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo, apresentam-se os materiais, equipamentos e procedimentos usados para a preparação e execução dos ensaios experimentais. Primeiramente, são apresentados os vários meios utilizados nas fermentações, uma vez que foram realizados ensaios preliminares, ensaios seguindo a metodologia estatística e ensaios de verificação em fermentador. Em seguida são apresentados os equipamentos e metodologias analíticas utilizadas. A parte de planejamento de experimentos, aborda a parte teórica sobre o respectivo assunto e a metodologia experimental empregada no presente trabalho, justificando a escolha das variáveis envolvidas e os planejamentos fatoriais desenvolvidos. Os ensaios relativos aos planejamentos de experimentos foram divididos em duas partes: otimização do meio para o crescimento de fungo e posteriormente a otimização do meio de produção do antibiótico cefalosporina C. Na parte final é abordada a fundamentação teórica sobre redes neurais e a metodologia utilizada para a modelagem do processo de crescimento do fungo utilizando esta técnica.

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Microrganismo**

Foi utilizada a linhagem de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 (C10), cedida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" - Campinas, São Paulo.

#### **3.1.2 Meios de Cultura**

Os reagentes usados nas análises, bem como os sais e todos os ingredientes utilizados nos meios de cultura, foram todos reagentes de grau analítico.

##### **3.1.2.1 Meio Sólido de Esporulação**

A composição do meio sólido empregado para o cultivo e preservação do microrganismo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 em tubos enclinados ("slants"),

foi baseada no meio utilizado por Shen *et al.* (1986) e são listados na Tabela 3.1, cujo pH da solução foi  $7,2 \pm 0,1$ .

Tabela 3.1: Composição do meio de cultura empregado para preservação do *C. acremonium*.

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
KCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
NaNO <sub>3</sub>	3,0
Extrato de levedura	4,0
Peptona	4,0
Ágar	20,0

### 3.1.2.2 Meio de Germinação e de preparo do Inóculo

A composição do meio de germinação está listada na Tabela 3.2 e foi baseada em meio definido por Demain *et al.* (1963), com algumas modificações feitas por Araujo (1996). Neste trabalho foi feita uma modificação na composição da solução de sais: o sal Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O utilizado no meio, por apresentar também uma fonte de nitrogênio, foi substituído FeCl<sub>2</sub>. O pH da solução foi  $7,0 \pm 0,1$ .

Tabela 3.2: Composição do meio de cultura empregado para preparo do germinado e inóculo do fungo *C. acremonium*.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	30,0
Ácido Oléico	1,5
DL-metionina	3,0
Acetato de Amônio	8,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,8
CaCO <sub>3</sub>	2,0
Solução concentrada de sais* = 50,0 mL/L	-

Continuação da Tabela 3.2

\* Composição da solução concentrada de sais:

Componentes	Concentração (g/L)
NaSO <sub>4</sub>	16,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,68
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	1,16
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,64
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,64
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04
FeCl <sub>2</sub>	0,16

### 3.1.2.3 Meio de Cultura para o Cultivo do *Cephalosporium acremonium* em Frascos Agitados e Fermentador

O meio utilizado nos ensaios realizados em frascos agitados e em fermentador de tanque agitado para ensaio de validação, está apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Composição do meio de cultura empregado nos experimentos com *C. acremonium* em frascos agitados e fermentador de tanque agitado.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	27,0
Sacarose	36,0
Ácido Oléico	1,5
DL-metionina	5,0
Acetato de Amônio	8,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,97
CaCO <sub>3</sub>	2,0
Solução concentrada de sais = 50,0 mL/L (Tabela 3.2)	

### 3.1.2.4 Meio de Cultura para Realização dos Experimentos Previstos no Planejamento Fatorial

As composições dos meios de cultivo para o acompanhamento do crescimento do microrganismo foi definido segundo a metodologia de planejamento experimental, descrita e discutida no item 3.2.3.1.1.

As composições dos meios de cultivo iniciais, para o acompanhamento da produção de antibiótico são mostrados na Tabela 3.4. Após a fase inicial o meio foi definido segundo a metodologia de planejamento experimental, mostradas e discutidas no item 3.2.3.1.2.

Tabela 3.4: Composição do meio de cultura empregado para a fase inicial dos experimentos para acompanhamento da produção de antibiótico.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	30,0
Ácido Oléico	0,4
DL-metionina	0,5
Acetato de Amônio	8,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0
CaCO <sub>3</sub>	2,0
Solução concentrada de sais = 20,0 mL/L (Tabela 3.2)	

### 3.1.2.5 Meio de Cultura Utilizado nos Experimentos Batelada Alimentada para Validação do Estudo de Otimização com Planejamento Fatorial

As composições dos meios de cultura, para ensaio realizado em fermentador de tanque agitado em regime de batelada alimentada, foram definidas a partir dos resultados dos ensaios conduzidos segundo a metodologia estatística aplicada (item 3.2.3.1.1 e 3.2.3.1.2). A Tabela 3.5 apresenta a composição do meio utilizado no período correspondente ao crescimento celular bem como a composição do meio suplementar. A

Tabela 3.6 apresenta a composição do meio suplementar utilizado no período correspondente à produção de antibiótico.

Tabela 3.5: Composição do meio de cultura empregado nos experimentos de fermentação em regime batelada alimentada.

Componentes do Meio Inicial	Concentração (g/L)
Glicose	4,5
Ácido Oléico	0,5
DL-metionina	0,5
Acetato de Amônio	2,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4/ \text{K}_2\text{HPO}_4$	1,2/3,0
$\text{CaCO}_3$	1,0
Solução concentrada de sais = 20,0 mL/L (Tabela 3.2)	
Componentes dos Meios Suplementares	Concentração (g/L)
Glicose*	100,0
Acetato de Amônio*	100,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4/ \text{K}_2\text{HPO}_4$ **	6,0/15,0
Solução concentrada de sais** = 60,0 mL/L Tabela 3.2	

\* Componente único em solução  
 \*\* Componentes em uma mesma solução

Tabela 3.6: Composição do meio de cultura suplementar empregado no experimento de fermentação em regime batelada alimentada.

Componentes dos Meios Suplementares	Concentração (g/L)
Sacarose*	100,0
DL-metionina*	50,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4/ \text{K}_2\text{HPO}_4$ **	6,0/15,0
Solução concentrada de sais** = 60,0 mL/L Tabela 3.2	

\* Componente único em solução  
 \*\* Componentes em uma mesma solução

### 3.1.3 Equipamentos

**a) Mesa Incubadora Rotativa:** As etapas de germinação, preparo do inóculo e os ensaios de fermentação, foram realizadas em câmaras de incubação rotativas Superhom G-25 e New Brunswick Scientific, com controle de temperatura e agitação.

**b) Bioreator:** O bioreator tipo tanque agitado e aerado utilizado foi um BioFlo III da New Brunswick de 5,0 L de volume útil, equipado com controle e monitoramento de temperatura, O<sub>2</sub> dissolvido e pH.

**c) Esterilização :** Os meios utilizados para a realização dos ensaios e todo o material que estaria em contato com o microrganismo (vidraria, e demais utensílios de usos diversos envolvidos na esterilização dos ensaios) foram esterilizados à 120°C, durante 20 minutos em autoclaves Fabber-Primar.

Para executar as manipulações com o meio e o microrganismo, em condições de assepsia, foi utilizada uma câmara de fluxo laminar da Veco, contendo bico de Bunsen e lâmpada germicida (UV).

**d) Medida de pH :** O pH das soluções preparadas e das amostras retiradas durante os ensaios foram medidos com auxílio de um medidor de pH de bancada B-271 da Micronal.

**e) Centrifugação e Conservação das amostras :** Utilizou-se uma centrífuga refrigerada da marca Eppendorf 5403, para separar as células do sobrenadante nas amostras coletadas durante os ensaios, cujo sobrenadante era armazenado em Ultra-Freezer Forma Scientific em temperatura de -50°C. Este, também era utilizado para preservar o microrganismo em criotubos.

**f) Espectrofotômetro :** Foi utilizado um espectrofotômetro da marca Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2000 para as análises de fósforo (azul de molibdênio) e glicose (DNS).

**g) Cromatógrafo Líquido de Alta Performance ("High Pressure Liquid Chromatograph"):** para a determinação das concentrações de sacarose, glicose e de cefalosporina C nos ensaios foi utilizado um cromatógrafo da marca Waters.



## **3.2 Metodologia**

### **3.2.1 Métodos Analíticos**

#### **3.2.1.1 Concentração Celular**

A concentração celular foi determinada a partir do procedimento de massa seca. Retirava-se um volume conhecido de amostra centrifugava-se durante 15 minutos a 8000 rpm e 6°C. Parte do sobrenadante era recolhido e armazenado em frascos a -50°C para posterior análise de açúcar, fósforo, nitrogênio e antibiótico. A massa compactada no tubo de centrífuga era tratada com solução de ácido acético (5% v/v) para dissolução dos sais (principalmente CaCO<sub>3</sub>) e centrifugada novamente durante 15 minutos a 8000 rpm e 6°C. O restante do sobrenadante era descartado e o volume compactado de biomassa era transferido para o recipiente, previamente pesado, e colocado na estufa a 105°C durante 24 horas.

#### **3.2.1.2 Concentração de Sacarose e Glicose**

A concentração de glicose, para as amostras que continham somente este açúcar, foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico, DNS (Miller, 1959). O sobrenadante, devidamente diluído, era submetido a análise lendo-se a absorvância em um espectrofotômetro a 540 nm.

Para as amostras que continham sacarose, glicose e frutose utilizou-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O sistema era provido com injetor rheodyne de 20 µL e bombas Waters 510 utilizando uma coluna de troca iônica da Shodex Ionpak KS-802-300 x 8 nm, pré-coluna Shodex Ionpak KS-G e detector Waters 410 usando como eluente água a uma vazão de 1 mL/min e temperatura controlada de 50 °C.

#### **3.2.1.3 Concentração de Nitrogênio**

O nitrogênio na forma de amônia, contido no sal acetato de amônio, foi determinado por destilação por arraste de vapor e quantificado estequiometricamente seguindo o procedimento proposto por Vogel (1989).

### 3.2.1.4 Concentração de Fósforo

A determinação da concentração de fósforo presente nas amostras foi feita pelo método colorimétrico do azul de molibdênio, seguindo o procedimento proposto por Vogel (1989), e a leitura da absorbância feita em espectrofotômetro à 830 nm.

### 3.2.1.5 Concentração de Cefalosporina C

A concentração de cefalosporina C foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com um sistema provido de injetor rheodyne de 20  $\mu$ L e bombas waters 510 utilizando uma coluna Nova-Park<sup>®</sup> C18 60  $\oplus$  4 $\mu$ m 3.9x150mm, pré-coluna Nova-Park<sup>®</sup> C18 60  $\oplus$  4 $\mu$ m 3.9x20 mm e detector Waters 486 ajustado no comprimento de onda de 254 nm usando como eluente solução tampão 1,36% (p/v) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1% (v/v) de acetronitrila, em pH = 6,0 ajustado com KOH 10 N, a uma vazão de 1 mL/min e temperatura de 30 °C.

O padrão de cefalosporina C foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Catalisis y Petróleo Química do CSIC, Madrid, Espanha. As curvas de calibração foram elaboradas a partir de soluções padrões conhecidas de cefalosporina C.

Os resultados foram obtidos em microcomputador utilizando o programa Millenium da Waters.

## 3.2.2 Procedimento Experimental

### 3.2.2.1 Conservação do Fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272

Foi desenvolvida e padronizada a metodologia para preservação do microrganismo em criotubos, mantidos no Ultra-freezer à -50°C. O procedimento experimental adotado foi baseado em metodologia proposta por Andrietta (1998).

Tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de esporulação (item 3.1.2.1), eram preparados a partir de criotubos e eram incubados em tubos de ensaios por um período de 7 dias a 28°C. Após este período de incubação, os tubos de ensaio eram preservados em

geladeira à 4°C. Estes tubos eram utilizados para o preparo do germinado e inóculo dos experimentos com o fungo.

A partir destes tubos de ensaio também foram preparados os criotubos. Utilizando-se 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9% p/v) foi preparada uma suspensão de esporos contidas em dois tubos de ensaio. Esta suspensão foi adicionada a 80 mL de meio de cultura de germinação, descrito no item 3.1.2.2, contido num erlenmeyer de 500 mL e cultivado por 48 horas em mesa incubadora rotativa a 28 °C a 250 rpm. Transferiu-se 20 mL do germinado para vários frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo 150 mL de meio de cultura de inóculo, descrito no item 3.1.2.2, e cultivados por 24 horas em mesa incubadora rotativa a 28 °C a 250 rpm. Então era adicionada 20% (v/v) de glicerol, como crioprotetor, que depois foram transferidas para criotubos que serem armazenados a -50 °C em ultrafreezer.

Esta metodologia de ativação das células provenientes de criotubos em meio sólido de esporulação foi adotada devido a problemas encontrados quando o conteúdo dos criotubos era adicionado diretamente ao meio de cultura para preparo de germinado, como aumento do tempo necessário para atingir alta concentração celular; presença de concentração de glicerol em concentrações repressoras da produção de cefalosporina C e maior quantidade de criotubos necessários para a preparação de germinado.

### **3.2.2.2 Preparação do Germinado**

Para cada tubo de ensaio contendo os esporos, era utilizado 5 mL de solução salina (NaCl à 0,9% v/v) para a suspensão dos esporos. A suspensão de esporos de dois tubos de ensaio eram adicionados em um erlenmeyer de 500 mL contendo 80,0 mL de meio de cultura de germinação, descrito no item 3.1.2.2 que eram incubados por 48 horas em mesa incubadora rotativa à 28°C e 250 rpm.

### **3.2.2.3 Preparação e Acompanhamento do Desenvolvimento do Inóculo**

Uma alíquota de 20 mL de germinado era adicionada a um erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL de meio do inóculo, como descrito no item 3.1.2.2, e incubados por 24 horas em mesa incubadora rotativa à 28°C e 250 rpm.

Com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento do inóculo, alíquotas de 10 mL de germinado eram adicionados a um erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de inóculo e incubados por 24 horas em mesa incubadora rotativa à 28°C e 250 rpm. O acompanhamento foi feito pela medida do crescimento celular, consumo de glicose, nitrogênio na forma de acetato de amônio e fósforo.

#### **3.2.2.4 Experimentos de Fermentação com *Cephalosporium acremonium* em Erlenmeyer e em Fermentador**

Para os ensaios padrão, em frascos agitados, para validação do estudo do planejamento fatorial, alíquotas de 10 mL de inóculo eram adicionados a um erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de produção, como descrito no item 3.1.2.3, a uma temperatura 28 °C, pH inicial 7,0±0,1 e mantidos a uma rotação de 250 rpm por um período de 144 horas. O acompanhamento foi feito pela medida do crescimento celular, consumo de glicose, de fósforo e de nitrogênio na forma de acetato de amônio.

Para o experimento em fermentador operando em regime batelada convencional (Bioflo III - New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ, EUA), foi utilizado 4,0 litros de meio de cultura conforme Tabela 3.3. Este meio foi inoculado com 400 mL de inóculo, a temperatura foi mantida em 28 °C e o oxigênio dissolvido foi controlado em 30% da saturação através da variação automática da velocidade de agitação entre 250 e 700 rpm e uma vazão de ar em 3 L/min por um período de 144 horas. O pH foi controlado em 7,0 com a adição automática de solução de NaOH 2 N e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N.

Todos os ensaios conduzidos segundo o planejamento fatorial foram realizados em regime descontínuo em mesa incubadora rotativa variando a concentração inicial dos nutrientes do meio de acordo com o previsto pelo planejamento, a uma temperatura de 28,0°C, pH inicial igual a 7,0 ± 0,1, com agitação de 250 rpm.

O volume total do meio de fermentação para o acompanhamento do crescimento do microrganismo nos ensaios da matriz planejamento, Tabela 3.9, foram de 60 mL (50 mL de meio para crescimento mais 10 mL de inóculo) em erlenmeyer de 500 mL.

Para o acompanhamento do crescimento do microrganismo nos ensaios da matriz planejamento, Tabelas 3.12 e 3.14, as fermentações foram realizadas com um volume total de 50 mL ( 45 mL de meio para crescimento mais 5 mL de inóculo ) em erlenmeyer de

500 mL. O acompanhamento das fermentações foi feito pela medida do crescimento celular, consumo de glicose, de fósforo e de nitrogênio na forma de acetato de amônio.

Para o acompanhamento da produção de antibiótico, as fermentações foram conduzidas em erlenmeyer de 500 mL com um volume 45 mL de meio de produção (Tabela 3.4) mais 5 mL de inóculo. Após aproximadamente 40 horas de fermentação, quando o meio atingia alta concentração celular e concentrações quase nulas de glicose e acetato de amônio, eram adicionados 5 mL de sacarose e DL-metionina de modo que as concentrações das variáveis em estudo atingissem os níveis definidos pelo planejamento, Tabela 3.16 e Tabela 3.17.

Para os experimentos em fermentador de tanque agitado Bioflo III, em regime batelada alimentada, foi utilizado um volume inicial de 2,5 litros de meio e um inóculo de 300 mL. A temperatura foi mantida em 28 °C e o oxigênio dissolvido em 30% da saturação através da variação automática da velocidade de agitação entre 250 e 700 rpm e uma vazão de ar em 3 L/min por um período de 144 horas. O pH foi controlado em 7,0 com a adição automática de solução de NaOH 2 N e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. O meio suplementar de crescimento, era adicionado ao fermentador seguindo uma vazão exponencialmente crescente no tempo de modo a manter as concentrações de glicose e acetato de amônio em torno de 4,5 e 2,5 g/L, respectivamente. Após 48 horas o meio suplementar de crescimento era trocado pelo meio suplementar de produção, o qual era adicionado também a uma vazão exponencialmente crescente no tempo de modo a manter as concentrações de sacarose e DL-metionina, em torno de 10,5 e 2,5 g/L, respectivamente. O meio suplementar contendo fósforo e os sais era adicionado em intervalos de tempo levando em consideração somente a diluição destes componentes no fermentador, ocorrida até o momento da adição.

### **3.2.3 Métodos Computacionais**

#### **3.2.3.1 Fundamentos Teóricos: Planejamento Fatorial**

A técnica do planejamento fatorial em dois níveis é de grande utilidade em investigações preliminares de uma pesquisa, isto é, em situações onde se deseja conhecer, por exemplo, a influência ou não de diversos fatores (variáveis) na variável resposta. Em um experimento com k fatores de dois níveis é requerida a realização de 2<sup>k</sup> ensaios diferentes; neste caso o planejamento é denominado fatorial completo, 2<sup>k</sup>. Cada fator é

constituído de dois níveis: baixo, geralmente denotado pelo sinal menos (-) ou por -1; e alto, denotado pelo sinal mais (+) ou por +1, o que corresponde a uma codificação das variáveis originais. Cada um desses experimentos, em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definido, é um ensaio experimental. A realização de  $2^k$  ensaios é o número mínimo, para se ter um planejamento fatorial completo. Devem ser acrescentados, ainda, ensaios em réplicas realizadas nas condições correspondentes às intermediárias entre as dos níveis atribuídos a cada variável (nível 0 ou ponto central do planejamento), com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios, e a partir daí avaliar a significância estatística dos efeitos. Cada ponto central é experimentado exatamente nas mesmas condições, sendo as diferenças entre seus valores, os resultados apenas de erros experimentais. A listagem dos ensaios com todas as possíveis combinações desses níveis é chamada de *matriz planejamento*. Para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, os ensaios devem ser realizados em ordem totalmente aleatória (Box *et al.*, 1978; Haaland, 1989).

Segundo Barros Neto *et al.* (1996) os ensaios no ponto central são extremamente importantes, pois o desleixo pode fazer com que os erros experimentais sejam muito subestimados. Se as repetições forem realizadas de forma imprópria, sem refletir a variabilidade total do processo, os erros parecerão menores do que na realidade são, podendo então o pesquisador ser induzido a tomar como significativos, efeitos que na verdade não existem. Segundo os mesmos autores a realização de repetições deve refletir também a variabilidade do processo em toda a faixa de estudo, e não apenas numa determinada combinação de níveis.

A codificação das variáveis independentes permite a comparação do efeito destas na resposta em estudo, diretamente a partir dos coeficientes do modelo em questão, e ela é feita usando a equação 3.1.

$$x = \frac{X - X_{pc}}{\frac{\Delta X}{2}} \quad (3.1)$$

onde:  $\Delta X = X_{+1} - X_{-1}$ ;  $x$  é a variável na unidade codificada,  $X$  é a variável na unidade original,  $X_{pc}$  é a variável na unidade original no ponto central e  $X_{+1}$  é o valor das variáveis em unidades originais nos respectivos níveis do planejamento.

A partir dos dados da matriz planejamento, pode-se calcular o efeito principal de cada variável na resposta em questão, assim como também calcular os efeitos de interações entre variáveis sobre esta resposta. Aqui, como na analogia da expansão em série de uma função, os efeitos principais das variáveis tendem a ser maiores que as interações entre duas variáveis, que por sua vez são mais importante que as interações entre três variáveis e assim por diante. Se alguns efeitos de interações dessas variáveis não são importantes, não é necessário fazer todos os ensaios do planejamento completo e sim, um planejamento fatorial fracionário.

O planejamento fracionário representa um subconjunto do fatorial completo. A primeira consequência desse procedimento é obviamente tornar idênticos alguns efeitos (contraste). As relações entre os vários contrastes são obtidos a partir da expressão definidora do fracionamento, conhecida como geratriz, ou relação geradora, do fatorial fracionário (Barros Neto *et al.* 1996).

Os fatoriais fracionários apresentam algumas características importantes: quando os contrastes não misturam, o efeito principal com interações de dois fatores e sim, com interações de três fatores, que em princípio devem ser menos significativos, diz-se que é um exemplo de fatorial fracionário de resolução quatro. Graças a isso e supondo-se que as interações de três fatores sejam mesmo desprezíveis, os valores dos contrastes deverão fornecer boas aproximações dos valores do efeito principal para cada fator, calculados no fatorial completo. Quando o efeito principal de cada fator está misturado somente com interações de quatro fatores e as interações de dois fatores se misturam com as de três, diz-se que é um exemplo de fatorial fracionário de resolução cinco. Outro tipo de planejamento fatorial fracionário é o de resolução três, que embora apresenta reduzido número de ensaios a serem realizados, produz contrastes que misturam efeito principal com interações de dois fatores, o que pode dificultar a análise dos resultados. Com a fragmentação do planejamento fatorial completo em fracionário, consegue-se estudar mais fatores com menos ensaios; obviamente existe um certo número máximo de variáveis que pode ser investigado. Quando esse limite é alcançado, diz-se que o planejamento está saturado (Box *et al.*, 1978, Myers *et al.*, 1976; Haaland, 1989).

Como foi dito anteriormente, os planejamentos fatoriais ortogonais, usando um número reduzido de experimentos por fator, são extremamente úteis quando a situação experimental é representada adequadamente por um modelo de 1ª ordem. Caso outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial queiram ser exploradas,

faz-se necessário recorrer a um modelo de 2ª ordem. Portanto para estimar os parâmetros do modelo de 2ª ordem, o planejamento de experimentos deverá ser ampliado. Uma alternativa é realizar um planejamento composto central, que é um planejamento fatorial de primeira ordem aumentado por pontos adicionais, para permitir a estimativa de coeficientes para o modelo de 2ª ordem (Box *et al.*, 1978, Myers *et al.*, 1976; Haaland, 1989). O número de ensaios adicionais será igual a  $2k$ , de níveis  $\pm \alpha$ . Essa expansão permite a estimativa de parâmetros para um modelo de segunda ordem. Portanto cada variável independente será medida em 5 níveis diferentes,  $\pm 1$ , 0 e  $\pm \alpha$ . Os níveis  $\pm \alpha$  são determinados pela equação 3.2.

$$\pm \alpha = \left(2^k\right)^{\frac{1}{4}} \quad (3.2)$$

onde  $k$  é o número de variáveis.

A metodologia de superfície de resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (Barros Neto *et al.*, 1996). A técnica de superfície de resposta pode ser aplicada a qualquer número de variáveis independentes e pode modelar simultaneamente várias respostas. Essa característica é importante em muitas situações práticas, sobretudo na indústria.

A equação 3.3 é utilizada para o cálculo dos efeitos, a partir da matriz planejamento que deve ser reescrita para conter as colunas de sinais de interações de fatores, usando os sinais algébricos que identificam o nível de cada fator. A essa matriz deve ser adicionada uma coluna de sinais positivos, que é usada para calcular a média de todos os ensaios. A essa nova tabela dá-se o nome tabela de coeficientes de contraste.

$$a_i = \left(\frac{1}{z}\right) x_C^t y \quad (3.3)$$



onde  $x_C^t$  é o vetor linha obtido pela transposição do vetor coluna  $x_C$  a partir da tabela de coeficientes de contraste e  $y$  a variável independente. No caso geral de um planejamento em dois níveis com  $k$  fatores, em que há um total de  $2^k$  ensaios, o divisor  $z$ , será  $2^{k-1}$  para os efeitos e  $2^k$  para a média.

No modelo estatístico a resposta observada no nível  $(x_1, \dots, x_k)$  é considerada como uma variável aleatória  $y(x_1, \dots, x_k)$ , que se distribui em torno de uma certa média populacional  $\eta(x_1, x_2)$ , com um certa variância populacional  $\sigma^2(x_1, \dots, x_k)$ . Ou seja:

$$y(x_1, \dots, x_k) = \eta(x_1, \dots, x_k) + \varepsilon(x_1, \dots, x_k) \quad (3.4)$$

onde  $\varepsilon(x_1, \dots, x_k)$  representa o erro aleatório com que as observações flutuam em torno da média populacional correspondente à combinação de níveis definida pelos valores de  $x_1, \dots, x_k$ .

O modelo estatístico especifica ainda que os erros aleatórios  $\varepsilon(x_1, \dots, x_k)$  são distribuídos independentemente, com média zero e com a mesma variância em todas as combinações de níveis. Uma análise dos resíduos é fundamental para se avaliar o grau de ajuste do modelo às observações. Num modelo bem ajustado o comportamento dos resíduos não deve destoar do que se esperaria dos erros aleatórios  $\varepsilon(x_1, \dots, x_k)$  postulados na formulação estatística representada pela equação 3.4.

O sistema de equações formado pela matriz planejamento pode ser representada de forma compacta por uma única equação matricial (equação 3.5).

$$\mathbf{y} = \mathbf{X} \mathbf{B} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (3.5)$$

onde :  $\mathbf{y}$  é o vetor coluna das respostas das observações,  $\mathbf{X}$  é a matriz completa das variáveis,  $\mathbf{B}$  é o vetor coluna dos coeficientes e  $\boldsymbol{\varepsilon}$  é o vetor coluna dos erros em torno das observações.

Os valores dos parâmetros podem ser calculados, resolvendo uma única equação matricial:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{y} \quad (3.6)$$

A equação 3.6 dá a solução geral para o ajuste de um modelo por mínimos quadrados, não importando quantas sejam as observações ou quantos parâmetros sejam necessários para caracterizar o modelo, desde que as matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  sejam ampliadas de forma adequada, ou seja, é preciso que a matriz  $\mathbf{X}'\mathbf{X}$  não seja singular (Himmelblau, 1970).

O exame dos resíduos é fundamental na avaliação da qualidade do ajuste de qualquer modelo. Esta avaliação pode ser feita construindo uma tabela ANOVA (Análise da Variância), Tabela 3.7.

A soma quadrática devido à regressão representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto em questão,  $\hat{y}_i$ , em relação à média global,  $\bar{y}$ ; a soma quadrática devido aos resíduos é a diferença entre o valor observado e o predito pelo modelo, a qual deve ser pequena, sugerindo que as previsões estão em boa concordância com as observações. Quando se tratar de um caso em que existirem observações repetidas, a expressão do resíduo pode ser decomposto algebricamente em dois termos: soma quadrática por falta de ajuste e soma quadrática devido a erro puro. O primeiro termo não está ligado ao modelo, refletindo apenas a dispersão das respostas repetidas ao redor de suas médias em cada nível e o segundo termo, depende do modelo e será tanto maior quanto mais as estimativas para um dado nível  $\hat{y}_i$  se afastarem do valor médio das respostas determinadas nesse nível.

Admitindo que os erros seguem uma distribuição normal, pode-se usar as médias quadráticas para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa através da equação 3.7.

$$\frac{MQ_R}{MQ_T} \approx F_{(p-1), (n-p)} \quad (3.7)$$

Para aplicar o teste basta comparar o valor de F calculado pela equação 3.7 com o valor encontrado em tabelas de distribuição F, no nível de confiança desejado. Se for verificado que o valor de F calculado for maior que o F tabelado, existem evidências estatísticas suficientes da existência de uma relação entre as variáveis dependentes e independentes. Pode acontecer, que uma regressão, embora significativa do ponto de vista de teste F, não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Sugeriu-se (Box e Wetz, 1973, *apud* Barros Neto, 1996) que, para uma regressão ser não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins

preditivos, o valor da razão  $MQ_R/MQ_r$  deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes o valor de F tabelado.

Tabela 3.7: Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados.  $n_i$  = número de repetições no nível  $i$ ;  $m$  = número de níveis distintos;  $n = \sum n_i$  = número total de observações;  $p$  = número de parâmetros do modelo (Barros Neto, 1996).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº. de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p-1$	$MQ_R = SQ_R/(p-1)$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n-1$	
% de variação explicada: $R^2 = SQ_R/SQ_T$		Correlação = $R^{1/2}$	
% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$			

No estudo da forma de uma superfície de resposta e localização das regiões de condições ótimas, é útil reduzir uma forma quadrática para a forma canônica. A análise canônica é um método que reescreve a equação de segunda ordem ajustada para verificar a natureza do ponto estacionário, isto é, se é um ponto de máximo, mínimo ou ponto de sela.

Considerando o modelo de 2ª ordem ajustado pela equação 3.8:

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{i \geq j}^k b_{ij} x_i x_j \quad (3.8)$$

a equação 3.8 pode ser reescrita na forma matricial, conforme equação 3.9:

$$y = b_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x} \quad (3.9)$$

onde:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_k \end{bmatrix} \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \dots \\ b_k \end{bmatrix} \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} b_{11} & \frac{1}{2}b_{12} & \dots & \frac{1}{2}b_{1k} \\ \frac{1}{2}b_{12} & b_{22} & \dots & \frac{1}{2}b_{2k} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \frac{1}{2}b_{1k} & \frac{1}{2}b_{2k} & \dots & b_{kk} \end{bmatrix}$$

Observa-se na equação 3.9 que  $\mathbf{x}'\mathbf{b}$  são os termos de primeira ordem na função de respostas e  $\mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}$  é a contribuição quadrática.

O ponto estacionário da superfície ajustada, será um conjunto de condições em  $(x_1, x_2, \dots, x_k)$ , tal que as derivadas  $\partial y/\partial x_1, \partial y/\partial x_2, \dots, \partial y/\partial x_k$  sejam simultaneamente iguais a zero. A derivada de  $y$  com respeito ao vetor  $\mathbf{x}$  é dada pela equação 3.10 e conjunto solução pela equação 3.11.

$$\frac{\partial y}{\partial \mathbf{x}} = \frac{\partial}{\partial \mathbf{x}} [b_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}] = \mathbf{b} + 2\mathbf{B}\mathbf{x} = 0 \quad (3.10)$$

$$\mathbf{x}_0 = -\frac{1}{2}\mathbf{B}^{-1}\mathbf{b} \quad (3.11)$$

A natureza do ponto estacionário é determinada através dos sinais e magnitudes dos autovalores,  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ , da matriz  $\mathbf{B}$ . Se estes autovalores são todos negativos, o ponto estacionário representa um ponto de resposta máxima para a superfície ajustada. Se todos os autovalores são positivos, o ponto estacionário representa um ponto de resposta mínima para a superfície ajustada. No caso onde os autovalores apresentam sinais contrários, o ponto estacionário é um ponto de sela.

### 3.2.3.1.1 Análise do Efeito da Composição do Meio na Velocidade Específica Máxima de Crescimento ( $\mu_{\max}$ )

**a) Meio Específico I:** Seis variáveis foram inicialmente selecionadas para o estudo de seus efeitos na velocidade específica máxima de crescimento celular, utilizando a técnica estatística do planejamento fatorial em dois níveis. As variáveis, concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais, bem como os níveis de concentrações estudados estão apresentados na Tabela 3.8. As faixas dos valores estudados das variáveis estão dentro daquelas usadas por alguns pesquisadores (Demain *et al.* 1963; Shen *et al.*, 1986; Araujo, 1996; Silva, 1998; Cruz, 2000).

Tabela 3.8: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	Nº	Definição	Nível		
			-1	0	+1
G	1	Glicose (g/L)	15,0	25,0	35,0
N	2	Acetato de Amônio (g/L)	5,0	9,0	13,0
P	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)*	1,0/2,5 <sup>0,672</sup>	2,0/5,0 <sup>1,344</sup>	3,0/7,5 <sup>2,016</sup>
Met	4	DL-metionina (g/L)	1,5	3,0	4,5
Olei	5	Ácido Oléico (g/L)	0,5	1,0	1,5
Sais	6	Solução de Sais (mL/L)	20,0	40,0	60,0

\* Valores sobrescritos correspondem à quantidade de fósforo (P) total.

As equações 3.12 a 17 representam as equações de codificações das variáveis estudadas, obtidas a partir da equação 3.1.

$$G_{\text{cod.}} = \frac{G - 25,0}{10,0} \quad (3.12)$$

$$N_{\text{cod.}} = \frac{N - 9,0}{4,0} \quad (3.13)$$

$$P_{\text{cod.}} = \frac{P - 1,344}{0,672} \quad (3.14)$$

$$\text{Met}_{\text{cod.}} = \frac{\text{Met} - 3,0}{1,5} \quad (3.15)$$

$$\text{Olei}_{\text{cod.}} = \frac{\text{Olei} - 1,0}{0,5} \quad (3.16)$$

$$\text{Sais}_{\text{cod.}} = \frac{\text{Sais} - 40,0}{20,0} \quad (3.17)$$

Utilizando a técnica do planejamento fatorial completo em dois níveis, seriam necessários 64 ensaios para analisar os efeitos principais e de interações entre as variáveis em estudo sobre a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ), determinada como descrita no item 3.2.3.3. Portanto um planejamento fatorial fracionário de resolução quatro foi proposto, totalizando 16 ensaios, cujas relações geradoras foram: I = 1345 e I = 2346. A Tabela 3.9 mostra a matriz planejamento resultante, onde mais três ensaios, no ponto central das variáveis, foram adicionadas à matriz, para estimativa do erro experimental.

Como foi dito anteriormente os fatoriais fracionários de resolução IV confundem alguns efeitos. As relações entre os contrastes calculados a partir da fração  $2_{IV}^{6-2}$  são mostrados na Tabela 3.10.

Tabela 3.9: Matriz Planejamento Fatorial Fracionário  $2_{IV}^{6-2}$  realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Níveis					
	G	N	P	Met	Olei	Sais
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	+1	-1
4	-1	-1	+1	+1	-1	-1
5	+1	+1	-1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1	-1
7	+1	-1	-1	+1	-1	+1
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1
11	+1	-1	+1	-1	-1	+1
12	-1	-1	+1	-1	+1	+1
13	+1	+1	-1	-1	+1	+1
14	-1	+1	-1	-1	-1	+1
15	+1	-1	-1	-1	+1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0

Tabela 3.10: Relações entre os contrastes da fração  $2_{IV}^{6-2}$ .

Relação entre as colunas de sinais		Contraste da Fração $2_{IV}^{6-2}$
1 = 345	2 = 346	$l_1 \rightarrow 1 + 345$
3 = 145	3 = 246	$l_2 \rightarrow 2 + 346$
4 = 135	4 = 236	$l_3 \rightarrow 3 + 145 + 246$
5 = 134	6 = 234	$l_4 \rightarrow 4 + 135 + 236$
13 = 45	23 = 46	$l_5 \rightarrow 5 + 134$
14 = 35	24 = 36	$l_6 \rightarrow 6 + 234$
15 = 34	26 = 34	$l_{13} = l_{45} \rightarrow 13 + 45$
I = 1345	I = 2346	$l_{14} = l_{35} \rightarrow 14 + 35$
		$l_{15} = l_{34} = l_{26} \rightarrow 15 + 34 + 26$
		$l_{24} = l_{36} \rightarrow 24 + 36$
		$l_{23} = l_{46} \rightarrow 23 + 46$

**b) Meio Específico II:** Um segundo planejamento foi proposto a partir das variáveis consideradas mais significativas no planejamento anterior: concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-Metionina. As variáveis ácido oléico e solução de sais foram mantidas nos níveis inferiores do planejamento anterior para todos os próximos ensaios. Os níveis das demais variáveis foram deslocados para uma nova região de experimentação, como sugerido pelo planejamento anterior. Novamente, aqui a variável dependente foi a velocidade específica máxima de crescimento. A Tabela 3.11 mostra as variáveis bem como os níveis de concentrações estudados.

Tabela 3.11: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	Nº	Definição	Nível		
			-1	0	+1
G	1	Glicose (g/L)	10,0	15,0	20,0
N	2	Acet. Amônio (g/L)	5,0	7,0	9,0
P	3	$KH_2PO_4 / K_2HPO_4$ (g/L)*	0,8/2,0 <sup>0,54</sup>	1,2/3,0 <sup>0,82</sup>	1,6/4,0 <sup>1,1</sup>
Met	4	DL-metionina (g/L)	0,5	1,0	1,5
Olei	5	Ácido Oléico (g/L)		0,50	
Sais	6	Solução de Sais (mL/L)		20,0	

\* Valores sobrescritos correspondem à quantidade de fósforo (P) total.

Um conjunto de ensaios determinados por um planejamento fatorial  $2^4$  completo, acrescido de quatro ensaios no ponto central dos níveis das variáveis foi realizado, totalizando 20 ensaios conforme mostrado na Tabela 3.12. As equações de codificação das variáveis são apresentadas a seguir:

$$G_{\text{cod.}} = \frac{G - 15.0}{5.0} \quad (3.18)$$

$$N_{\text{cod.}} = \frac{N - 7.0}{2.0} \quad (3.19)$$

$$P_{\text{total cod.}} = \frac{P - 0.82}{0.28} \quad (3.20)$$

$$\text{Met}_{\text{cod.}} = \frac{\text{Met} - 1.0}{0.5} \quad (3.21)$$

Tabela 3.12: Matriz Planejamento Fatorial Completo  $2^4$  realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Níveis			
	G	N	P	Met
1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1
3	+1	-1	+1	+1
4	-1	-1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1
6	-1	+1	-1	+1
7	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	-1
11	+1	-1	+1	-1
12	-1	-1	+1	-1
13	+1	+1	-1	-1
14	-1	+1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0



**c) Meio Específico III:** Um terceiro planejamento foi proposto a partir das variáveis consideradas mais significativas no planejamento anterior: concentração de glicose, acetato de amônio. A variável concentração de fósforo e DL-metionina foram mantidas respectivamente, no nível central e inferior do planejamento para todos os próximos ensaios. Os níveis das variáveis concentração de glicose e de acetato de amônio foram deslocados para uma nova região de experimentação, como sugerido pelo planejamento anterior. Novamente aqui a variável dependente foi a velocidade específica máxima de crescimento. A Tabela 3.13 mostra as variáveis, bem como os níveis de concentrações estudados.

Um planejamento fatorial composto central  $2^2 + 4$  (pontos axiais) + 4 (ponto central) foi realizado, totalizando 20 ensaios, com réplicas nos ensaios relativos ao fatorial  $2^2$  e aos pontos axiais, conforme mostrado na tabela 3.14. As equações 3.22 e 3.23 representam as equações de codificações das variáveis em estudo.

Tabela 3.13: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	Nº	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
G	1	Glicose (g/L)	3,0	4,0	6,5	9,0	10,0
N	2	Acet. Amônio (g/L)	1,9	2,5	4,0	5,5	6,1
P	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)*			1,2/3,0 <sup>0,82</sup>		
Met	4	DL-metionina (g/L)			0,50		
Olei	5	Ácido Oléico (g/L)			0,50		
Sais	6	Solução de Sais (mL/L)			20,0		

\* Valores sobrescritos correspondem à quantidade de fósforo (P) total.

$$G_{\text{cod.}} = \frac{G - 6,5}{2,5} \quad (3.22)$$

$$N_{\text{cod.}} = \frac{N - 4,0}{1,5} \quad (3.23)$$

Tabela 3.14: Matriz Planejamento Fatorial Composto Central realizado para estudo influência das variáveis concentração de glicose = G e de acetato de amônio = N do crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível	
	G	N
1	+1	+1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	-1	-1
5	+1,4142	0
6	-1,4142	0
7	0	+1,4142
8	0	-1,4142
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

**c) Meio Específico IV:** Um quarto planejamento foi proposto com as mesmas variáveis do planejamento anterior, concentração de glicose e de acetato de amônio, mas para níveis diferentes uma vez que os resultados obtidos anteriormente não se ajustaram adequadamente ao modelo de 2ª ordem. Os níveis das variáveis foram deslocados para uma nova região de experimentação, como sugerido pelo planejamento anterior. Novamente, aqui a variável dependente foi a velocidade específica máxima de crescimento. A Tabela 3.15 mostra as variáveis bem como os níveis de concentrações estudados.

Tabela 3.15: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	Nº	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
G	1	Glicose (g/L)	0,5	1,5	4,0	6,5	7,5
N	2	Acet. Amônio (g/L)	0,4	1,0	2,5	4,0	4,6
P	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)*			1,2/3,0 <sup>0,82</sup>		
Met	4	DL-metionina (g/L)			0,50		
Olei	5	Ácido Oléico (g/L)			0,50		
Sais	6	Solução de Sais (mL/L)			20,0		

\* Valores sobrescritos correspondem à quantidade de fósforo (P) total.

Um planejamento fatorial composto central,  $2^2+4+3$ , foi realizado totalizando 19 ensaios, com réplicas nos ensaios relativos ao fatorial  $2^2$  e aos pontos axiais, conforme mostrado na Tabela 3.14. As equações 3.24 e 3.25 representam as equações de codificações das variáveis em estudo.

$$G_{\text{cod.}} = \frac{G - 4,0}{2,5} \quad (3.24)$$

$$N_{\text{cod.}} = \frac{N - 2,5}{1,5} \quad (3.25)$$

### 3.2.3.1.2 Análise do Efeito da Composição do Meio na Velocidade Específica de Produção de Antibiótico ( $\mu_p$ )

Duas variáveis foram selecionadas para o estudo de seus efeitos na velocidade específica de produção de antibiótico, utilizando a técnica estatística do planejamento fatorial em dois níveis. As variáveis concentração de sacarose = S e de DL-metionina = Met bem como os níveis de concentrações estudados estão apresentados na Tabela 3.16. As faixas dos valores estudados das variáveis estão dentro daquelas usadas por alguns pesquisadores (Demain *et al.* 1963; Shen *et al.*, 1986; Araujo, 1996; Silva, 1998; Cruz, 2000).

Tabela 3.16: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências na produção de cefalosporina C pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	Nº	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
<b>Planejamento 1</b>							
S	1	Sacarose (g/L)	-	8,0	13,0	18,0	-
Met	2	DL-Metionina (g/L)	-	1,5	3,0	4,5	-
<b>Planejamento 2</b>							
S	1	Sacarose (g/L)	2,8	4,0	7,0	10,0	11,2
Met	2	DL-Metionina (g/L)	0,9	1,5	3,0	4,5	5,1

Primeiramente um planejamento fatorial  $2^2$  completo (com réplicas), acrescido de 4 ensaios relativos aos pontos centrais totalizando 10 ensaios, foi realizado conforme mostrado na Tabela 3.17. As equações 3.26 e 27 representam as equações de codificações

das variáveis estudadas para planejamento 1 definido na Tabela 3.16. Um segundo planejamento foi proposto a partir das conclusões do planejamento anterior. Um planejamento fatorial composto central,  $2^2+4+3$  totalizando 19 ensaios foi realizado conforme mostrado na Tabela 3.17. As equações 3.27 e 3.28 representam as equações de codificações das variáveis estudadas para o planejamento 2 definido na Tabela 3.16..

Tabela 3.17: Matriz Planejamento Fatorial Composto Central realizado para estudo influência das variáveis concentração de sacarose = S e de DL-metionina = Met na produção de cefalosporina C pelo fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível	
	G	Met
1	+1	+1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	-1	-1
5	+1,4142	0
6	-1,4142	0
7	0	+1,4142
8	0	-1,4142
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

$$S_{\text{cod.}} = \frac{S - 13,0}{5,0} \quad (3.26)$$

$$\text{Met}_{\text{cod.}} = \frac{\text{Met} - 3,0}{1,5} \quad (3.27)$$

$$S_{\text{cod.}} = \frac{S - 7,0}{3,0} \quad (3.28)$$

Levando-se em conta que a realização dos experimentos seria conduzida em "shakers" e com vários erlemmeyers, procurou-se padronizar o procedimento experimental. Os ensaios foram realizados aleatoriamente. O software Statistica (Statsoft, v. 5.0) foi utilizado para a análise dos resultados e o nível de significância em todos os testes aplicados foram de 95%. Os cálculos para a análise canônica foram feitos em programação computacional implementado em Maple V (v. 5.0).

### 3.2.3.2 Fundamentos Teóricos: Redes Neurais

As redes neurais artificiais nada mais são do que pequenos módulos que simulam o funcionamento de um neurônio. Estes módulos devem funcionar de acordo como os elementos em que foram inspirados, recebendo e retransmitindo informações. As redes neurais artificiais são uma descrição genérica para uma ampla classe de modelos computacionais inspirados na estrutura e comportamento de neurônios reais. Como o cérebro, elas podem reconhecer modelos, reorganizar dados e, mais interessante, aprender comportamentos dinâmicos complexos de sistemas físicos (Lau, 1990).

Os modelos artificiais desenvolvidos podem ser arranjados ordenadamente para construir as chamadas redes neurais artificiais, ou simplesmente redes neurais. Várias arquiteturas podem ser obtidas, destacando-se três tipos como sendo as mais comumente empregadas, que são as redes de múltiplas camadas, onde a informação segue uma única direção, a rede recursiva e a rede com conexões laterais (Baughman e Liu, 1995). O tipo de rede neural mais utilizada no campo da engenharia química é a rede neural múltiplas camadas e uma revisão sobre o assunto é encontrada nos trabalhos de Lau (1990), Werbos (1990) e Hussain (1999).

A Figura 3.1 mostra o esquema de uma rede neural de múltiplas camadas. A rede contém uma camada de entrada, por onde as informações como concentrações e variáveis operacionais importantes do processo são alimentadas, uma camada oculta e uma camada de saída onde se obtém as respostas do sistema. Após os sinais entrarem nos neurônios, ocorre um somatório dos sinais de entrada ponderados pelos pesos associados a cada um, seguido de aplicação de uma função de ativação ao resultado obtido da somatória. As funções de ativação, sigmóide e tangente hiperbólica são comumente usadas em processos bioquímicos (Thibault *et al.*, 1990;).

A maioria dos modelos de redes neurais possuem alguma regra de treinamento, onde os pesos de suas conexões são ajustados de acordo com os padrões apresentados. Em outras palavras, elas aprendem através de exemplos. Arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas, com unidades que podem estar conectadas às unidades da camada posterior. A rede neural passa por um processo de treinamento a partir dos casos reais conhecidos, adquirindo, a partir daí, a sistemática necessária para executar adequadamente o processo desejado dos dados fornecidos. Sendo assim, a rede neural é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais, diferindo da computação

programada, onde é necessário um conjunto de regras rígidas pré-fixadas e algoritmos (Haykin, 1999).

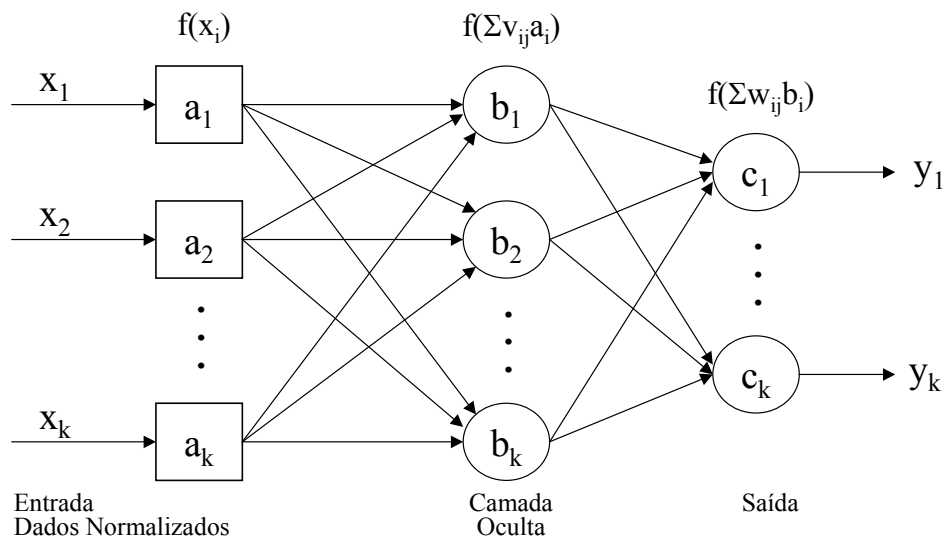


Figura 3.1: Rede Neural de múltiplas camadas ("Feedforward"), com uma camada oculta, onde  $x_i$  são as variáveis de entrada,  $f(\cdot)$  é a função de ativação,  $v_{ij}$  e  $w_{ij}$  pesos das conexões dos neurônios entre as camadas e  $y_i$  a resposta desejada.

O primeiro passo no treinamento da rede neural consiste em se definir as variáveis a serem utilizadas como entrada(s) e saída(s) para rede. Essa escolha é um dos itens de grande importância para se alcançar sucesso na utilização da técnica. O segundo passo reside na definição do número de camadas ocultas e do número de neurônios (elementos processantes) de cada camada, além da definição da função de ativação a ser utilizada em cada elemento. A próxima etapa consiste na elaboração da base de dados, que será utilizada durante a etapa de treinamento ou aprendizado da rede, e da escolha de um algoritmo de treinamento (Cruz, 1996).

O algoritmo da retropropagação (Rumelhart e McClelland, 1986) é bastante utilizado em redes neurais múltiplas camadas e ele é baseado na técnica do gradiente descendente e a função mais comumente empregada para realizar o ajuste dos pesos da rede é a soma dos quadrados dos erros (SQE). A adaptação dos pesos da rede inicia-se com um valor arbitrário e vai sendo alterado à medida que a função SQE é minimizada. No algoritmo da retropropagação o parâmetro  $\eta$  (taxa de aprendizado), que controla a estabilidade e a taxa de convergência, pode ser reduzido durante o treinamento para

diminuir os efeitos de ruídos sobre a correção dos pesos, ou pode ter seu valor aumentado para acelerar o processo de treinamento. Outro parâmetro é o termo do momento ( $\alpha$ ), que é um peso extra adicionado quando estes são ajustados, melhorando a taxa de treinamento (Widrow & Lehr, 1990).

A fase de aprendizado da rede neural é de grande importância. Devido à necessidade de sucessivas repetições dos padrões de entrada-saída para a rede, grande quantidade de tempo pode ser requerida nesta etapa. É nesta fase também que podem surgir problemas como o sobre-treinamento "overfitting", mínimo local da rede, além de dificuldades de convergência. A fase mais onerosa no emprego da técnica encontra-se na etapa de treinamento da rede. Existem na literatura propostas de algoritmos para superar e/ou evitar estes problemas (Baughman e Liu, 1995).

O modelo da rede neural a ser empregada aqui é um do tipo "feedforward", com uma camada de entrada, uma oculta e uma de saída. As variáveis escolhidas como entrada da rede neural foram as concentrações de glicose, acetato de amônio, fósforo, DL-metionina, ácido oléico e solução de sais e a variável de saída a velocidade específica máxima de crescimento. Desta forma, a topologia da rede incluía 6 entradas e uma saída.

O algoritmo da retropropagação (Rumelhart *et al.*, 1986) foi empregado para o treinamento da rede. A função objetivo empregada durante a fase de treinamento foi a soma dos quadrados dos desvios entre a velocidade específica máxima de crescimento na saída da rede e os valores experimentais, sobre todo o conjunto de dados.

A primeira etapa para a utilização desta técnica consiste na definição do número de neurônios ( $\phi$ ) na camada oculta e na elaboração da base de dados que será empregada para o treinamento da rede. Numa segunda etapa, determina-se o parâmetro  $\eta$  (taxa de aprendizado) e o parâmetro termo do momento,  $\alpha$ . Para a etapa de treinamento da rede empregou-se taxa de aprendizado e termo de momento, 0,7 e 0,9, respectivamente, valores estes comumente citados na literatura (Rumelhart *et al.*, 1986; Widrow e Lehr, 1990; Hoskins e Himmelblau, 1988). A função de ativação utilizada nos neurônios foi a sigmoideal (Bhat e Mc Avoy, 1990). Dados experimentais obtidos a partir dos vários planejamentos experimentais realizado serão selecionados para compor a base de dados para o treinamento da rede e validação do modelo.

### 3.2.3.3 Fundamentos Teóricos e Métodos de Cálculo sobre a Velocidade Específica Máxima de Crescimento do Microrganismo ( $\mu_{\max}$ )

O crescimento microbiano em processos batelada apresenta um comportamento cinético transiente, caracterizado pela existência das fases “lag”, exponencial, estacionária e de declínio. A existência e duração da fase exponencial de crescimento num cultivo descontínuo, é talvez uma das questões que geram maior controvérsia devido principalmente às diferentes interpretações de um mesmo conjunto de dados experimentais, que são feitas por diferentes pesquisadores.

Após a fase "lag", onde nenhum aumento no número de células é evidente, há um período de crescimento rápido, durante o qual o número de células aumenta exponencialmente com o tempo, pois a população microbiana está bem adaptada ao novo ambiente. Na fase exponencial, a velocidade específica de crescimento é máxima e constante. É sabido que durante esta fase, a composição química, as atividades metabólicas, assim como a fisiologia das células se mantêm constantes. O crescimento é chamado balanceado neste estágio do cultivo, que dura até que o nível de algum nutriente se torne limitante ou até que a concentração de alguma toxina atinja valores inibitórios de modo que o valor da velocidade específica de crescimento não possa ser mantido no máximo (Bailey & Ollis, 1986). A equação 3.29 descreve o aumento da concentração celular durante este período.

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (3.29)$$

como  $\mu = \text{constante} = \mu_{\max}$ , integrando resulta em:

$$C_x = C_{x_0} \cdot e^{[\mu_{\max}(\Delta t)]} \quad (3.30)$$

onde:  $C_x$  é a concentração celular,  $C_{x_0}$  concentração celular inicial em  $t_0$ , tempo inicial da fase exponencial.

Neste trabalho o valor da velocidade específica máxima de crescimento para cada ensaio, foi estimada pelo ajuste da equação 3.30 aos dados experimentais da concentração celular variando ao longo do tempo, utilizando para o ajuste não-linear o Método Quasi-Newton (Davis, 1984), implementado no “software” Statistica (v. 5.0).



Por dependerem do microrganismo utilizado e das condições em que foram realizados os experimentos, encontra-se na literatura uma grande variedade de valores dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo de produção de cefalosporina. Na Tabela 3.18 são listados alguns parâmetros e seus valores citados por alguns autores.

Tabela 3.18: Parâmetros cinéticos, estimados por vários pesquisadores.

REFERÊNCIAS	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g <sub>cél</sub> /g <sub>subst</sub> )
Chu e Constantinides, 1988	0,04526	0,46188
Matsumura et al., 1981	0,069	0,45
Araujo et al., 1996	0,0645	0,655
Cruz et al., 1998	0,0671	0,599

### 3.2.3.4 Fundamentos Teóricos e Métodos de Cálculo sobre a Velocidade Específica de Produção de Cefalosporina C ( $\mu_p$ )

Muitos processos bioquímicos envolvem crescimento em batelada, como ocorre numa fermentação levada a termo em um frasco Erlenmeyer. Considerando que aqui o volume se mantém constante e as concentrações de nutrientes, células e produtos variam com o tempo, é possível determinar a cada instante as velocidades de consumo de substrato, de formação de produto e de crescimento do microrganismo. Partindo da hipótese de que a concentração de células é uma boa medida responsável por toda o mecanismo da produção do antibiótico, pode-se calcular a velocidade específica de formação de antibiótico, conforme a equação (3.31) (Gaden, 1955; apud Schmidell, *et al.* 2001):

$$\mu_p = \frac{1}{C_x} \frac{dC_p}{dt} \quad (3.31)$$

como  $\mu_p = \text{constante}$ , integrando resulta em:

$$C_p = \mu_p C_x (t - t_o) + C_{p_o} \quad (3.32)$$

onde  $\mu_p$  é a velocidade específica de formação de produto ou de produção de antibiótico,  $C_x$  e a concentração celular, considerada aqui, a média aritmética no decorrido período de tempo ( $t_0$  à  $t$ ) em questão,  $C_p$  é a concentração de antibiótico e  $C_{p_0}$  é a concentração inicial de antibiótico no tempo inicial de produção considerado.

Neste trabalho o valor da velocidade específica de produção de antibiótico para cada ensaio, foi estimada pelo ajuste da equação 3.32 aos dados experimentais da concentração de antibiótico variando ao longo do tempo considerando uma concentração celular média neste período de tempo, utilizando para o ajuste o Método Quasi-Newton, (Davis, 1984), implementado no “software” Statistica (v.5.0).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Ensaios preliminares

#### 4.1.1 Crescimento do *Cephalosporium acremonium* no Preparo do Inóculo

As concentrações iniciais dos componentes do meio de cultura para cada ensaio realizado, eram definidas a partir do planejamento fatorial. Como estes ensaios eram inoculados a partir de um meio contendo estes componentes e no sentido de se padronizar ao máximo os procedimentos experimentais, o inóculo responsável pelo início da etapa de fermentação tornou-se um fator importante. Portanto, fez-se necessário um estudo para o acompanhamento do desenvolvimento do inóculo, para um conhecimento prévio das concentrações de células, glicose, acetato de amônio e fósforo para um período de tempo. A Figura 4.1 mostra as concentrações médias de células, glicose, acetato de amônio e fósforo para dois ensaios realizados por um período de 31 horas. Pode-se observar na Figura 4.1 que no tempo de 24 horas, o meio contém cerca de 14 g/L de glicose, 4 g/L de acetato de amônio, 1,8/4,6 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 13 g/L de células e o processo encontra-se em fase de crescimento exponencial. Portanto, adotou-se este tempo de cultivo para o inóculo em todos os ensaios.

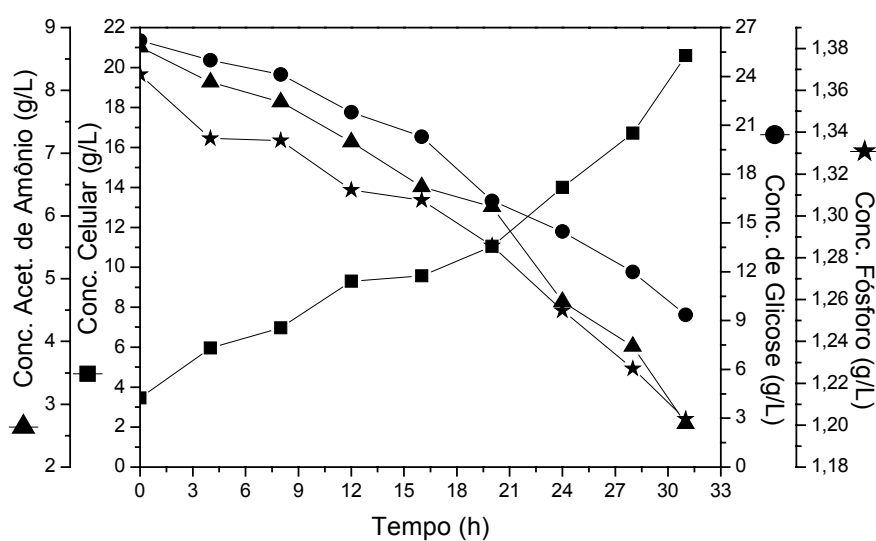


Figura 4.1: Comportamento do crescimento celular, consumo de glicose, acetato de amônio e fósforo pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, realizada a 28°C e 250 rpm.

A Tabela 4.1 apresenta dados relativos a vários ensaios realizados de preparo de inóculo para determinar os valores das concentrações de células, glicose, acetato de amônio e fósforo com respectivos intervalos de confiança, para um período de 24 horas. Os valores da média de concentração de glicose, acetato de amônio e fósforo foram utilizados para o preparo do meio de fermentações com o intuito de se obterem valores de concentrações iniciais o mais próximo do estabelecido pelo planejamento fatorial.

Tabela 4.1: Valores de concentração celular, glicose, acetato de amônio e fósforo; média e respectivos intervalos de confiança do crescimento do inóculo pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, realizada a 28°C e 250 rpm, por um período de 24 horas.

Ensaio	Conc. Celular (g/L)	Conc. Glicose (g/L)	Conc. Acet. de Amônio (g/L)	Conc. Fósforo (g/L)*	Conc. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Conc. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)
1	10,2733	14,3221	3,0832	1,2569	1,8632	4,6831
2	10,6519	12,5765	3,4933	1,2750	1,9044	4,7337
3	13,4162	9,9681	2,2230	1,2016	1,7866	4,4706
4	10,4232	13,5055	3,8109	1,1895	1,7472	4,4530
5	9,3657	14,9778	4,3987	1,2907	1,9279	4,7920
6	12,7194	13,9572	4,4460	1,2318	1,8298	4,5848
7	10,5994	14,6394	3,6206	1,3614	2,0157	5,0756
8	10,2167	14,3827	4,6371	1,2118	1,7949	4,5175
9	10,5241	14,5547	3,2631	1,2506	1,8560	4,6568
10	9,4385	15,8386	4,2922	1,4136	2,1233	5,2334
Intervalo de confiança						
	Nº Casos	Média	-95%	+95%	Variância	Desvio Padrão
Conc. Celular (g/L)	10	10,7628	9,8294	11,6962	1,70262	1,30484
Conc. Glicose (g/L)	10	13,8722	12,7121	15,0323	2,62989	1,62169
Conc. Acet. de Amônio (g/L)	10	3,7268	3,1893	4,2642	0,56450	0,75133
Conc. Fósforo (g/L)	10	1,2682	1,2171	1,3194	0,00510	0,07145
Conc. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	10	1,8849	1,8032	1,9665	0,01302	0,11413
Conc. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	10	4,7200	4,5363	4,9037	0,06594	0,25680

\* 33.7% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 66.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

#### 4.1.2 Ensaios em Frascos Agitados e em Reator Convencional de Tanque Agitado

As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram os valores médios dos resultados de dois ensaios realizados em frascos agitados, como descrito no item 3.2.2.4. Na Figura 4.2 pode-se observar que o fenômeno da diauxia foi evidenciado pelo consumo de toda a glicose, com acelerada formação de biomassa, até aproximadamente 48 horas e em seguida, pela lenta assimilação da sacarose e a formação do antibiótico, com manutenção da concentração celular na faixa de 19-21 g/L. Verifica-se a relação entre o consumo de um açúcar de difícil assimilação, a sacarose, e a produção do antibiótico. Simultaneamente ao consumo deste carboidrato observa-se a crescente formação do antibiótico, atingindo em torno de 120 horas de processo cerca de 1300 mg<sub>CPC</sub>/L. Após este período houve queda na formação de biomassa e na produção.

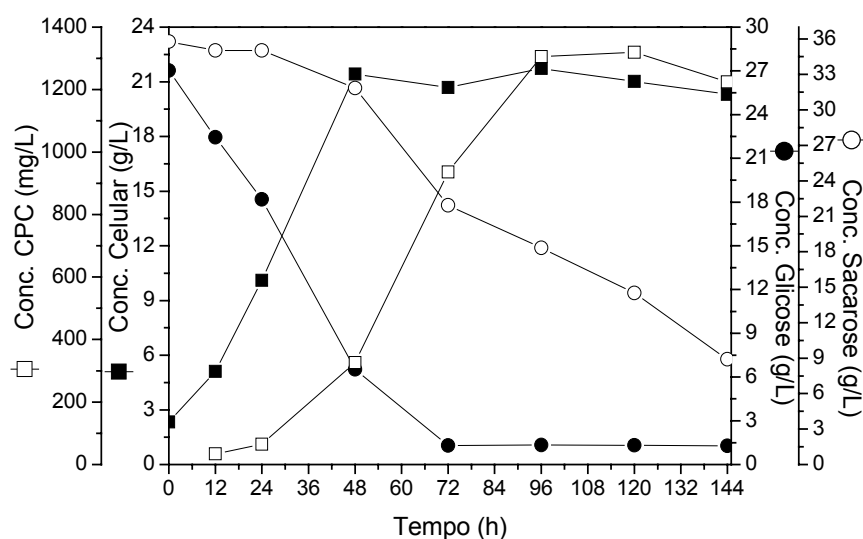


Figura 4.2: Dados experimentais de concentração celular, cefalosporina C(CPC), glicose e sacarose realizada em frascos agitados pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, a 28°C e 250 rpm.

Na Figura 4.3 verifica-se a dependência do pH com o consumo de açúcar e a formação de biomassa. Observa-se um decréscimo em seu valor durante a assimilação de glicose para o crescimento celular, seguido de um aumento a partir do início do metabolismo da sacarose e estabilização da biomassa. Pode-se observar, também nesta figura, que todo o acetato de amônio foi utilizado durante a fase de rápido crescimento. Observa-se uma grande demanda do fósforo durante a formação de biomassa, confirmando

sua relação com o processo respiratório celular e uma queda neste consumo, durante a assimilação da sacarose. Este comportamento provavelmente foi devido à difícil assimilação da sacarose, que ocasionou a estabilização da biomassa.

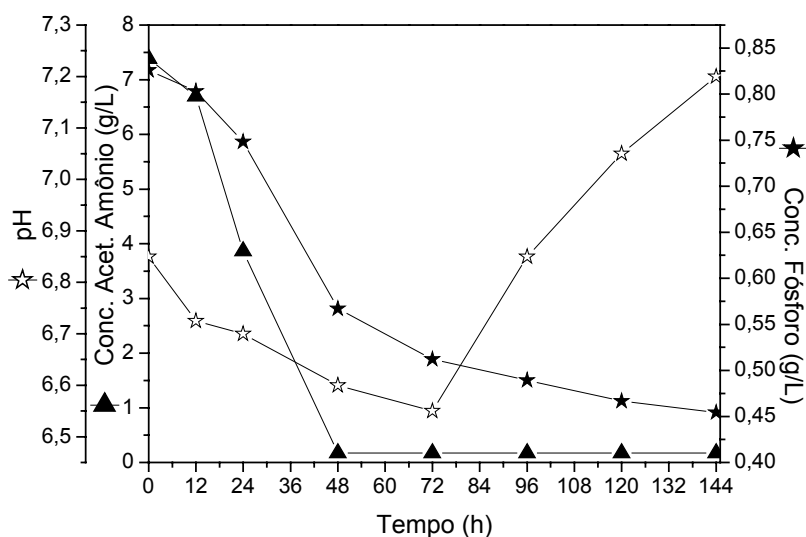


Figura 4.3: Dados experimentais do consumo de acetato de amônio, fósforo e a variação do pH na produção de cefalosporina C, realizada em frascos agitados, pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, a 28°C e 250 rpm.

A Figura 4.4 ilustra os resultados do ensaio realizado em fermentador de tanque agitado em regime batelada convencional, como descrito no item 3.2.2.4. Mais uma vez ficou claro o fenômeno da diauxia evidenciando o consumo de toda a glicose, com acelerada formação de biomassa, até aproximadamente 48 horas e, em seguida, pela lenta assimilação da sacarose e a formação do antibiótico, com manutenção da concentração celular na faixa de 13-17 g/L. Verifica-se a relação entre o consumo de um açúcar de difícil assimilação, a sacarose, com a produção do antibiótico. Simultaneamente ao consumo deste carboidrato observa-se a crescente formação do antibiótico atingindo em torno de 144 horas de processo cerca de 1100 mg<sub>CPC</sub>/L. Após este período houve queda na formação de biomassa e na produção do antibiótico. A produção de cefalosporina C, para ambos os casos estudados, atingiu valores compatíveis com alguns citados na literatura de 1200 mg<sub>CPC</sub>/L, 1600 mg<sub>CPC</sub>/L e 1000mg<sub>CPC</sub>/L, obtidos por Araujo (1996); Silva (1998) e Cruz (2000).

A velocidade específica de produção do antibiótico para o ensaio em frascos agitados utilizando a equação 3.32 foi de 0,66 mg<sub>CPC</sub>/g<sub>cel</sub>.h, para uma concentração celular

média de 21,22  $\text{g}_{\text{cél}}/\text{L}$  no período de tempo de 48 a 120 horas. Para o ensaio em fermentador, utilizando a equação 3.32 e uma concentração celular média de 15,7322  $\text{g}_{\text{cél}}/\text{L}$  para o período de tempo de 48 a 144 horas, a velocidade específica de produção de antibiótico foi de 0,71  $\text{mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cél}}/\text{h}$ .

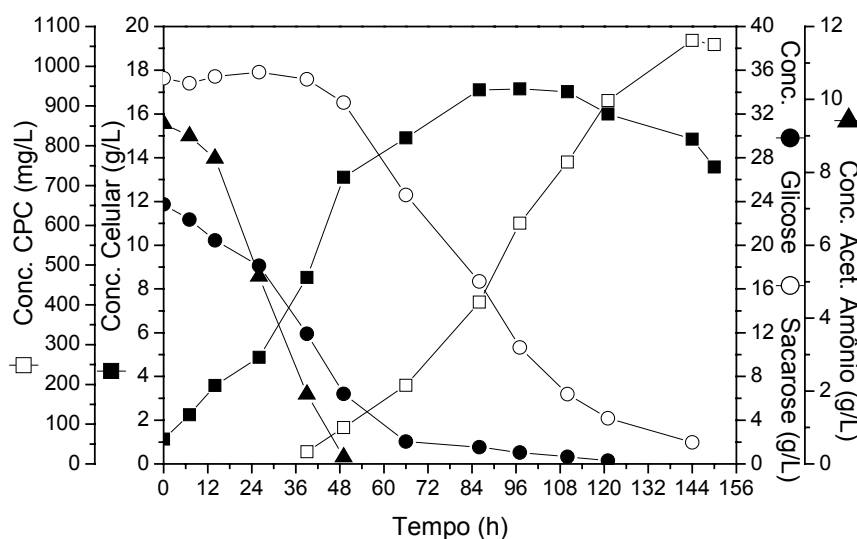


Figura 4.4: Dados experimentais de concentração celular, cefalosporina C (CPC), glicose, sacarose e acetato de amônio, obtidos em ensaio realizado em fermentador no regime batelada pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, a 28°C, pH 7,0 e 250-700 rpm.

## 4.2 Otimização do Crescimento do Fungo *Cephalosporium acremonium* e Produção de Antibiótico Utilizando Planejamento Estatístico

### 4.2.1 Estudo do Crescimento do Fungo *Cephalosporium acremonium* em Meio Específico I

Como descrito no item 3.2.3.1.1, 16 ensaios foram conduzidos por um planejamento fatorial fracionário de resolução quatro, a partir dos quais foram analisados os efeitos da concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais, na velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo. A Tabela 3.8 mostra os níveis utilizados para cada variável.

A Tabela 4.2 apresenta o desenvolvimento do planejamento fatorial fracionário e a variável resposta velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo ( $\mu_{\text{max}}$ ),

para cada ensaio executado. Os gráficos obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio que permitiram calcular os valores de  $\mu_{\max}$  estão reunidos no Apêndice A.

Verifica-se na Tabela 4.2, que valores inferiores foram obtidos para  $\mu_{\max}$ , comparado aos valores encontrados por alguns pesquisadores e apresentados na Tabela 3.18. Mesmo realizando as várias combinações de concentrações no meio, de acordo com o planejamento fatorial fracionário, observa-se que a velocidade específica máxima de crescimento do fungo não variou bruscamente, salvo algumas exceções, indicando uma relação linear entre os fatores e a variável resposta ( $\mu_{\max}$ ).

Tabela 4.2: Planejamento Fatorial Fracionário  $2_{IV}^{6-2}$  realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração (g/L)						$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
	G	N	P	Met	Olei	Sais	
1	+35,0	+13,0	+2,016	+4,5	+1,5	+60,0	0,0361
2	-15,0	+13,0	+2,016	+4,5	-0,5	+60,0	0,0346
3	+35,0	-5,0	+2,016	+4,5	+1,5	-20,0	0,0364
4	-15,0	-5,0	+2,016	+4,5	-0,5	-20,0	0,0433
5	+35,0	+13,0	-0,672	+4,5	-0,5	-20,0	0,0374
6	-15,0	+13,0	-0,672	+4,5	+1,5	-20,0	0,0194
7	+35,0	-5,0	-0,672	+4,5	-0,5	+60,0	0,0496
8	-15,0	-5,0	-0,672	+4,5	+1,5	+60,0	0,0469
9	+35,0	+13,0	+2,016	-1,5	-0,5	-20,0	0,0536
10	-15,0	+13,0	+2,016	-1,5	+1,5	-20,0	0,0435
11	+35,0	-5,0	+2,016	-1,5	-0,5	+60,0	0,0440
12	-15,0	-5,0	+2,016	-1,5	+1,5	+60,0	0,0464
13	+35,0	+13,0	-0,672	-1,5	+1,5	+60,0	0,0461
14	-15,0	+13,0	-0,672	-1,5	-0,5	+60,0	0,0254
15	+35,0	-5,0	-0,672	-1,5	+1,5	-20,0	0,0482
16	-15,0	-5,0	-0,672	-1,5	-0,5	-20,0	0,0508
17	<sup>0</sup> 25,0	<sup>0</sup> 9,0	<sup>0</sup> 1,344	<sup>0</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 40,0	0,0400
18	<sup>0</sup> 25,0	<sup>0</sup> 9,0	<sup>0</sup> 1,344	<sup>0</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 40,0	0,0450
19	<sup>0</sup> 25,0	<sup>0</sup> 9,0	<sup>0</sup> 1,344	<sup>0</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 40,0	0,0412

#### 4.2.1.1 Estimativa dos Efeitos

O “software” Statistica (Statsoft, v. 5.0) foi utilizado para o cálculo dos efeitos das variáveis na velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo. No entanto, como os cálculos não se referem a um planejamento completo, os valores destes efeitos



encontrados são ditos contrastes, ou seja, efeito principal confundido com efeito de interação de três fatores e interações de dois fatores estão confundidos com interações de outros dois fatores (vide Tabela 3.10). O contraste relativo aos fatores foi calculado e os resultados são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Contrastes estimados para a concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na variável resposta  $\mu_{\max}$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial fracionário  $2_{IV}^{6-2}$ .

Fator	Contrastes	D. Padrão	t(12)	p	Intervalo de Confiança	
					-95%	+95%
Média	0,0415	0,0017	23,7993	1,82E-11	0,0377	0,0453
G	0,0052	0,0038	1,3561	0,2000	-0,0031	0,0134
N	-0,0087	0,0038	-2,2846	0,0413	-0,0169	-0,0004
P	0,0018	0,0038	0,4667	0,6491	-0,0065	0,0100
Met	-0,0068	0,0038	-1,7957	0,0978	-0,0151	0,0015
Olei	-0,0019	0,0038	-0,5157	0,6154	-0,0102	0,0063
Sais	-0,0004	0,0038	-0,1139	0,9111	-0,0087	0,0078

$t_{(12;0,025)}_{\text{tabelado}} = 2,179$

Diz-se que um efeito não é significativo, dentro de uma faixa estudada, quando o valor zero está contido no seu respectivo intervalo de confiança. Portanto, num planejamento fatorial fracionário deve-se tomar cuidado ao analisar estes efeitos, pois na verdade estamos analisando contrastes, que portanto, confundem os efeitos. Os efeitos das variáveis concentração de glicose (G), acetato de amônio (N), fósforo (P), DL-Metionina (Met), ácido oléico (Olei) e solução de sais (Sais) apresentados na Tabela 4.3, como foi dito, confundem efeito principal com efeitos de interações de três fatores, uma vez que efeitos de interação de ordens superiores são menos importantes, os contrastes apresentados na Tabela 4.3, são uma boa estimativa do efeito principal para a respectiva variável.

Observando os valores da Tabela 4.3, verifica-se que os contrastes considerados significativos foram os relativos à média global, concentração acetato de amônio e DL-metionina. O contraste relativo ao fator concentração de glicose apesar de numericamente

ser não significativo, esta variável obviamente não será descartada devido sua relevância já conhecida em qualquer processo fermentativo. O contraste relativo à concentração de fósforo e ácido oléico apesar de apresentarem valores poucos significativos em relação aos demais contrastes considerados significativos, não devem ser desprezados sendo necessário passar por uma análise mais minuciosa. O contraste relativo à solução de sais foi considerado não significativo na faixa estudada.

Os contrastes de interações de dois fatores envolvendo o efeito da concentração de glicose e acetato de amônio, foram calculados e são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Contrastes estimados para a concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na variável resposta  $\mu_{\max}$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial fracionário  $2_{IV}^{6-2}$ .

Fator	Efeitos	D. Padrão	p	Intervalo de Confiança	
				-95%	+95%
Média	0,0415	0,0016	3,79E-08	0,0376	0,0453
G	0,0052	0,0036	0,1917	-0,0033	0,0136
N	-0,0087	0,0036	0,0451	-0,0171	-0,0002
P	0,0018	0,0036	0,6342	-0,0067	0,0102
Met	-0,0068	0,0036	0,0973	-0,0153	0,0016
Olei	-0,0019	0,0036	0,5998	-0,0104	0,0065
Sais	-0,0004	0,0036	0,9067	-0,0089	0,0079
GN	0,0074	0,0036	0,0755	-0,0010	0,0158
GP	-0,0045	0,0036	0,2426	-0,0129	0,0039
Gmet	-0,0013	0,0036	0,7277	-0,0097	0,0071
Golei	-0,0025	0,0036	0,5041	-0,0109	0,0059
Gsais	0,0005	0,0036	0,8964	-0,0079	0,0089
NP	0,0081	0,0036	0,0407	0,0004	0,0158
Nmet	-0,0035	0,0036	0,3232	-0,0111	0,0042
Nolei	0,0005	0,0036	0,8885	-0,0072	0,0081
Nsais	-0,0025	0,0036	0,4722	-0,0102	0,0052

Observando a Tabela 4.4, os contrastes relativos à interação glicose/fósforo e acetato de amônio/fósforo são mais significativos do que os efeitos glicose/ácido oléico e acetato de amônio/ácido oléico, mostrando a maior influência do fator fósforo em formar interações significativas de dois fatores no crescimento do fungo em relação à variável

concentração de ácido oléico. Alguns efeitos não foram calculados por serem iguais a algum outro efeito ou estar confundido em algum contraste (vide Tabela 3.10).

Portanto as variáveis consideradas mais importantes na velocidade máxima específica de crescimento do fungo foram as concentrações de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina. As variáveis eliminadas pela análise de seus efeitos no planejamento fatorial fracionário aplicado foram concentração de ácido oléico e solução de sais, confirmando a utilidade de planejamentos fracionários em uma etapa preliminar em estudo.

Com a eliminação destas variáveis não significativas o planejamento fatorial fracionário mostrado na Tabela 4.2 recai em um planejamento fatorial completo com quatro variáveis, concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina, totalizando 16 ensaios e mais triplicata no ponto central. Com este planejamento é possível calcular todos os efeitos, principais e de interações, que afetam a velocidade máxima específica de crescimento do microrganismo e tentar ajustar uma superfície de resposta em torno das condições estabelecidas pelos níveis das variáveis.

Os efeitos principais e de interações de até três fatores foram calculados e são apresentados na Tabela 4.5.

Analisando-se os intervalos de confiança na Tabela 4.5, verifica-se que os efeitos considerados significativos na faixa estudada foram o efeito principal da concentração de glicose, acetato de amônio, DL-metionina e os efeitos de interações de dois fatores glicose/nitrogênio, glicose/fósforo, nitrogênio/fósforo e nitrogênio/DL-metionina. A importante influência dos efeitos de interações de dois fatores envolvendo a variável fósforo, justifica o fato deste fator ter permanecido no planejamento e não ter sido retirado quando seu intervalo de confiança na Tabela 4.3 e 4.4 permitiam que este fosse eliminado como fator não importante no  $\mu_{\max}$ . Observa-se também na Tabela 4.5 que os valores dos efeitos principais das variáveis consideradas significativas, fatorial completo, estão em boa concordância com os valores dos contrastes mostrados na Tabela 4.3 e 4.4, justificando a aproximação feita anteriormente de que efeitos de interações de ordens superiores são poucos significativos.

Tabela 4.5: Efeitos principais e de interações entre fatores para a concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na variável resposta  $\mu_{\max}$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo  $2^4+3$ .

Fator	Efeitos	D. Padrão	t(4)	p	Intervalo de Confiança	
					-95%	+95%
Média	0,0415	0,0005	90,7857	8,83E-08	0,0402*	0,0427
G	0,0052	0,0009	5,1731	0,0066	0,0024*	0,0079
N	-0,0087	0,0009	-8,7150	0,0009	-0,0114*	-0,0059
P	0,0018	0,00096	1,7803	0,1496	-0,0009	0,0045
Met	-0,0068	0,0009	-6,8501	0,0024	-0,0095*	-0,0041
G N	0,0074	0,0009	7,4652	0,0017	0,0047*	0,0102
G P	-0,0046	0,0009	-4,5696	0,0103	-0,0073*	-0,0018
G Met	-0,0013	0,0009	-1,2978	0,2641	-0,0041	0,0015
N P	0,0081	0,0009	8,1456	0,0012	0,0053*	0,0109
N Met	-0,0035	0,0009	-3,5174	0,0245	-0,0063*	-0,0007
P Met	-0,0025	0,0009	-2,5208	0,0653	-0,0053	0,0003
G N P	-0,0022	0,0009	-2,2249	0,0901	-0,0049	0,0005
G N Met	-0,0015	0,0009	-1,5143	0,2045	-0,0043	0,0013
G P Met	-0,0019	0,0009	-1,9673	0,1205	-0,0047	0,0008
N P Met	-0,0004	0,0009	-0,4348	0,6861	-0,0032	0,0023

$t_{(4;0,025)}\text{tabelado} = 2,776$

#### 4.2.1.2 Ajuste e Análise do Modelo Matemático

A matriz planejamento da Tabela 4.2 foi organizada de modo a obter as colunas dos sinais para os fatores considerados importantes, as interações entre dois fatores e os valores de velocidade específica máxima de crescimento do fungo. A partir destes foi possível ajustar e verificar a adequabilidade de um modelo polinomial de primeira ordem na forma da equação 3.8, onde o coeficiente  $b_0$  representa a influência da média global,  $b_i$  ( $i=1\dots k$ ) o efeito principal dos fatores e os coeficientes  $b_{ij}$  ( $i \neq j=1\dots k$ ), representam a influência de interações entre dois fatores.

Este modelo foi usado por acreditar-se, em princípio, que a superfície de resposta na região de interesse seria uma função linear dos fatores. Caso este modelo esteja correto, ele poderá indicar, principalmente, a direção e magnitude da mudança na resposta quando os níveis dos fatores forem alterados.

Os valores dos coeficientes da equação 3.8 foram calculados utilizando os dados da Tabela 4.2 para os fatores considerados significativos, resolvendo a equação 3.6 que dá a

solução geral para o ajuste do modelo por mínimos quadrados. O valor dos parâmetros são mostrados na Tabela 4.6 juntamente com o desvio padrão e seu intervalo de confiança.

Tabela 4.6: Parâmetros do modelo linear considerando a influência dos fatores concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na variável resposta  $\mu_{\max}$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo  $2^4+3$ .

Fatores	b	Desvio.		Intervalo de Confiança	
		padrão	t(11)	-95%	+95%
Média	0,0415	0,0007	58,4789	0,0400	0,0429
G	0,0026	0,0008	3,3322	0,0009	0,0042
N	-0,0043	0,0008	-5,6137	-0,0059	-0,0027
Met	-0,0034	0,0008	-4,4124	-0,0050	-0,0018
G N	0,0037	0,0008	4,8087	0,0021	0,0053
G P	-0,0023	0,0008	-2,9435	-0,0038	-0,0007
N P	0,0041	0,0008	5,2469	0,0025	0,0056
N Met	-0,0017	0,0008	-2,2657	-0,0033	-0,0002

$t_{(11;0,025)}_{\text{tabelado}} = 2,201$

Como foi descrito anteriormente, os níveis das variáveis foram codificados entre +1 e -1. Isto facilita uma análise direta da influência de cada variável na velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo a partir dos próprios valores numéricos dos coeficientes b's. Portanto pode-se observar pela Tabela 4.6 a grande influência do fator concentração de acetato de amônio e suas interações com glicose e com o fósforo. Destaque deve ser dado também para a variável concentração de glicose e suas interações. Este fatores, concentração de glicose e de acetato de amônio muito importantes para o crescimento do microrganismo.

A Tabela 4.7 apresenta a análise de variância para o modelo polinomial de 1ª ordem com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6. A porcentagem de variação explicada pela regressão é de 92,01% e com um coeficiente de correlação de 0,960. O bom ajuste do modelo é refletido no gráfico dos resíduos mostrado na Figura 4.5, resíduos em função dos valores preditos pelo modelo ajustado, mostrando a compatibilidade com uma distribuição aleatória o que autoriza o emprego do teste de F. Comparando os valores de  $F_{\text{calculado}}$  com  $F_{\text{tabelado}}$  na Tabela 4.7, observa-se uma regressão significativa. Portanto os dados experimentais são bem representados pelo modelo ajustado, o qual de acordo com o teste F, pode ser usada para fins preditivos dentro do domínio dos fatores estudados.

Tabela 4.7: Análise da variância para um ajuste polinomial de 1ª ordem com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6 estimados a partir dos dados da Tabela 4.5.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº. de graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>
Regressão	0,001209	7	0,000173	18,08
Resíduos	0,000105	11	9,56E-06	
Total	0,001314			

% de variação explicada = 92.01 → R = 0.9600

F<sub>(7,11;95%)tabelado</sub> = 3,01

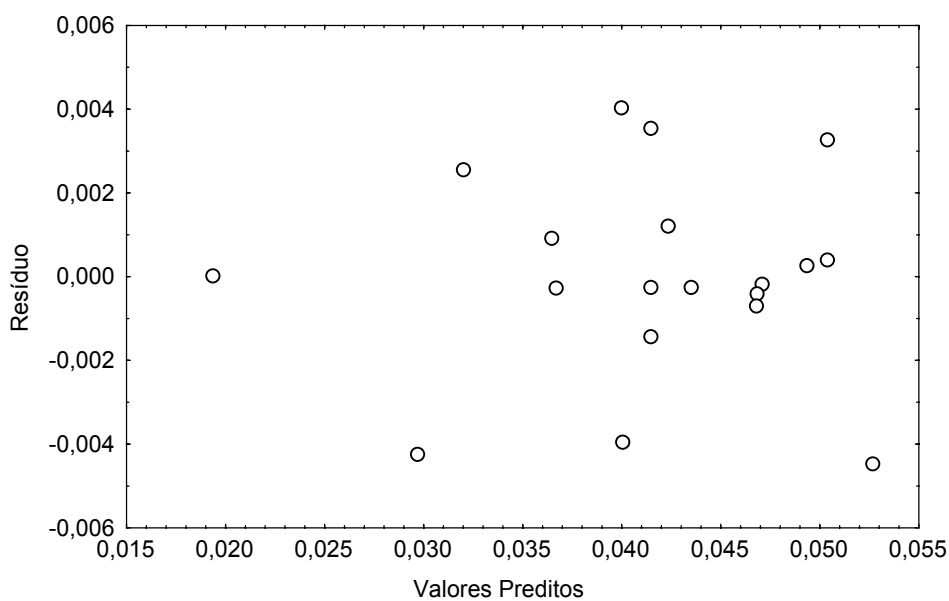


Figura 4.5: Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina.

### 4.2.1.3 Análise da Superfície de Resposta Para o Crescimento Celular ( $\mu_{\max}$ )

A superfície de resposta obtida a partir do modelo, com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, indica possíveis regiões de se encontrar valores superiores aos encontrados anteriormente para a variável resposta  $\mu_{\max}$  e a partir daí fazer um deslocamento do planejamento experimental para valores de concentrações das variáveis consideradas importantes, dentro desta nova região.

Inicialmente a natureza da superfície de resposta é explorada através dos gráficos de superfície de contorno da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), no espaço de dois fatores, mantendo-se os outros dois fixos. As Figuras 4.6 à 4.11 mostram algumas superfícies de contorno correspondentes ao modelo com os parâmetros da Tabela 4.6, onde os valores dos fatores concentrações encontram-se graficadas em valores reais. Observa-se nas Figuras 4.6 à 4.11 uma pequena variação na velocidade específica máxima de crescimento, mesmo para as várias combinações de concentrações de nutrientes.

Na Figura 4.6 nota-se que o aumento na velocidade específica máxima de crescimento caminha em sentidos opostos, ou seja, para altas concentrações de glicose e acetato de amônio ou para baixas concentrações destes nutrientes, mantendo as concentrações de fósforo e DL-metionina nos níveis alto (+1). As Figuras 4.7, 4.9 e 4.11 deixa bem claro a pequena influência da variável concentração de fósforo como efeito principal, justificando sua retirada do modelo, mas apresenta grande influência na interação com a concentração de glicose e acetato de amônio. Na Figura 4.11 fica evidente a influência da concentração de DL-metionina para valores de concentração correspondente ao nível inferior (-1) desta. As Figuras 4.6, 4.9 e 4.11 mostram que a influência da concentração de acetato de amônio é mais acentuada para o valor de concentração correspondente ao nível inferior desta variável, para vários valores de concentrações de fósforo e DL-metionina.

Todas as superfícies exploradas, mostraram que um aumento na velocidade específica máxima de crescimento pode ser obtida para uma ampla faixa de concentração dos fatores, principalmente quando todas estas estão em uma faixa de concentração correspondente ao seu nível inferior.

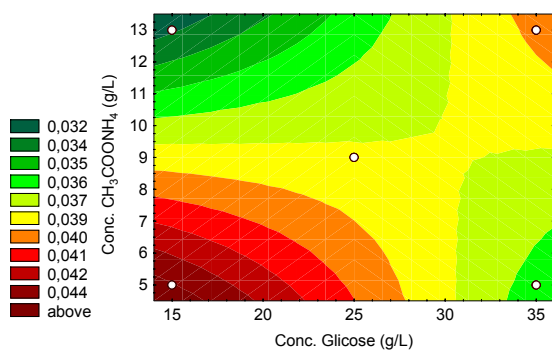


Figura 4.6: Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de fósforo e de DL-metionina em 2,016 e 4,5 g/L, respectivamente.

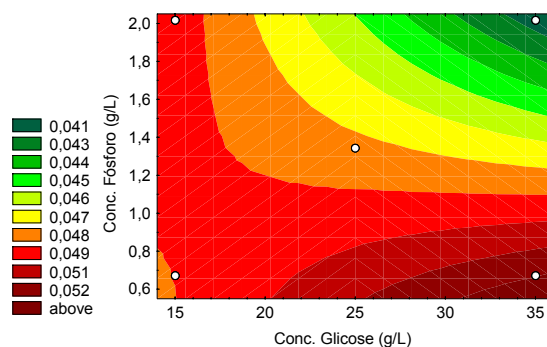


Figura 4.7: Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de acetato de amônio e de DL-metionina em 5,0 e 1,5 g/L, respectivamente.

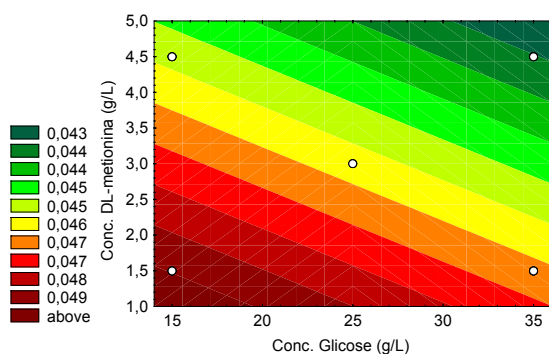


Figura 4.8: Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de acetato de amônio e de fósforo em 5,0 e 1,344 g/L, respectivamente.

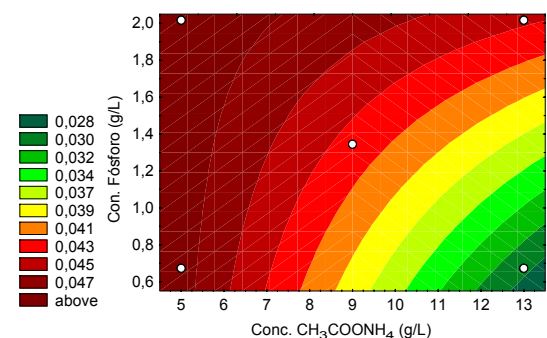


Figura 4.9: Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de glicose e de DL-metionina em 15,0 e 1,5 g/L, respectivamente.

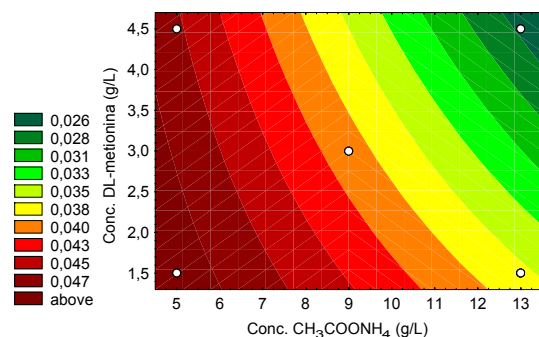


Figura 4.10: Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de glicose e de fósforo em 5,0 e 1,344g/L, respectivamente.

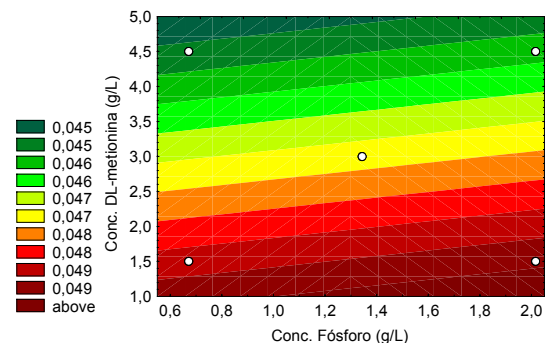


Figura 4.11: Contornos da resposta para a equação 3.8 com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, fixando a conc. de glicose e de acetato de amônio em 15,0 e 5,0 g/L, respectivamente.



Três ensaios foram realizados para comprovar o aumento da velocidade específica máxima de crescimento, para três regiões distintas estabelecidas pelas Figuras 4.6 à 4.11. Os valores de concentrações das variáveis em cada ensaio, são apresentados na Tabela 4.8, juntamente com os valores de  $\mu_{\max}$  obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio (Apêndice A) e os preditos pelo modelo ajustado com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6. A concentração de ácido oléico e solução de sais foram mantidos constantes para o três ensaios, e no nível mais baixo do planejamento anterior que foi de 0,5g/L e 20,0mL/L, respectivamente. A concentração de DL-metionina foi também considerada constante para os três ensaios e igual a 0,5 g/L.

Observa-se com os dados da Tabela 4.8 que não verificou-se experimentalmente um aumento na velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) para o ensaio T3, como previsto pelo modelo ajustado com os parâmetros apresentados na Tabela 4.6, confirmando que modelos empíricos são modelos locais, isto é, aplicáveis apenas a uma determinada região tornando a extrapolação bastante arriscada. Mas nas outras regiões testadas (ensaio T1 e T2) os valores de  $\mu_{\max}$  são superiores aos valores de  $\mu_{\max}$  preditos pela modelo, destacando-se como uma região, com os valores de concentrações dos respectivos nutrientes, com uma velocidade de crescimento acima dos valores já obtidos. Um novo domínio de concentrações das variáveis foi estabelecido dentro da região de experimentação do ensaio T2 (concentrações de variáveis representadas pelas Figuras 4.6 à 4.11, correspondentes ao nível inferior destas).

Tabela 4.8: Valores de  $\mu_{\max\text{PRED}}$  (preditos pelo modelo) e  $\mu_{\max\text{EXP}}$  determinados para cada ensaio, com respectivos valores de concentração de nutrientes, mantendo-se a concentração de ácido oléico, DL-metionina e solução de sais em, 0,5 g/L, 0,5g/L 20,0mL/L, respectivamente.

	Nutrientes/Concentração(g/L)		$\mu_{\max\text{EXP}}(\text{h}^{-1})$	$\mu_{\max\text{PRED}}(\text{h}^{-1})$
Ensaio T1	Glicose	22,0	0,0580	0,0489
	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	6,5		
	Fósforo	1,0		
Ensaio T2	Glicose	10,0	0,0663	0,0575
	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	3,0		
	Fósforo	0,40		
Ensaio T3	Glicose	40,0	0,0435	0,0603
	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	15,0		
	Fósforo	2,10		

## 4.2.2 Estudo do Crescimento do Fungo *Cephalosporium acremonium* em Meio Específico II

Como foi descrito no item 3.2.3.1.1, um segundo planejamento foi proposto a partir das variáveis consideradas mais significativas no planejamento anterior: concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina. Os níveis das variáveis foram deslocados para uma nova região de experimentação como sugerido pelo planejamento anterior (item 4.2.1), cujos níveis são mostrados na Tabela 3.11. Novamente, aqui a variável dependente foi a velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{\max}$ .

Um planejamento fatorial  $2^4$  completo totalizando 16 ensaios foi executado, acrescido de quatro ensaios correspondentes aos pontos centrais do planejamento, totalizando 20 ensaios, conforme mostra a matriz planejamento da Tabela 3.12.

A Tabela 4.9 apresenta o desenvolvimento do planejamento fatorial completo com os fatores em valores codificados e reais de concentrações e a variável resposta, velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo ( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio executado. Os gráficos obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio, que permitiram calcular os valores de  $\mu_{\max}$  estão reunidos no Apêndice B.

Comparando -se os dados obtidos experimentalmente apresentados na Tabela 4.9, com alguns dados obtidos por outros pesquisadores apresentados na Tabela 3.18, verifica-se que um aumento significativo nos valores de  $\mu_{\max}$  foi alcançado através da execução do planejamento estatístico neste domínio das variáveis, o qual permitiu testar combinações diferentes de condições de cultivo. Maiores valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos nos ensaios 4 e 10, já destacando o favorecimento ao crescimento para meios de cultivos com baixas concentrações de glicose. Portanto o deslocamento do planejamento para um novo domínio, mostrou-se satisfatório.

Tabela 4.9: Planejamento Fatorial Completo realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met, na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium*.

Ensaio	Nível Concentração				$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
	G (g/L)	N (g/L)	Met (g/L)	P (g/L)	
1	+20,0	+9,0	+1,5	+1,10	0,0558
2	-10,0	+9,0	+1,5	+1,10	0,0654
3	+20,0	-5,0	+1,5	+1,10	0,0672
4	-10,0	-5,0	+1,5	+1,10	0,0863
5	+20,0	+9,0	-0,5	+1,10	0,0613
6	-10,0	+9,0	-0,5	+1,10	0,0753
7	+20,0	-5,0	-0,5	+1,10	0,0412
8	-10,0	-5,0	-0,5	+1,10	0,0788
9	+20,0	+9,0	+1,5	-0,54	0,0548
10	-10,0	+9,0	+1,5	-0,54	0,0784
11	+20,0	-5,0	+1,5	-0,54	0,0455
12	-10,0	-5,0	+1,5	-0,54	0,0585
13	+20,0	+9,0	-0,5	-0,54	0,0429
14	-10,0	+9,0	-0,5	-0,54	0,0552
15	+20,0	-5,0	-0,5	-0,54	0,0689
16	-10,0	-5,0	-0,5	-0,54	0,0761
17	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82	0,0614
18	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82	0,0583
19	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82	0,0594
20	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82	0,0604

#### 4.2.2.1 Estimativa dos Efeitos das Variáveis Independentes em $\mu_{\max}$

O software Statistica (Statsoft, v. 5.0) foi utilizado para o cálculo dos efeitos das variáveis na velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo.

A partir dos dados da Tabela 4.9, calculou-se os efeitos principais, interação entre dois e entre três fatores. Os resultados são apresentados pelo gráfico de Pareto, Figura 4.12 onde se pode observar o efeito principal não significativo do fator concentração de DL-metionina, assim como os efeitos de interações entre duas variáveis. Os efeitos principais considerados importantes foram os fatores concentração de glicose, fósforo e acetato de amônio, destacando a forte influência destes nutrientes, bem como suas capacidades de se interagirem para a formação de biomassa, efeito evidenciado a interação envolvendo estes três fatores.

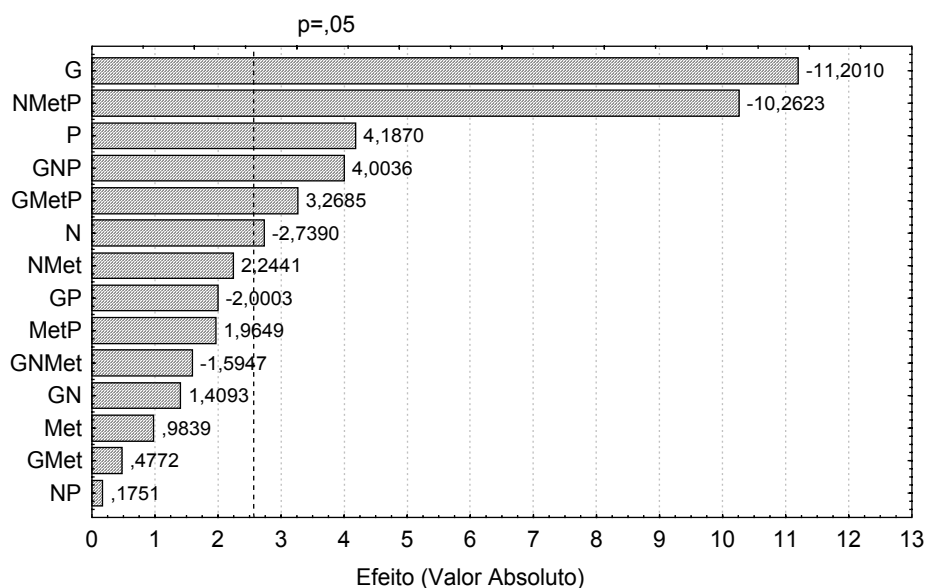


Figura 4.12: Gráfico de Pareto ilustrando o efeito da concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

#### 4.2.2.2 Ajuste e Análise do Modelo Matemático

Os dados da matriz planejamento da Tabela 4.9 foram utilizados para ajustar e verificar a adequabilidade de um modelo polinomial de primeira ordem na forma da equação 3.8, incluindo interações entre três fatores, uma vez que a análise dos efeitos mostrou a forte influência deste tipo de interação.

Os valores dos coeficientes do modelo foram calculados utilizando os dados da Tabela 4.9 e resolvendo a equação matricial 3.6 que dá a solução geral para o ajuste do modelo por mínimos quadrados. Os valores dos parâmetros do modelo são apresentados na Tabela 4.10, juntamente com o desvio padrão e seu intervalo de confiança. Os coeficientes considerados significativos, os quais devem ser considerados no modelo foram, a média global das observações, o efeito principal da concentração de glicose, acetato de amônio e fósforo, o efeito de interações entre três fatores, concentração de glicose/acetato de amônio/fósforo, glicose/DL-metionina/fósforo e acetato de amônio/DL-metionina/fósforo. O efeito principal da concentração de DL-metionina e os efeitos de interações entre dois fatores não foram considerados significativos, como pode ser observado na Tabela 4.10 com seus respectivos intervalos de confiança ou comparando o valor t ("student")

calculado com o t tabelado ( $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ , efeito ou coeficiente de regressão significativo); portanto estes efeitos não foram considerados no modelo. O modelo simplificado que melhor representa a influência dos fatores estudados bem como suas interações na velocidade específica máxima de crescimento, no domínio estudado, é o modelo representado pela equação 4.1.

A Tabela 4.11 apresenta a análise de variância para o ajuste da equação 4.1. A porcentagem de variação explicada pela regressão é de 92,01%, com um coeficiente de correlação de 0,960. O bom ajuste do modelo é refletido no gráfico dos resíduos mostrado na Figura 4.13, resíduos versus os valores preditos pelo modelo ajustado, mostrando a compatibilidade com uma distribuição aleatória, o que autoriza o emprego do teste de F. Comparando os valores de  $F_{\text{calculado}}$  com  $F_{\text{tabelado}}$ , na Tabela 4.11, mostra uma regressão significativa. Portanto os dados experimentais são bem representados pela equação 4.1 a qual de acordo com o teste F pode ser usada para fins preditivos, dentro do domínio dos fatores estudados.

Tabela 4.10: Parâmetros do modelo linear considerando a influência dos fatores concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met na variável resposta  $\mu_{\text{max}}$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com seus respectivos intervalos de confiança obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo  $2^4+4$ .

Fatores	Coef. de Regressão	Desvio Padrão	t(5)	p	Intervalo de Confiança	
					-95%	+95%
Média	0,0625*	0,0007	91,914	2,89E-09	0,0608	0,0643
G	-0,0085*	0,0008	-11,2010	9,9E-05	-0,0108	-0,0066
N	-0,0021*	0,0008	-2,7390	0,0408	-0,0040	-0,0001
Met	0,0007	0,0008	0,9839	0,3703	-0,0012	0,0027
P	0,0032*	0,0008	4,1870	0,0086	0,0012	0,0051
GN	0,0011	0,0008	1,4093	0,2177	-0,0009	0,0030
GMet	0,0004	0,0008	0,4773	0,6533	-0,0016	0,0023
GP	-0,0015	0,0008	-2,0003	0,1019	-0,0035	0,0004
NMet	0,0017	0,0008	2,2441	0,0748	-0,0003	0,0037
NP	0,0001	0,0008	0,1752	0,8678	-0,0018	0,0021
MetP	0,0015	0,0008	1,9649	0,1066	-0,0005	0,0035
GNMet	-0,0012	0,0008	-1,5947	0,1716	-0,0032	0,0007
GNP	0,0030*	0,0008	4,0036	0,0103	0,0011	0,0050
GMetP	0,0025*	0,0008	3,2685	0,0222	0,0005	0,0044
NMetP	-0,0078*	0,0008	-10,2623	0,0001	-0,00976	-0,0058

\*Significativos

$t_{(5;0,025)}_{\text{tabelado}} = 2,571$

$$\begin{aligned} \mu_{\max} = & 0,0625 - 0,0085 G - 0,0021 N + 0,0032 P + 0,0030 GNP + 0,0025 G\text{Met}P \\ & \pm 0,002 \quad \pm 0,002 \quad \pm 0,002 \quad \pm 0,002 \quad \pm 0,002 \quad \pm 0,002 \\ & - 0,0078 N\text{Met}P \\ & \pm 0,002 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Tabela 4.11: Análise da variância para o ajuste da equação 4.1 a partir dos dados experimentais da Tabela 4.9.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº. de graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>
Regressão	0,002617	6	0,436E-03	25,89
Resíduo	0,000219	13	16,84E-06	
Total	0,002836			
% de variação explicada = 92,28 → R = 0,9606				
F <sub>(6,13;95%)</sub> tabelado = 2,92				

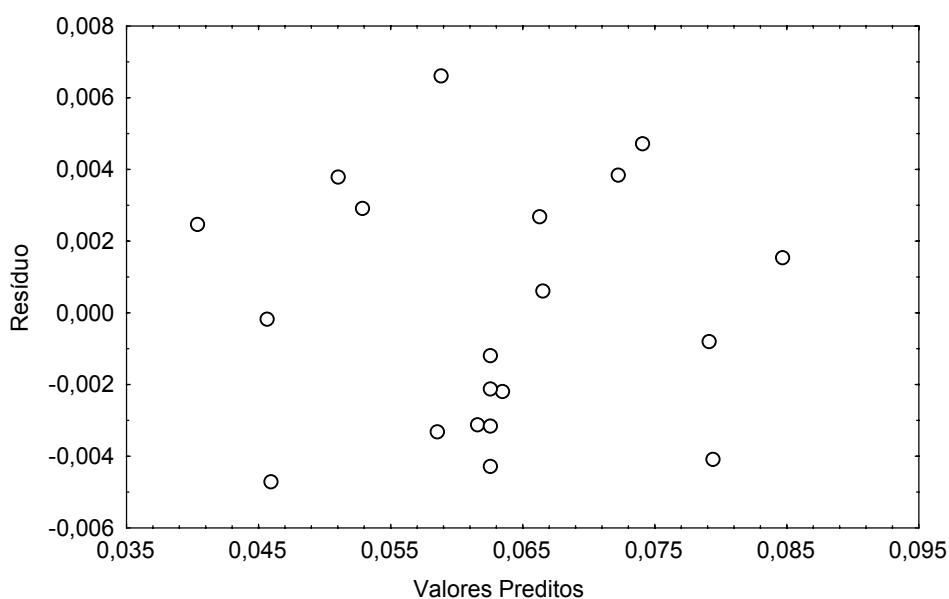


Figura 4.13: Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* com as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio, fósforo e DL-metionina.

#### 4.2.2.3 Análise da Superfície de Resposta para o Crescimento Celular ( $\mu_{\max}$ )

A natureza da superfície de resposta foi explorada através de gráficos de superfície e de contorno da velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo em função dos fatores concentração de glicose e acetato de amônio, mantendo-se fixo a concentração de fósforo e DL-metionina. A Figura 4.14 mostra a superfície de resposta e a Figura 4.15 os contornos da equação 4.1, com os fatores em seus níveis reais e mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina fixas em 1,1g/L e 0,5 g/L, respectivamente. Observa-se nestas figuras que maiores velocidades de crescimento são obtidas para concentrações de glicose e acetato de amônio nos limites inferiores do domínio estudado. As figuras indicam que para os níveis de concentração de fósforo e DL-metionina fixos e 1,1 e 0,5 g/L, respectivamente, uma velocidade específica de crescimento da ordem de  $0,078 \text{ h}^{-1}$  pode ser atingida para concentrações de glicose e acetato de amônio de 10,0 e 5,0 g/L, respectivamente.

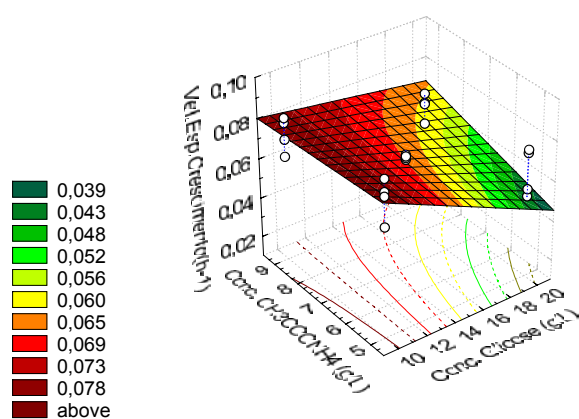


Figura 4.14: Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina em 1,1 e 0,5 g/L respectivamente.

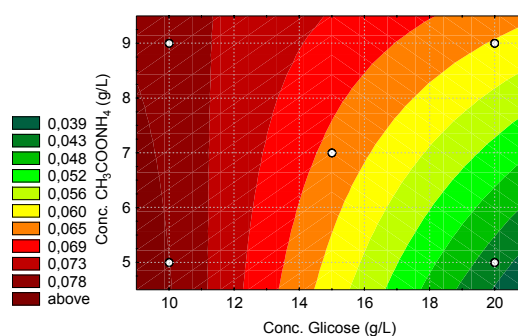


Figura 4.15: Contornos da equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, fixando a conc. de fósforo e DL-metionina em 1,1 e 0,5 g/L respectivamente.

Mantendo-se a concentração de fósforo e DL-metionina fixa em 0,82 e 0,5 respectivamente, pode-se observar pelas Figuras 4.16 e 4.17 que maiores velocidade de crescimento podem ser atingidas para concentração de glicose em torno de 10,0 g/L e acetato de amônio 5,0 g/L, o que já se pode perceber a pouca influência da concentração de fósforo.

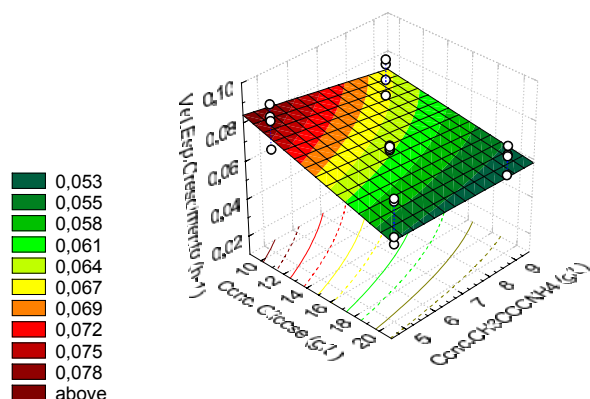


Figura 4.16: Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina em 0,82 e 0,5 g/L respectivamente.

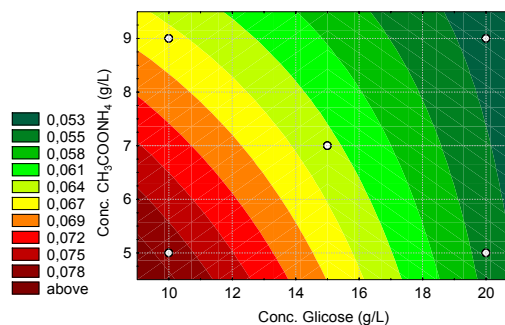


Figura 4.17: Contornos da equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, fixando a conc. de fósforo e DL-metionina em 0,82 e 0,5 g/L respectivamente.

A Figura 4.18 mostra a superfície de resposta e a Figura 4.19 os contornos da equação 4.1 com a concentração de fósforo e DL-metionina fixas em 0,54 g/L e 0,5 g/L, respectivamente. Novamente observa-se altas velocidades de crescimento para baixas concentrações de glicose e acetato de amônio

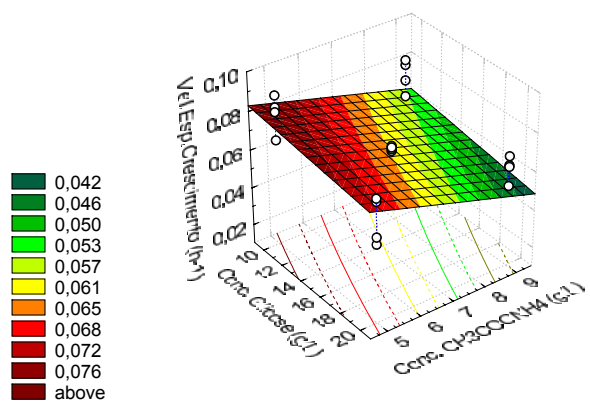


Figura 4.18: Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio, mantendo a concentração de fósforo e DL-metionina em 0,54 e 0,5 g/L respectivamente.

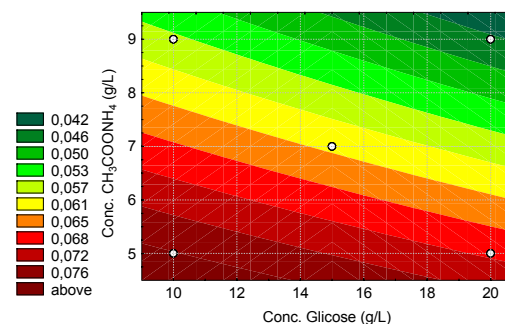


Figura 4.19: Contornos da equação 4.1 em função da conc. de glicose e acetato de amônio fixando a conc. de fósforo e DL-metionina em 0,54 e 0,5 g/L respectivamente.

A Figura 4.20 mostra a superfície de resposta e a Figura 4.21 os contornos da equação 4.1 com a concentração de glicose e acetato de amônio fixas em 10,0 g/L e 5,0 g/L, respectivamente. Observa-se que para a ampla faixa de concentração de fósforo e DL-metionina estudada, a velocidade específica de crescimento não é bruscamente alterada, mantendo as concentrações de glicose e acetato de amônio em seus níveis inferiores.



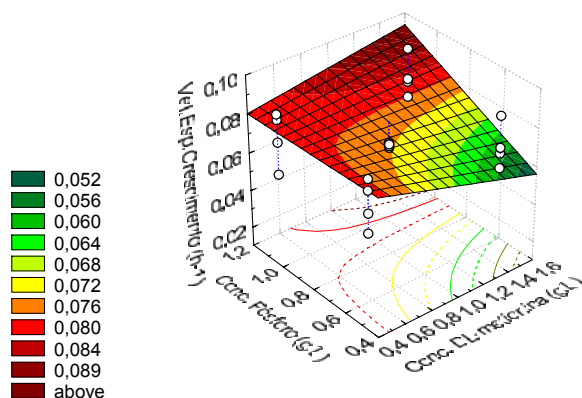


Figura 4.20: Superfície de resposta para equação 4.1 em função da conc. de fósforo e DL-metionina, mantendo a concentração de glicose e acet. de amônio em 10,0 e 5,0 g/L respectivamente.

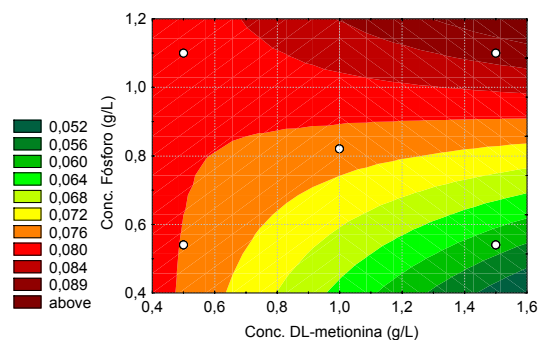


Figura 4.21: Contornos da equação 4.1 em função da conc. de fósforo e DL-metionina, fixando a conc. de glicose e acet. de amônio em 10,0 e 5,0 g/L respectivamente.

Todas as superfícies até agora exploradas, Figuras 4.14 à 4.21, mostraram uma forte tendência no aumento dos valores de  $\mu_{\max}$  para valores de concentração de glicose e acetato de amônio em torno de 10,0 e 5,0 g/L respectivamente e para uma ampla faixa de concentração de fósforo e DL-metionina. Outras possibilidades podem ser avaliadas para outras combinações de concentrações das variáveis, dependendo principalmente do objetivo que se deseja. Como aqui o objetivo é encontrar valores de concentrações de nutrientes onde pode se obter alta velocidade de crescimento, continuou-se a investigação realizando um novo planejamento. Para os próximos ensaios as variáveis concentração de fósforo e DL-metionina foram mantidas constantes com concentrações para o fósforo correspondentes ao seu nível central, ou seja, 0,82 g/L ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,2/3,0$  g/L) e a concentração de DL-metionina em seu nível inferior, ou seja, 0,5 g/L. Portanto as variáveis concentração de glicose e acetato de amônio consideradas mais relevantes tiveram seus níveis deslocados para uma nova região de experimentação.

### 4.2.3 Estudo do Crescimento do Fungo *Cephalosporium acremonium* em Meio Específico III

Como foi descrito no item 3.2.3.1.1, um terceiro planejamento foi proposto a partir das variáveis consideradas mais significativas no planejamento anterior: concentração de glicose e acetato de amônio. Os níveis das variáveis foram deslocados para uma nova região de experimentação como sugerido pelo planejamento anterior discutido no item 4.2.2. Os níveis estabelecidos no novo planejamento são mostrados na Tabela 3.13. Novamente aqui a variável dependente foi a velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{\max}$ .

Um planejamento fatorial composto central,  $2^2+4(\text{pontos axiais})+4(\text{ponto central})$  foi implementado, conforme mostra a matriz planejamento da Tabela 3.14. Os ensaios do planejamento  $2^2$  bem como os ensaios nos pontos axiais foram realizados em duplicatas, totalizando 20 ensaios.

A Tabela 4.12 apresenta o desenvolvimento do planejamento fatorial composto central com os fatores em valores codificados e reais de concentrações e a variável resposta velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo ( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio executado. Os gráficos obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio que permitiram calcular os valores de  $\mu_{\max}$ , estão reunidos no Apêndice C.

Comparando -se os dados obtidos experimentalmente apresentados na Tabela 4.12, com os obtidos nos ensaios apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.9, verifica-se que melhora significativa nos valores de velocidade específica máxima de crescimento foi alcançada através do deslocamento do domínio das variáveis estudadas em relação aos planejamentos experimentais anteriores. Maiores valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos nos ensaios 4 e 12 já destacando o favorecimento a um aumento na velocidade de crescimento, para baixas concentrações de glicose e acetato de amônio. Portanto o deslocamento do planejamento para um novo domínio mostrou-se satisfatória.

Tabela 4.12: Resultados de um Planejamento Fatorial Composto Central realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração		$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )*	
	G (g/L)	N (g/L)	(1)	(2)
1	+9,0	+5,5	0,1418	0,1362
2	-4,0	+5,5	0,1669	0,1744
3	+9,0	-2,5	0,1677	0,1482
4	-4,0	-2,5	0,2161	0,2239
5	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1499	-
6	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1622	-
7	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1513	-
8	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1524	-
9	<sup>+α</sup> 10,0	<sup>0</sup> 4,0	0,1185	0,1302
10	<sup>-α</sup> 3,0	<sup>0</sup> 4,0	0,1692	0,1775
11	<sup>0</sup> 6,5	<sup>+α</sup> 6,0	0,1661	0,1562
12	<sup>0</sup> 6,5	<sup>-α</sup> 2,0	0,1766	0,1871

\*duplicatas

Primeiramente os ensaios 1 a 8 descrito na Tabela 4.12 foram utilizados para ajustar e verificar a adequabilidade de um modelo polinomial de primeira ordem da forma:

$$\mu_{\max} = b_0 + b_1G + b_2N + b_{12}GN + \varepsilon \quad (4.2)$$

Onde o termo  $b_0$  representa o efeito global da média das respostas,  $b_1$  e  $b_2$  os efeitos principais da concentração de glicose e acetato de amônio, respectivamente e  $b_{12}$  o efeito de interação entre a concentração de glicose e acetato de amônio. Este modelo foi usado por acreditar-se, em princípio, que a superfície de resposta na região de interesse era uma função linear dos fatores. Caso este modelo estivesse correto ele poderia indicar, principalmente, a direção e magnitude da mudança na resposta quando os níveis dos fatores fossem mudados, inclusive para situações intermediárias.

Os parâmetros da equação 4.2 foram ajustados com dados experimentais da Tabela 4.12 (ensaios 1 a 8), como descrito no item 3.2.3.1 e é dada por:

$$\mu_{\max} = 0,1659 \pm 0,005 - 0,0235G \pm 0,006 - 0,0171N \pm 0,006 + 0,0076GN \pm 0,006 \quad (4.3)$$

A análise de variância para o ajuste da equação 4.3 encontra-se na Tabela 4.13. A porcentagem de variação explicada pela regressão é de 85,71%, mas este valor não deve ser comparado com 100% por causa da contribuição devido ao erro puro. Como não há modelo que consiga reproduzir a soma quadrática do erro puro, a variação explicada pela regressão deve ser comparada com o valor da máxima variação explicada que é de 96,43%.

O valor de F para a regressão é de 12, no nível de significância de 95%, comparado com  $F_{\text{tabelado}}$  de 4,07, mostra uma regressão significativa não fosse a evidência de falta de ajuste confirmada pelo seu valor de F na Tabela 4.13 com o valor de  $F_{\text{tabelado}}$  de 5,57. A inadequação do modelo pode ser visualizada pelo gráfico dos resíduos representados na Figura 4.22, que não se distribuem aleatoriamente.

Tabela 4.13: Análise da variância para ajuste da equação 4.3 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.12.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº. de graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	0,0072	3	0,0024	12
Resíduo	0,0012	8	0,0002	
F. de Ajuste	0,0009	1	0,0009	20,93
Erro Puro	0,0003	7	4,3E-05	
Total	0,0084	11		

% de variação explicada = 85,71 → R = 0,9256  
 % máxima de var. explicável = 96,43  
 $F_{(3,8;95\%)\text{tabelado}} = 4,07$      $F_{(1,7;95\%)\text{tabelado}} = 5,59$

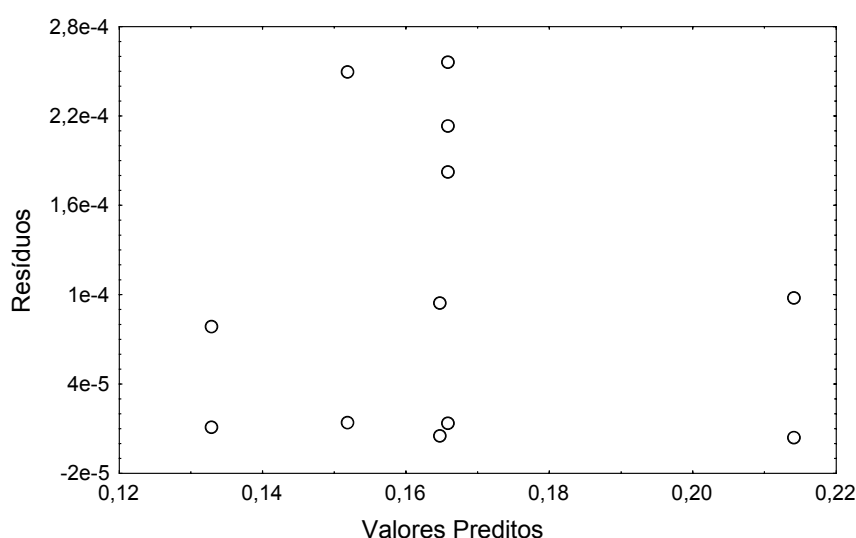


Figura 4.22: Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ) do fungo *C. acremonium* ATCC 48272 com as variáveis concentração de glicose e de acetato de amônio.

Como o modelo linear apresenta falta de ajuste o próximo passo é tentar um ajuste a um modelo quadrático, que é dado pela equação 3.8. Para estimar eficientemente todos os coeficientes deste modelo e para verificar sua adequabilidade os dados do planejamento fatorial composto central apresentados na Tabela 4.12 foram utilizados. A equação de segundo grau ajustada por mínimos quadrados é dada por:

$$\mu_{\max} = 0,1539 - 0,0204G - 0,0119N + 0,0005G^2 + 0,0114N^2 + 0,0076GN \quad (4.4)$$

$$\begin{matrix} \pm 0,0008 & \pm 0,0041 & \pm 0,0041 & \pm 0,0054 & \pm 0,0054 & \pm 0,0058 \end{matrix}$$

A Tabela 4.14 apresenta a análise de variância para o ajuste da equação 4.4. O valor de F para a regressão é de 17, no nível de significância de 95%, comparado com  $F_{\text{tabelado}}$  de 2,96, o que mostra uma regressão significativa, mas novamente aqui se verifica a falta de ajuste confirmada pelo seu valor de F na Tabela 4.14 com o valor de  $F_{\text{tabelado}}$ . A inadequação do modelo pode ser visualizada pelo gráfico dos resíduos apresentados na Figura 4.23, que não se distribuem aleatoriamente.

Tabela 4.14: Análise da variância para ajuste da equação 4.4 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.12.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº. de graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	0,0108	5	0,0022	17
Resíduo	0,0018	14	1,3E-04	
F. de Ajuste	0,0012	3	3,8E-04	7
Erro Puro	0,0006	11	5,5E-05	
Total	0,0126	19		
% de variação explicada = 85,71		→	R = 0,9258	
% máxima de var. explicável = 96				
$F_{(5,14;95\%)\text{tabelado}} = 2,96$			$F_{(3,11;95\%)\text{tabelado}} = 3,59$	

Como pode-se observar pela Tabela 4.13 e 4.14, houve uma melhoria em relação ao ajuste do modelo de 1ª ordem para um modelo de 2ª ordem, principalmente em relação à falta de ajuste mas não o suficiente para tornar o modelo representativo aos dados experimentais e conseqüentemente para uso deste com fins preditivos.

Devido à falta de ajuste do modelo de segunda ordem, aos dados experimentais, faz-se necessário buscar alternativas para melhorar este ajuste. Como pode ser observado na Tabela 4.12, os maiores valores de velocidade específica máxima de crescimento foram

obtidos para valores de concentração de glicose e acetato de amônio em torno de 4,0 e 2,5, respectivamente. Portanto um novo planejamento foi proposto e os fatores estudados foram deslocados para um novo domínio.

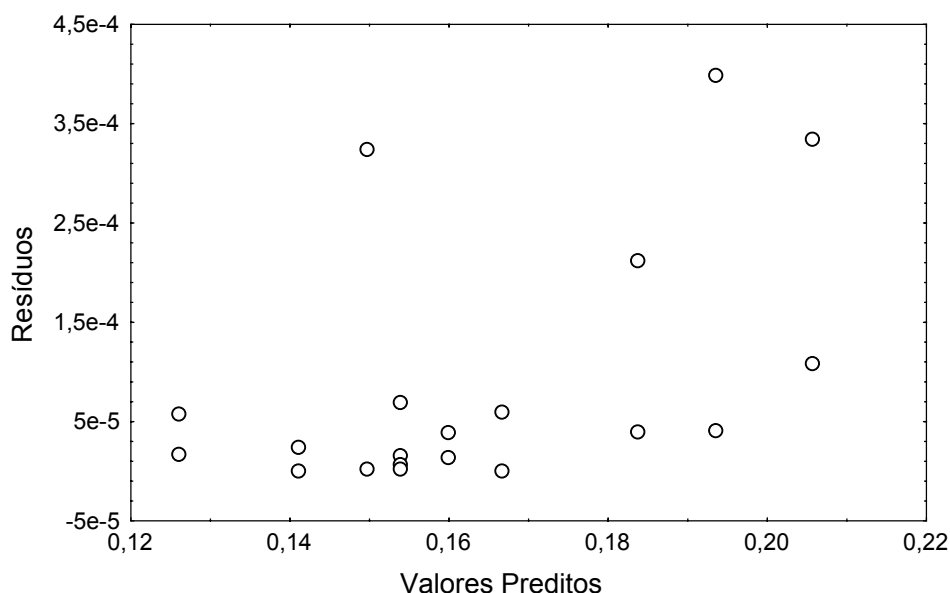


Figura 4.23: Gráfico de resíduo versus valores preditos pelo modelo polinomial de 2ª ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* com as variáveis concentração de glicose e acetato de amônio.

#### 4.2.4 Estudo do Crescimento do Fungo *Cephalosporium acremonium* em Meio Específico IV

Como foi descrito no item 3.2.3.1.1, um quarto planejamento foi proposto para avaliar o efeito das variáveis concentração de glicose e acetato de amônio na variável dependente, velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{\max}$ . Os níveis das variáveis foram deslocados para uma nova região de experimentação, como sugerido pelo planejamento anterior, discutido no item 4.2.3, cujos níveis são mostrados na Tabela 3.15. Novamente aqui um planejamento fatorial composto central  $2^2+4(\text{pontos axiais})+3(\text{ponto central})$  foi implementado, conforme mostra a matriz planejamento da Tabela 3.14. Os ensaios do planejamento  $2^2$  bem como os ensaios nos pontos axiais foram realizados em duplicatas, totalizando 19 ensaios. O valor da velocidade específica máxima de crescimento correspondentes ensaios 5 e 6 na Tabela 4.15, são os mesmos do ensaio 4 da Tabela 4.12 uma vez que as condições experimentais e os níveis das variáveis estudadas eram os mesmos.

A Tabela 4.15 apresenta o desenvolvimento do planejamento fatorial composto central com os fatores em valores codificados e reais de concentrações e a variável resposta velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo ( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio executado. Os gráficos obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio que permitiram calcular os valores de  $\mu_{\max}$  estão reunidos no Apêndice D.

Observando os valores de  $\mu_{\max}$  obtidos a partir dos dados experimentais e apresentados na Tabela 4.15, verifica-se que valores de velocidade específica máxima de crescimento, superiores aos obtidos pelo planejamento anterior e discutido no item 4.2.3, não foram alcançados, sugerindo que um valor de máximo pode estar dentro deste domínio estabelecido pelos fatores em estudo. Maiores valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos nos ensaios 5, 6 e 7 confirmando o favorecimento ao crescimento para baixas concentrações de glicose e acetato de amônio.

Tabela 4.15: Resultados obtidos de um Planejamento Fatorial Composto Central realizado para o estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração		$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )*	
	G (g/L)	N (g/L)	(1)	(2)
1	+6,5	+4,0	0,1500	0,1524
2	-1,5	+4,0	0,1785	0,1703
3	+6,5	-1,0	0,1766	0,1813
4	-1,5	-1,0	0,1512	0,1499
5	<sup>0</sup> 4,0	<sup>0</sup> 2,5	0,2161	-
6	<sup>0</sup> 4,0	<sup>0</sup> 2,5	0,2239	-
7	<sup>0</sup> 4,0	<sup>0</sup> 2,5	0,2122	-
8	+ <sup>α</sup> 7,5	<sup>0</sup> 2,5	0,1667	0,1724
9	- <sup>α</sup> 0,5	<sup>0</sup> 2,5	0,1447	0,1565
10	<sup>0</sup> 4,0	+ <sup>α</sup> 4,6	0,1723	0,1689
11	<sup>0</sup> 4,0	- <sup>α</sup> 0,4	0,1606	0,1715

\*duplicatas

#### 4.2.4.1 Ajuste e Análise do Modelo Matemático

A partir da análise dos dados obtidos no planejamento anterior e discutido no item 4.2.3, e dos dados da Tabela 4.15, partiu-se diretamente para uma ajuste a um modelo de segunda ordem representado pela equação 3.8. Para estimar eficientemente todos os coeficientes deste modelo e para verificar sua adequabilidade, todos os dados do

planejamento fatorial composto central apresentados na Tabela 4.15 foram utilizados. Os valores dos parâmetros foram estimados e são apresentados na Tabela 4.16 juntamente com o desvio padrão e seu intervalo de confiança. Os coeficientes considerados significativos, os quais devem ser considerados no modelo, foram a média global das observações, o efeito principal linear e quadrático da concentração de glicose, o efeito principal quadrático da concentração acetato de amônio, o efeito de interações entre dois fatores concentração de glicose/acetato de amônio. O efeito principal linear da concentração de acetato de amônio não foi considerado significativo, como pode ser observado na Tabela 4.16 com seu respectivo intervalo de confiança ou comparando o  $t_{\text{calculado}}$  com o  $t_{\text{tabelado}}$ . Portanto este parâmetro foi retirado do modelo e os demais parâmetros foram reestimados e a equação final que melhor representa a influência dos fatores estudados bem como suas interações, na velocidade específica máxima de crescimento no domínio estudado, é o modelo representado pela equação 4.5.

Tabela 4.16: Parâmetros do modelo quadrático, considerando a influência dos fatores concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na variável resposta  $\mu_{\text{max}}$  do fungo *C. acremonium* com seus respectivos intervalos de confiança, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial composto central  $2^2+4+3$ .

Fatores	Coefic. de Regressão	Desvio. padrão	t(11)	Intervalo de Confiança	
				-95%	+95%
Média	0,2174	0,0030	72,4103	0,2107	0,2241
G (L)	0,0040	0,0013	3,0767	0,0011	0,0069
G (Q)	-0,0288	0,0018	-15,3314	-0,0329	-0,0246
N (L)	0,0003	0,0013	0,2437	-0,0026	0,0032
N (Q)	-0,0246	0,0018	-13,1331	-0,0288	-0,0205
GN	-0,0129	0,0018	-7,0164	-0,0170	-0,0088

$t_{(11;0,025)\text{tabelado}} = 2,201$

$$\mu_{\text{max}} = 0,2174 + 0,0040G - 0,0288G^2 - 0,0246N^2 - 0,0129GN \quad (4.5)$$

$\pm 0,0067 \quad 0,0029 \quad 0,0042 \quad 0,0042 \quad 0,0041$

A análise de varância para o ajuste da equação 4.5 encontra-se na Tabela 4.17. A porcentagem de variação explicada pela regressão é de 95,7%, o qual deve ser comparado com o valor da máxima variação explicada que é de 96,8%. Outra forma de verificar o bom ajuste do modelo é através do gráfico de probabilidade normal. Se a distribuição de erro é normal, o gráfico de probabilidade normal resultará em uma linha reta, o que pode ser verificado pela Figura 4.24, o que autoriza o emprego do teste de F.



Tabela 4.17: Análise da variância para ajuste da equação 4.5 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.15.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	N <sup>o</sup> . de graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>
Regressão	0,0089	4	0,0022	78,6
Resíduo	0,0004	14	2,8E-05	
F. de Ajuste	0,0001	4	2,5E-05	0,83
Erro Puro	0,0003	10	3,0E-05	
Total	0,0093			

% de variação explicada = 95,7 → R = 0,9782  
 % máxima de var. explicável = 96,8  
 $F_{(4,14;95\%)\text{tabelado}} = 3,11$   $F_{(4,10;95\%)\text{tabelado}} = 3,48$

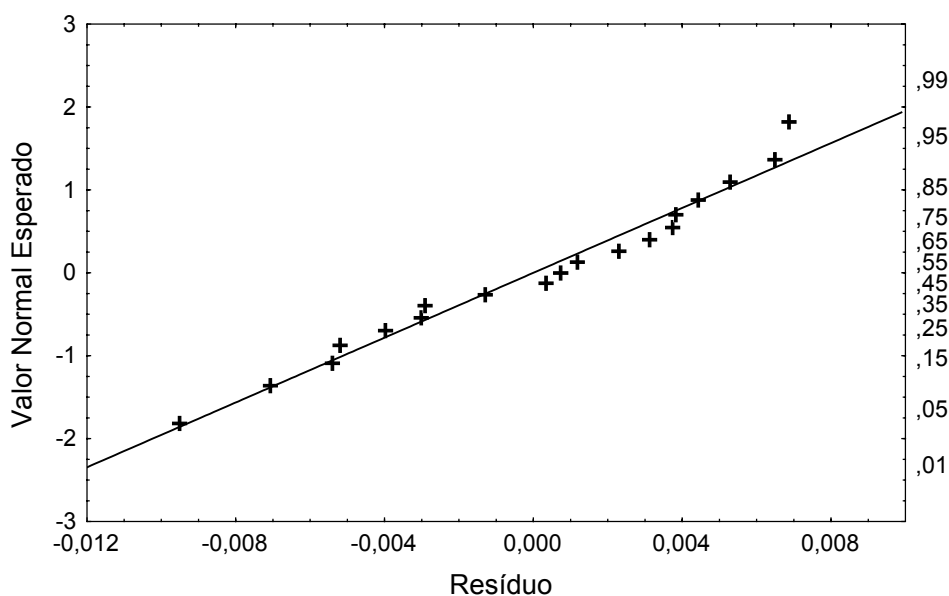


Figura 4.24: Gráfico de probabilidade normal dos erros associados ao modelo polinomial de 2<sup>a</sup> ordem, que relaciona a velocidade de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* com as variáveis concentração de glicose e de acetato de amônio.

O valor de F para a regressão é de 78,6 e para a falta de ajuste é de 0,83, no nível de significância de 95%, comparado com  $F_{\text{tabelado}}$  de 3,11, para a regressão e  $F_{\text{tabelado}}$  de 3,48 para a falta de ajuste, o que mostra uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativo. Portanto os dados experimentais da Tabela 4.15 são bem representados pela equação 4.5 a qual de acordo com o teste F pode ser usada para fins preditivos, dentro do domínio dos fatores estudados.

#### 4.2.4.2 Análise da Superfície de Resposta

A natureza da superfície de resposta foi explorada através de gráficos de superfície e de contorno da velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo em função dos fatores concentração de glicose e acetato de amônio. A Figura 4.25 mostra a superfície de resposta e a Figura 4.26 os contornos da equação 4.5, com os fatores em seus níveis reais. De acordo com essas figuras a região contém um ponto de máximo situado aproximadamente para uma concentração de glicose e acetato de amônio em torno de 4,5 e 2.5 g/L respectivamente, ou seja, próxima aos valores correspondentes ao ponto central do planejamento. Observa-se também que a velocidade específica máxima de crescimento pode ser mantida em um valor "ótimo" para uma ampla combinação de concentrações entre os nutrientes avaliados, ou seja, um aumento na concentração de um componente pode ser equilibrada pela diminuição na concentração do outro.

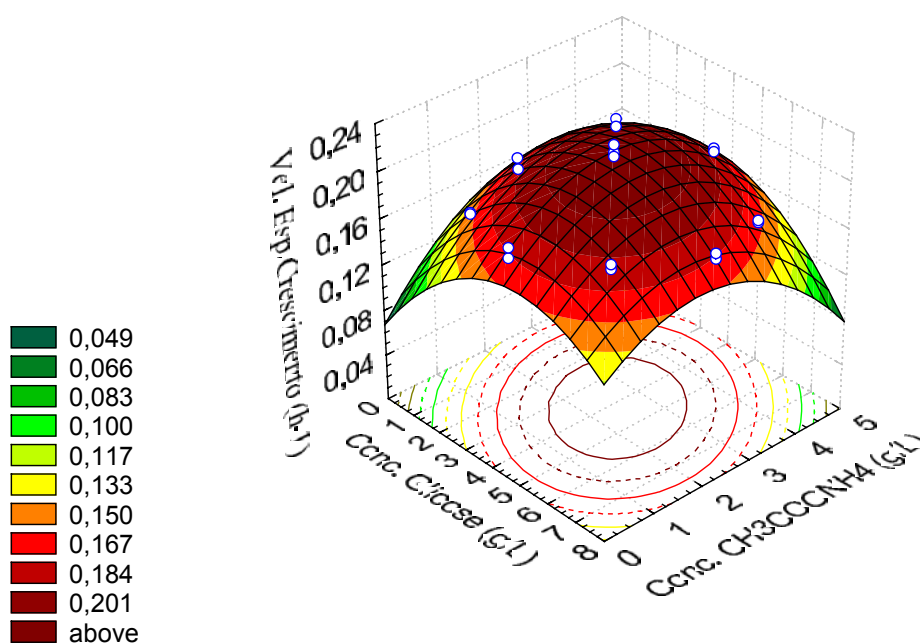


Figura 4.25: Superfície de resposta de  $\mu_{\max}$ , equação 4.5, em função da concentração de glicose e acetato de amônio.

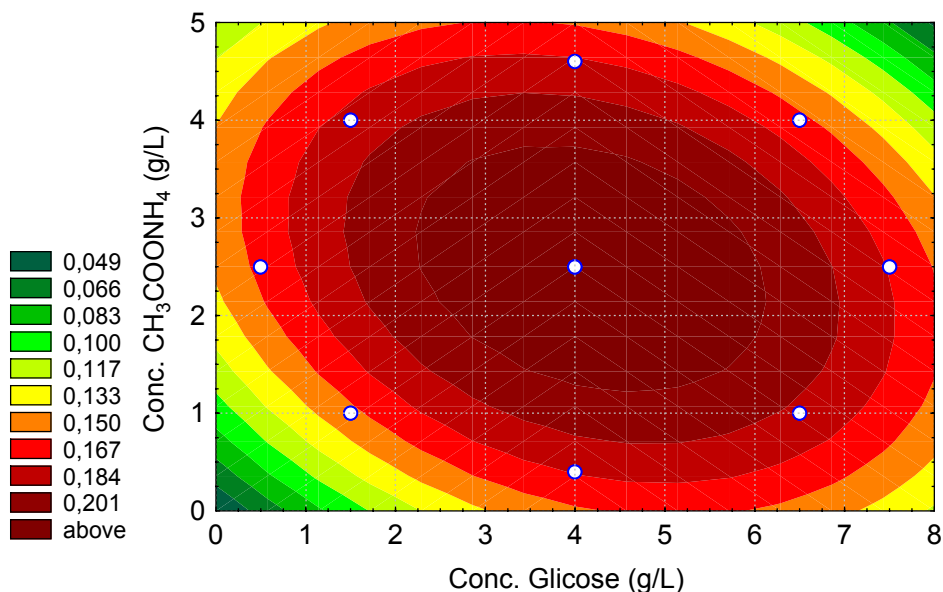


Figura 4.26: Contornos da superfície de resposta de  $\mu_{\max}$ , equação 4.5, em função da concentração de glicose e acetato de amônio

Como foi descrito no item 3.2.3.1, a análise canônica é um método que reescreve a equação de segunda ordem ajustada para verificar a natureza do ponto estacionário, isto é, se este é um ponto de máximo, de mínimo ou ponto de sela. A análise canônica foi feita com o objetivo de confirmar o ponto de máximo já detectado anteriormente pela superfície de resposta, embora geralmente seja melhor se observar uma região ótima de trabalho e não apenas um ponto ótimo sobre a superfície estudada. A Tabela 18 mostra os valores otimizados das variáveis concentração de glicose e acetato de amônio onde obtem-se uma máxima velocidade de crescimento  $\mu_{\max}$ , a partir da equação 4.5. Podemos observar na Tabela 4.18 que os valores dos autovalores,  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ , são negativos, confirmando que a natureza do ponto estacionário é um ponto de máximo. O Valor otimizado de  $\mu_{\max}$  foi obtido para concentrações relativamente baixas dos nutrientes estudados, diferentemente do que a literatura tem retratado, cujos valores para  $\mu_{\max}$  estão dentro de uma faixa de 0,06-0,09 h<sup>-1</sup>, embora estes autores tenham trabalhado com condições experimentais e concentrações de nutrientes diferentes. Oprime e Suazo (1997) trabalhando com o fungo *Penicillium chrysogenum*, já haviam observado que o crescimento deste fungo, era beneficiado por concentrações mais baixas de alguns nutrientes. Resultados similares também foram obtidos por Pulitano (1988), que trabalhando com o fungo *Penicillium chrysogenum* obteve duas possibilidades de altos valores de  $\mu_{\max}$ , trabalhando-se com

temperaturas entre 25,5 e 28,5°C, associando-se uma alta concentração de glicose com uma baixa concentração de sulfato de amônio ou uma baixa concentração de glicose com uma alta concentração de sulfato de amônio.

Tabela 4.18: Valores otimizados por análise canônica das variáveis concentrações de glicose e acetato de amônio na velocidade específica máxima de crescimento,  $\mu_{\max}$  a partir da equação 4.5.

<b>Veloc. espec. máxima. de crescimento (<math>\mu_{\max}</math>)</b>						
$\lambda_1$	$\lambda_2$	$G_{\text{cod}}$	$N_{\text{cod}}$	$G_{\text{real}}(\text{g/L})$	$N_{\text{real}}(\text{g/L})$	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$
-0,0336	-0,0201	0,0734	-0,0191	4,1835	2,4714	0,2179

Segundo Cooney (1979), altas concentrações de muitos nutrientes são de fato inibitórias para o processo de fermentação, resultantes de efeitos osmóticos não específicos ou efeitos altamente específicos envolvendo interações de nutrientes químicos com uma determinada enzima ou um componente da membrana. Em particular, poderá haver repressão catabólica pelo carbono, enxofre, fósforo e nitrogênio. Segundo o autor algumas hipóteses sobre a interação entre a fonte de carbono e a de nitrogênio durante a fase de crescimento do microrganismo podem ser formulada: quando ambas estão em altas concentrações, há grande quantidade de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultura, o que acarretaria um efeito inibitório sobre o processo de fermentação, diminuindo a velocidade específica de crescimento do fungo; quando ambas as fontes (carbono e nitrogênio) estão em baixas concentrações, isso limitaria o crescimento pela falta de nutrientes; quando uma das fontes está em excesso e a outra em baixa concentração, de algum modo parece haver um equilíbrio entre o possível efeito inibitório e o possível efeito limitante de um e de outro, de modo a favorecer uma alta velocidade específica de crescimento do microrganismo.

#### 4.2.5 Estudo da Produção de Cefalosporina C pelo Fungo *Cephalosporium acremonium* em Meio Específico I

Como foi descrito no item 3.2.3.1.2, 10 ensaios foram conduzidos por um planejamento fatorial completo, a partir dos quais foram analisados os efeitos da concentração de sacarose = S e de DL-metionina = Met na velocidade específica de produção de antibiótico,  $\mu_p$ . A Tabela 3.16 mostra os níveis utilizados para cada variável.

A Tabela 4.19 apresenta o desenvolvimento do planejamento fatorial completo e a variável resposta, velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ), para cada ensaio realizado. Os gráficos obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio que permitiram calcular os valores de  $\mu_p$ , descrito no item 3.2.3.4, estão reunidos no Apêndice E.

Tabela 4.19: Planejamento Fatorial completo realizado para estudo da influência das variáveis concentração de Sacarose = S e DL-metionina = Met na velocidade específica de produção do antibiótico cefalosporina C (CPC), pelo fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração		$\mu_p$ (mg <sub>CPC</sub> /g <sub>Cel.</sub> .h)*	
	S (g/L)	Met (g/L)	(1)	(2)
1	+18,0	+4,5	0,6079	0,7008
2	-8,0	+4,5	0,8694	0,7854
3	+18,0	-1,5	0,8407	0,8173
4	-8,0	-1,5	1,0298	0,9807
5	<sup>0</sup> 13,0	<sup>0</sup> 3,0	0,9890	0,9222

\*duplicatas

Observando -se os dados de velocidade específica de produção de antibiótico obtidos a partir dos dados experimentais, mostrados na Tabela 4.19, verifica-se uma melhoria significativa comparada com os valores obtidos para os ensaios realizados em frascos agitados e em biorreator convencional discutidos no item 4.1.2. Maiores valores de  $\mu_p$  foram obtidos nos ensaios 4 e 5 já destacando o favorecimento para a produção de antibiótico para concentrações de sacarose e DL-metionina na faixa de 8,0-13,0 g/L e 1,5-3,0 g/L, respectivamente.

Os ensaios 1 a 5 descritos na Tabela 4.19 foram utilizados para ajustar e verificar a adequabilidade de um modelo polinomial de primeira ordem da forma:

$$\mu_p = b_0 + b_1S + b_2\text{Met} + b_{12}\text{SMet} + \varepsilon \quad (4.6)$$

Onde  $b_0$  representa o efeito global da média das respostas,  $b_1$  e  $b_2$  o efeito principal da concentração de sacaros e DL-metionina, respectivamente e  $b_{12}$  o efeito de interação entre a concentração de sacarose e DL-metionina. Este modelo foi usado por acreditar-se, em princípio, que a superfície de resposta na região de interesse era uma função linear dos fatores. Caso este modelo estivesse correto, isto poderia indicar, principalmente, a direção e magnitude da mudança na resposta quando os níveis dos fatores fossem alterados.

Os parâmetros da equação 4.6 foram ajustados aos dados experimentais da Tabela 4.19, como descrito no item 3.2.3.1 e estão apresentados na Tabela 4.20 juntamente com o desvio padrão e seu intervalo de confiança. Os coeficientes considerados significativos, os quais devem ser considerados no modelo, foram a média global das observações, o efeito principal da concentração de sacarose e o efeito principal da concentração DL-metionina. O efeito de interação da concentração de sacarose/DL-metionina apresentou ser não significativo, como pode ser observado na Tabela 4.20 analisando seu intervalo de confiança.

Tabela 4.20: Parâmetros do modelo de 1ª ordem, que considera a influência dos fatores concentração de sacarose = S e DL-metionina = Met na variável resposta  $\mu_p$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial completo  $2^2+2$ .

Fatores	Coefic. de Regressão	Desvio. padrão	t(5)	Intervalo de Confiança	
				-95%	+95%
Média	0,8543	0,0152	56,1867	0,8152	0,8934
S	-0,0873	0,0170	-5,1366	-0,1310	-0,0436
Met	-0,0881	0,0170	-5,1824	-0,1318	-0,0444
SMet	0,0008	0,0170	0,0474	-0,0429	0,0445

$t_{(5;0,025)\text{tabelado}} = 2,571$

A análise de varância para o ajuste da equação 4.6 foi feita considerando todos os parâmetros da Tabela 4.20 e está apresentado na Tabela 4.21. A percentagem de variação explicada pela regressão é de 76,79%. Como não há modelo que consiga reproduzir a soma quadrática do erro puro, a variação explicada pela regressão deve ser comparada com o valor da máxima variação explicada que é de 96,43%.

Tabela 4.21: Análise da variância para ajuste da equação 4.6 com os parâmetros ajustados a partir dos dados da Tabela 4.20.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	N <sup>o</sup> . de graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>
Regressão	0,1231	3	0,0410	6,6
Resíduo	0,0372	6	0,0062	
F. de Ajuste	0,0256	1	0,0256	11,13
Erro Puro	0,0116	5	0,0023	
Total	0,1603	9		
% de variação explicada = 76,79		→	R = 0,8763	
% máxima de var. explicável = 92,76				
F <sub>(3,6;95%)tabelado</sub> = 4,76			F <sub>(1,5;95%)tabelado</sub> = 6,61	

O valor de F para a regressão é de 6,6, no nível de significância de 95%, comparado com F<sub>tabelado</sub> de 4,76, o que mostra uma regressão significativa, não fosse a evidência de falta de ajuste confirmada pelo alto valor de F<sub>calculado</sub>, na Tabela 4.21, comparado com F<sub>tabelado</sub>. Portanto a inadequação do modelo é evidente o que torna necessário procurar uma melhoria através, por exemplo, de um ajuste de um modelo quadrático. Apesar de um próximo passo a ser seguido para um melhor ajuste de um modelo aos dados experimentais, ser um ajuste quadrático, optou-se por fazer um deslocamento dos níveis das variáveis estudadas para uma nova região de experimentação, pois o amplo domínio já estabelecido das variáveis, principalmente o fator concentração de sacarose, poderia acarretar uma possível falta de ajuste a um modelo quadrático, fato já ocorrido no item 4.2.3. Portanto a variável concentração de sacarose, teve seus níveis deslocados para uma nova região de experimentação e a concentração de DL-metionina foi mantida em seu mesmo nível, para o estudo na próxima região de experimentação.

#### 4.2.6 Estudo da Produção de Cefalosporina C pelo Fungo *Cephalosporium acremonium* em Meio Específico II

Como foi descrito no item 3.2.3.1.2, 19 ensaios foram conduzidos por um planejamento fatorial composto central,  $2^2+4$  (duplicatas)+3 (ponto central), a partir dos quais foram analisados os efeitos da concentração de sacarose = S e de DL-metionina = Met na velocidade específica de produção de antibiótico. A Tabela 3.16 mostra os níveis utilizados para cada variável.

A Tabela 4.22 apresenta o desenvolvimento do planejamento fatorial composto central e a variável resposta velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ), para cada ensaio realizado. Os gráficos obtidos a partir dos dados experimentais de cada ensaio, que permitiram calcular os valores de  $\mu_p$  estão reunidos no Apêndice F.

Tabela 4.22: Planejamento Fatorial composto central realizado para estudo da influência das variáveis concentração de Sacarose = G, DL-metionina = Met na velocidade específica de produção de antibiótico cefalosporina C (CPC), pelo fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração		$\mu_p$ (mg <sub>CPC</sub> /g <sub>Cél.</sub> .h)*	
	S (g/L)	Met (g/L)	(1)	(2)
1	+10,0	+4,5	0,7381	0,8126
2	-4,0	+4,5	0,2827	0,2634
3	+10,0	-1,5	1,1491	1,0524
4	-4,0	-1,5	0,5697	0,6579
5	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 3,0	1,0119	-
6	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 3,0	0,9584	-
7	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 3,0	0,9155	-
8	+ <sup>α</sup> 11,25	<sup>0</sup> 3,0	1,0127	1,1441
9	- <sup>α</sup> 2,75	<sup>0</sup> 3,0	0,4206	0,3925
10	<sup>0</sup> 7,0	+ <sup>α</sup> 5,1	0,3887	0,3789
11	<sup>0</sup> 7,0	- <sup>α</sup> 0,9	0,6413	0,6893

\*duplicatas

Novamente observando -se os dados de  $\mu_p$  obtidos a partir dos dados experimentais e apresentados na Tabela 4.22, verifica uma melhoria significativa comparada com os apresentados na Tabela 2.1 (Araújo *et al.*, 1994). Verifica-se que valores superiores de  $\mu_p$  foram obtidos através da execução do planejamento estatístico, e também uma melhoria significativa comparada com os valores obtidos para os ensaios realizados em frascos



agitados e em biorreator convencional discutidos no item 4.1.2. Maiores valores de  $\mu_p$  foram obtidos nos ensaios 3 e 8 destacando o favorecimento para a produção de antibiótico para concentração de sacarose em torno de 10,0 g/L e para concentração de DL-metionina na faixa de 1,5-3,0 g/L.

#### 4.2.6.1 Ajuste e Análise do Modelo Matemático

Neste caso, partiu-se diretamente para uma ajuste a um modelo de segunda ordem representado pela equação 3.8. Para estimar todos os coeficientes deste modelo e para verificar sua adequabilidade, os dados do planejamento fatorial composto central apresentados na Tabela 4.22 foram utilizados. Os valores dos parâmetros ajustados são mostrados na Tabela 4.23, juntamente com o desvio padrão e seu intervalo de confiança. Os coeficientes considerados significativos, os quais devem ser considerados no modelo, foram a média global das observações, o efeitos principais linear e quadrático da concentração de sacarose, o efeito principal quadrático da concentração de DL-metionina. O coeficiente de interação da concentração de sacarose/DL-metionina não foi considerado significativo, como pode ser observado na Tabela 4.23 através do seu intervalo de confiança ou comparando o  $t_{\text{calculado}}$  com o  $t_{\text{tabelado}}$ . Portanto este coeficiente foi retirado do modelo e os parâmetros foram reestimados, assim, a equação final que melhor representa a influência das variáveis estudadas bem como suas interações, na velocidade específica de produção de antibiótico no domínio estudado, é o modelo representado pela equação 4.7.

Tabela 4.23: Parâmetros do modelo quadrático, considerando a influência dos fatores concentração de Sacarose = S e DL-metionina = Met na variável resposta  $\mu_p$  do fungo *C. acremonium* ATCC 48272, obtidos a partir dos resultados de um planejamento fatorial composto central  $2^2+4(\text{duplicatas})+3(\text{ponto central})$ .

Fatores	Coefic. de Regressão	Desvio. padrão	t(11)	Intervalo de Confiança	
				-95%	+95%
Média	0,9619	0,0297	32,414	0,8958	1,0281
S (L)	0,2424	0,0128	18,8657	0,2138	0,2711
S (Q)	-0,0954	0,0185	-5,1447	-0,1367	-0,0541
Met (L)	-0,1330	0,0128	-10,3527	-0,1617	-0,1044
Met (Q)	-0,2044	0,0185	-11,0196	-0,2457	-0,1631
Smet	0,0038	0,0182	0,2112	-0,0366	0,0443

$t_{(10;0,025)\text{tabelado}} = 2,228$

$$\mu_p = 0,9619 + 0,2424S - 0,1330Met - 0,0954S^2 - 0,2044Met^2 \quad (4.7)$$

$$\begin{matrix} \pm 0,066 & \pm 0,029 & \pm 0,029 & \pm 0,041 & \pm 0,041 \end{matrix}$$

A análise de variância para o ajuste da equação 4.7 encontra-se na Tabela 4.24. A percentagem de variação explicada pela regressão é de 96,36%, o qual deve ser comparado com o valor da máxima variação explicada que é de 98,35%. A Figura 4.27 mostra o gráfico de probabilidade normal onde pode-se observar uma distribuição normal dos erros, caracterizado pela linearidade com que estes se distribuem nesta, o que autoriza o emprego do teste de F.

Tabela 4.24: Análise da variância para ajuste da equação 4.3 com os parâmetros ajustados com os dados apresentados na tabela 4.22.

Fonte de variação	Soma Quadrática	N <sup>o</sup> . de graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>calculado</sub>
Regressão	1,5456	4	0,3864	94,24
Resíduo	0,0580	14	0,0041	
F. de Ajuste	0,0316	4	0,0079	3,04
Erro Puro	0,0264	10	0,0026	
Total	1,6036	18		

% de variação explicada = 96,36      →      R = 0,9817  
 % máxima de var. explicável = 98,35

$F_{(4,14;95\%)\text{tabelado}} = 3,11$      $F_{(4,10;95\%)\text{tabelado}} = 3,48$

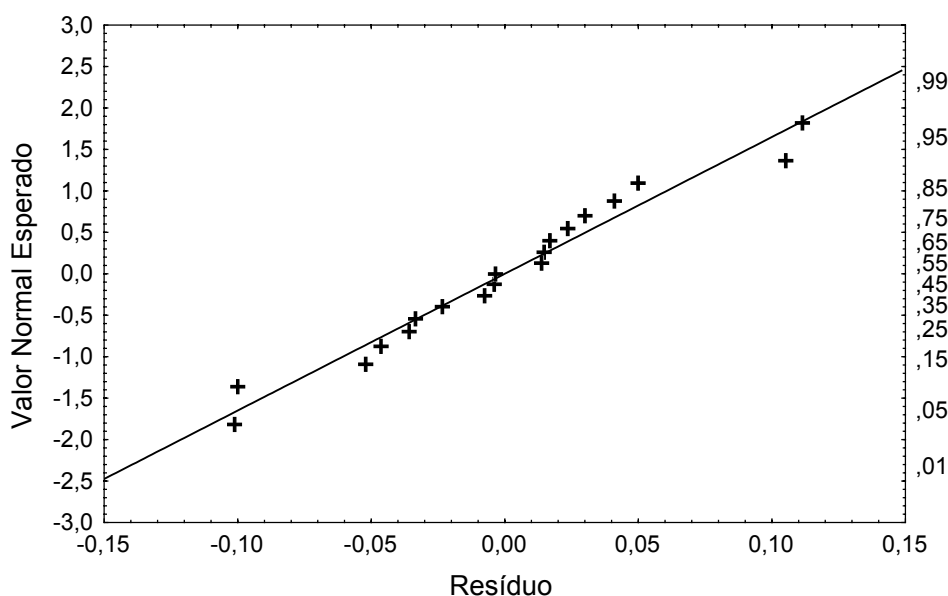


Figura 4.27: Gráfico de probabilidade normal dos erros associados ao modelo polinomial de 2<sup>a</sup> ordem, que relaciona a velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ) do fungo *C. acremonium* com as variáveis concentração de sacarose e DL-metionina.

O valor de F para a regressão é de 94,24 e para a falta de ajuste é de 3,04, no nível de significância de 95%, comparado com  $F_{\text{tabelado}}$  de 3,11 para regressão e  $F_{\text{tabelado}}$  de 3,48 para falta de ajuste, o que mostra uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. Portanto os dados experimentais da Tabela 4.22 são bem representados pela equação 4.7 a qual de acordo com o teste F, pode ser usada para fins preditivos, dentro do domínio dos fatores estudados.

#### 4.2.6.2 Análise da Superfície de Resposta para a Produção de Antibiótico ( $\mu_p$ )

A natureza da superfície de resposta foi explorada através de gráficos de superfície e de contorno da velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo em função dos fatores concentração de sacarose e DL-metionina. A Figura 4.28 mostra a superfície de resposta e a Figura 4.29 os contornos da equação 4.7, com os fatores em seus níveis reais. De acordo com essas figuras, a região contém um ponto de máximo situado aproximadamente para uma concentração de sacarose e DL-metionina em torno de 10,0 e 2,5 g/L, respectivamente. Observa-se também que a velocidade específica de produção de antibiótico pode ser mantida em altos valores para uma ampla combinação de concentrações das variáveis, conseqüentemente um aumento na concentração de um componente pode ser equilibrada pela diminuição do outro.

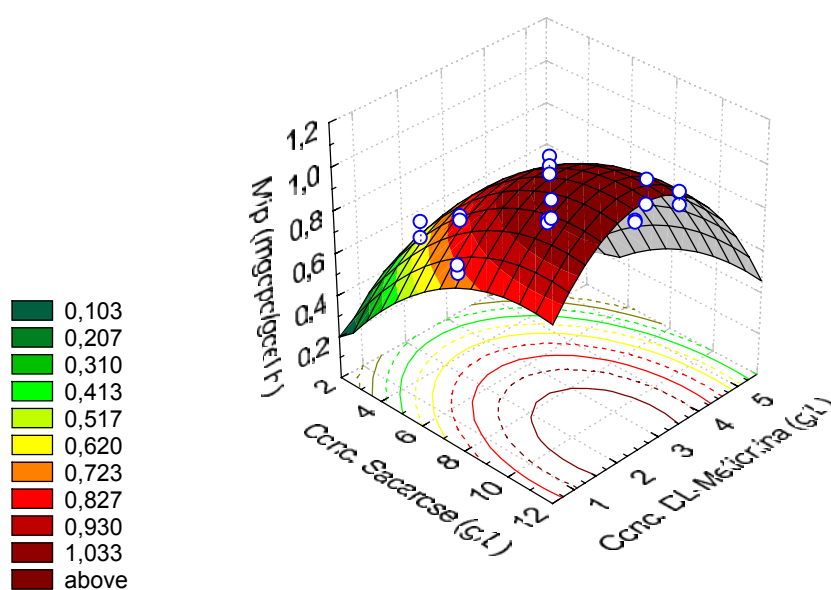


Figura 4.28: Superfície de resposta da velocidade específica de produção de cefalosporina C (Mip), equação 4.7, em função da concentração de sacarose e DL-metionina.

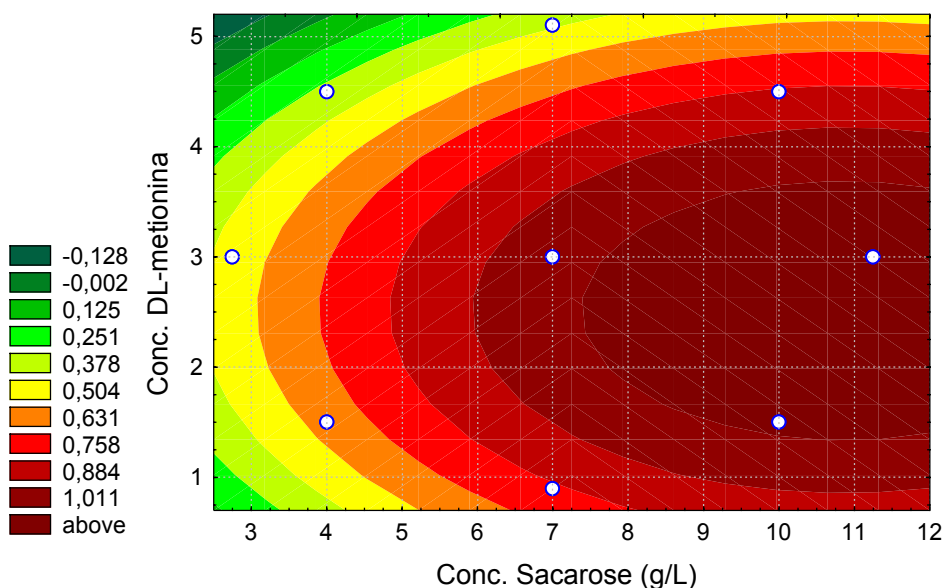


Figura 4.29: Contornos da superfície de resposta da velocidade específica de produção de cefalosporina C ( $\mu_p$ ), equação 4.7, em função da concentração de sacarose e DL-metionina.

Novamente aqui, seguindo a metodologia descrita no item 3.2.3.1, a análise canônica foi feita com o objetivo de confirmar o ponto de máximo já detectado anteriormente pela superfície de resposta, embora nem sempre o que se deseja é obter um ponto de máximo e sim uma região ótima de trabalho sobre a superfície estudada. A Tabela 4.25 mostra os valores otimizados das variáveis concentrações de sacarose e DL-metionina na velocidade específica de produção de antibiótico,  $\mu_p$  a partir da equação 4.7. Podemos observar na Tabela 4.25 que os valores dos autovalores,  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ , são negativos confirmando que a natureza do ponto estacionário é um ponto de máximo.

Tabela 4.25: Valores otimizados por análise canônica das variáveis concentrações de sacarose e DL-metionina na velocidade específica de produção de cefalosporina C,  $\mu_p$  a partir da equação 4.7.

Veloc. espec. de produção de cefalosporina C ( $\mu_p$ )						
$\lambda_1$	$\lambda_2$	$S_{cod}$	$Met_{cod}$	$S_{real}(g/L)$	$Met_{real}(g/L)$	$\mu_p(mg_{CPC}/g_{cél. \cdot h})$
-0,2121	-0,1079	1,1209	-0,3038	10,3628	2,5443	1.1220

#### **4.2.7 Ensaio em Fermentador de Tanque Agitado em Regime Batelada Alimentada para Validação do Modelo Estatístico**

O ensaio em regime batelada alimentada foi realizado com o objetivo de reproduzir os resultados obtidos na otimização realizada com a técnica do planejamento estatístico de experimentos. Como descrito no item 3.2.2.4, o reator foi alimentado a uma vazão exponencial, com concentrações de glicose e acetato de amônio de forma a manter as concentrações destes nutrientes no biorreator o mais próximo possível dos valores que maximizam a velocidade específica de crescimento, que é em torno de 4,5 e 2,5 g/L, respectivamente. Posteriormente a alimentação de glicose e acetato de amônio foi substituída por sacarose e DL-metionina de forma que as concentrações destes componentes se mantessem no biorreator o mais próximo possível dos valores que maximizam a velocidade específica de produção do antibiótico, que são em torno de 10,5 e 2,5 g/L, respectivamente. As composições do meio de cultivo utilizada estão apresentados na Tabela 3.5 e 3.6 e as condições de operação foram descritas no item 3.2.2.4.

As Figuras 4.30 e 4.31 mostram os resultados experimentais para o ensaio realizado no biorreator em regime batelada alimentada onde o crescimento celular e formação de produto foram avaliados em termos de concentração e de massa, neste caso levando em consideração a diluição ocorrido com a alimentação. Por um período de 48 horas o biorreator foi alimentado com solução de glicose e acetato de amônio com o objetivo de favorecer o crescimento. Neste período observa-se na Figura 4.30 uma acelerada formação de biomassa, atingindo neste período uma concentração celular em torno de 17,0 g/L. Também nesta figura observa-se a formação do antibiótico associada ao crescimento. Isto ocorreu porque a concentração do açúcar glicose estava baixa, e nestas condições a formação do produto é favorecida devido à baixa repressão exercida por esse carboidrato, fato já mencionado por alguns autores (Behmer e Demain, 1983; Demain, 1984). Após o período de 48 horas a solução de glicose e acetato de amônio foram substituídas por solução de sacarose e de DL-metionina com o objetivo de propiciar a produção do antibiótico. Uma maior velocidade de produção de antibiótico pode ser observada por um período de 30 horas, correspondentes ao tempo de fermentação de 60 a 90 horas, período este onde a concentração de sacarose manteve-se mais estável e dentro do valor estabelecido para a operação o que pode ser observado na Figura 4.31.

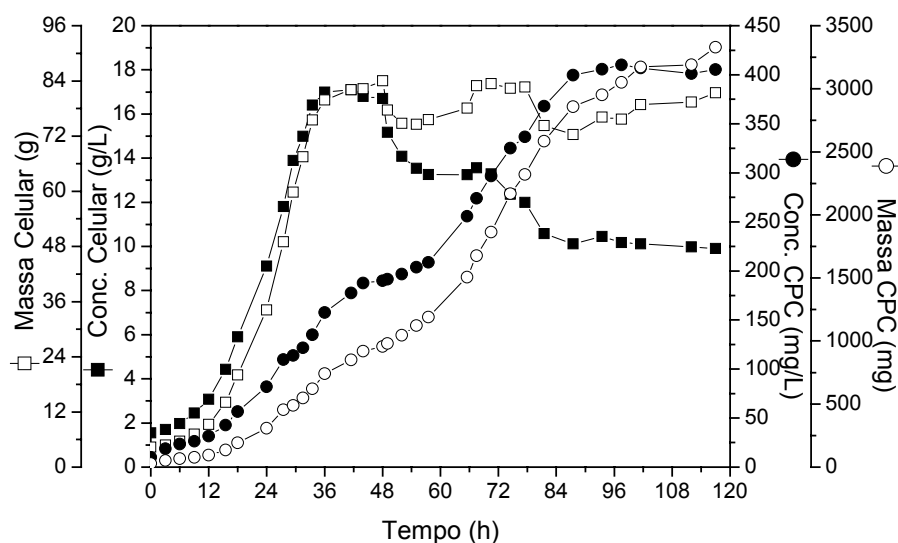


Figura 4.30: Resultados experimentais de concentração e massa celular e de cefalosporina C (CPC), obtidos para um ensaio realizado em fermentador de tanque agitado (Bioflo III) em batelada alimentada utilizando uma vazão de alimentação exponencial para a solução de glicose e acetato de amônio no período inicial de 48 horas e após, alimentação exponencial de solução de sacarose e DL-metionina.

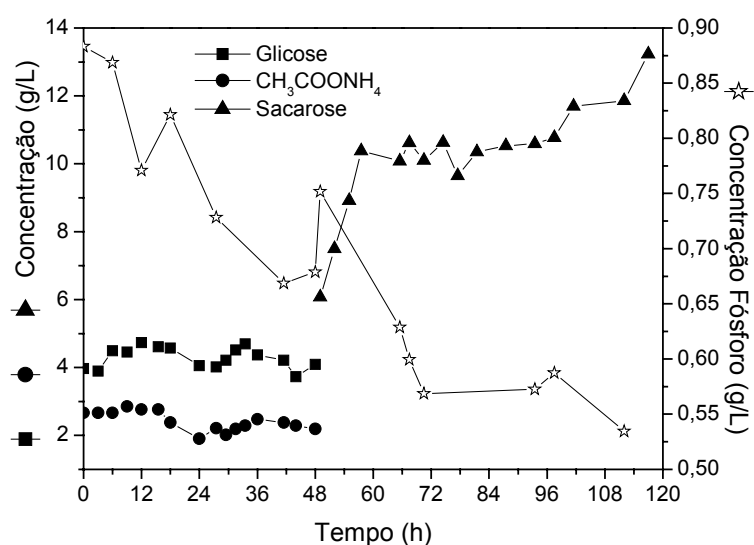


Figura 4.31: Resultados experimentais obtidos para um ensaio em fermentador de tanque agitado (Bioflo III) em batelada alimentada utilizando uma vazão de alimentação exponencial para a solução de glicose e acetato de amônio no período inicial de 48 horas e após, alimentação exponencial de solução de sacarose e DL-metionina.

O valor da velocidade específica máxima de crescimento foi determinado, em termos de massa a partir dos dados experimentais da Figura 4.30, para o período de fermentação de 0 a 33 horas utilizando a equação 3.30 e o valor obtido foi de  $0,09 \text{ h}^{-1}$ . O ajuste para o cálculo da velocidade pode ser visto na Figura 4.32. O valor da velocidade

específica de produção de antibiótico também foi determinado em termos de massa a partir dos dados experimentais da Figura 4.30, para o período de fermentação de 58 a 90 horas. Para tal, utilizou-se uma concentração celular média, neste período de tempo, de 78,97 g, utilizando a equação 3.32 e o valor obtido foi de 0,75 mg<sub>CPC</sub>/g<sub>cel</sub>.h. O ajuste para o cálculo da velocidade pode ser visto na Figura 4.32.

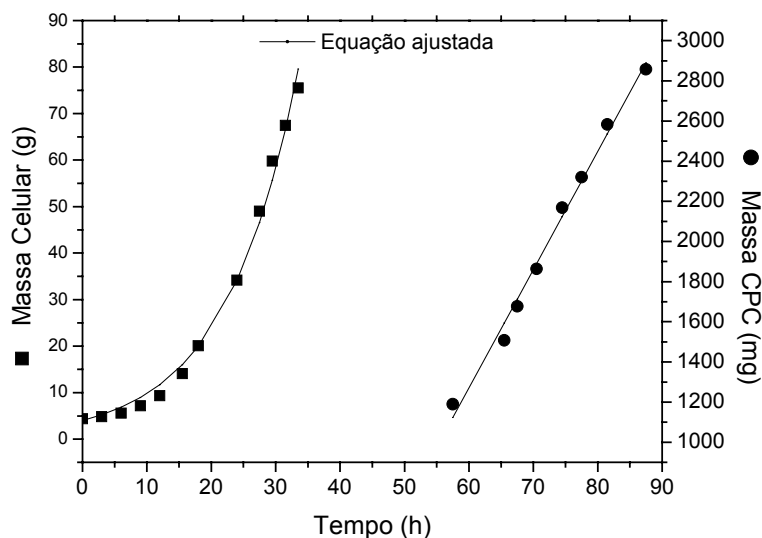


Figura 4.32: Ajuste dos resultados de massa celular e de cefalosporina C (CPC), à equação 3.30 e 3.32, para determinação da velocidade específica máxima de crescimento e velocidade específica de produção de antibiótico, respectivamente, obtidos de um ensaio batelada alimentada.

Como pode-se notar o valor de  $\mu_{\max}$  e  $\mu_p$  obtidos no ensaio realizado em fermentador foram inferiores aos obtidos pelos modelos estatísticos. Algumas hipóteses para justificar esta possível diferença pode ser, a morte celular causada pela agitação do sistema que para manter o nível de oxigênio no meio, uma velocidade de 700 rpm foi requerida, enquanto que para os ensaios realizados em mesa rotativa a agitação era de 250 rpm, constante. As medidas obtidas através dos ensaios realizados em mesa rotativa, não levam em conta a adaptação do microrganismo ao meio, principalmente em relação à pressão osmótica, pois o tempo de ensaio era menor, enquanto que para o ensaio em fermentador, o efeito da adaptação do microrganismo a um meio cuja pressão osmótica é menor, deve ser levado em consideração.

## 4.3 Redes Neurais

### 4.3.1 Base de Dados para Treinamento e Simulação do Modelo

Como foi descrito no item 3.2.3.2, um dos primeiros passos para uso da técnica de redes neurais, é o estabelecimento de uma base de dados para o treinamento, que consiga representar todo o domínio estudado. O conjunto de dados escolhido para o treinamento da rede foram os obtidos dos ensaios realizados de acordo com os planejamentos fatoriais, para verificar o efeito das concentrações de glicose, acetato de amônio, fósforo, DL-metionina, ácido oléico e solução de sais na velocidade específica máxima de crescimento do fungo. Todos os ensaios apresentados na Tabela 4.2 e 4.9, bem como os ensaios referentes ao planejamento fatorial completo da Tabela 4.12 e 4.15, foram utilizados para o treinamento da rede e simulação. Os ensaios referentes aos pontos axiais dos planejamentos da Tabela 4.12 e 4.15 bem como os do planejamento da Tabela 4.9, apresentados no Apêndice B, somente serão utilizados para avaliar a capacidade de previsão da rede para condições experimentais diferentes das utilizadas no treinamento.

A Tabela 4.26 apresenta um conjunto de ensaios que foram acrescentados ao conjunto que formará a base de dados para o treinamento da rede. Para a utilização deste conjunto de ensaios da Tabela 4.26, partiu-se da hipótese de que a falta de algum nutriente essencial no meio de cultura impediria o crescimento, ou seja, velocidade de crescimento igual a zero. Portanto um conjunto de 63 ensaios constituiu a base de dados a ser utilizada para o treinamento e simulação da rede neural, 19 ensaios referentes à Tabela 4.2, 20 ensaios referentes à Tabela 4.9, 12 ensaios referentes à Tabela 4.12, 7 ensaios referentes à Tabela 4.15 e 5 ensaios referentes à Tabela 4.26.

As Figuras 4.33, 4.34, 4.35 e 4.36 mostram o domínio local para as variáveis concentrações de glicose e de acetato de amônio referentes aos planejamentos apresentados na Tabela 4.2, 4.9, 4.12 e 4.15, respectivamente. A Figura 4.37 apresenta o domínio global, acrescentado com os dados da Tabela 4.26, utilizado para o treinamento da rede e obtenção de um modelo representativo dos dados experimentais.



Tabela 4.26: Condições experimentais utilizadas no treinamento da rede para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Concentração (g/L)						$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
	G	N	P	Met	Olei	Sais	
1	0,0	0,0	0,82	0,5	0,5	20,0	0,0
2	17,0	0,0	0,82	0,5	0,5	20,0	0,0
3	35,0	0,0	0,82	0,5	0,5	20,0	0,0
4	0,0	6,5	0,82	0,5	0,5	20,0	0,0
5	0,0	13,0	0,82	0,5	0,5	20,0	0,0

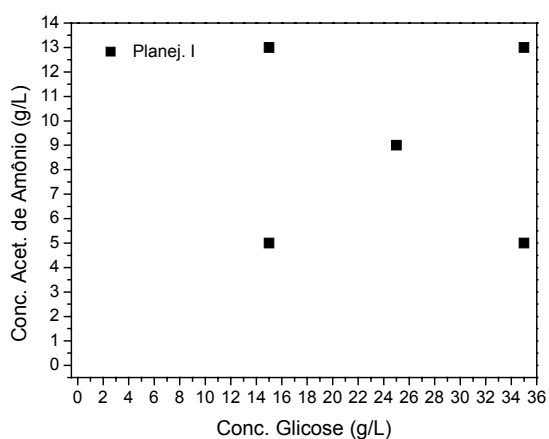


Figura 4.32: Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.2.

**Erro! Vínculo não válido.**

Figura 4.34: Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.12.

**Erro! Vínculo não válido.**

Figura 4.33: Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.9, com os pontos axiais mostrados no Apêndice B.

**Erro! Vínculo não válido.**

Figura 4.35: Domínio das variáveis conc. de glicose e acet. de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.15.

**Erro! Vínculo não válido.**

Figura 4.37: Domínio global utilizado para o treinamento da rede, para as variáveis concentração de glicose e acetato de amônio, definidos no planejamento fatorial da Tabela 4.2, 4.9, 4.12 e 4.15 com os pontos adicionais mostrados na Tabela 4.26.

### 4.3.2 Arquitetura da Rede Neural

Como foi descrito no item 3.2.3.2, o modelo de rede neural do tipo "feedforward", mostrada na Figura 3.1, foi empregada para inferir as velocidades específicas de crescimento celular. As variáveis escolhidas como entrada da rede neural foram as concentrações iniciais de glicose, acetato de amônio, fósforo, DL-metionina, ácido oléico e solução de sais, pelo fato de apresentarem uma relação direta com a velocidade específica de crescimento celular. Desta forma, a topologia da rede inclui 6 entradas e uma saída.

Inicialmente foi realizado um estudo com relação ao número de neurônios na camada oculta. Foram analisadas redes contendo de 4 a 26 neurônios nessa camada, empregando-se para a taxa de aprendizado e termo de momento, valores iguais a 0,7 e 0,9, respectivamente. A rede foi treinada e usada para simular o conjunto de dados do treinamento e os ensaios relativos aos pontos axiais. A Figura 4.38 ilustra a soma do quadrado dos erros no treinamento ( $SQE_{\text{treinamento}}$ ) e para a simulação ( $SQE_{\text{simulação}}$ ), em função do número de neurônios na camada oculta, após 10.000 apresentações da base dados à rede. A Figura 4.38 mostra também a correlação obtida entre os dados simulados e experimentais, relativos aos ensaios nos pontos axiais dos planejamentos, em função do números de neurônios.

Observa-se na Figura 4.38 que um menor erro no treinamento foi obtido para um número de neurônio igual a 22. Embora a soma do quadrado dos erros para a simulação da base de dados do treinamento mostrou-se sempre decrescente, à medida que aumenta o número de neurônios, a correlação obtida entre os dados simulados e experimentais, para a base de dados relativo aos pontos axiais, apresentou um maior valor para um número de neurônios igual a 22. Nascimento e Yamamoto (1993) verificaram que o aumento do número de neurônios na camada oculta conduz a um melhor mapeamento do conjunto de treinamento, mas tem como consequência, na maioria dos casos, previsões piores, caso conhecido como "overfitting". A partir destes resultados, uma análise mais detalhada foi feita com uma rede contendo 22 neurônios na camada oculta.

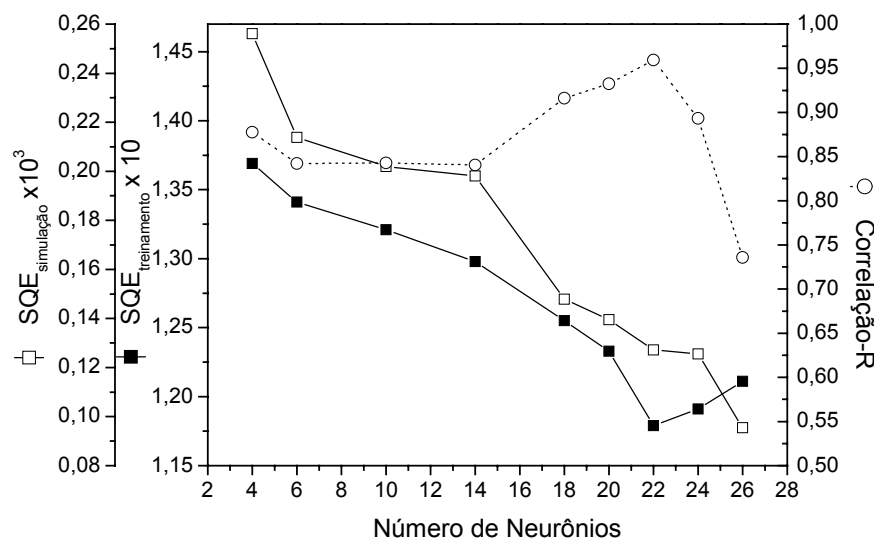


Figura 4.38: Soma do Quadrado dos Erros(SQE) obtido após 10.000 apresentações da base de dados à rede, para simulação destes e correlação obtida entre os dados simulados e experimentais, relativos aos ensaios nos pontos axiais dos planejamentos.

A rede foi treinada, utilizando 22 neurônios na camada oculta, e usada para simular o conjunto de dados do treinamento e os ensaios relativos aos pontos axiais. A Figura 4.39 ilustra a  $SQE_{treinamento}$  e a  $SQE_{simulação}$ , em função do número de apresentações da base de dados à rede. A Figura 4.39 mostra também a correlação obtida entre os dados simulados e experimentais, relativos aos ensaios nos pontos axiais, em função do número de apresentações da base de dados à rede.

Observa-se na Figura 4.39 que um menor valor para a  $SQE_{treinamento}$  foi obtido para um número de apresentações da base de dados à rede em torno de 12.500 e para a  $SQE_{simulação}$ , valores menores são obtidos à medida que aumenta o número de apresentações. Mas observando os valores de correlação-R, na Figura 4.39, menores valores são obtidos quando se aumentam o número de apresentações da base de dados à rede. Para uma faixa de 10.000-12.500, observa-se maiores valores de correlação-R. Observa-se também que a  $SQE_{treinamento}$  após 10.000 já está sobre-treinada uma vez que a  $SQE_{simulação}$  teve um menor valor bem como um maior valor de correlação-R em 10.000 apresentações da base de dados à rede.

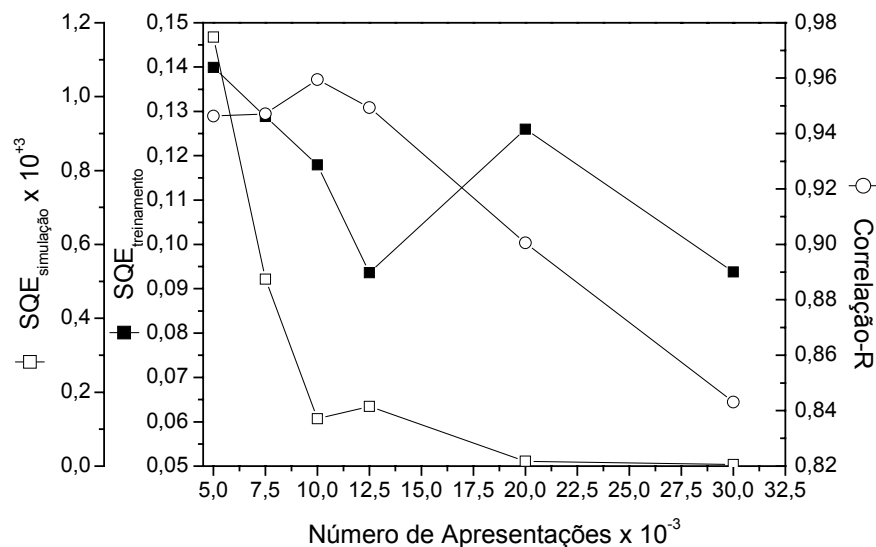


Figura 4.39: Soma do Quadrado dos Erros (SQE) obtida, por uma rede com 22 neurônios na camada oculta, no treinamento e para a simulação, a correlação entre os dados simulados e experimentais, relativos aos pontos axiais, em função do número de apresentações da base de dados à rede.

Portanto a rede que melhor representou os valores experimentais da influência das concentrações de glicose, acetato de amônio, fósforo, DL-metionina, ácido oléico e solução de sais na velocidade específica máxima de crescimento do fungo, dentro do domínio representado pela Figura 4.37, foi uma rede que com 22 neurônios na camada oculta, cuja base de dados, Tabelas 4.2, 4.9, 4.12 e 4.15, foram apresentadas à rede 10.000 vezes, número que minimizou a soma quadrática dos erros no treinamento e simulação e também apresentou uma maior correlação obtida entre os dados simulados e experimentais, relativos aos ensaios nos pontos axiais dos planejamentos fatoriais, apresentados à rede.

A Figura 4.40 mostra a velocidade específica máxima de crescimento obtida experimentalmente ( $\mu_{exp}$ ) em função dos valores simulados pela rede ( $\mu_{rede}$ ), representado pela reta real, onde verifica-se uma boa concordância das previsões do modelo obtido através da rede neural. A boa capacidade preditiva da rede também pode ser observada, comparando a reta real com a reta ideal ( $\mu_{rede} = \mu_{exp}$ ). A Tabela 4.27 apresenta a análise de variância para a reta ideal, considerando que esta representa os dados de velocidade específica de crescimento do fungo obtida pela rede. A alta porcentagem de variação explicada pela regressão de 96,95% e com um coeficiente de correlação de 0,9846, confirma os bons resultados preditos pela rede, para os dados utilizados no treinamento da mesma.

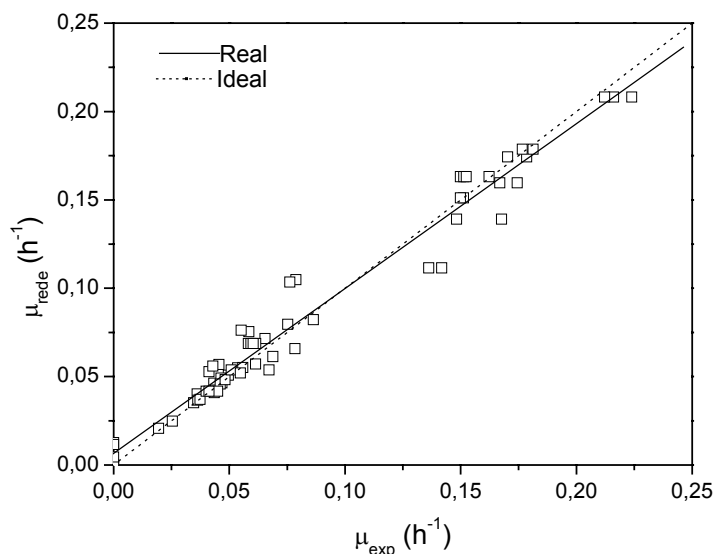


Figura 4.40: Relação entre velocidade específica máxima de crescimento obtida a partir de dados experimentais ( $\mu_{\text{exp}}$ ) e a prevista pela rede neural ( $\mu_{\text{rede}}$ ), representada pela reta real, e reta ideal onde  $\mu_{\text{rede}} = \mu_{\text{exp}}$ .

Tabela 4.27: Análise de variância para o modelo de redes neurais, utilizado na simulação do conjunto de dados utilizados no treinamento da rede.

Fonte de Variação	Soma Quadrática
Regressão	0,2316
Resíduos	0,0073
Total	0,2389
% de variação explicada = 96,95 → R = 0,9846	

E a Figura 4.41 mostra  $\mu_{\text{exp}}$  em função de  $\mu_{\text{rede}}$ , relativos aos ensaios nos pontos axiais e representado pela reta real, onde verifica-se a boa concordância das previsões do modelo obtido através da rede neural. A boa capacidade preditiva da rede também pode ser observada, comparando a reta real com a reta ideal ( $\mu_{\text{rede}} = \mu_{\text{exp}}$ ). A Tabela 4.28 apresenta a análise de variância para a reta ideal, considerando que esta representa os dados de velocidade específica de crescimento do fungo obtida pela rede. A alta porcentagem de variação explicada pela regressão de 91,72% e com um coeficiente de correlação de 0,9577, confirma os bons resultados preditos pela rede, para os dados relativos aos pontos axiais dos planejamentos.

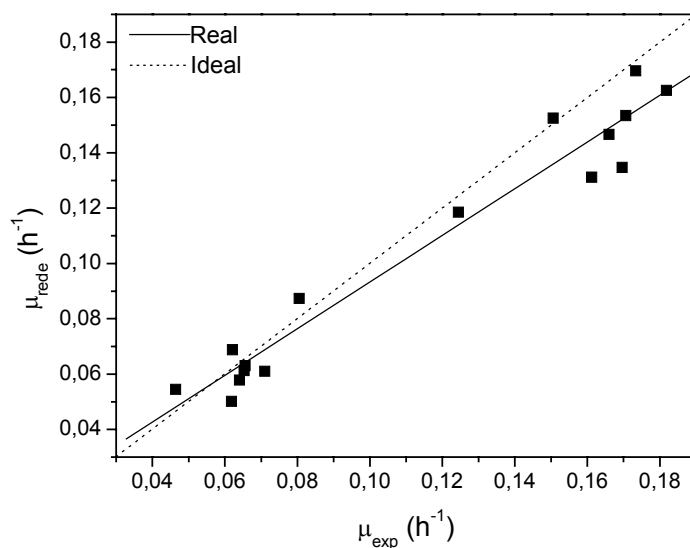


Figura 4.41: Relação entre velocidade específica máxima de crescimento obtida a partir de dados experimentais ( $\mu_{\text{exp}}$ ) e a prevista pela rede neural ( $\mu_{\text{rede}}$ ), relativos aos pontos axiais.

Tabela 4.28: Análise de variância para o modelo de redes neurais, utilizado na simulação do conjunto de dados referentes aos ensaios nos pontos axiais.

Fonte de Variação	Soma Quadrática
Regressão	0,0410
Resíduos	0,0037
Total	0,0447
% de variação explicada = 91,72 → R = 0,9577	

### 4.3.3 Análise da Superfície de Resposta obtida pela Rede Neural

A rede neural definida anteriormente foi utilizada para simular todo o domínio definido pela Figura 4.37. Em todas as simulações a seguir, considerou-se constantes as concentrações de fósforo, DL-metionina e ácido oléico em 0,82, 0,5, 0,5 g/L, respectivamente, e para a solução de sais em 20,0 mL/L. As superfícies foram obtidas em função das variáveis concentrações de glicose e acetato de amônio, por terem sido consideradas como as variáveis mais importantes na análise estatística efetuada anteriormente.

A Figura 4.42 mostra alguns perfis obtidos na simulação através da rede neural da velocidade específica máxima de crescimento em função da concentração de glicose,

mantendo a de acetato de amônio fixa. A Figura 4.43 mostra a velocidade específica máxima de crescimento em função da concentração de acetato de amônio, mantendo fixo a de glicose. Nas duas figuras fica claro que o crescimento celular segue um modelo de inibição pelo substrato, no caso por dois substratos, concentração de glicose e acetato de amônio. Nas duas figuras observa-se que maiores valores de velocidade específica máxima de crescimento celular são obtidas para concentrações de glicose e de acetato de amônio na ordem de 4,0 e 2,5 g/L, respectivamente, em concordância com os valores obtidos experimentalmente e os valores otimizados para estas variáveis e apresentados na Tabela 4.18.

Na Figura 4.42 observa-se que para concentrações de acetato de amônio fixas em 9,0 e 13,0 g/L e concentrações de glicose na faixa de 9,0 a 35,0 g/L a velocidade específica máxima de crescimento celular sofre pouca variação, na faixa de 0,04 a 0,07 h<sup>-1</sup> e valores correspondentes, obtidos experimentalmente, são apresentados nas Tabela 4.2 e 4.9. Maiores valores de  $\mu_{\max}$  são encontrados para regiões de concentrações de glicose e acetato de amônio na faixa de 3,0 a 6,0 e 0,4 a 2,5 g/L, respectivamente, e valores correspondentes, obtidos experimentalmente, são apresentados nas Tabela 4.12 e 4.15.

Na Figura 4.43 observações semelhantes podem serem feitas, onde para concentrações de glicose fixas em 10,0 e 35,0 g/L e concentrações de acetato de amônio na faixa de 6,0 a 13,0 g/L a velocidade específica máxima de crescimento celular sofre pouca variação, na faixa de 0,04 a 0,09 h<sup>-1</sup> e valores correspondentes, obtidos experimentalmente, são apresentados nas Tabela 4.2 e 4.9. Maiores valores de  $\mu_{\max}$  são encontrados para regiões de concentrações de glicose e acetato de amônio na faixa de 0,5 a 10,0 e 0,4 a 3,0 g/L, respectivamente, e valores correspondentes, obtidos experimentalmente, são apresentados nas Tabela 4.12 e 4.15.

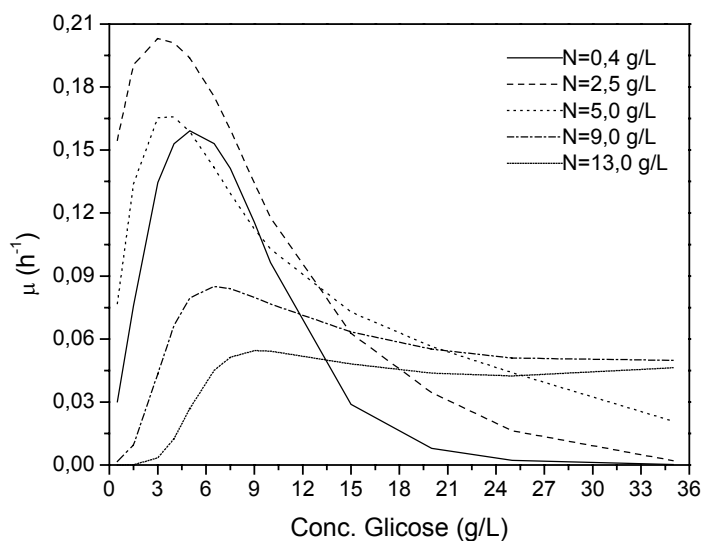


Figura 4.42: Perfis da velocidade específica máxima de crescimento em função da concentração de glicose, mantendo a de acetato de amônio fixa, obtidos na simulação através da rede neural.

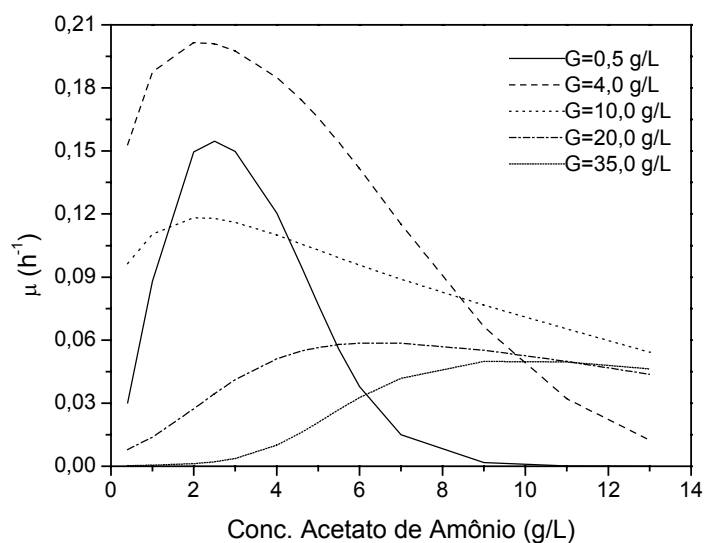


Figura 4.43: Perfis da velocidade específica máxima de crescimento em função da concentração de acetato de amônio, mantendo a de glicose fixa, obtidos na simulação através da rede neural.

Primeiramente, superfícies de respostas foram obtidas dividindo o domínio global mostrado na Figura 4.37, em quatro regiões. A Figura 4.44 mostra as velocidades específicas de crescimento celular, obtidos pela simulação do domínio da concentração de glicose e de acetato de amônio, variando de acordo com a respectiva região. Na Figura 4.44, (A) mostra a velocidade específica de crescimento celular, obtida pela simulação do domínio de concentração de glicose variando de 0,0 a 15,0 g/L e de acetato de amônio



variando de 6,0 a 13,0 g/L, (B) concentração de glicose variando de 15,0 a 35,0 g/L e de acetato de amônio variando de 6,0 a 13,0 g/L, (C) concentração de glicose variando de 0,0 a 15,0 g/L e de acetato de amônio variando de 0,0 a 6,0 g/L e (D) concentração de glicose variando de 15,0 a 35,0 g/L e de acetato de amônio variando de 0,0 a 6,0 g/L. Observando estas figuras fica claro que o crescimento celular é fortemente influenciado pelas concentrações de glicose e de acetato de amônio onde um maior valor de velocidade específica de crescimento pode ser visualizado na Figura 4.44-(C), destacando o efeito inibitório para concentração de glicose e de acetato de amônio a partir de 4,0 e 2,5 g/L, respectivamente.

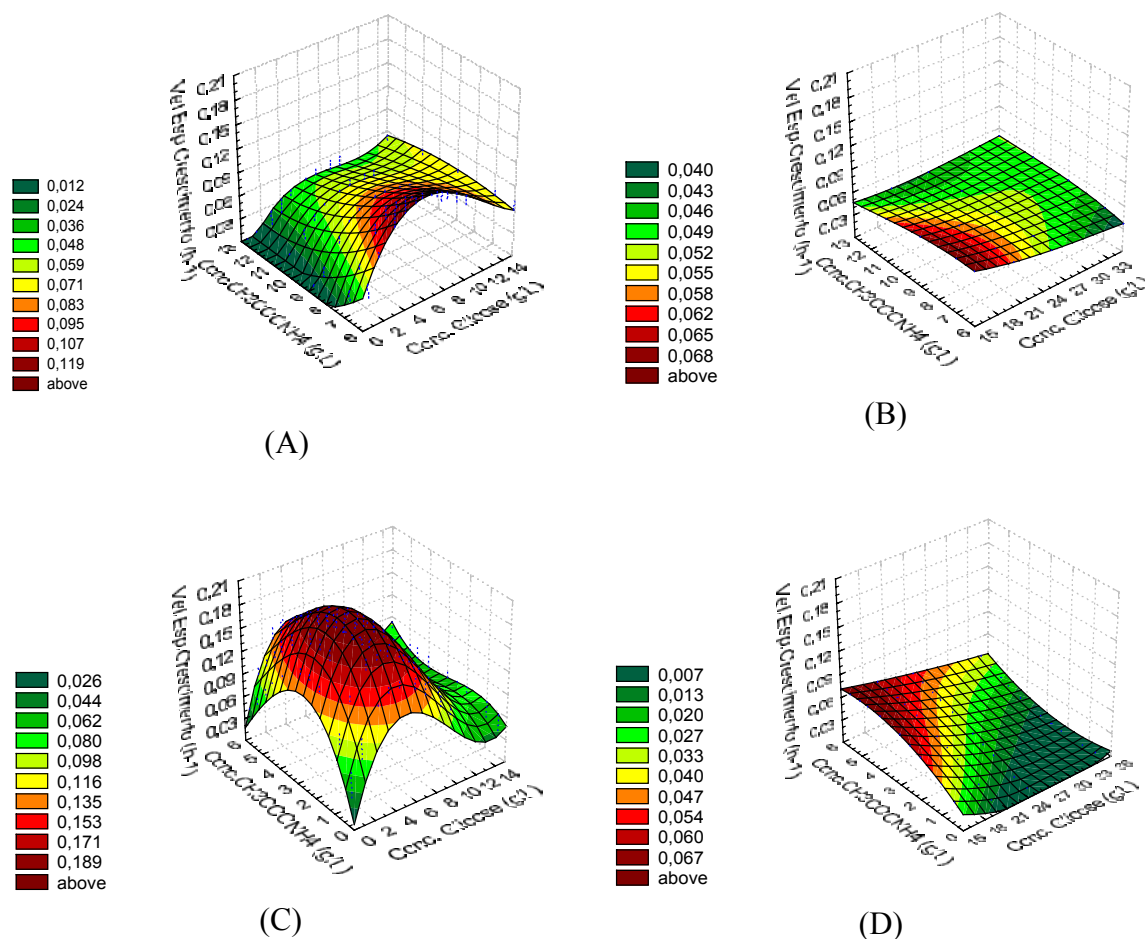


Figura 4.44: Superfície de resposta da velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ), obtidos pela simulação, em rede neural, para os vários domínios de concentrações de glicose e de acetato de amônio.

As Figuras 4.45-(A), (B), (C) e (D) mostram os contornos da velocidade específica de crescimento celular, obtidos pela simulação do domínio da concentração de glicose e de acetato de amônio, variando de acordo com a respectiva região, correspondentes às

superfícies da Figura 4.44-(A), (B), (C) e (D), respectivamente. Observando estas figuras fica claro que um maior valor de velocidade específica de crescimento pode ser visualizado na Figura 4.45-(C), para uma faixa de concentração de glicose de 3,0 a 5,0 g/L e de acetato de amônio de 2,0 a 3,0 g/L.

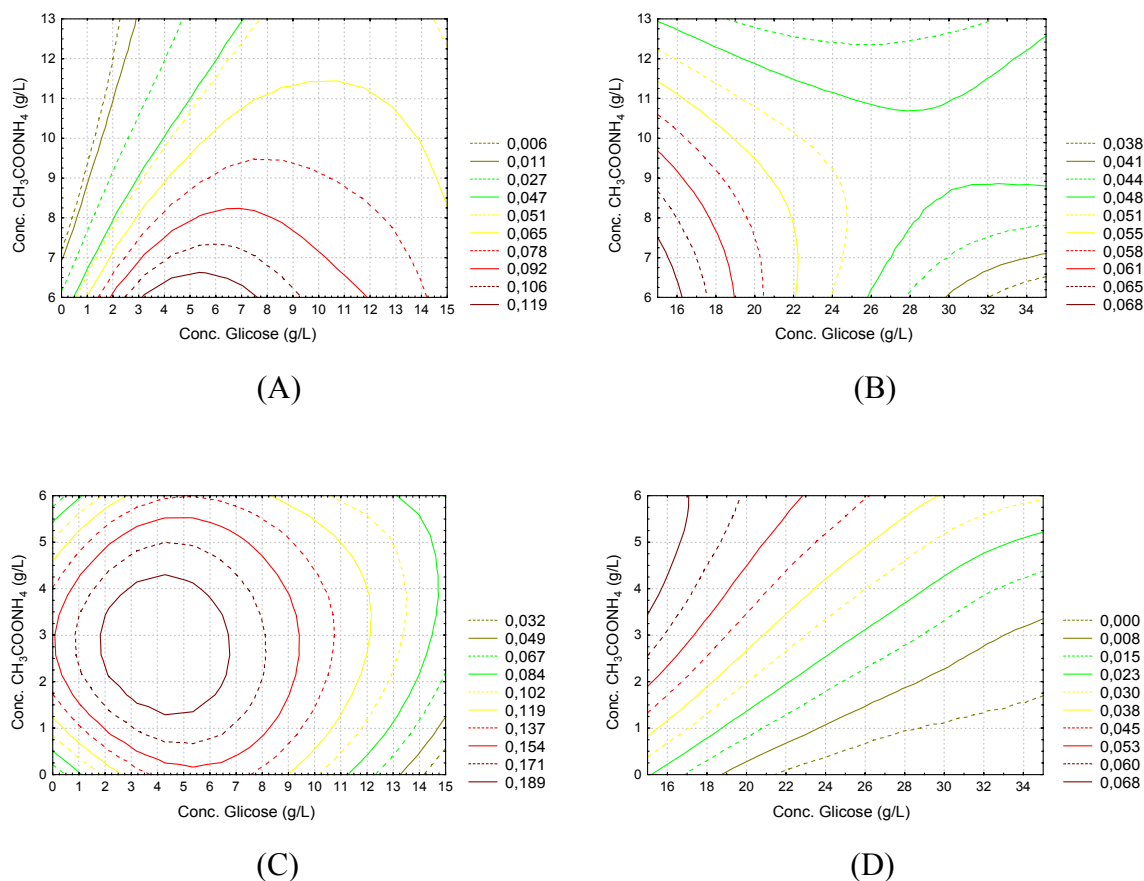
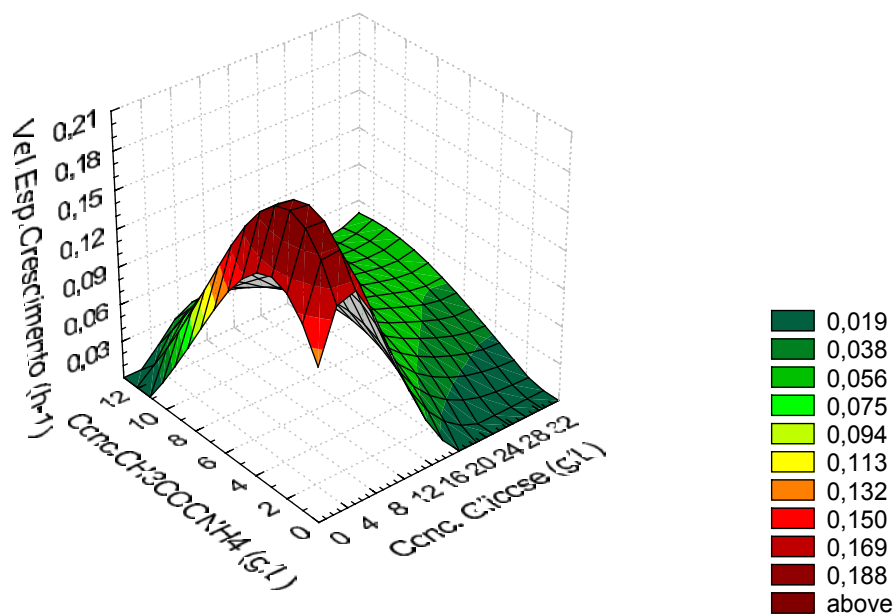


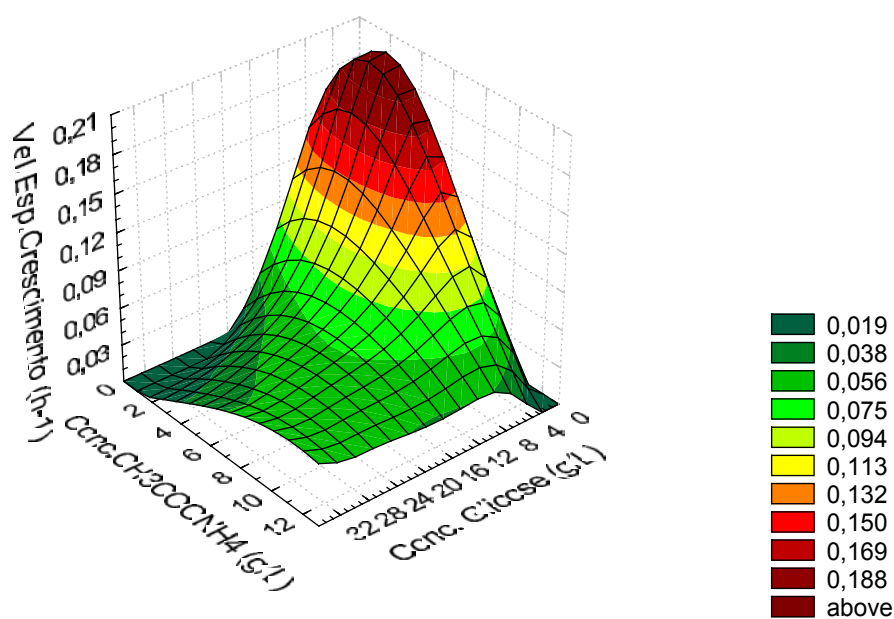
Figura 4.45: Contornos da superfícies da resposta velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ), obtidos pela simulação, em rede neural, para os vários domínios de concentrações de glicose e de acetato de amônio.

A Figura 4.46 mostra a Figura 4.44-(A), (B), (C) e (D) juntas em duas rotações diferentes para uma melhor visualização. Ela mostra o efeito das variáveis concentrações de glicose e de acetato de amônio na velocidade específica máxima de crescimento celular obtida pela simulação de todo o domínio representado pela Figura 4.37. Mais uma vez fica evidente o efeito inibitório tanto da concentração de glicose como a de acetato de amônio,

o que justifica a maior importância destas variáveis no meio de cultura, fato confirmado pela análise estatística discutida no item 4.2.



(A)



(B)

Figura 4.46: Superfície de resposta da velocidade específica de crescimento celular, obtidos pela simulação, em rede neural, em função das concentrações de glicose e de acetato de amônio, numa ampla faixa, para duas rotações diferentes, (A) e (B).

A Figura 4.47 mostra a superfície de contorno da velocidade específica máxima de crescimento no espaço das variáveis concentrações de glicose e de acetato de amônio obtida pela simulação, do todo o domínio representado pela Figura 4.37.

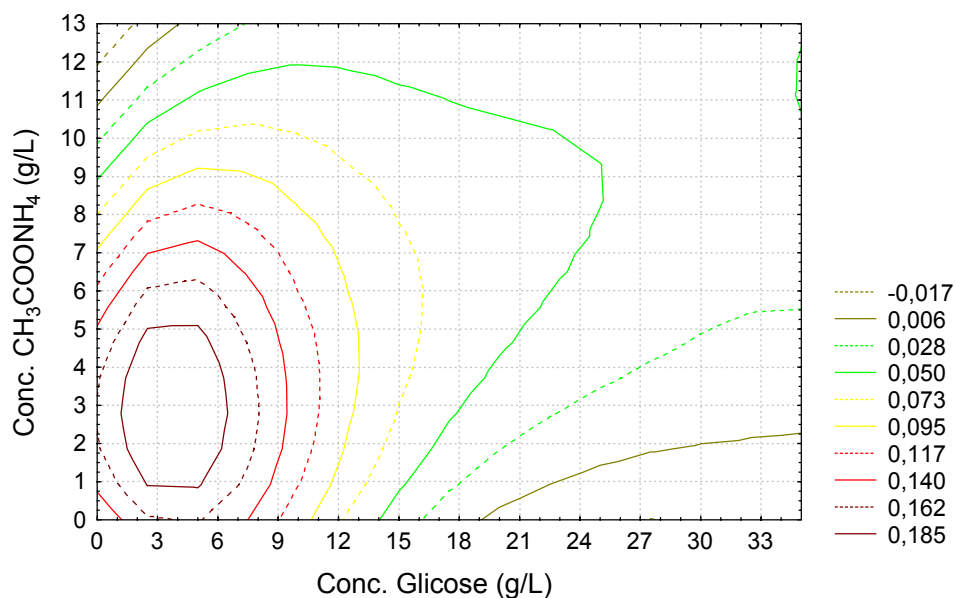


Figura 4.47: Contorno da velocidade específica máxima de crescimento no espaço das variáveis concentrações de glicose e de acetato de amônio obtida pela simulação em rede neural.

A Tabela 4.29 apresenta valores de velocidade específica máxima de crescimento, simulados na rede neural, pelo modelo estatístico e, para alguns casos, valores experimentais. Observa-se o bom ajuste, em todos os casos analisados e em casos de interpolações, valores comparáveis são obtidos, pelo modelo estatístico e os simulados na rede.

Tabela 4.29: Valores da velocidade específica máxima de crescimento, simulados na rede neural ( $\mu_{rede}$ ), pelo modelo estatístico ( $\mu_{est}$ ) e experimental ( $\mu_{exp}$ ), em função da concentração de glicose (G) e de acetato de amônio (N).

G (g/L)	N (g/L)	$\mu_{rede}$ ( $h^{-1}$ )	$\mu_{est}$ ( $h^{-1}$ )	$\mu_{exp}$ ( $h^{-1}$ )
1,5	1,0	0,1459	0,1471	0,1506
2,75	1,75	0,1864	0,1988	-
4,0	2,5	0,2009	0,2174	0,2174
5,25	3,25	0,1632	0,2028	-
6,5	4,0	0,1574	0,1551	0,1512
9,0	5,5	0,1120	-	0,1390

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se o seguinte:

**a)** Das seis variáveis estudadas durante a fase de crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, como variáveis independentes: concentração de glicose, acetato de amônio, DL-metionina, fósforo, ácido oleico e solução de sais, mostraram efeito significativo na variável resposta velocidade específica máxima de crescimento, a concentração de glicose e a de acetato de amônio.

**b)** Os maiores valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos a partir dos ensaios conduzidos segundo um planejamento fatorial composto central para domínios das variáveis mais significativas, concentrações de glicose e de acetato de amônio. O modelo que correlacionou as variáveis significativas, concentração de glicose e acetato de amônio a um nível de 5% de significância foi um modelo de 2ª ordem, dado pela seguinte equação:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} = & 0,2174 + 0,0040 \left( \frac{G - 4,0}{2,5} \right) - 0,0288 \left( \frac{G - 4,0}{2,5} \right)^2 - 0,0246 \left( \frac{N - 2,5}{1,5} \right)^2 \\ & - 0,0129 \left( \frac{G - 4,0}{2,5} \right) \left( \frac{N - 2,5}{1,5} \right) \end{aligned}$$

onde:

$\mu_{\max}$  = Velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )

G = Concentração de glicose, 0,5 - 7,5 (g/L);

N = Concentração acetato de amônio, 0,4 - 4,6 (g/L);

**c)** As duas variáveis estudadas durante a fase de produção de antibiótico como variáveis independentes: concentração de sacarose e DL-metionina (planejamento fatorial composto central), mostraram-se significativas na variável resposta velocidade específica de produção do antibiótico, medida no início da fase produtiva do microrganismo.

**d)** O modelo que melhor correlacionou as variáveis significativas envolvidas no início da fase de produção de antibiótico pelo fungo *C. acremonium* ATCC 48272, ao nível de 5% de significância, é um modelo de segunda ordem, dado pela seguinte equação:

$$\mu_p = 0,9619 + 0,2424\left(\frac{S - 7,0}{3,0}\right) - 0,0954\left(\frac{S - 7,0}{3,0}\right)^2 - 0,1330\left(\frac{\text{Met} - 3,0}{1,5}\right) - 0,2044\left(\frac{\text{Met} - 3,0}{1,5}\right)^2$$

onde:

$\mu_p$  = Velocidade específica de produção de cefalosporina C ( $\text{mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cel}} \text{ h}$ )

S = Concentração de sacarose, 2,8-11,2 (g/L);

Met = Concentração DL-metionina, 0,9-5,1 (g/L);

e) O planejamento estatístico mostrou-se uma ferramenta bastante eficiente para avaliação do bioprocesso, pois com a realização dos ensaios propostos, foi possível atingir valores de  $\mu_{\text{max}}$  e de  $\mu_p$  de até  $0,22 \text{ h}^{-1}$  e  $1,1 \text{ mg}_{\text{CPC}}/\text{g}_{\text{cel}} \text{ h}$ , respectivamente.

f) As superfícies e contornos de velocidade específica máxima de crescimento celular obtidas a partir dos dados de concentração de glicose e acetato de amônio simulados com uma rede neural do tipo "feedforward", com três camadas, 22 neurônios na camada oculta, treinada com o algoritmo retropropagação, por um conjunto de ensaios dos planejamentos de experimentos, mostraram-se que o crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272 segue um modelo cinético de inibição por estes dois nutrientes.

g) Valores máximos de  $\mu_{\text{max}}$  foram obtidos a partir de simulações com o modelo neural para concentrações de glicose e acetato de amônio da ordem de 4,0 e 2,5 g/L, respectivamente, semelhantes aos obtidos com o modelo estatístico.

## 6 SUGESTÕES

Como sugestões para futuros trabalhos, estão as seguintes:

A elaboração de um meio de cultivo para o inóculo, visando uma adaptação gradual do microrganismo, para concentrações inferiores ao utilizado neste trabalho, pois as diferenças de concentrações para todos os componentes do meio de cultivo no inóculo em relação ao meio onde se obteve altas velocidades de crescimento, são muito diferentes.

Avaliar as possibilidades de se obterem, em fermentador, altas velocidades de formação de biomassa e de produto para outras faixa de concentrações dos componentes estudados que não sejam necessariamente no ponto ótimo.

Avaliar o potencial da rede na determinação de um modelo representativo para a formação de produto.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E. P.; LODER, P. B. Cephalosporin C. In: Flynn, E. H. Cephalosporins and Penicilins - Chemistry and Biology. © by Academic Press, Inc., 1972.
- AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. Biochemical Engineering. 2<sup>nd</sup> edition., New York, Academic Press, 1973.
- ALMEIDA, R. M. R. G. Estudo da Produção de Cefalosporina C com Células Imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* em Biorreator tipo Torre em Batelada Alimentada. São Carlos-SP, DEQ-UFSCar, 1999, 94p. (Dissertação).
- ANDRIETTA, M. G. S. Estudo do Meio de Cultivo para Produção de Cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*. Campinas-SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 1998, 94p. (Tese).
- ARAUJO, M. L. G. C. **Studies on Spore Immobilization of *Penicillium chrysogenum* Bioparticles**. Rev. Microbiol. São Paulo, v. 24, p. 144-149, 1993.
- ARAUJO, M. L. G. C. Estudo Cinético do Processo de Produção de Cefalosporina C com Células Livres e Imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. São Carlos-SP, DEQ-UFSCar, 1996, 189p. (Tese).
- ARAUJO, M. L. G. C.; GOMES, L. M. S.; SANTANA, M. H. A.; OLIVEIRA, R. P.; HOKKA, C. O. **Estudo Cinético do Processo de Produção de Cefalosporina C**. In: Anais do X Congresso Brasileiro de Engenharia Química, v. 2, p. 1240 –1245, São Paulo, SP, 1994.
- ARAUJO, M. L. G. C.; CRUZ, A. J. G.; SILVA, A. S.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. **Estudo Comparativo do Processo de Produção de Cefalosporina C por Células Livres e Imobilizadas de *Cephalosporium acremonium***. In: Anais do XXV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (XXV ENEMP), v. 1, p. 274-281, São Carlos, SP, 1998.
- ARAUJO, M. L. G. C.; OLIVEIRA, R. P.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. **Comparative Studies on Cephalosporin C Production Process with Free and Immobilized Cells of *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272**. Chemical Engineering Science, 51(11): 2835-2840, 1996.
- ARIS, R. **Ends and Beginings in the Mathematical Modelling of Chemical Engineering Systems**. Chemical Engineering Science, 48(14), p. 2507-2517, 1993.



- BARBOZA, M. Estudo de Aspectos de Transferência de Massa do Processo de Produção de Penicilina em Biorreator Tipo Torre. São Carlos-SP, DEQ-UFSCar, 1994, 107p. (Dissertação).
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. 2<sup>a</sup> ed., Campinas-SP, editora da Unicamp, 1996.
- BASAK, S.; VELAYUDHAN, A.; LADISH, M., R. **Simulation of Diauxic Production of Cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*: Lag Model for Fed-Batch Fermentation**. *Biotechnology Progress*, v. **11**(6), p. 626-631, 1995.
- BAUGHMAN, D. R.; LIU, Y. A. Neural networks in Bioprocessing and Chemical Engineering. 1<sup>st</sup> edition, New York, Academic Press, 1995.
- BAYER, T.; ZHOU, W.; HOLZHAUER, K.; SCHUGERL, K. Investigations of Cephalosporin C Production in Air Lift Tower Loop Reactor. ***Applied Microbiology Biotechnology***, v. **30**, p. **26-33**, 1989.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2<sup>nd</sup> edition., McGraw Hill Book Company, New York, 1986.
- BEHMER, C. J.; DEMAIN, A. L. **Further Studies on Carbon Catabolite Regulation of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Synthesis in *Cephalosporium acremonium***. *Current Microbiology*, v. **8**, p. 107-114, 1983.
- BHAT, N. V.; Mc AVOY, T. **Use of Neural Nets for Dynamic Modeling and Control of Chemical Process Systems**. *Computers & Chemical Engineering*, **14**(4/5):573-583, 1990.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for Experimenters. New York, John Wiley & Sons Inc, 1978.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. Empirical Model-Building and Response Surfaces. New York, John Wiley & Sons Inc, 1987.
- BUCKLAND, B. C.; LILLY, M. D. **Fermentation: An Overview**. In: **Biotechnology (A Multi-Volume Comprehensive Treatise)**, v. 3, cap. 1, 2<sup>nd</sup> edition, VCH, Weinheim, Germany, 1993.
- BULL, D. N. **Instrumentation for Fermentation Process Control**. In: Moo-Yuon, M., **Comprehensive Biotechnology**, Pergamon Press, Oxford, v. **3**, p. 149-163, 1985.
- BULSARI, A. B. Neural Networks for Chemical Engineers. Computer - Aided chemical engineering, 6. New York, 1996.

- CALAM, C. T. *Process Development in Antibiotic Fermentations*. Cambridge University Press, cap. 1, 1987.
- CALTRIDER, P. G.; NISS, H. F. **Role of Methionine in Cephalosporin Synthesis**. *Applied Microbiology*, v. 14, n. 5, p. 746-753, 1966.
- CANTO, C. S. A. *Desenvolvimento e Avaliação da Performance de um Biorreator de Membrana Cerâmica para Cultivo de Células Aeróbias. Aplicação na Produção de Cefalosporina C por Cephalosporium acremonium*. São Carlos - SP, DEQ - UFSCar, 197p. (tese).
- CHU, W. B. Z.; CONSTANTINIDES, A. *Modeling, Optimization and Computer Control of the Cephalosporin C Fermentation Process*. ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 32, p. 277-288, 1988.
- COONEY, C. L. *Computer Application in Fermentation Technology - A Perspective*. ***Biotechnology and Bioengineering Symposium***, n. 9, p. 1-11, 1979.
- CRUZ, A. J. *Modelagem Fenomenológica e Simulação por Redes Neurais do Bioprocesso de Produção de Penicilina-G*. São Carlos - SP, DEQ-UFSCar, 1996, 113p. (Dissertação).
- CRUZ, A. J. G.; ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. **Phenomenological and Neural-Network Modeling of Cephalosporin C Production Bioprocess**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 579-592, 1998.
- CRUZ, A. J. G.; SILVA, A. S.; ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. **Modelling and Optimization of the Cephalosporin C Production Bioprocess in a Fed-Batch Bioreactor with Invert Sugar as Substrate**. *Chemical Engineering Science*, v.54, p.3137-3142, 1999.
- CRUZ, A. J. G. *Estudo de Produção de Cefalosporina C com Acompanhamento em Linha de Variáveis do Processo*. São Carlos-SP, DEQ-UFSCar, 2000, p236. (tese).
- CRUZ, A. J. G.; ALMEIDA, R. M. R. G.; ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. **The Dead Core Model Applied to Beads with Immobilized Cells in a Fed-Batch Cephalosporin C Production Bioprocess**. *Chemical Engineering Science*, v. 56, p. 419-425, 2001.
- CUNHA, B. C. A. **Produção de Antibióticos**. *In Tecnologias das Fermentações*. Lima, U. A.; Aquarone, E. e Borzani, W. Edgard Blucher, Ed. da Universidade de São Paulo, cap. 7, p. 113 - 156, 1975.

- DAVIS, M. E. Numerical Methods and Modeling for Chemical Engineers. 1<sup>st</sup> ed. John Wiley & Sons, 1984.
- DEMAIN, A. L. **Overproduction of Microbiol Metabolites and Enzymes Due Alteration of Regulation.** Adv. Biochem. Eng.,v. 1: 113-142, 1971.
- DEMAIN, A. L.; AHAROMOWITZ, Y.; MARTIN, J. F. **Metabolic Control of Secondary Biosynthetic Pathways.** *In: Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts, p. 49-68, 1983.
- DEMAIN, A. L. **Biology of Antibiotic Formation.** *In: Vandamme. E. J. Biotechnology of Industrial Antibiotics.* New York, © by Marcel Dekker, Inc., p. 33-42, 1984.
- DEMAIN, A. L.; NEWKIRK, J. F.; HENDLIN, D. **Effect of Methionine, Norleucine, and Lysine Derivatives on Cephalosporin C Formation in Chemically Defined Media.** Journal of Bacteriology, v. 85, p. 339-344, 1963.
- DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. **The  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Past, Present and Future.** Antonie van Leeuwenhoek, v. 75 p. 5-19, 1999.
- DEVARKOS, G. A. e WEBB, C. **On the Merits of Viable-Cell Immobilization.** Biotechnol. adv., v. 9, p. 559-612, 1991.
- DREW, S. W.; DEMAIN, A. L. **Effect of Primary Metabolites on Secondary Metabolism.** Annual Rev. Microbiol., 31: 343-356, 1977.
- DI MASSINO, C.; MONTAGUE, G. A.; MORRIS, A. J.; THAN, M. T. **Towards Improved Penicillin Fermentation Via Artificial Neural Networks.** Computers Chemical Engineering. 16(4): 283 - 291, 1992.
- ELANDER, R. P. **Bioprocess Technology in Industrial Fungi.** *In: Neeway, J. O. Fermentations process development of industrial organisms.* cap. 4, Marcel Dekker, New York, 1989.
- FERREIRA, A. A.; SUAZO, C. T.; CRUZ, A. J. G.; PULITANO, V. M. S. **Planejamento Fatorial e Redes Neurais: Hibridização para Simplificar a Otimização do Crescimento de um Fungo.** *In: XII Simpósio Nacional de Fermentação (XII SINAIFERM), Teresópolis - RJ. Anais [CD-ROM].* Teresópolis: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- GOMES, L. M. S.; HOKKA, C. O.; SANTANA, M. H. A. **Bioprocesso em Batelada Alimentada para Produção de Cefalosporina C.** *In: Anais 11° Congresso*

- Brasileiro de Engenharia Química (XI COBEQ), Rio de Janeiro, RJ, 1996. Anais Rio de Janeiro, v. 2, p.1514-1519, 1996.
- HAALAND, P. D. *Experimental Design in Biotechnology*. New York, Marcel Dekker, Inc., 259p, 1989.
- HAN, K.; LEVENSPIEL, O. Extended Monod Kinetics for Substrate, Product, and Cell Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p.430-437, 1988.
- HAYKIN, S. *Neural Networks a Comprehensive Foundation*. 2<sup>nd</sup> edition. New Jersey, 1999.
- HEIM, J.; SHEN, Y. Q.; WOLFE, S.; DEMAIN, A. L. **Regulation of Isopenicillin N Synthetase and Deacetoxycephalosporin C Synthetase by Carbon Source During the Fermentation of *Cephalosporium acremonium***. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 232-236, 1984.
- HOSKINS, J. C.; HIMMELBLAU, D. M. **Artificial Neural Network Model of Knowledge Representation in Chemical Engineering**. *Computers & Chemical Engineering*, v. 12, p. 881-890, 1988.
- HOKKA, C. O. e MORAIS, I. **Fermentação Semi Contínua I: Análise do Comportamento da Fermentação para Produção de Penicilina**. *Revista Brasileira de Tecnologia*, v. 9, p. 175-180, 1978.
- HUMMELBLAU, D. M. *Process Analysis by Statistical Methods*. John Wiley & sons, Inc.1970.
- HUSSAN, M. A. **Review of the Applications of the Neural Networks in Chemical Process Control-Simulation and On-Line Implementation**. *Artificial intelligence in engineering*, v. 13, p. 55-68, 1999.
- KENNEDY, M. J.; PRAPULA, S. G.; THAKUR, M. S. **Designing Fermentation Media: A Comparison of Neural Networks to Factorial Design**. *Biotechnology Techniques*, v. 6, p. 293-298, 1992.
- KONIG, B. SCHUGERL, K. SEEWALD, C. **Strategies for Penicillin Fermentation in Tower-Loop Reactors**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 24, p. 259-280, 1982.
- KITANO, K.; KINTAKA, K.; NAKAO, Y. **Comparative Study of Methionine effect on Cephalosporin Production by Various Fungi**. *J. Ferment. Technol.*, v. 55, n. 1, p. 27-36, 1977.
- LAU, C. G. Y. *Neural Networks I: Theory and Modeling*. *Proceedings of the IEEE*, 78(9): 1411 - 1413, 1990.

- LEMKE, P. A.; NASH, C. H. **Mutations that Affect Antibiotic Synthesis by *Cephalosporium acremonium***. Canadian Journal Microbiology, v. **18**, p. 255-259, 1972.
- LEWANDOWSKA, M.; PASZEWSKI, A. **Sulphate and Methionine as Sulfur Sources for Cysteine and Cephalosporin C Synthesis in *Cephalosporium acremonium***. Acta Microbiologica Polonica v. **37**, n. 1, p. 17-26, 1988.
- LIM, H. C.; LEE, K. S. **Control of Bioreactor Systems. In: Biotechnology - a multi volume comprehensive treatise**, v. **4**, cap. 16, 2<sup>nd</sup> edition, VCH, Weinheim, Germany, 1991.
- LIMA, L. P. C. **Elementos de microbiologia. In: Tecnologias das fermentações**. Edgard Blucher, ed. da Universidade de São Paulo, cap. 1, p. 1-18, 1975.
- McDANIEL, L. E.; BAILEY, E. G. **Application of Response Surface Optimization Techniques to Polyene Macrolide Fermentation Studies in Shake Flasks**. Developments in Industrial Microbiology, v. **17**, p. 91-98, 1976.
- MARQUARDT, D.W. **An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters**. J.Soc.Indust.Appl.Math., v.**11**, p.431-441, 1963.
- MARTIN, J. **Control of Antibiotic Synthesis by Phosphate**, Advanced Biochemical Engineering., v. **6**, p. 105, 1977.
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. **Effect of Glucose and Methionine Consumption Rates on Cephalosporin C Production by *Cephalosporium acremonium***. Journal of Fermentation Technology, v.**56**, n.4, p.345-353, 1978.
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. **Morphological Differentiation in Relation to Cephalosporin C Synthesis by *Cephalosporium acremonium***. Journal of Fermentation Technology, v. **58**, p. 197- 204, 1980.
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. **Modeling of Cephalosporin C Production and Its Application to Fed-Batch Culture**. J. Fermentation Technology, v. **59**, p. 115-123, 1981.
- MARZO, A.; BO, L. D. **Chromatography as Analytical Tool for Selected Antibiotic Classes: a Reappraisal Addressed to Pharmacokinetic Applications**. Journal of Chromatography A, v. **812**, p. 17-34, 1998.

- MOSS, M. O. **Morfology and Physiology of *Penicillium* and *Acremonium***. In: Tederby, J. F. **Penicillium and Acremonium**, Biotechnology Books, Plenum Press, v. 1, p. 37-71, 1987.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 1<sup>st</sup> edition. Wiley Series in probability and statistics, 1995.
- NASH, C. H.; HUBER, F. M. **Antibiotics Syntesis and Morphological Differentiation of *Cephalosporium acremonium***. Applied Microbiology, v. **22**, p. 6-10, 1971.
- NIELSEN, J. **A Simple Morphologically Structured Model Describing the Growth of Filamentous Microorganisms**. Biotechnology & Bioengineering, v. **41**, p. 715-727, 1993.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. **Bioreactor: Description and Modelling**. In: **Biotechnology - A Multi-Volume Comprehensive Treatise**, v. **3**, cap. 5, 2<sup>nd</sup> edition, VCH, Weinheim, Germany, 1993.
- OH, D. K.; HYUN, C. K.; KIM, J. H.; PARK, Y. H. **Production of Penicillin in a Fluidized-bed Bioreactor: Control of Cell Growth and Penicillin Production by Phosphate Limitation**. Biotechnol. Bioeng., v. **32**, p. 569-573, 1988.
- OPRIME, M. E. A. G.; SUAZO, C. A. T. **Quantification of the Effect of Operational Variables on the Cell Growth Yield ( $Y_{x/s}$ ) of *Penicillium chrysogenum* by Surface Response Analysis**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. **14**, n. 04, p. 417 - 423, 1997.
- PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. Biodiversidade: Valor Econômico e Valor Social. Preservação e Bioprospecção. <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>, junho, 2001.
- POLLARD, J. F.; BROUSSARD, M. R.; GARRISON, D. B.; SAN, K. Y. **Process Identification Using Neural Networks**. Computer & Chemical Engineering, **16**(4), p. 253-270, 1992.
- POSTEN, C. H.; COONEY, C. L. **Growth of Microorganisms**. In: **Biotechnology - a multi volume comprehensive treatise**. 2<sup>nd</sup> edition, Germany, v. **1**, p. 113-159, 1984.
- PSICHOGIOS, D. C.; UNGAR, L. H. **A Hibrid Neural Network First Approach to Process Modeling**. AIChE journal, v. **38**, p. 1499-1511, 1992.
- PULITANO, V. M. S. E. Otimização do Efeito de Algumas Variáveis Sobre o Crescimento Celular e a Produção de Penicilina pelo Fungo *Penicillium chrysogenum* através de

- Análise por Superfície de Resposta. São Carlos – SP, DEQ - UFSCar, 1998, 228p. (tese).
- RATUSZNEI, S. M. R. Estudo de Condições para a Indução de Crescimento de *Penicillium chrysogenum* na Forma de Pellets. São Carlos – SP, DEQ - UFSCar, 1993, 97p. (Dissertação).
- RODRIGUES, M. L.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. **Planejamento Fatorial e “Screening Design” como ferramenta para Otimização de Processos Bioquímicos.** In: XII SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações. Universidade Federal de Uberlândia, [CD-ROM], Uberlândia - MG, 1998.
- RUMELHART, D. E.; McCLELLAND, J. L. and the PDP Research Group Parallel Distributed Processing : Explorations en the Microstructure of Cognition. vol. I, cap. 8, MIT, Cambridge, Mass., 1986.
- SÁNDOR, E.; SZENTIRMAI, A.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R.; PÓCSI, I.; KARAFFA, L. **Analysis of the Relationship Between Growth, Cephalosporin C Production and Fragmentation in Acremonium chrysogenum.** Canadian Journal of Microbiology, v. 47, p. 801-806, 2001.
- SARRA, M.; REDIN, I.; OCHIN, F. **Application of Factorial Design to the Optimization of Medium Composition in Batch Cultures of *Streptomyces lividans* TK21 Producing a Hybrid Antibiotic.** Biotechnology letters, v. 15, p. 559-564, 1993.
- SCHUGERL, K. **Some Basic Principles for the Layout of Tower Bioreactors.** J. chem. tech. biotechnol., v. 32, p. 73-80, 1982.
- SAVIDGE, T.A. **Enzymatic Conversion Used in the Production of Penicillins and Cephalosporins.** In: Vandamme, E.J. **Antibiotic Search and Production: An Overview.** Biotechnology of Industrial Antibiotics. Marcel Dekker Inc., New York, 22, p.171-224, 1984.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica. v. 2, Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.
- SHEN, Y. Q.; HEIM, J.; SOLOMON, N. A.; WOLFE, S.; DEMAINE, A. L. **Repression of  $\beta$ -Lactam Production in *Cephalosporium acremonium* by Nitrogen Sources.** The Journal of Antibiotics, v. 37, n.5, p. 503-511, 1984.
- SHEN, Y. Q.; WOLFE, S.; DEMAINE, A. L. **Level of Isopenicillin N Synthetase and Deacetoxycephalosporin C Synthetase in *Cephalosporium acremonium***

- Producing High and Low Levels of Cephalosporin C.** *Bio/Technology*, v. **4**, p. 61-63, 1986.
- SILVA, A.S. Produção de Cefalosporina C em Batelada Alimentada Utilizando Sacarose invertida. São Carlos - SP, DEQ-UFSCar, 1998, 76p. (Dissertação).
- SILVA, A. S.; CRUZ, A. J. G.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. **The Effect of the Addition of Invert Sugar on the Production of Cephalosporin C in a Fed-Batch Bioreactor.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. **15**, n.4, p.320-325, 1998.
- SILVA, A. S. Estudo do Desempenho de um Biorreator de Membrana Cerâmica na Produção de Cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. São Carlos - SP, DEQ - UFSCar, 2002, 182p. (Tese).
- SKATRUD, P. L.; SCHWECKE, T.; LIEMPT, H. V.; MATTHEW, T. B. **Advances in the Molecular Genetics of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Biosynthesis.** *In* Rehm, H. J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P. **Biotechnology.** 2<sup>nd</sup> edition., Germany, Ed. VCH, v. **7**, p.245-276, 1997.
- SMITH, A. **Cephalosporins.** *In*: Moo-Young, M., **Comprehensive Biotechnology**, Oxford, Pergamon Press, v. **3**, p.165-185, 1985.
- SOLTERO, F. V. e JOHNSON, M. J. **The Effect of the Carbohydrate Nutrition on Penicillin Production by *Penicillium chrysogenum* Q-176.** *Applied Microbiology*, v. **1**, p. 52-53, 1953.
- SRIVASTAVA, P.; KUNDU, S. A. **Studies on Cephalosporin C Production in Air lift Ractor Using Different Growth Modes of *Cephalosporium acremonium*.** *Process Biochemistry*, v. **34**, p. 329-333, 1999.
- SYU, M. J.; TSAO, G. T. **Neural Network Modelling of Batch Cell Growth Pattern.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. **42**, p. 376-380, 1993.
- SWARTZ, R. W. **Penicilins.** *In*: Moo-Young, M. **Comprehensive Biotechnology**, Oxford, Pergamon Press, v. **3**, p. 7-47, 1985.
- STAEHELI, J. **Variable Screening and Optimization.** *Developments in Biological Standardization*, v. **66**, p. 143-153, 1987.
- TAI, P. Produção de Cefalosporina C com Células de *Cephalosporium acremonium* Imobilizados em Biorreator Tipo Torre em Batelada e Batelada Repetida. São Carlos - SP, DEQ - UFSCar, 1996, 94p. (Dissertação).



- THIBAULT, J.; VAN BREUSEGEM, V. **On-line Prediction of Fermentation Variables Using Neural Networks**. *Biotechnology & bioengineering*, v. **36**, p. 1041-1048, 1990.
- TUCKER, K. G.; THOMAS, C. R. **Mycelial Morphology: Effect of Spore Inoculum Level**. *Biotechnology Letters*, v. **14**(11), p. 1071-1074, 1992.
- VANDAMME, E. **Antibiotic Search and Production: An Overview**. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, v. **22**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- VAN CAM, H. J. L. **An Efficient Model Development Strategy for Bioprocess Based on Macroscopy Balances**. *Biotechnology & bioengineering*, v. **54**, p. 550-560, 1997.
- VAN SUIJDAM, J. C.; HOLS, H.; KOSSEN, N. W. F. **Unstructured Model for Growth of Mycelial Pellets in Submerged Cultures**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. **24**, p. 177-191, 1982.
- VICIK, S. M.; FEDOR, A. J.; SWARTZ, R. W. **Defining an Optimal Carbon Source/Methionine Feed Strategy for Growth and Cephalosporin C Formation by *Cephalosporium acremonium***. *Biotechnol. Prog.*, v.6, n.5, p.333-340, 1990.
- VINING, L. C.; SHAPIRO, S.; MADDURI, K.; STUTTARD, C. **Biosynthesis and Control of  $\beta$ -Lactam Antibiotics: The Early Steps in the "Classical" Tripeptide Pathway**. *Biotechnol. Adv.*, v.8, p.159-183, 1990.
- VOGEL. *Análise Química Quantitativa*. Ed. Guanabara Koogan S. A. S., Rio de Janeiro, 1989.
- WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAINE, A. L.; DUNNILL, A.; HUMPHREY, A. E. e LILLY, M. D. *Fermentation and Enzyme Technology*. 1<sup>st</sup> edition, John Wiley & Sons, 1979.
- WEIL, J.; MIRAMONTI, J.; LADISCH, M. R. **Cephalosporin C: Mode of Action and Biosynthetic Pathway**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.17, p.85-87, 1995a.
- WEIL, J.; MIRAMONTI, J.; LADISCH, M. R. **Biosynthesis of Cephalosporin C: Regulation and Recombinant Technology**. *Enzyme and Microbial Technology*, v.17, n.1, p.88-90, 1995b.
- WERBOS, P. J. **Backpropagation Through Time: What it Does and How to Do It**. *Proceedings IEEE*, v. **78**, p. 1550-1560, 1990.
- WIDROW, B. e LEDHR, M. A. **30 Years of Adaptive Neural Networks: Perceptron, Madaline and Backpropagation**. *Proceeding of the IEEE*, **78**(9): 1415-1442, 1990.

- WILLIS, M. J.; DI MASSIMO, C.; MONTAGUE, G. A.; MORRIS, A. J. **Artificial Neural Networks In Process Engineering**. IEE Proceedings-D, **138**(3), p. 256-266, 1991.
- ZAIAT, M. Características de Biorreator Tipo Torre para a Produção de Penicilina por *Penicillium chrysogenum* Imobilizado. São Carlos - SP, DEQ-UFSCar, 1992, 149p. (Dissertação).
- ZANCA, D. M.; MARTIN, J. F. **Carbon Catabolite Regulation of the Conversion of Penicillin N into Cephalosporin C**. The Journal of Antibiotics, v. **36**, n.6, p.700-708, 1983.
- ZHANG, J.; WOLFE, S.; DEMAIN, A. L. **Phosphate Repressible and Inhibitable  $\beta$ -Lactam Synthetases in *Cephalosporium acremonium* Strain C-10**. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. **29**, p. 242-247, 1988.
- ZHOU, W.; HOLZHAUER-RIEGER, K.; DORS, M.; SCHUGERL, K. **Influence of Dissolved Oxygen Concentration on the Biosynthesis of Cephalosporin C**. Enzyme and Microbial. Technology, v. **14**, p. 848-854, 1992.

## APÊNDICE A

A tabela 4.2 apresentou o desenvolvimento do planejamento fatorial fracionário com 6 fatores, em valores codificados e reais de concentrações e a variável resposta velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio executado. A tabela 3.8 é aqui reproduzida por definir os níveis dos fatores usados no planejamento e a Tabela A1 apresenta a matriz planejamento da Tabela 4.2 juntamente com os valores de  $\mu_{\max}$ . Os valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos a partir dos dados experimentais como descrito no item 3.2.3.3, e estão apresentados nas Figuras A1 a A19.

Tabela 3.8: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	Nº	Definição	Nível		
			-1	0	+1
G	1	Glicose (g/L)	15,0	25,0	35,0
N	2	Acetato de Amônio (g/L)	5,0	9,0	13,0
P	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)*	1,0/2,5 <sup>(0,672)</sup>	2,0/5,0 <sup>(1,344)</sup>	3,0/7,5 <sup>(2,016)</sup>
MET	4	DL-metionina (g/L)	1,5	3,0	4,5
OLEI	5	Ácido Oléico (g/L)	0,5	1,0	1,5
SAIS	6	Solução de Sais (mL/L)	20,0	40,0	60,0

\* Valores sobrescritos correspondem à quantidade de fósforo (P) total.

Tabela A1: Planejamento Fatorial Fracionário  $2_{IV}^{6-2}$  realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, acetato de amônio = N, fósforo = P, DL-metionina = Met, ácido oléico = Olei e soluções de sais = Sais na velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível						$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
	G	N	P	Met	Olei	Sais	
1	+35,0	+13,0	+2,016	+4,5	+1,5	+60,0	0,0361
2	-15,0	+13,0	+2,016	+4,5	-0,5	+60,0	0,0346
3	+35,0	-5,0	+2,016	+4,5	+1,5	-20,0	0,0364
4	-15,0	-5,0	+2,016	+4,5	-0,5	-20,0	0,0433
5	+35,0	+13,0	-0,672	+4,5	-0,5	-20,0	0,0374
6	-15,0	+13,0	-0,672	+4,5	+1,5	-20,0	0,0194
7	+35,0	-5,0	-0,672	+4,5	-0,5	+60,0	0,0496
8	-15,0	-5,0	-0,672	+4,5	+1,5	+60,0	0,0469
9	+35,0	+13,0	+2,016	-1,5	-0,5	-20,0	0,0536
10	-15,0	+13,0	+2,016	-1,5	+1,5	-20,0	0,0435
11	+35,0	-5,0	+2,016	-1,5	-0,5	+60,0	0,0440
12	-15,0	-5,0	+2,016	-1,5	+1,5	+60,0	0,0464
13	+35,0	+13,0	-0,672	-1,5	+1,5	+60,0	0,0461
14	-15,0	+13,0	-0,672	-1,5	-0,5	+60,0	0,0254
15	+35,0	-5,0	-0,672	-1,5	+1,5	-20,0	0,0482
16	-15,0	-5,0	-0,672	-1,5	-0,5	-20,0	0,0508
17	<sup>0</sup> 25,0	<sup>0</sup> 9,0	<sup>0</sup> 1,344	<sup>0</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 40,0	0,0400
18	<sup>0</sup> 25,0	<sup>0</sup> 9,0	<sup>0</sup> 1,344	<sup>0</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 40,0	0,0450
19	<sup>0</sup> 25,0	<sup>0</sup> 9,0	<sup>0</sup> 1,344	<sup>0</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 40,0	0,0412

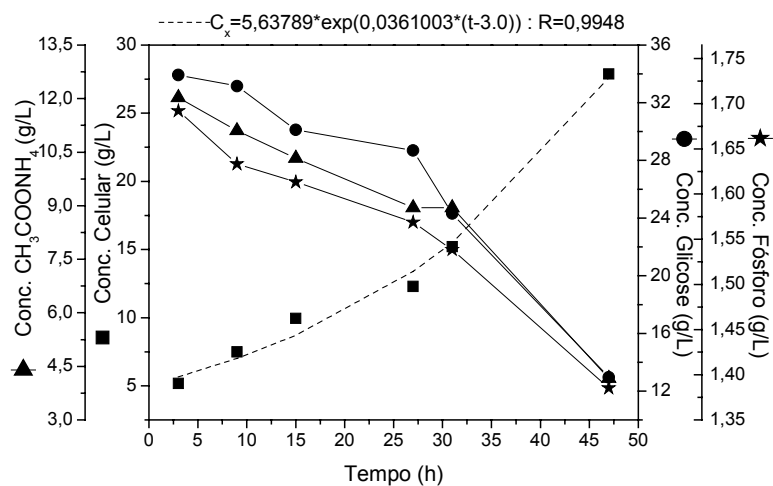


Figura A1: Resultados experimentais referentes ao ensaio 1.

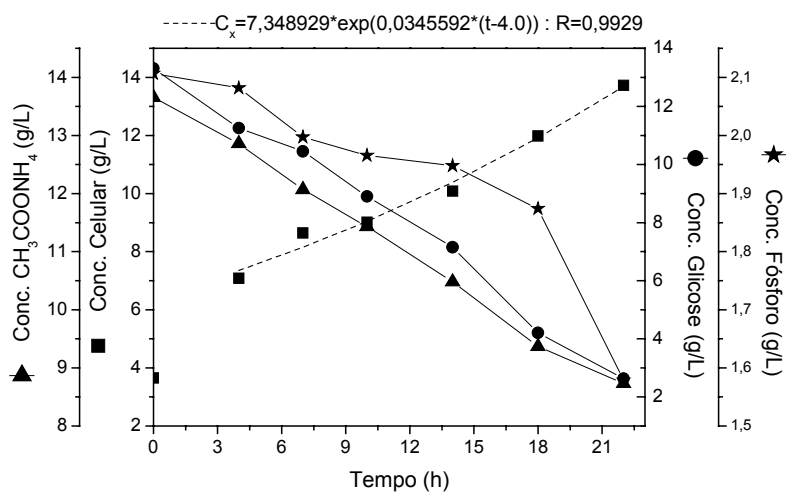


Figura A2: Resultados experimentais referentes ao ensaio 2.

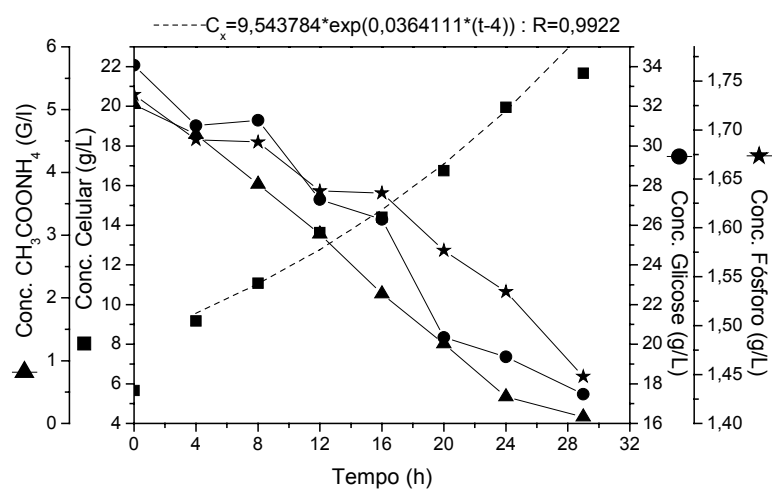


Figura A3: Resultados experimentais referentes ao ensaio 3.

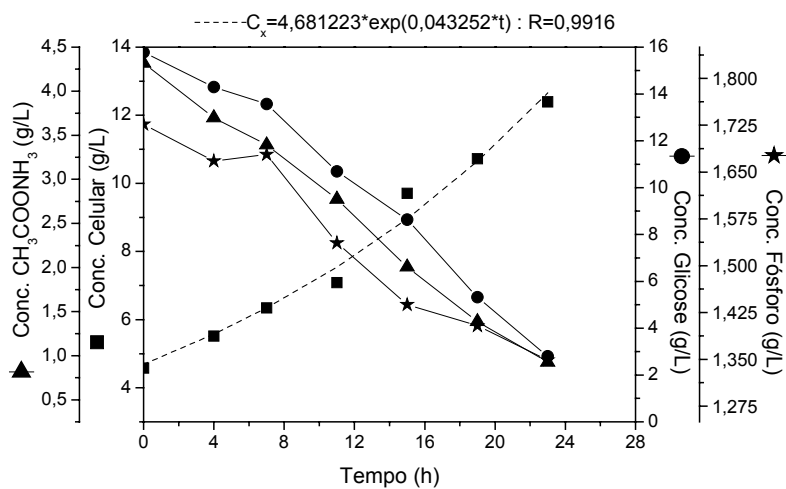


Figura A4: Resultados experimentais referentes ao ensaio 4.

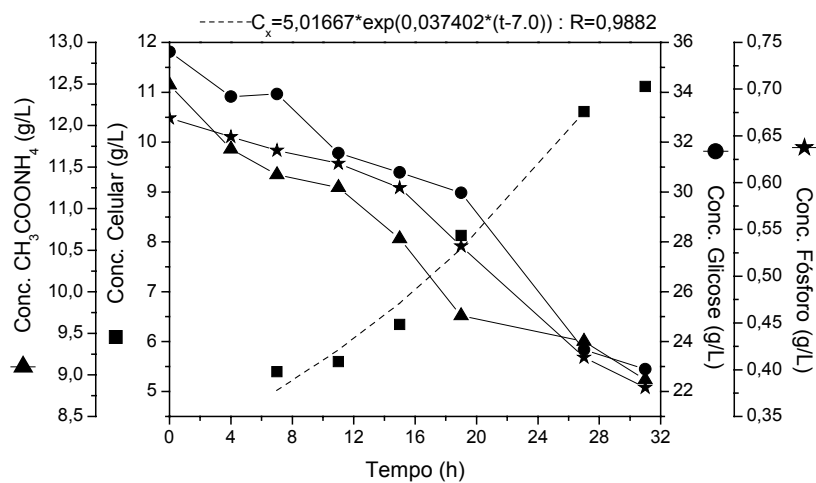


Figura A5: Resultados experimentais referentes ao ensaio 5.

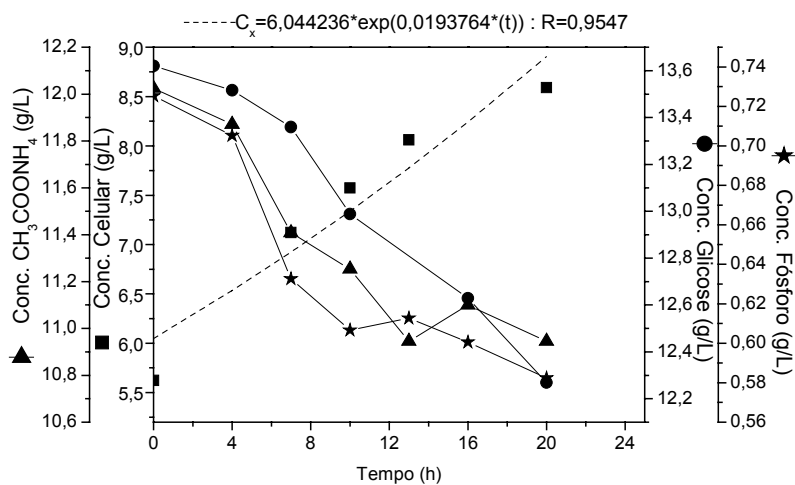


Figura A6: Resultados experimentais referentes ao ensaio 6.

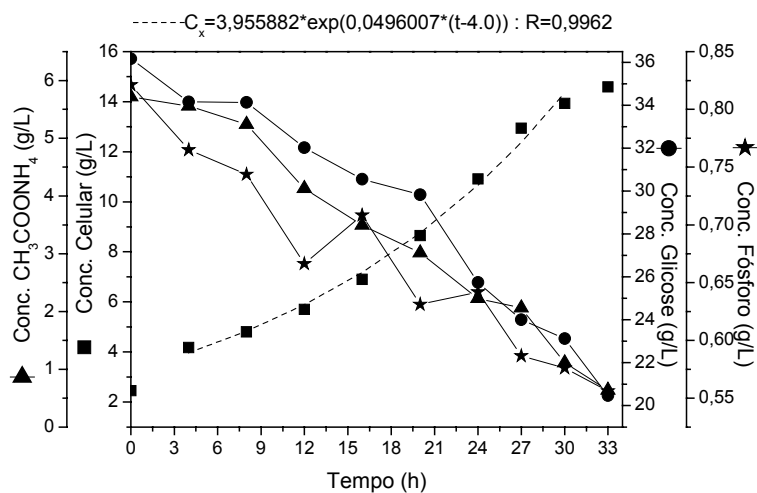


Figura A7: Resultados experimentais referentes ao ensaio 7.

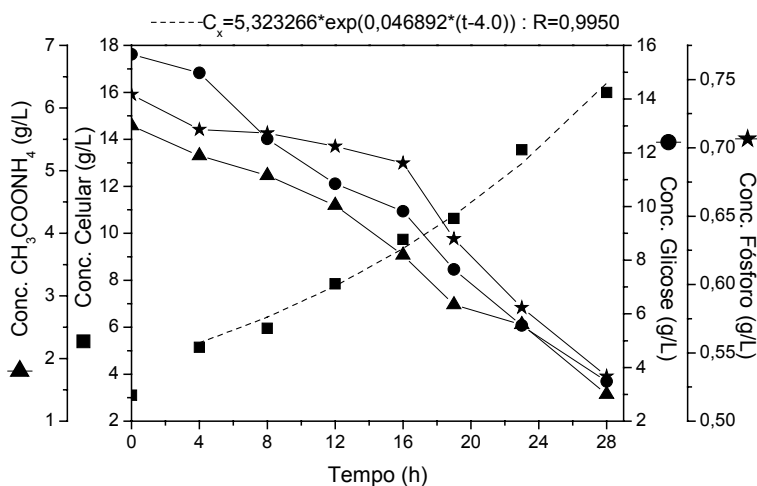


Figura A8: Resultados experimentais referentes ao ensaio 8.

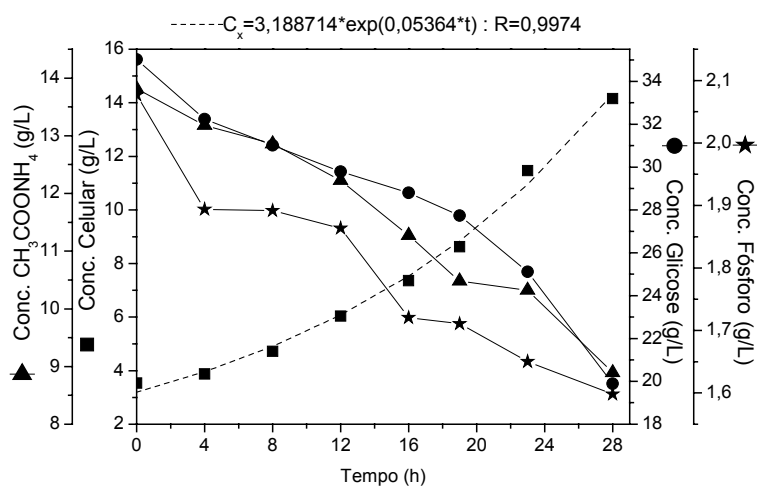


Figura A9: Resultados experimentais referentes ao ensaio 9.

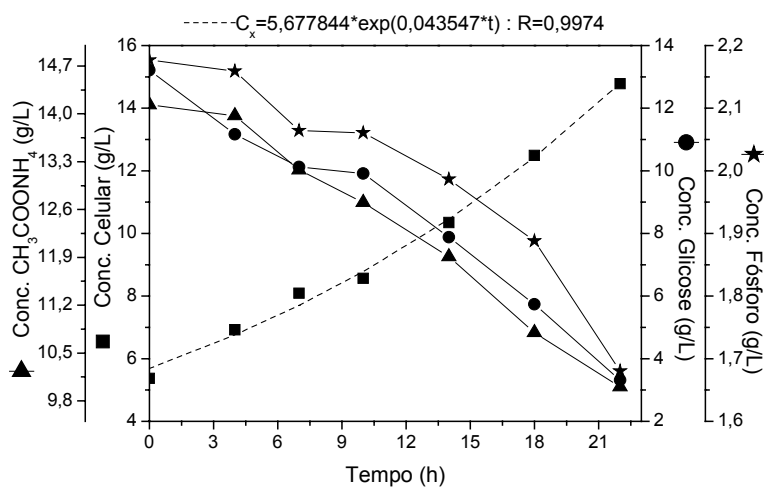


Figura A10: Resultados experimentais referentes ao ensaio 10.

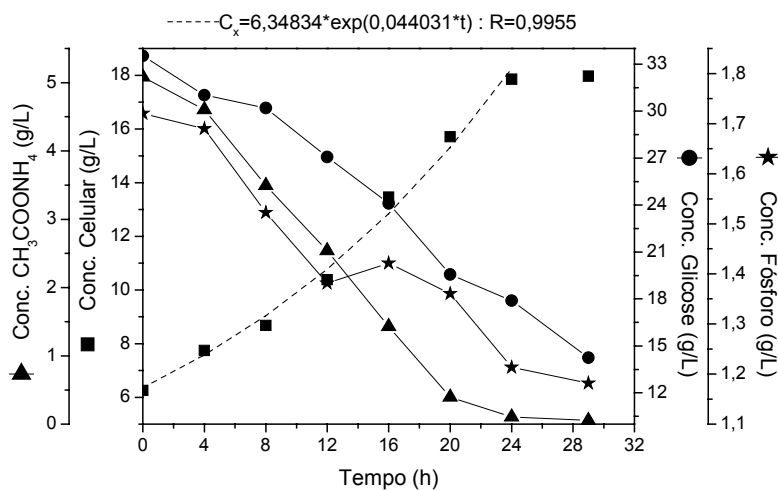


Figura A11: Resultados experimentais referentes ao ensaio 11.

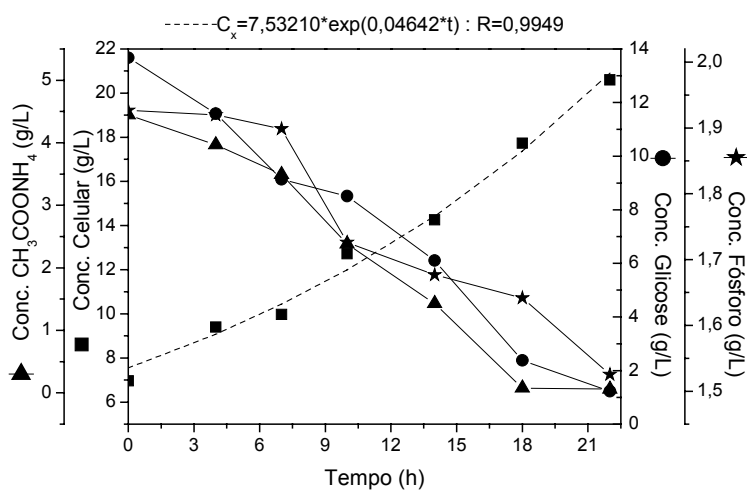


Figura A12: Resultados experimentais referentes ao ensaio 12.



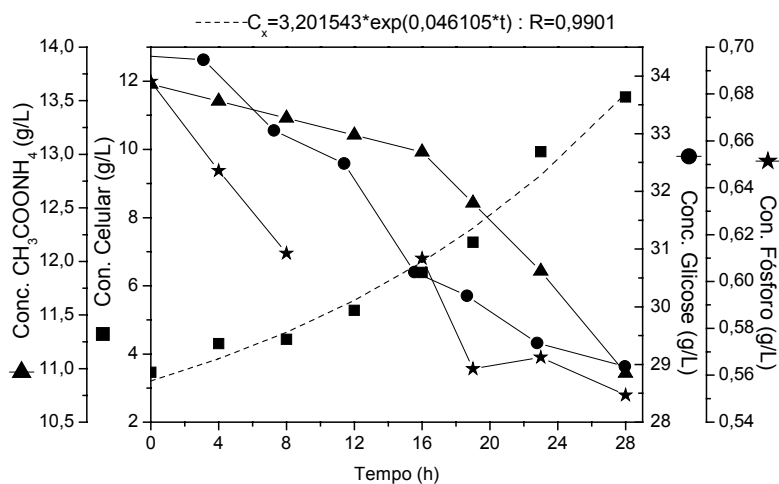


Figura A13: Resultados experimentais referentes ao ensaio 13.

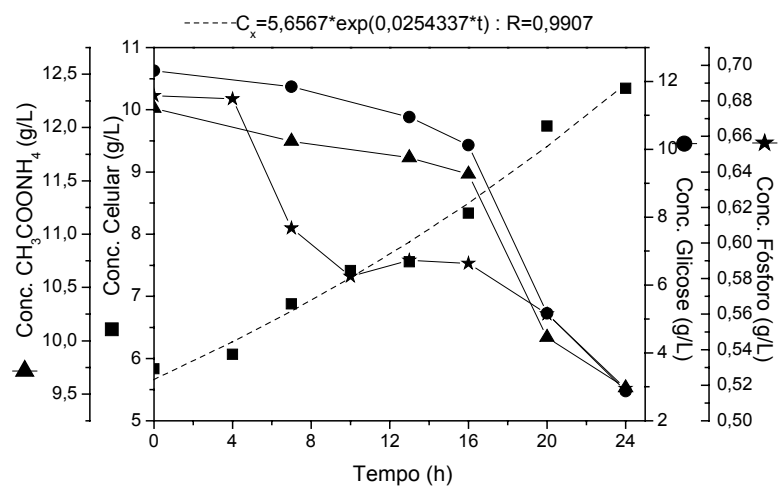


Figura A14: Resultados experimentais referentes ao ensaio 14.

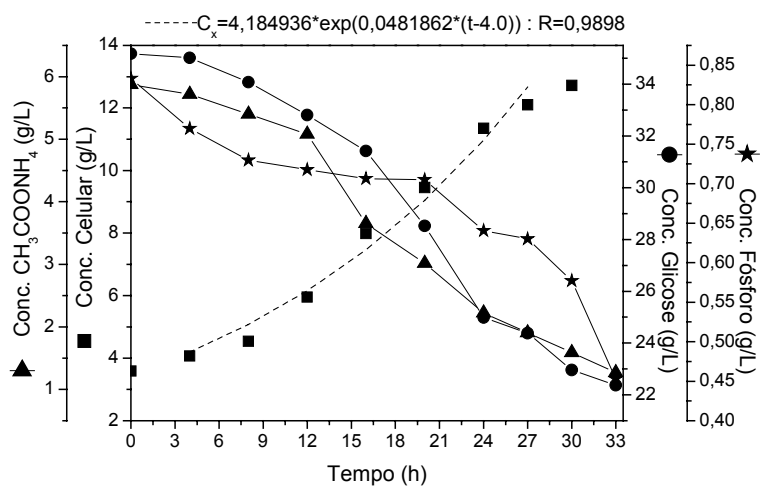


Figura A15: Resultados experimentais referentes ao ensaio 15.

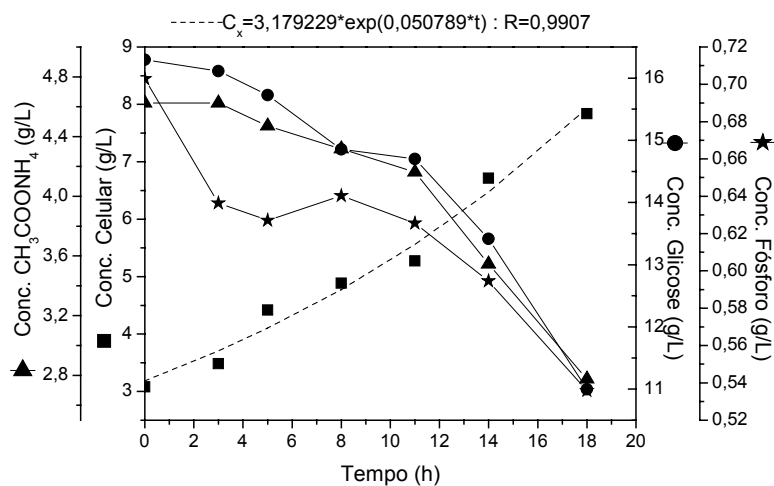


Figura A16: Resultados experimentais referentes ao ensaio 16.

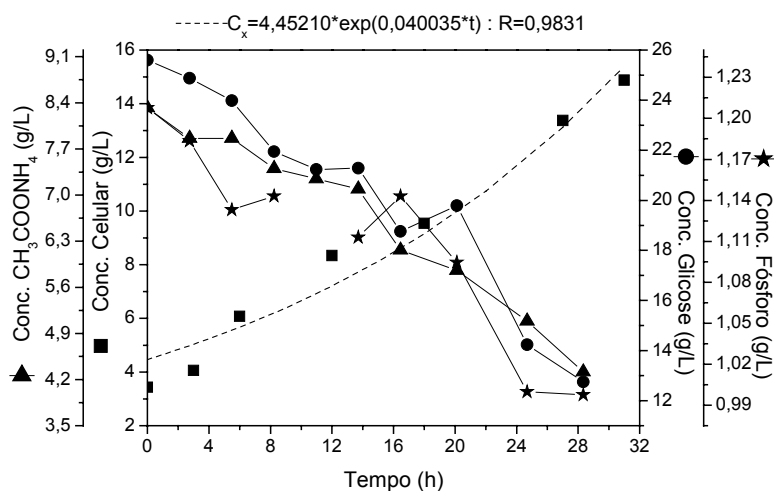


Figura A17: Resultados experimentais referentes ao ensaio 17.

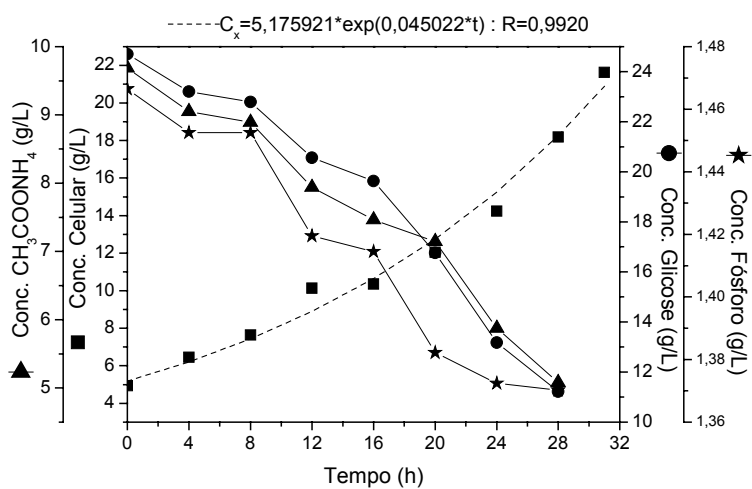


Figura A18: Resultados experimentais referentes ao ensaio 18.

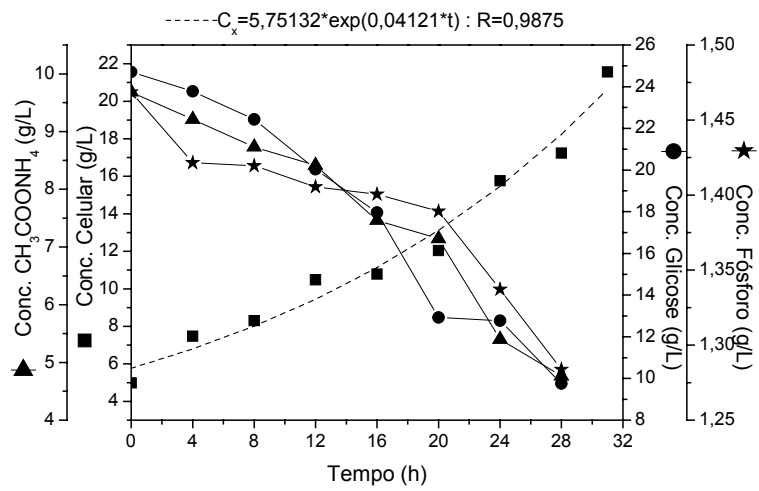


Figura A19: Resultados experimentais referentes ao ensaio 19.

## APÊNDICE B

A tabela 4.9 apresentou o desenvolvimento do planejamento fatorial completo com 4 fatores, em valores codificados e reais de concentrações e a variável resposta velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio executado.

A tabela 3.11 é aqui reproduzida por definir os níveis dos fatores usados no planejamento e a Tabela B1 apresenta a matriz planejamento da Tabela 4.9 acrescida dos ensaios relativos aos pontos axiais do planejamento, determinados pela equação 3.2, juntamente com os valores de  $\mu_{\max}$ . Os valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos a partir dos dados experimentais como descrito no item 3.2.3.3, e estão apresentados nas Figuras B1 a B28.

Tabela 3.11: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	N <sup>o</sup>	Definição	Nível		
			-1	0	+1
G	1	Glicose (g/L)	10,0	15,0	20,0
N	2	Acet. Amônio (g/L)	5,0	7,0	9,0
P	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)*	0,8/2,0 <sup>0,54</sup>	1,2/3,0 <sup>0,82</sup>	1,6/4,0 <sup>1,1</sup>
MET	4	DL-metionina (g/L)	0,5	1,0	1,5
OLEI	5	Ácido Oléico (g/L)		0,50	
SAIS	6	Solução de Sais (mL/L)		20,0	

\* Valores sobrescritos correspondem à quantidade de fósforo (P) total.

Tabela B1: Planejamento Fatorial Composto Central realizado para estudo da influência das variáveis, concentração de glicose = G, de acetato de amônio = N, fósforo = P e DL-metionina = Met, na velocidade específica máxima de crescimento de *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração					$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
	G (g/L)	N (g/L)	Met (g/L)	P (g/L)		
1	+20,0	+9,0	+1,5	+1,10		0,0558
2	-10,0	+9,0	+1,5	+1,10		0,0654
3	+20,0	-5,0	+1,5	+1,10		0,0672
4	-10,0	-5,0	+1,5	+1,10		0,0863
5	+20,0	+9,0	-0,5	+1,10		0,0613
6	-10,0	+9,0	-0,5	+1,10		0,0753
7	+20,0	-5,0	-0,5	+1,10		0,0412
8	-10,0	-5,0	-0,5	+1,10		0,0788
9	+20,0	+9,0	+1,5	-0,54		0,0548
10	-10,0	+9,0	+1,5	-0,54		0,0784
11	+20,0	-5,0	+1,5	-0,54		0,0455
12	-10,0	-5,0	+1,5	-0,54		0,0585
13	+20,0	+9,0	-0,5	-0,54		0,0429
14	-10,0	+9,0	-0,5	-0,54		0,0552
15	+20,0	-5,0	-0,5	-0,54		0,0689
16	-10,0	-5,0	-0,5	-0,54		0,0761
17	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0614
18	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0583
19	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0594
20	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0604
21	<sup>+2</sup> 25,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0536
22	<sup>-2</sup> 5,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0884
23	<sup>0</sup> 15,0	<sup>+2</sup> 11,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0455
24	<sup>0</sup> 15,0	<sup>-2</sup> 3,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0532
25	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>+2</sup> 2,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0600
26	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>-2</sup> 0,0	<sup>0</sup> 0,82		0,0536
27	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>+2</sup> 1,38		0,0593
28	<sup>0</sup> 15,0	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 1,0	<sup>-2</sup> 0,26		0,0621

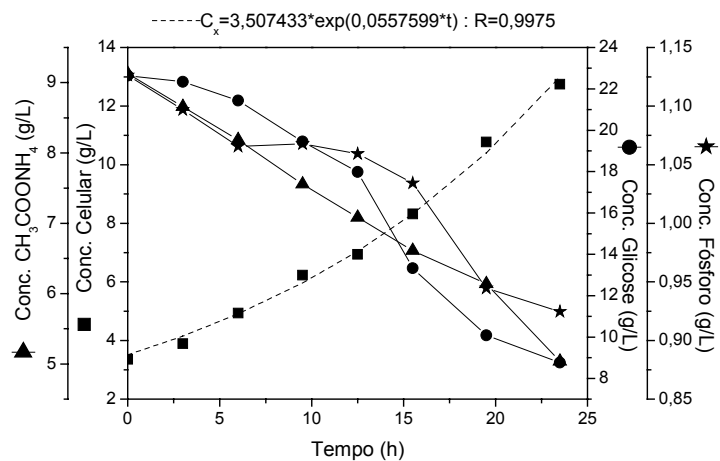


Figura B1: Resultados experimentais referentes ao ensaio 1.

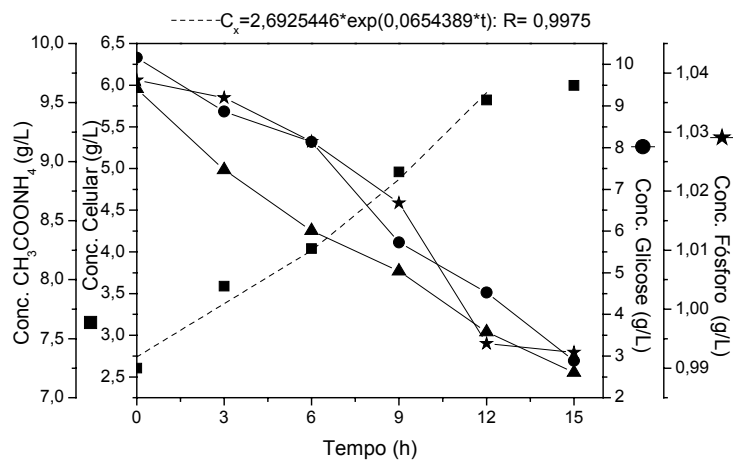


Figura B2: Resultados experimentais referentes ao ensaio 2.

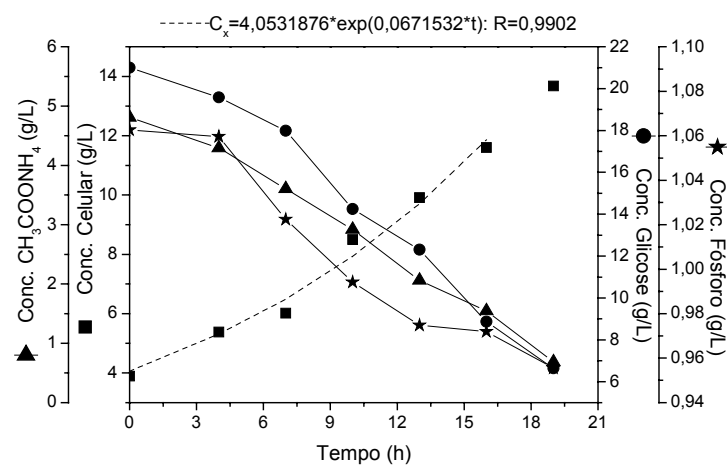


Figura C3: Resultados experimentais referentes ao ensaio 3.

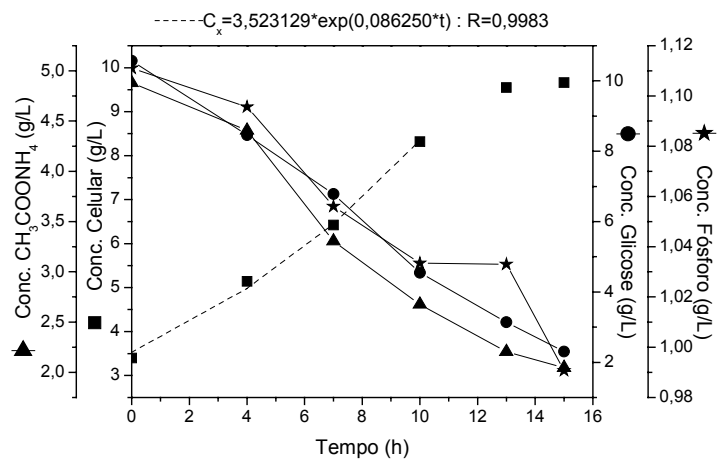


Figura B4: Resultados experimentais referentes ao ensaio 4.

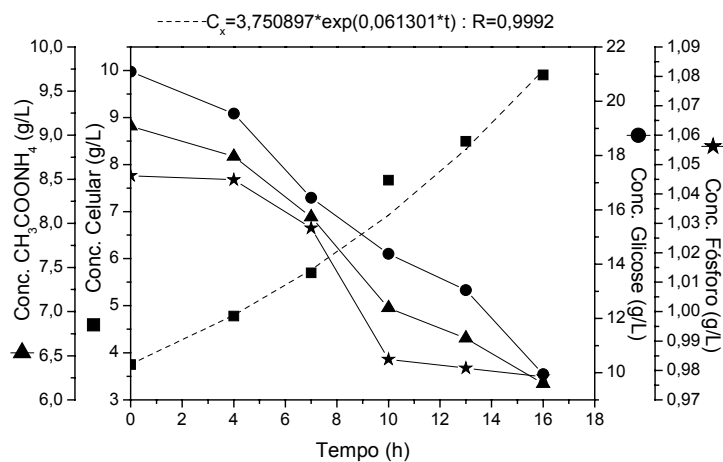


Figura B5: Resultados experimentais referentes ao ensaio 5.

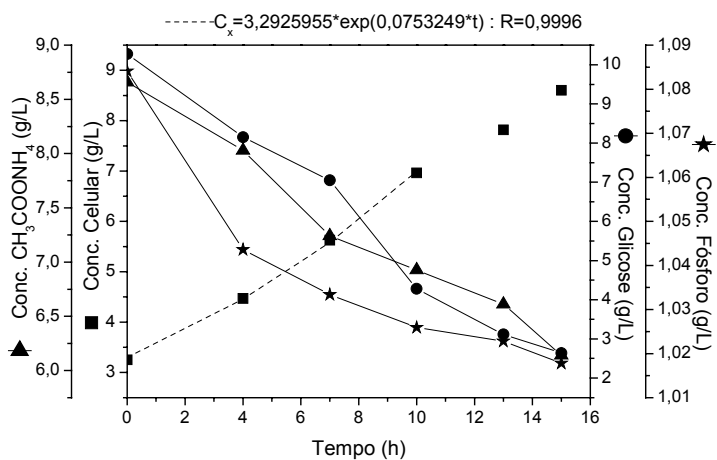


Figura B6: Resultados experimentais referentes ao ensaio 6.

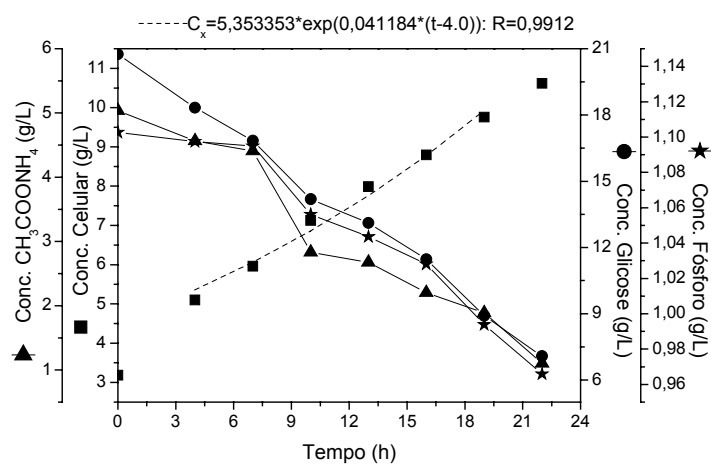


Figura B7: Resultados experimentais referentes ao ensaio 7.

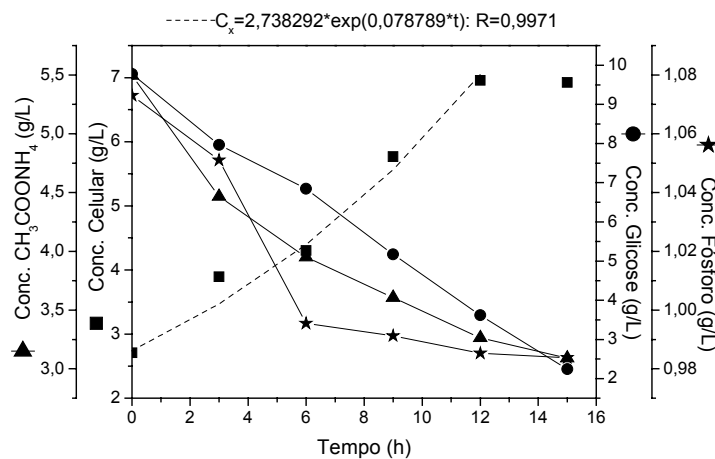


Figura B8: Resultados experimentais referentes ao ensaio 8.

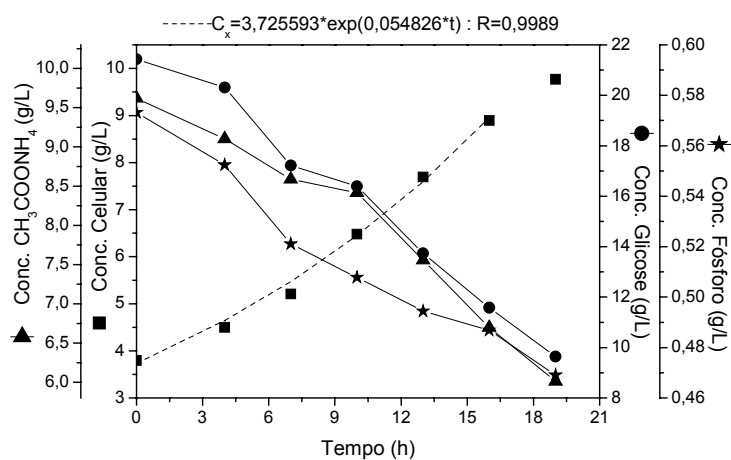


Figura B9: Resultados experimentais referentes ao ensaio 9.



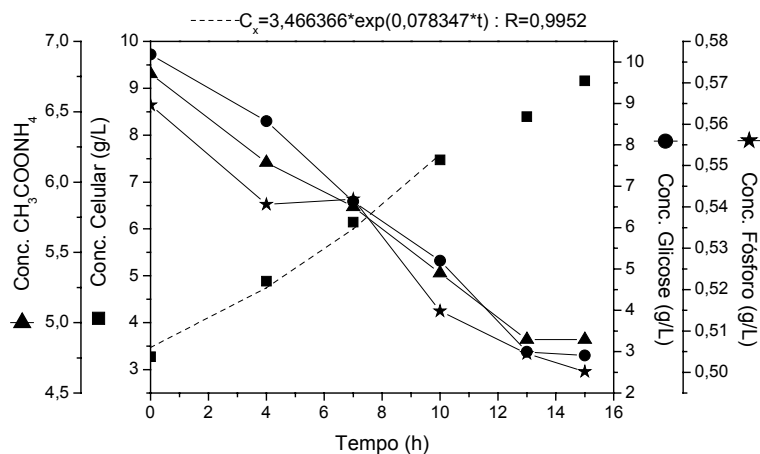


Figura B10: Resultados experimentais referentes ao ensaio 10.

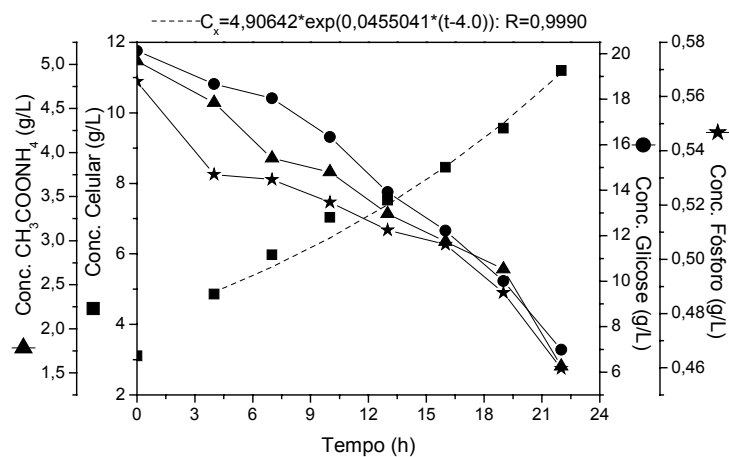


Figura B11: Resultados experimentais referentes ao ensaio 11.

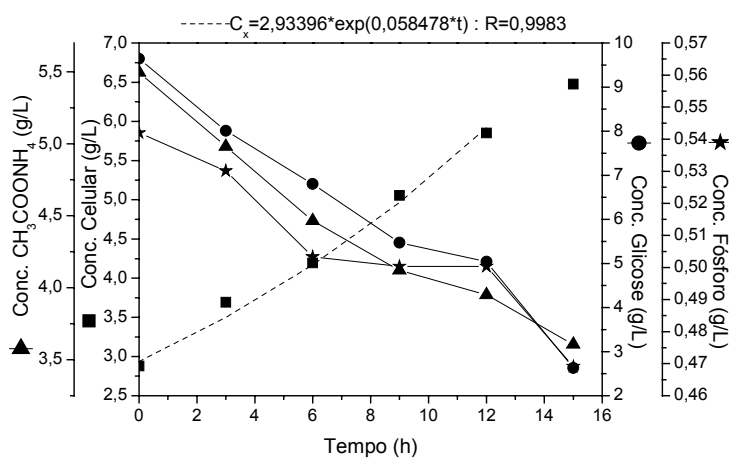


Figura B12: Resultados experimentais referentes ao ensaio 12.

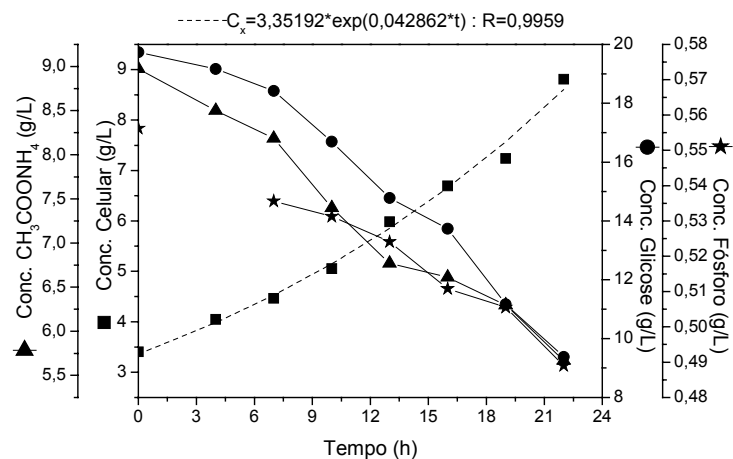


Figura B13: Resultados experimentais referentes ao ensaio 13.

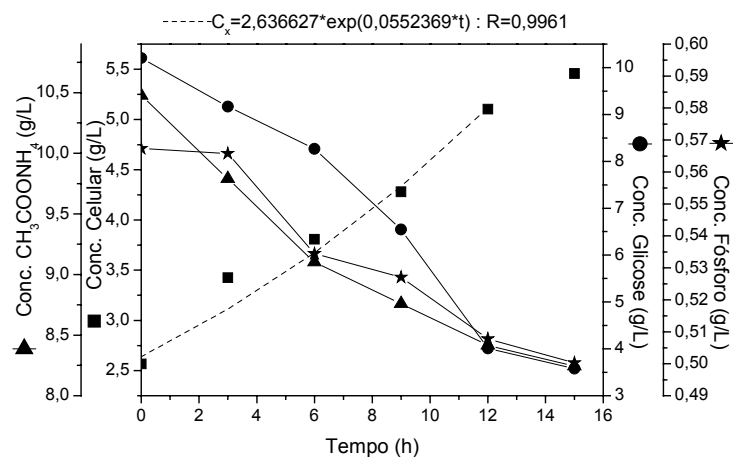


Figura B14: Resultados experimentais referentes ao ensaio 14.

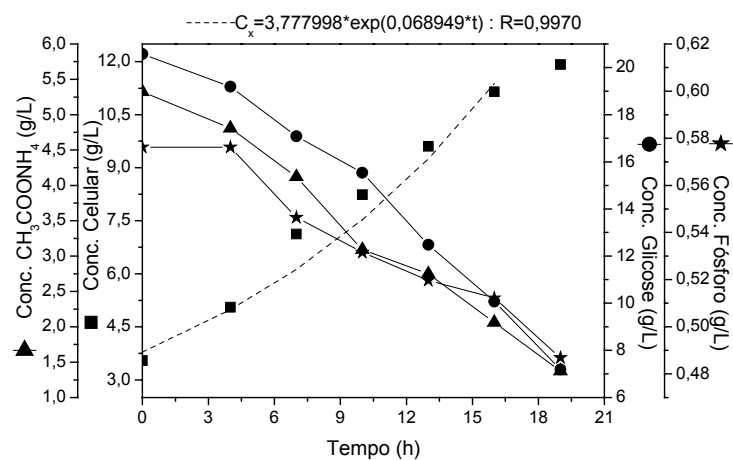


Figura B15: Resultados experimentais referentes ao ensaio 15.

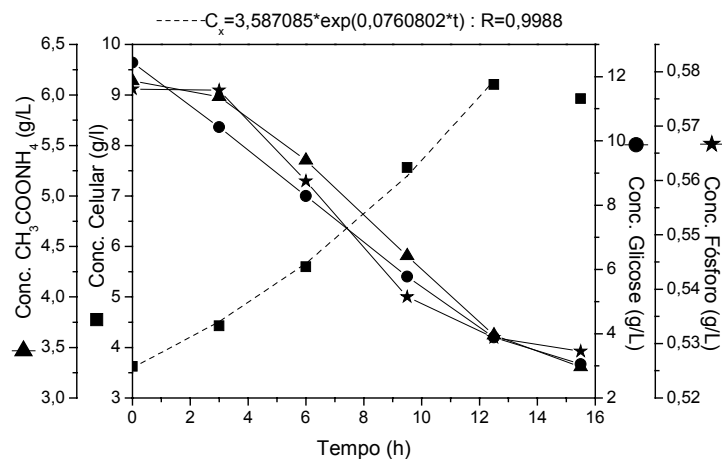


Figura B16: Resultados experimentais referentes ao ensaio 16.

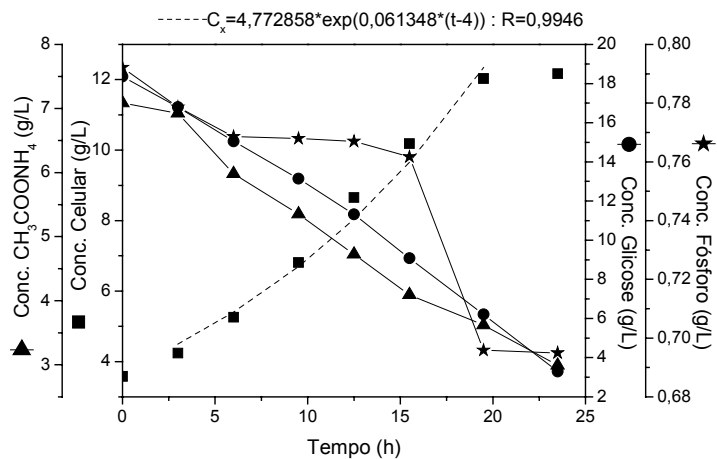


Figura B17: Resultados experimentais referentes ao ensaio 17.

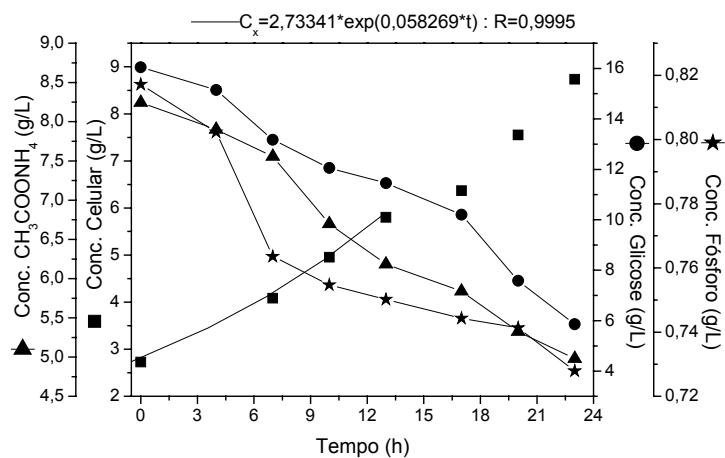


Figura B18: Resultados experimentais referentes ao ensaio 18.

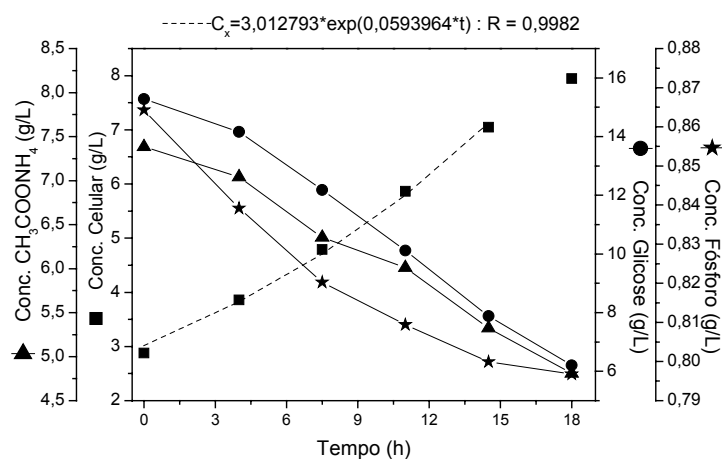


Figura B19: Resultados experimentais referentes ao ensaio 19.

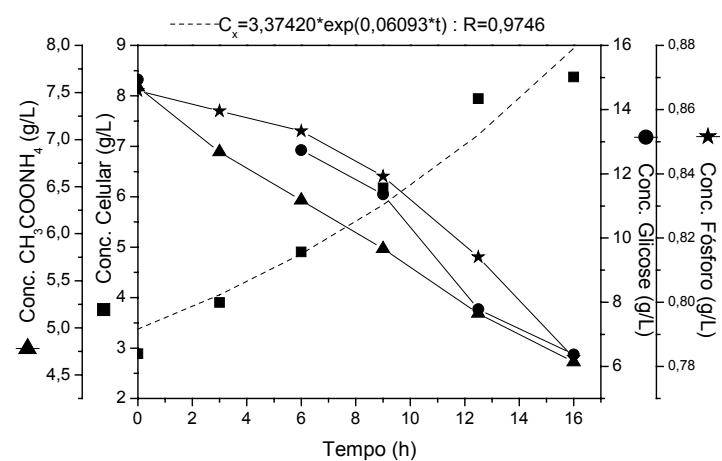


Figura B20: Resultados experimentais referentes ao ensaio 20.

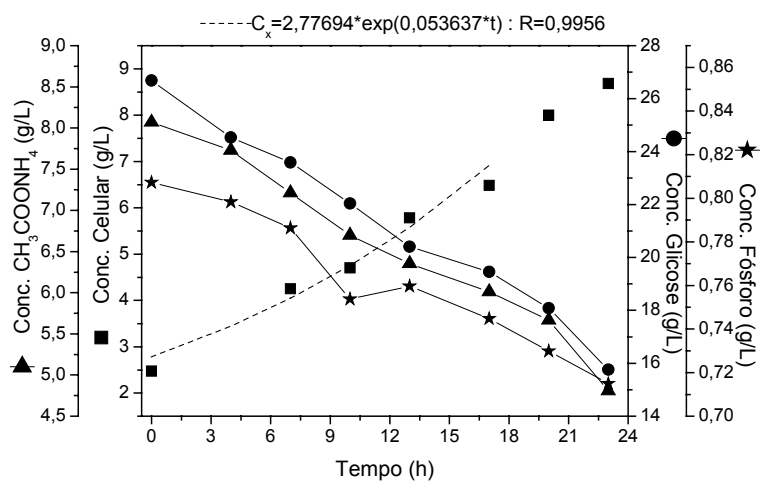


Figura B21: Resultados experimentais referentes ao ensaio 21.

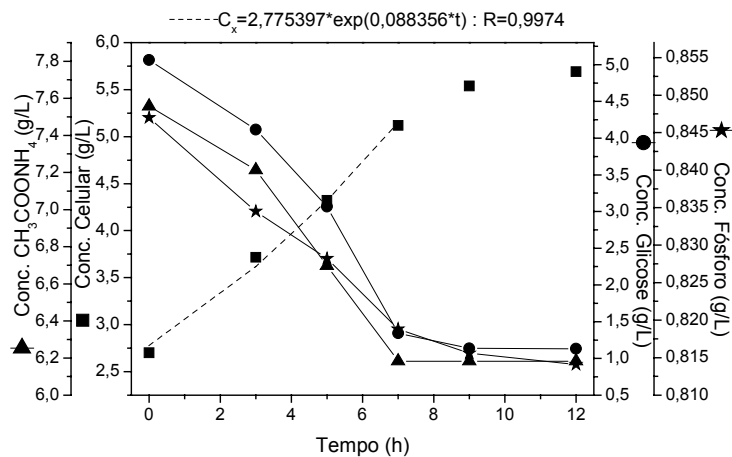


Figura B22: Resultados experimentais referentes ao ensaio 22.

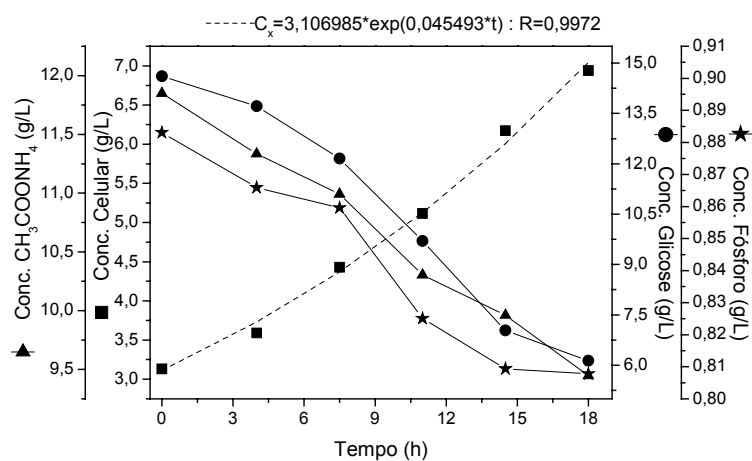


Figura B23: Resultados experimentais referentes ao ensaio 23.

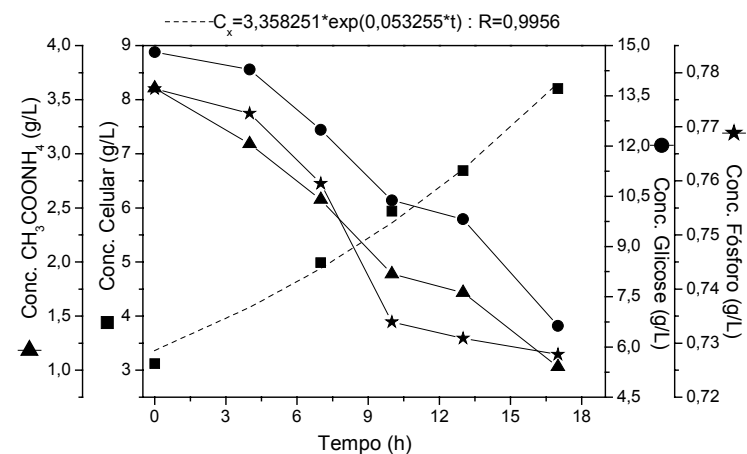


Figura B24: Resultados experimentais referentes ao ensaio 24.

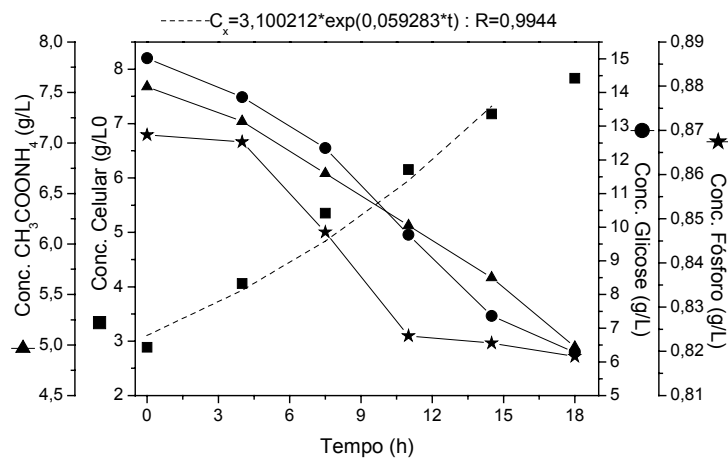


Figura B25: Resultados experimentais referentes ao ensaio 25.

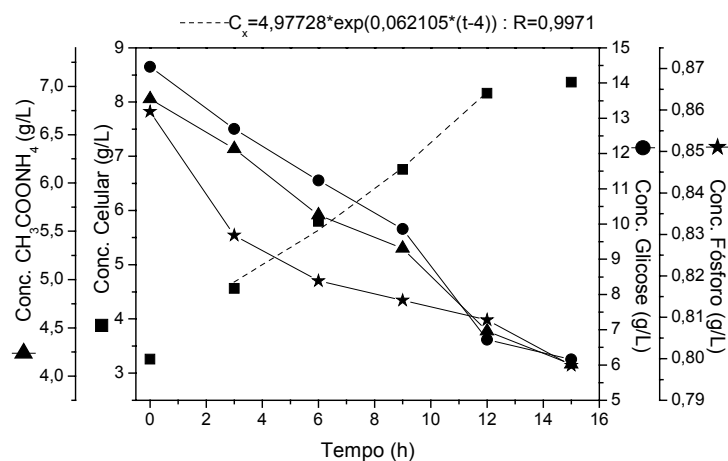


Figura B26: Resultados experimentais referentes ao ensaio 26.

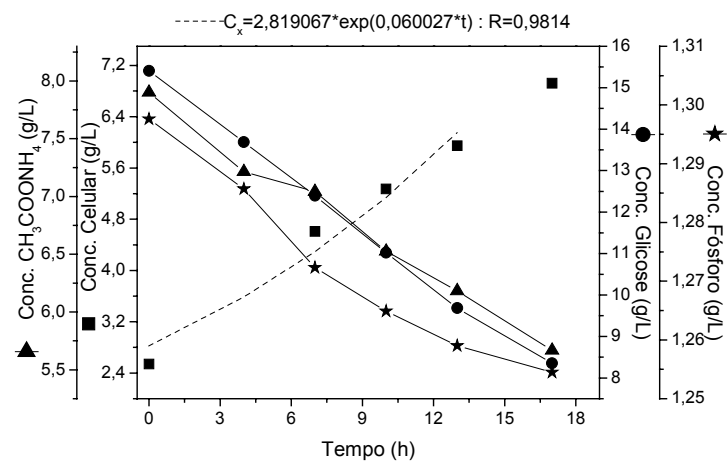


Figura B27: Resultados experimentais referentes ao ensaio 27.

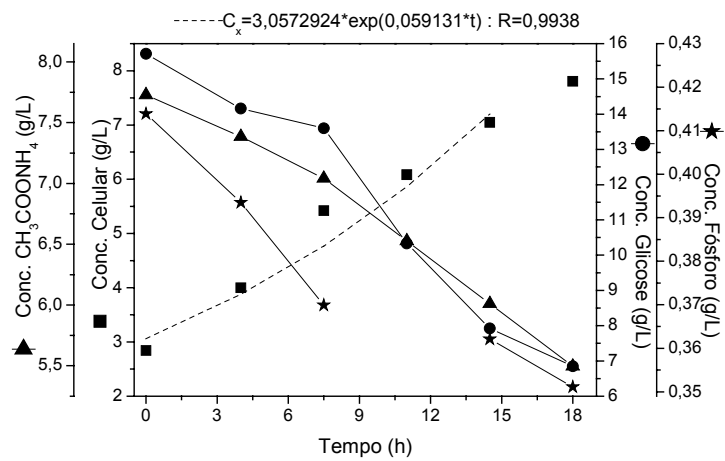


Figura B28: Resultados experimentais referentes ao ensaio 28.

## APÊNDICE C

A Tabela 4.12, apresentou o desenvolvimento do planejamento fatorial composto central para as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio e a variável resposta, velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio realizado. A Tabela 3.13 é aqui reproduzida por definir os níveis dos fatores usados no planejamento e a Tabela C1 apresenta a matriz planejamento da Tabela 4.15 juntamente com os valores de  $\mu_{\max}$ . Os valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos a partir dos dados experimentais como descrito no item 3.2.3.3, e estão apresentados nas Figuras C1 a C12.

Tabela 3.13: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	N <sup>o</sup>	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
G	1	Glicose (g/L)	3,0	4,0	6,5	9,0	10,0
N	2	Acet. Amônio (g/L)	2,0	2,5	4,0	5,5	6,0

\* Valores sobrescrito corresponde à quantidade de fósforo (P) total.

Tabela C1: Resultados de um Planejamento Fatorial Composto Central realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Concentração		$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )*	
	G (g/L)	N (g/L)	(1)	(2)
1	<sup>+</sup> 9,0	<sup>+</sup> 5,5	0,1418	0,1362
2	<sup>-</sup> 4,0	<sup>+</sup> 5,5	0,1669	0,1744
3	<sup>+</sup> 9,0	<sup>-</sup> 2,5	0,1677	0,1482
4	<sup>-</sup> 4,0	<sup>-</sup> 2,5	0,2161	0,2239
5	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1499	-
6	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1622	-
7	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1513	-
8	<sup>0</sup> 6,5	<sup>0</sup> 4,0	0,1524	-
9	<sup>+α</sup> 10,0	<sup>0</sup> 4,0	0,1185	0,1302
10	<sup>-α</sup> 3,0	<sup>0</sup> 4,0	0,1692	0,1775
11	<sup>0</sup> 6,5	<sup>+α</sup> 6,0	0,1661	0,1562
12	<sup>0</sup> 6,5	<sup>-α</sup> 2,0	0,1766	0,1871

\*duplicatas



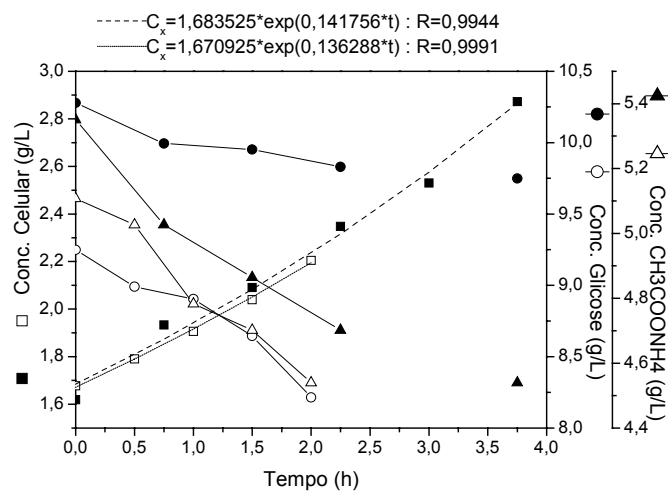


Figura C1: Resultados experimentais referentes ao ensaio 1.

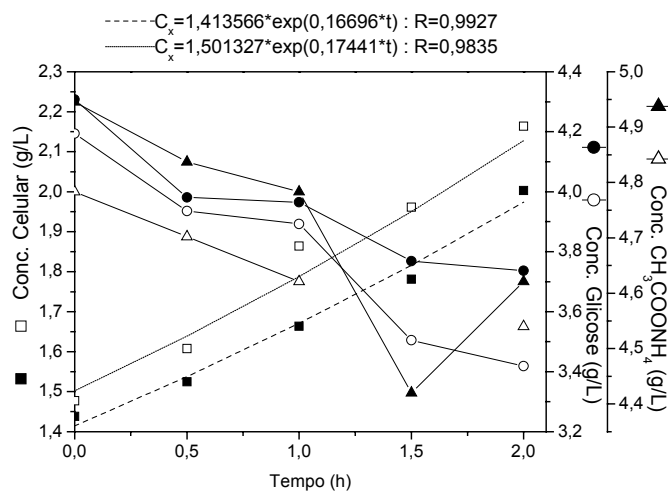


Figura C2: Resultados experimentais referentes ao ensaio 2.

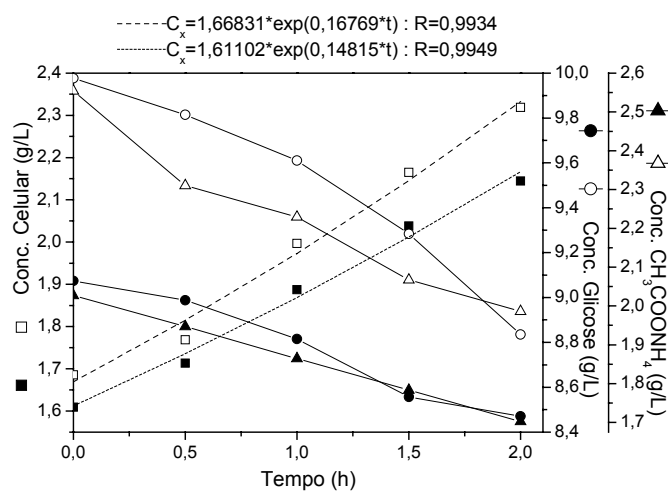


Figura C3: Resultados experimentais referentes ao ensaio 3.

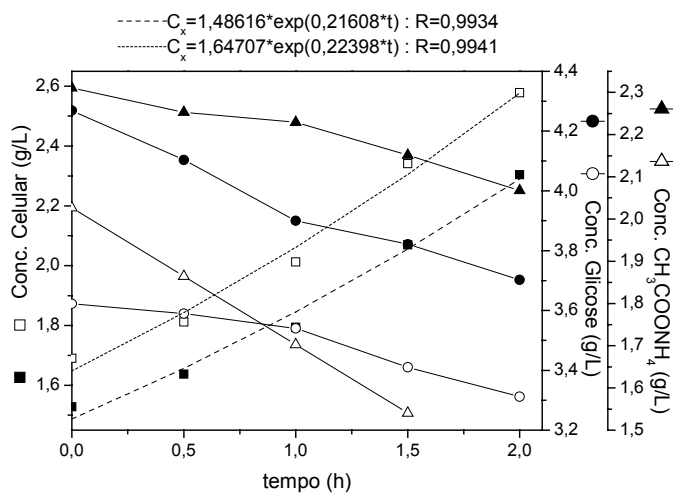


Figura C4: Resultados experimentais referentes ao ensaio 4.

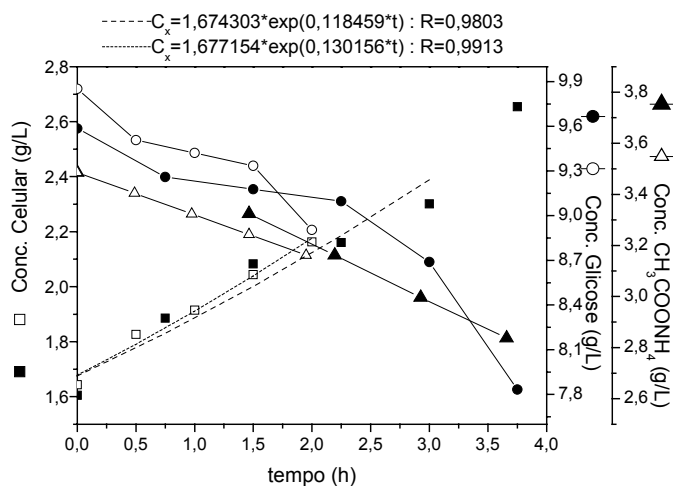


Figura C5: Resultados experimentais referentes ao ensaio 9.

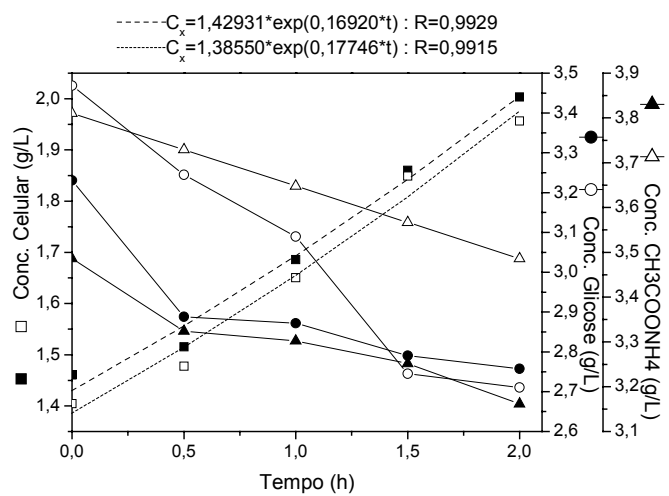


Figura C6: Resultados experimentais referentes ao ensaio 10.

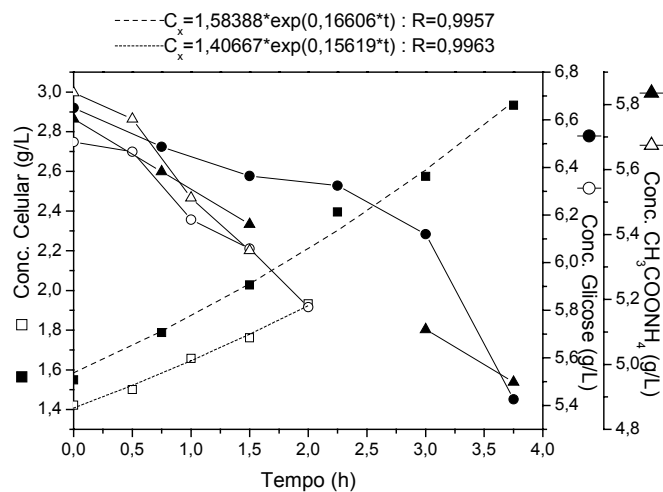


Figura C7: Resultados experimentais referentes ao ensaio 11.

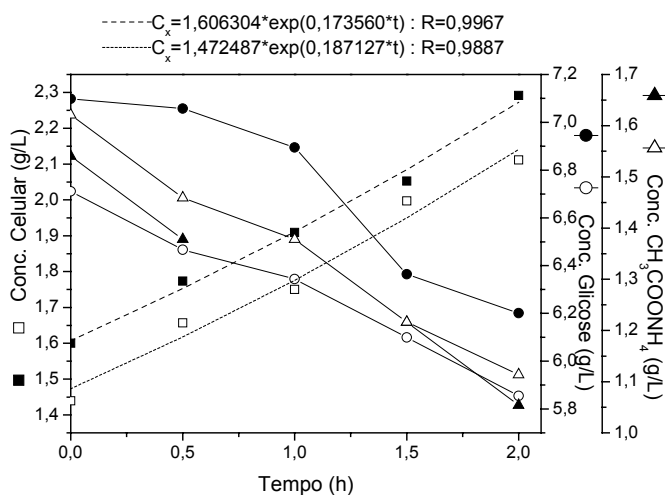


Figura C8: Resultados experimentais referentes ao ensaio 12.

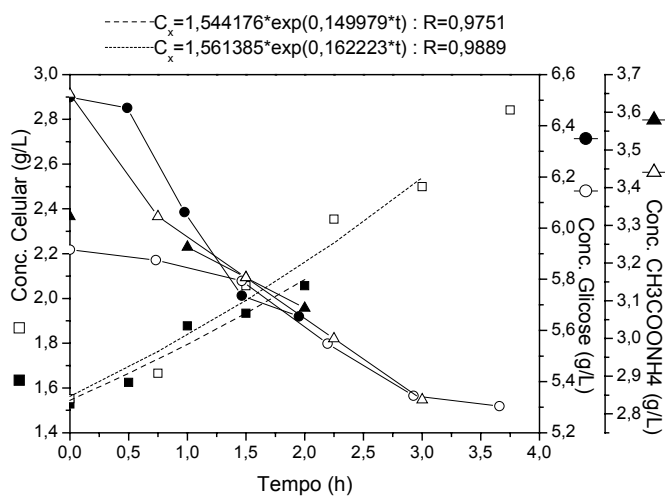


Figura C9: Resultados experimentais referentes ao ensaio 5 e 6.

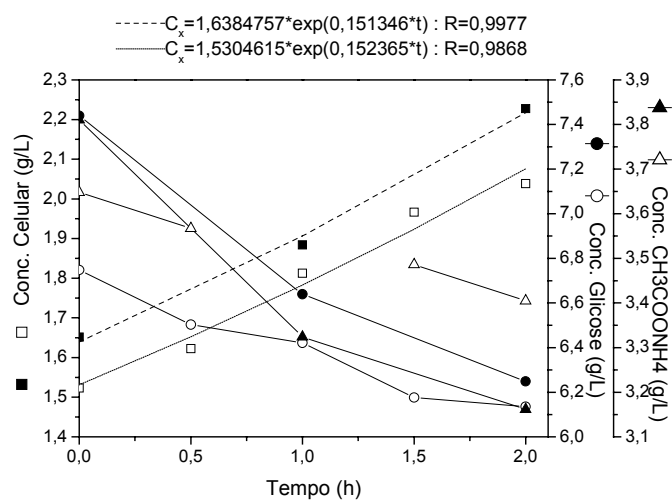


Figura C10: Resultados experimentais referentes ao ensaio 7 e 8.

## APÊNDICE D

A Tabela 4.15, apresentou o desenvolvimento do planejamento fatorial composto central para as variáveis concentração de glicose, acetato de amônio e a variável resposta, velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), para cada ensaio realizado. A Tabela 3.15 é aqui reproduzida por definir os níveis dos fatores usados no planejamento e a Tabela D1 apresenta a matriz planejamento da Tabela 4.15 juntamente com os valores de  $\mu_{\max}$ . Os valores de  $\mu_{\max}$  foram obtidos a partir dos dados experimentais como descrito no item 3.2.3.3, e estão apresentados nas Figuras D1 a D7. O ensaio 1 (Tabela D1) é representado pelas Figuras C9 e C10 e os ensaios 5 e 6 pela Figura C4.

Tabela 3.15: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências no crescimento do fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	N <sup>o</sup>	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
G	1	Glicose (g/L)	0,5	1,5	4,0	6,5	7,5
N	2	Acet. Amônio (g/L)	0,4	1,0	2,5	4,0	4,6

Tabela D1: Resultados obtidos de um Planejamento Fatorial Composto Central realizado para o estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G e acetato de amônio = N na velocidade específica máxima de crescimento do fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Concentração		$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )*	
	G (g/L)	N (g/L)	(1)	(2)
1	+6,5	+4,0	0,1500	0,1524
2	-1,5	+4,0	0,1785	0,1703
3	+6,5	-1,0	0,1766	0,1813
4	-1,5	-1,0	0,1512	0,1499
5	<sup>0</sup> 4,0	<sup>0</sup> 2,5	0,2161	-
6	<sup>0</sup> 4,0	<sup>0</sup> 2,5	0,2239	-
7	<sup>0</sup> 4,0	<sup>0</sup> 2,5	0,2122	-
8	+ <sup>α</sup> 7,5	<sup>0</sup> 2,5	0,1667	0,1724
9	- <sup>α</sup> 0,5	<sup>0</sup> 2,5	0,1447	0,1565
10	<sup>0</sup> 4,0	+ <sup>α</sup> 4,6	0,1723	0,1689
11	<sup>0</sup> 4,0	- <sup>α</sup> 0,4	0,1606	0,1715

\*duplicata

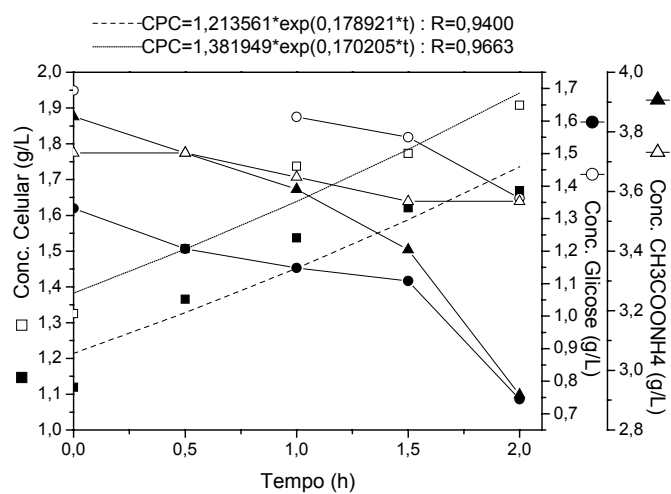


Figura D1: Resultados experimentais referentes ao ensaio 2.

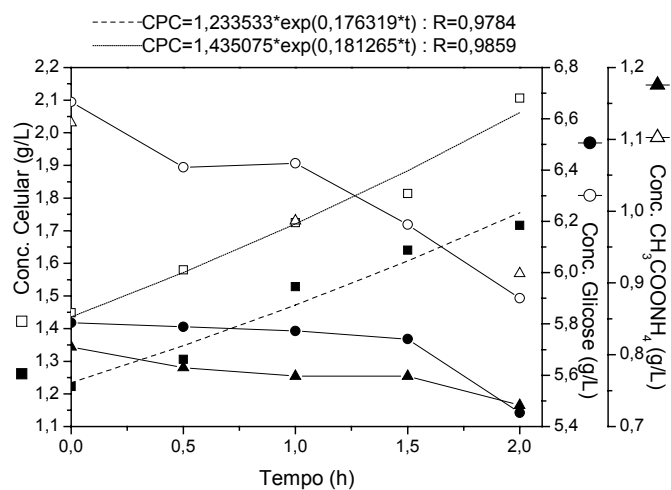


Figura D2: Resultados experimentais referentes ao ensaio 3.

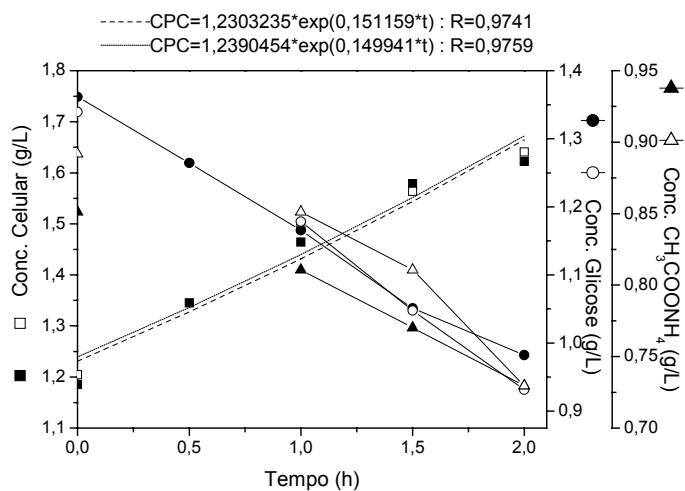


Figura D3: Resultados experimentais referentes ao ensaio 4.

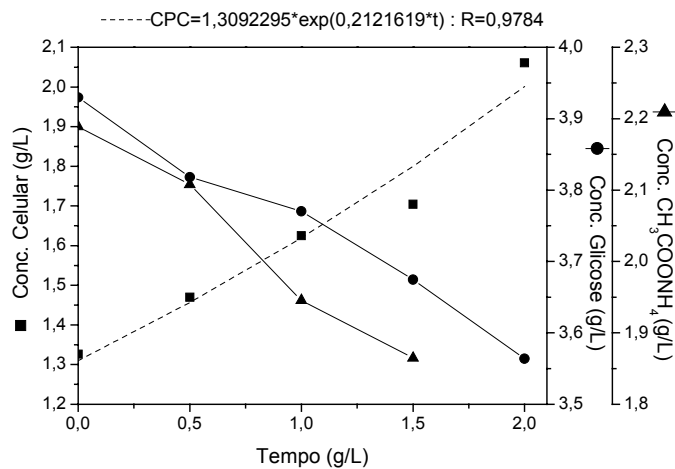


Figura D4: Resultados experimentais referentes ao ensaio 7.

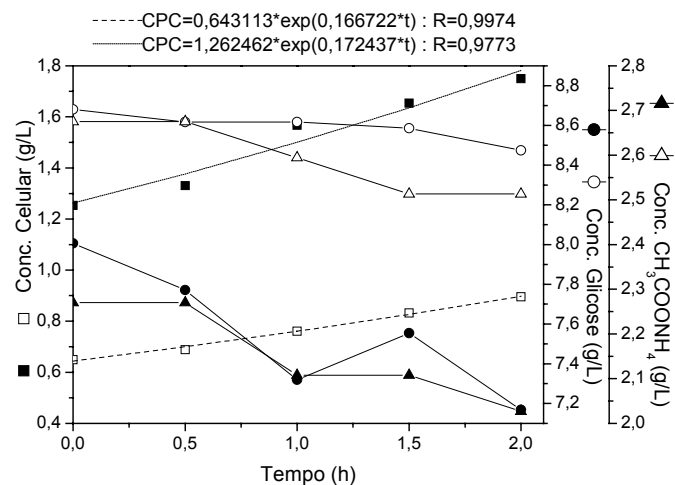


Figura D5: Resultados experimentais referentes ao ensaio 8.

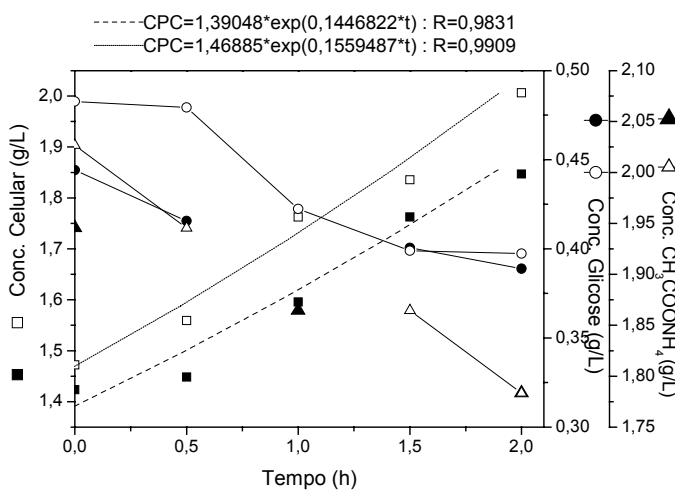


Figura D6: Resultados experimentais referentes ao ensaio 9.

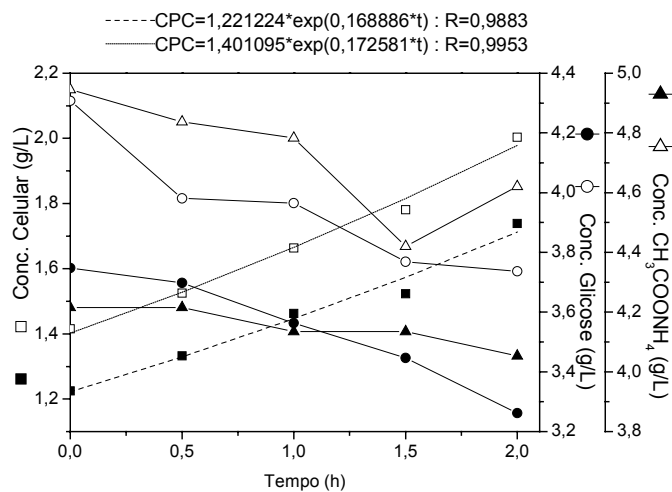


Figura D6: Resultados experimentais referentes ao ensaio 10.

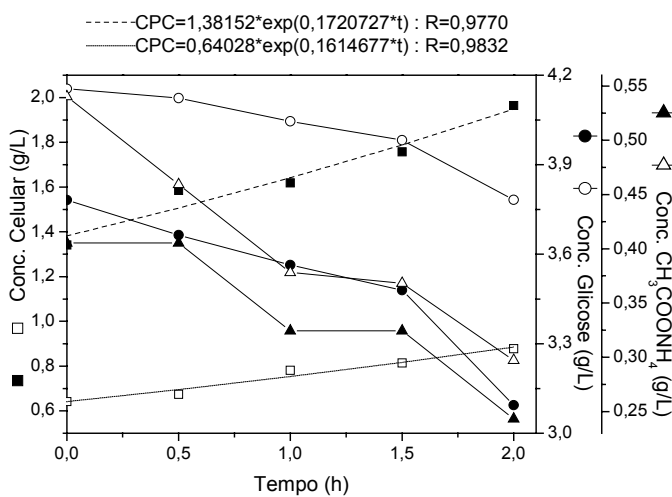


Figura D7: Resultados experimentais referentes ao ensaio 11.



## APÊNDICE E

A Tabela 4.19, apresentou o desenvolvimento do planejamento fatorial completo para as variáveis concentração de sacarose, DL-metionina e a variável resposta, velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ), para cada ensaio realizado. A Tabela 3.16 é aqui reproduzida por definir os níveis dos fatores usados no planejamento e a Tabela E1 apresenta a matriz planejamento da Tabela 4.19 juntamente com os valores de  $\mu_p$ . Os valores de  $\mu_p$  foram obtidos a partir dos dados experimentais como descrito no item 3.2.3.4, e estão apresentados nas Figuras E1 a E5.

Tabela 3.16: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências na produção de cefalosporina C pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	N <sup>o</sup>	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
<b>Planejamento 1</b>							
S	1	Sacarose (g/L)	-	8,0	13,0	18,0	-
MET	2	DL-Metionina (g/L)	-	1,5	3,0	4,5	-

Tabela E1: Planejamento Fatorial completo realizado para estudo da influência das variáveis concentração de sacarose = S, DL-metionina = Met na velocidade específica de produção de antibiótico cefalosporina C (CPC), pelo fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração		$\mu_p$ (mg <sub>CPC</sub> /g <sub>Cél.</sub> .h)*	
	S (g/L)	Met (g/L)	(1)	(2)
1	<sup>+</sup> 18,0	<sup>+</sup> 4,5	0,6079	0,7008
2	<sup>-</sup> 8,0	<sup>+</sup> 4,5	0,8694	0,7854
3	<sup>+</sup> 18,0	<sup>-</sup> 1,5	0,8407	0,8173
4	<sup>-</sup> 8,0	<sup>-</sup> 1,5	1,0298	0,9807
5	<sup>0</sup> 13,0	<sup>0</sup> 3,0	0,9890	0,9222

\*duplicata

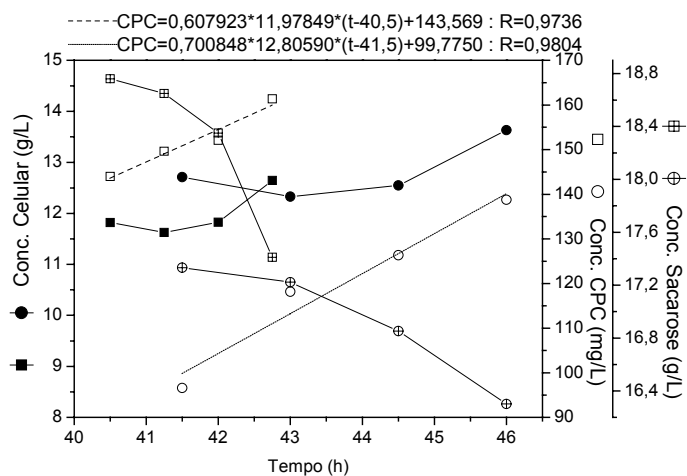


Figura E1: Resultados experimentais referentes ao ensaio 1.

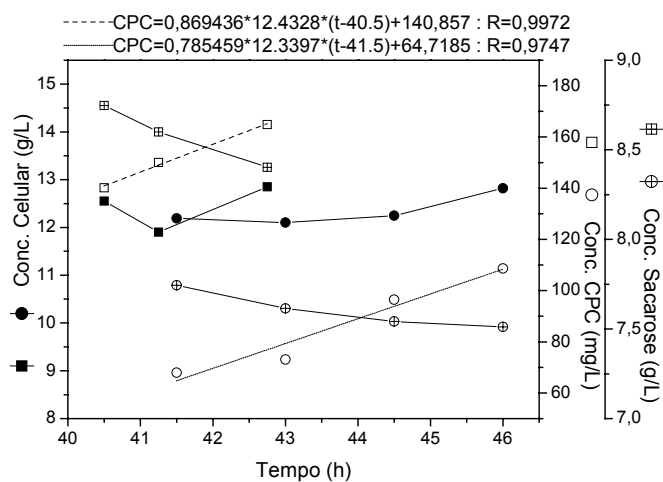


Figura E2: Resultados experimentais referentes ao ensaio 2.

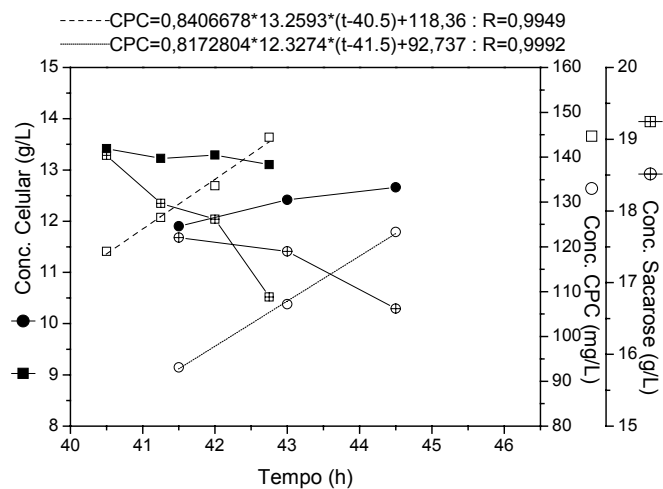


Figura E3: Resultados experimentais referentes ao ensaio 3.

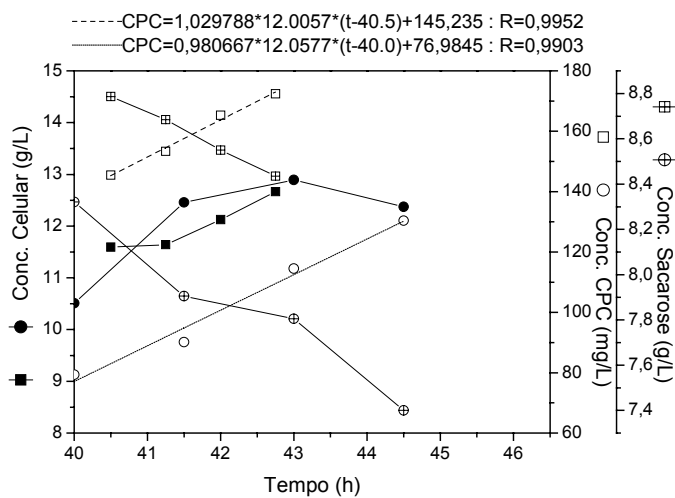


Figura E4: Resultados experimentais referentes ao ensaio 4.

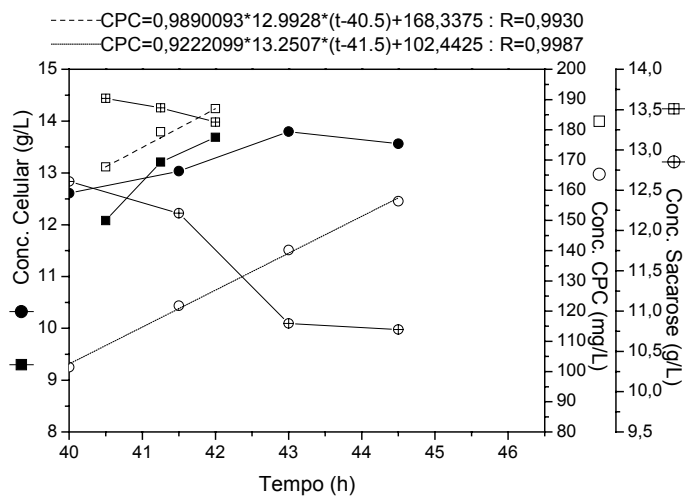


Figura E5: Resultados experimentais referentes ao ensaio 5.

## APÊNDICE F

A Tabela 4.22, apresentou o desenvolvimento do planejamento fatorial composto central para as variáveis concentração de sacarose e DL-metionina e a variável resposta, velocidade específica de produção de antibiótico ( $\mu_p$ ), para cada ensaio realizado. Cada um dos ensaios originou um valor experimental de  $\mu_p$  obtida como descrita no item 3.2.3.4.

A Tabela 3.16 é aqui reproduzida por definir os níveis dos fatores usados no planejamento, juntamente com a Tabela 4.19 acrescida dos valores de  $\mu_{max}$  obtidos experimentalmente para cada ensaio (Tabela F1). As Figuras F1 a F9 mostram os dados experimentais para cada ensaio apresentado na Tabela F1 bem como o ajuste da equação 3.32, para determinação de  $\mu_p$ .

Tabela 3.16: Definição dos níveis dos fatores para o estudo de suas influências na produção de cefalosporina C pelo fungo *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.

Fator	N <sup>o</sup>	Definição	Nível				
			-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
S	1	Sacarose (g/L)	2,8	4,0	7,0	10,0	11,2
MET	2	DL-Metionina (g/L)	0,9	1,5	3,0	4,5	5,1

Tabela F1: Planejamento Fatorial composto central realizado para estudo da influência das variáveis concentração de glicose = G, DL-metionina = Met na velocidade específica de produção de antibiótico cefalosporina C (CPC), pelo fungo *C. acremonium* ATCC 48272.

Ensaio	Nível Concentração		$\mu_p$ (mg <sub>CPC</sub> /g <sub>Cél.</sub> .h)*	
	S (g/L)	Met (g/L)	(1)	(2)
1	+10,0	+4,5	0,7381	0,8126
2	-4,0	+4,5	0,2827	0,2634
3	+10,0	-1,5	1,1491	1,0524
4	-4,0	-1,5	0,5697	0,6579
5	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 3,0	1,0119	-
6	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 3,0	0,9584	-
7	<sup>0</sup> 7,0	<sup>0</sup> 3,0	0,9155	-
8	<sup>+α</sup> 11,25	<sup>0</sup> 3,0	1,0127	1,1441
9	<sup>-α</sup> 2,75	<sup>0</sup> 3,0	0,4206	0,3925
10	<sup>0</sup> 7,0	<sup>+α</sup> 5,1	0,3887	0,3789
11	<sup>0</sup> 7,0	<sup>-α</sup> 0,9	0,6413	0,6893

\*duplicatas

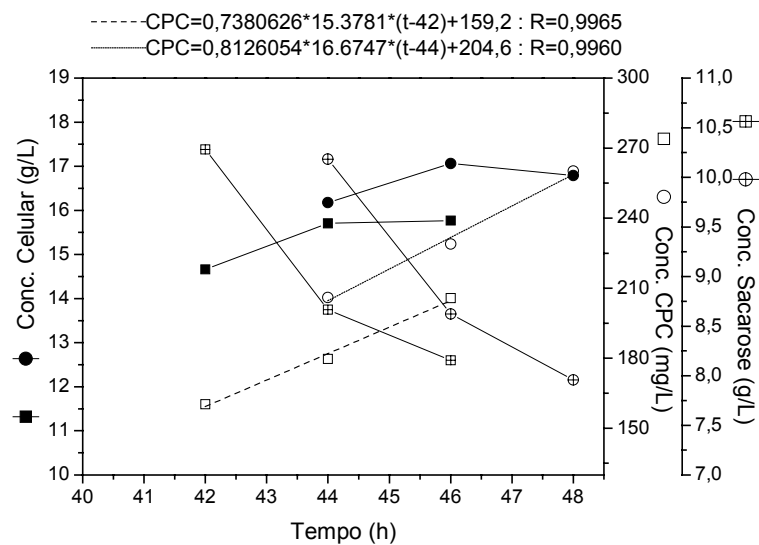


Figura F1: Resultados experimentais referentes ao ensaio 1.

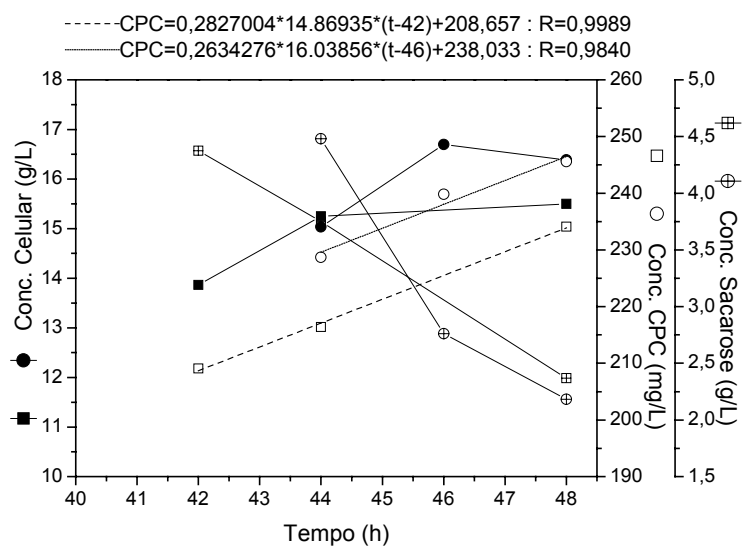


Figura F2: Resultados experimentais referentes ao ensaio 2.

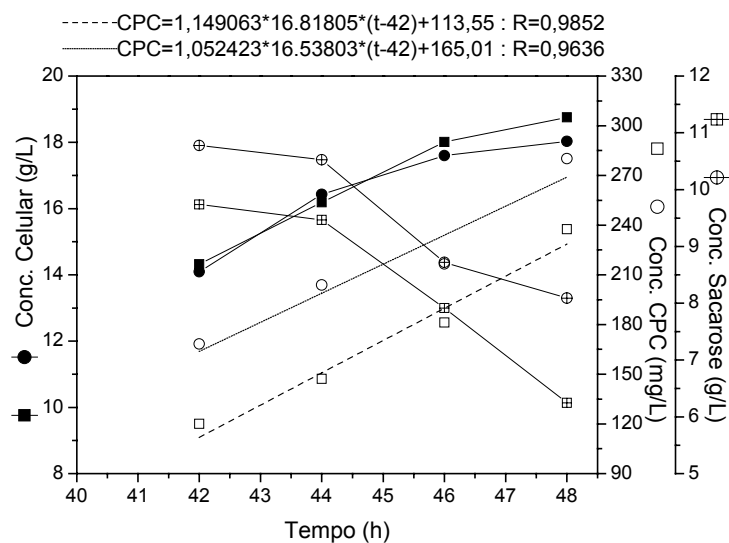


Figura F3: Resultados experimentais referentes ao ensaio 3.

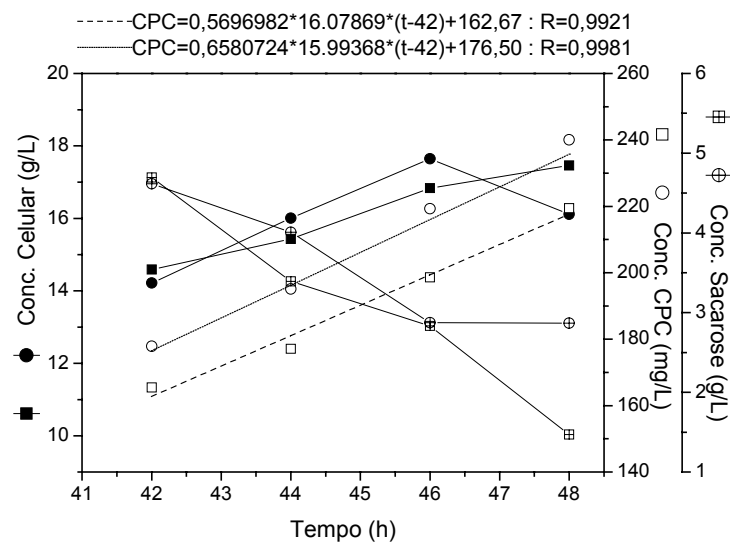


Figura F4: Resultados experimentais referentes ao ensaio 4.

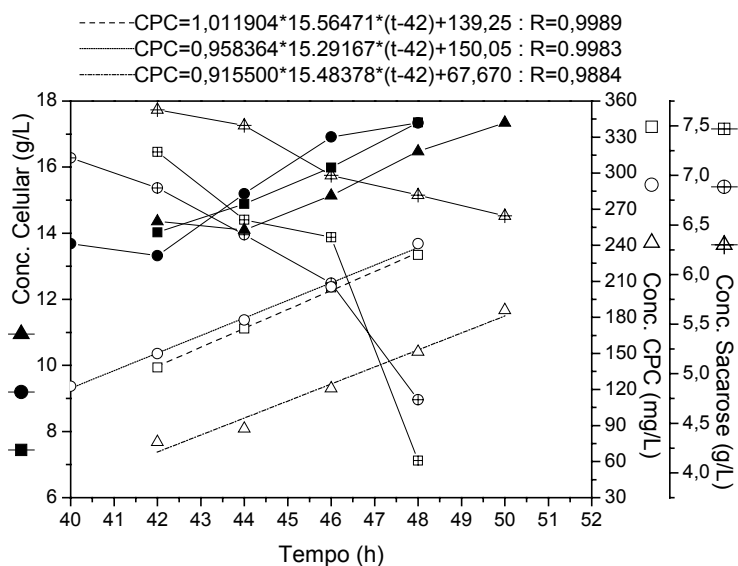


Figura F5: Resultados experimentais referentes ao ensaio 5, 6 e 7.

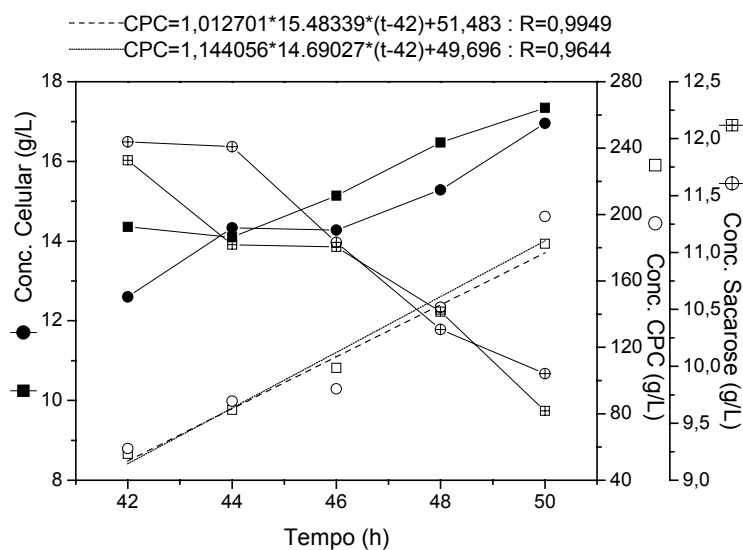


Figura F6: Resultados experimentais referentes ao ensaio 8.

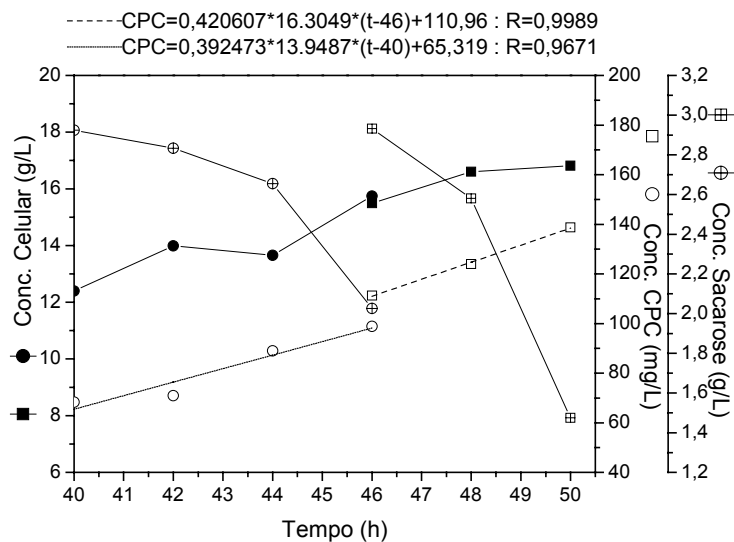


Figura F7: Resultados experimentais referentes ao ensaio 9.

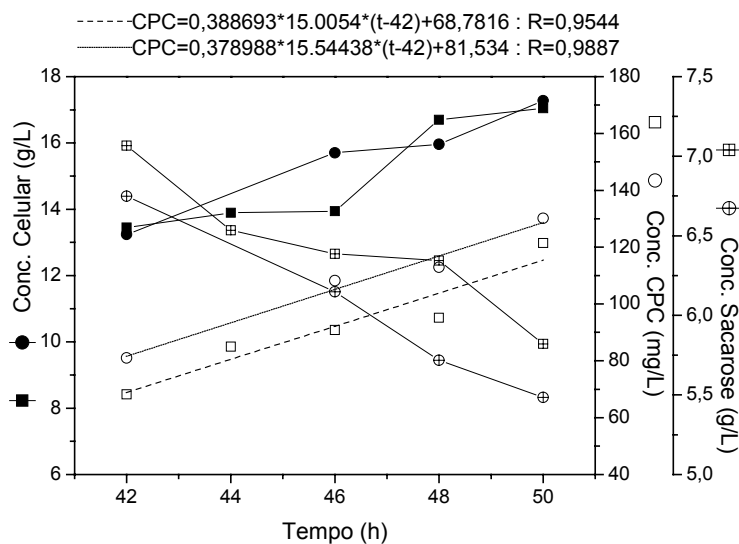


Figura F8: Resultados experimentais referentes ao ensaio 10.

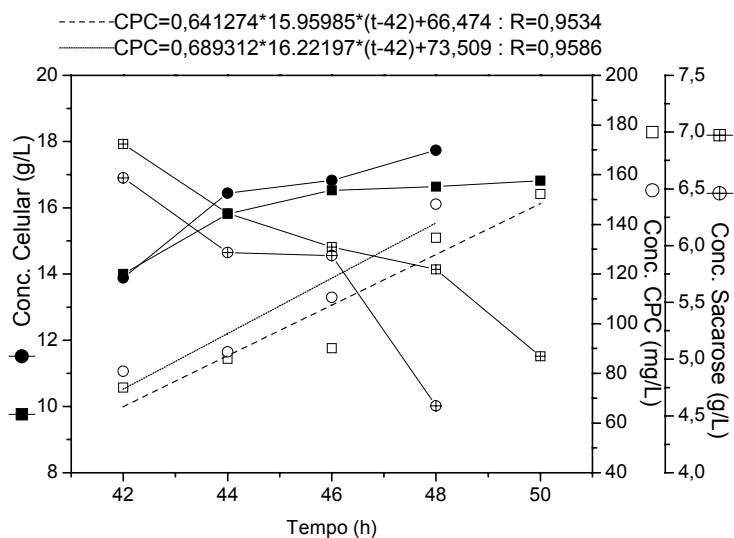


Figura F9: Resultados experimentais referentes ao ensaio 11.