JOSÉ PAULO CASTILHO LOPES DA COSTA

**Análise da Produção do Antitumoral Retamicina em Cultivos Contínuos de
Streptomyces olindensis ICB20 Utilizando Planejamento Fatorial**

São Paulo

2008

JOSÉ PAULO CASTILHO LOPES DA COSTA

**Análise da Produção do Antitumoral Retamicina em Cultivos Contínuos de
Streptomyces olindensis ICB20 Utilizando Planejamento Fatorial**

**Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Engenharia**

**São Paulo
2008**

JOSÉ PAULO CASTILHO LOPES DA COSTA

**Análise da Produção do Antitumoral Retamicina em Cultivos Contínuos de
Streptomyces olindensis ICB20 Utilizando Planejamento Fatorial**

**Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Engenharia**

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador:

Prof^a Dr^a Maria Cândida Reginato Facciotti

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, José Paulo Castilho Lopes da

Análise da produção do antitumoral retamicina em cultivos contínuos de *Streptomyces olindensis* ICB20 utilizando planejamento fatorial / J.P.C.L. da Costa. -- São Paulo, 2008.

194 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

**1.Planejamento e análise de experimentos multivariados
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Cândida Reginato Facciotti pela amizade, orientação e paciência no desenvolvimento deste trabalho e pelo exemplo de honestidade e humildade.

Aos professores Beatriz Vahan Kilikian, Maria Elena S. Taqueda, Aldo Tonso, Pedro Pessoa Alcântara Filho, Willibaldo Schmidell e Reinaldo Giudici pelo apoio para realização deste trabalho e amizade.

Ao Prof. Dr. Gabriel Padilla e Dr^a Renata Furlan que gentilmente cederam os microrganismos utilizados neste projeto.

Aos colegas mais recentes Aninha, Cíntia, Daniela, Danielle, Isabela, Juliana, Mariana, Marilena, Patrícia, Paula, Paula e Janaína, Priscila, Verônica, Cadu, Marcos e Thiago pela amizade e bons momentos.

Aos colegas mais antigos Áurea, Fabiano, Nuno, Harm, Jorge, Rogério e Olavo pelo companheirismo.

Aos amigos Gorete e Olivo que tive oportunidade de rever.

Aos funcionários Andrea, Orlinda, Flávia, Vanessa, Elisete, Graça, Terezinha, Valter, Alexandre, Antônio Carlos e Tadeu.

Ao pessoal da biblioteca, Lúcia, Fátima e Maria, pela ajuda e amizade.

Ao Júnior e seu colegas do café do B19.

Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro no projeto para aquisição da câmera digital, filtros e corantes para fluorescência.

RESUMO

O objetivo deste projeto foi estudar a produção de retamicina em biorreatores de bancada por *Streptomyces olindensis* ICB20 em cultivos contínuos, visando avaliar a influência da frequência de agitação (N=300, 500 ou 700rpm), da concentração de oxigênio dissolvido (OD=20, 50 ou 80%) e da velocidade específica de crescimento ($\mu=0,05, 0,15$ ou $0,25 \text{ h}^{-1}$), segundo um planejamento fatorial completo (três fatores, N, OD e μ , em dois níveis) com seis repetições no ponto central. Os ensaios no ponto central serviram para avaliar a significância da curvatura nos modelos estatísticos e a reprodutibilidade do processo. Buscou-se correlacionar a concentração de retamicina com estes fatores, com o diâmetro dos halos de inibição, determinados em testes de atividade biológica e com a morfologia do microrganismo, classificada em hifas, *clumps* ou *pellets*.

Melhores resultados para a concentração de retamicina foram obtidos para N = 300 rpm e $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. A análise estatística mostrou que a concentração de oxigênio dissolvido não exerce influência sobre o processo na faixa estudada. Modelos estatísticos foram calculados, por regressão linear múltipla, para correlacionar a concentração celular, de retamicina, os fatores de conversão, a produção e as produtividades com os fatores N, OD e μ em unidades codificadas. A curvatura foi significativa ($\alpha = 10\%$) para a concentração de retamicina. Um modelo fenomenológico relacionando a concentração de retamicina à frequência de agitação (N) e à velocidade específica de crescimento (μ) em estado estacionário foi determinado:

$$\text{Ret} = (1005/\text{N}) \cdot \exp(-12,79 \cdot \mu) \quad R^2 = 0,97.$$

Este modelo foi validado com ensaios além dos previstos no planejamento fatorial e também com os resultados obtidos por Pamboukian (2003).

A correlação entre a concentração da retamicina e o diâmetro do halo de inibição (Φ), determinada em testes de atividade biológica, foi:

$$\text{Ret} = 0,2889 \cdot \Phi - 1,4437 \quad R^2 = 0,93 \text{ } (\Phi \text{ em mm}).$$

Com relação à morfologia, apenas a porcentagem de hifas, em relação a área total, sofreu influência de N, μ e das interações $\text{N} \cdot \mu$ e $\text{N} \cdot \text{OD} \cdot \mu$. Um modelo estatístico em unidades não codificadas foi calculado e combinado ao modelo fenomenológico. Este novo modelo considera a adição da porcentagem de *clumps* à de *pellets*, formando uma classe denominada de aglomerado (AGL):

$$\text{Ret} = [(34 + 100 \cdot \mu) / (83 - \% \text{AGL} - 116 \cdot \mu)] \cdot (\exp(-12,79 \cdot \mu)) \quad R^2 = 0,95.$$

Foi possível correlacionar a produtividade específica de retamicina à área média dos aglomerados (AM):

$$\text{Pret} / \text{Xc} = 0,015 \cdot [((\text{AM} - 3,75) / \text{AM}) + \exp(-0,3 \cdot (\text{AM} - 3,75)^2)] \quad R^2 = 0,8$$

Foram testados diferentes corantes para identificar partes viáveis da célula. Apenas o corante BacLight® apresentou bons resultados, porém não foi possível concluir estes estudos por atraso no processo de importação dos filtros de fluorescência.

ABSTRACT

The aim of this project was to study the production of retamycin in bench-top bioreactors by *Streptomyces olindensis* ICB20 in continuous cultures in order to evaluate the influence of the agitation rate (N=300, 500 or 700 rpm), the dissolved oxygen concentration (20%, 50% or 80%) and the specific growth rate ($\mu=0.05, 0.15$ or 0.25 h^{-1}). A full factorial experimental design (three factors, two levels) was used to perform these experiments, including six runs at the central point, to analyse the significance of the curvature of the statistical models and reproducibility of the process. Models to calculate retamycin concentration in function of these factors, growth inhibition diameter, determined by disc diffusion tests and the morphology of the microorganism, grown as filaments, clumps or pellets were investigated.

Best results were achieved for retamycin concentration when $N = 300 \text{ rpm}$ and $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$. Statistical analysis showed no influence of the dissolved oxygen concentration in the range studied. Statistical models were calculated by multiple linear regression for the responses of interest (biomass, retamycin and glucose concentration, conversion yields and productivities) in function of N, OD and μ in coded units. Curvature was significant ($\alpha = 10\%$) for retamycin concentration. A phenomenological model for retamycin concentration in function of the agitation rate (N) and specific growth rate (μ) in steady state was determined:

$$\text{Ret} = (1005/N) \cdot \exp(-12.79 \cdot \mu) \quad R^2 = 0.97.$$

This model was checked by calculation with data of all runs included in this project and also of some continuous experiments reported by Pamboukian (2003), when $0.05 \leq \mu \leq 0.25 \text{ h}^{-1}$.

A correlation between retamycin concentration as a function of the diameter of the growth inhibitory area (Φ) was determined (biological activity tests):

$$\text{Ret} = 0.2889 \cdot \Phi - 1.4437 \quad R^2 = 0.93, (\Phi \text{ em mm}).$$

It was not possible to establish a correlation between either clumps or pellets percentage and the factors of the experimental design. Filaments percentage was related to N, μ and the interactions $N \cdot \mu$ and $N \cdot \text{OD} \cdot \mu$. A statistical model in uncoded units was calculated and combined with the phenomenological model. In this case the percentage of clumps was added to the percentage of pellets; this morphological class was identified as AGL:

$$\text{Ret} = [(34 + 100 \cdot \mu) / (83 - \% \text{AGL} - 116 \cdot \mu)] \cdot (\exp(-12.79 \cdot \mu)) \quad R^2 = 0.95.$$

Another model relating the specific retamycin productivity to the average area of AGL was proposed:

$$\text{Pret} / X_c = 0.015 \cdot [((\text{AM} - 3.75) / \text{AM}) + \exp(-0.3 \cdot (\text{AM} - 3.75)^2)] \quad R^2 = 0.8.$$

Different dyes were tested to identify non-viable cells. Good results were achieved using BacLight®. Unfortunately it was not possible to conclude these experiments due to some delay occurred in the process to import specific fluorescence filters.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE SÍMBOLOS	
LETRAS GREGAS	
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1. <i>STREPTOMYCES</i>	26
2.2. RETAMICINA	27
2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS - ANTIBIÓTICOS	30
2.4. CULTIVOS EM PROCESSO CONTÍNUO	30
2.5. INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CRESCIMENTO E NA SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	36
2.6. ANÁLISE DE IMAGENS – MORFOLOGIA E VIABILIDADE	38
2.7. PLANEJAMENTO FATORIAL	48
2.8. TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO LEB/DEQ/EPUSP	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1. MICRORGANISMO	59
3.2. MEIOS DE CULTIVO	59
3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO	59
3.4. ANÁLISES	61
3.4.1. Concentração celular	61
3.4.2. Concentração de glicose	62
3.4.3. Dosagem de retamicina	62
3.4.4. Caracterização morfológica	62
3.4.5. Testes de atividade biológica	63
3.4.6. Testes de viabilidade	65
3.4.6.1. <i>BacLight</i> TM	66

3.5.	TRATAMENTO DOS RESULTADOS – EQUACIONAMENTO DO BIORREATOR	67
3.6.	PLANEJAMENTO FATORIAL	70
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1.	ENSAIOS PRELIMINARES	75
4.2.	ENSAIOS PREVISTOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL	82
4.2.1.	Tratamento estatístico	91
4.2.2.	Variabilidade no ponto central	124
4.2.3.	Proposta de um modelo fenomenológico para a produção de retamicina	127
4.3.	RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	132
4.4.	RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA	135
4.4.1.	Tratamento estatístico aplicado à análise morfológica	140
4.4.1.1.	Tratamento estatístico aplicado à análise morfológica – porcentagem em área	142
4.4.1.2.	Tratamento estatístico aplicado à análise morfológica – em área média	149
4.5.	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR	156
4.5.1.	Ensaio preliminares	156
4.5.2.	Corante <i>BacLight</i> TM	158
5.	CONCLUSÕES	161
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
	ANEXO 1	178
	ANEXO 2	183

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Alguns importantes metabólitos secundários e suas aplicações (Demain, 1999).....	27
Tabela 3.1 Planejamento estatístico em dois níveis, três variáveis (2^3) e ponto central.....	72
Tabela 4.1. Ensaio preliminar.....	75
Tabela 4.2. Resultados obtidos no estado estacionário para os ensaios FC1 e FC4.....	76
Tabela 4.3. Comparação entre os valores de projeto da vazão específica de alimentação e os obtidos experimentalmente.....	82
Tabela 4.4. Concentração de glicose (g.L^{-1}) no balão de alimentação quando foi estabelecido o estado estacionário para todas as condições de cultivo.....	82
Tabela 4.5. Matriz dos ensaios, concentração celular, de retamicina, de glicose, cv para definição do estado estacionário e média, desvio padrão e cv para os ensaios no ponto central (PC1 a PC6).	83
Tabela 4.6. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração celular (unidades codificadas).....	92
Tabela 4.7. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração de retamicina (unidades codificadas).....	93
Tabela 4.8. Cálculo do resíduo ($Y = \text{resposta de interesse, } X \text{ ou Ret}$) – 6 ensaios no ponto central.....	94

Tabela 4.9. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração celular; unidades codificadas (4 ensaios no ponto central).....	98
Tabela 4.10. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração de retamicina; unidades codificadas (4 ensaios no ponto central).....	99
Tabela 4.11. Cálculo do resíduo (Y = resposta de interesse, X ou Ret) – 4 ensaios no ponto central.....	104
Tabela 4.12. Coeficientes dos fatores e interações significativos.....	106
Tabela 4.13. Concentração celular, de retamicina, de glicose, produtividades, fatores de conversão e produtividade específica para os ensaios do planejamento fatorial e ponto central, exceto PC2 e PC3.....	106
Tabela 4.14. Experimentos para avaliar a variabilidade no ponto central.....	125
Tabela 4.15. Resultados para os ensaios dos grupos 7 e 8.....	126
Tabela 4.16. Resultados para os nove ensaios no ponto central.....	126
Tabela 4.17. Comparação entre os resultados obtidos experimentalmente (Ret) em diversos ensaios e os calculados (Retc) pela equação 4.11, modelo fenomenológico.....	130
Tabela 4.18. Teste de atividade biológica: diâmetro do halo de inibição (Φ) para os ensaios previstos no planejamento fatorial.....	132

Tabela 4.19. Resumo da análise morfológica (porcentagem da área e área média expressa em μm^2 para cada classe morfológica).....	135
Tabela 4.20. Área média (expressa em μm^2), desvio padrão e coeficiente de variação para as classes morfológicas medidas por Pamboukian (2003).....	137
Tabela 4.21. Análise morfológica para os ensaios ordenados conforme execução.....	139
Tabela 4.22. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a porcentagem da área total de hifas (unidades codificadas).....	142
Tabela 4.23. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a porcentagem da área total de <i>pellets</i> (unidades codificadas).....	143
Tabela 4.24. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a porcentagem da área total de <i>clumps</i> (unidades codificadas).....	144
Tabela 4.25. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a área média das hifas (unidades codificadas).....	151
Tabela 4.26. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a área média dos <i>pellets</i> (unidades codificadas).....	152
Tabela 4.27. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a área média de <i>clumps</i> (unidades codificadas).....	153

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1. Estruturas químicas de as antraciclinas: a) daunorrubicina; b) doxorubicina (INOUE, 2006).....	28
Figura 2.2. Estrutura química das retamicinas E1 e E2 (BIEBER <i>et al.</i> , 1989)..	28
Figura 2.3. Intercalação da daunorrubicina ao DNA: a) Diagrama da intercalação; b) Vista perpendicular ao plano das bases (AUBEL-SADRON e LONDOS-GAGLIARDI, 1984).....	29
Figura 2.4. Concentração celular (▼), de glicose (■) e de L-lisina (▲), adaptado de Oh e Serenetz (1993).....	33
Figura 2.5. Plano de fases, adaptado de Oh e Serenetz (1993).....	34
Figura 2.6. Concentração celular (●), de glicose (○) e de L-lisina (▲), adaptado de Ensari e Lim (2003) para diferentes vazões específicas de alimentação: $A = 0,14 \text{ h}^{-1}$, $B = 0,209 \text{ h}^{-1}$, $C = 0,279 \text{ h}^{-1}$, $D = 0,349 \text{ h}^{-1}$, $E = 0,419 \text{ h}^{-1}$, $F = 0,279 \text{ h}^{-1}$ e $G = 0,14 \text{ h}^{-1}$. Adaptado de Ensari e Lim (2003).....	34
Figura 2.7. Planos de fases, adaptado de Ensari e Lim (2003).....	35
Figura 2.8. Correlação entre a área média dos <i>pellets</i> e do micélio e a produção máxima de tilosina obtida por Tamura <i>et al.</i> (1997).....	42
Figura 2.9. Correlação entre o comprimento médio das hifas e a produtividade de ad-7-ADCA, adaptado de Robin <i>et al.</i> (2003).....	48

Figura 2.10. Representação de alguns modelos de planejamento fatorial com 3 fatores (adaptado de BRERETON, 2005 e BOX, HUNTER e HUNTER, 2005): a) fatorial fracionado; b) fatorial completo; c) estrela; d) repetição no ponto central; e) central composto.....	49
Figura 2.11. <i>Leverages</i> e <i>outliers</i> , adaptado de Rousseeuw e Zomeren (1990).	51
Figura 2.12. <i>Dotplot</i> , adaptado de Johnson e Wichern (2002).....	52
Figura 2.13. Gráfico de probabilidade normal, adaptado de Box, Hunter e Hunter (2005).....	53
Figura 2.14. Exemplo de identificação das variáveis e interações significativas..	53
Figura 3.1 Esquema do perímetro e perímetro convexo, adaptado de Pamboukian (2003).....	64
Figura 3.2. Superfície de resposta traçada com o <i>software</i> MINITAB.....	73
Figura 3.3. Gráficos em três dimensões traçados com o <i>software</i> MINITAB: a) interpolação pelo método das distâncias; b) polinômio de Akima.	74
Figura 4.1. Correlação entre a concentração relativa de retamicina e o halo de inibição ao final dos ensaios descontínuos – teste de atividade biológica.....	76

Figura 4.2. a) *Pellet* obtido em cultivo em incubador rotativo durante teste de produção de retamicina; lâmina sem tratamento. b). *Pellet* obtido em cultivo em fermentador; lâmina sem tratamento. c). *Pellets, clumps* e hifas obtidos em cultivo em fermentador; lâmina após tratamento para análise morfológica..... 77

Figura 4.3. Fermentador ao final de um cultivo contínuo. a) Vista externa do fermentador. b) Vista interna do fermentador. c) Detalhe da extremidade do eletrodo de oxigênio dissolvido..... 78

Figura 4.4. Resultados obtidos no ensaio FC1: a) concentração celular (♦), de retamicina (■) e de glicose (▲); b) concentração de oxigênio dissolvido..... 80

Figura 4.5. Resultados obtidos no ensaio FC4: a) concentração celular (♦), de retamicina (■) e de glicose (▲); b) concentração de oxigênio dissolvido; c) vazão de ar e de O₂ ou N₂..... 81

Figura 4.6. Resultados do grupo 1: a) concentração celular (♦), de retamicina (■) e de glicose (▲); b) concentração de oxigênio dissolvido (em vermelho) e frequência de agitação (em azul)..... 85

Figura 4.7. Resultados do grupo 2: a) concentração celular (♦), de retamicina (■) e de glicose (▲); b) Concentração de oxigênio dissolvido (em vermelho) e frequência de agitação (em azul); c). Vazão de ar (em azul) e de O₂ ou N₂ (em vermelho)..... 86

Figura 4.8. Resultados do grupo 3: a) concentração celular ($\blacklozenge$), de retamicina ($\blacksquare$) e glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido (em vermelho) e frequência de agitação (em azul); c) Vazão de ar (em azul), de O_2 ou N_2 (em vermelho) e de ar + O_2 ou N_2 (em preto)..... 87

Figura 4.9. Resultados do grupo 4: a) concentração celular ($\blacklozenge$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido ($N = 500$ rpm); c) Vazão de ar (em azul) e de O_2/N_2 (em vermelho). 88

Figura 4.10. Resultados do grupo 5: a) concentração celular ($\blacklozenge$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido ($N = 500$ rpm); c) Vazão de ar (em azul), vazão de N_2 (em vermelho) e vazão de ar + N_2 (em preto)..... 89

Figura 4.11. Fase descontínua para os cinco grupos de ensaio onde (+), (x), (), (Δ) e ($\diamond$) representam os resultados para cada grupo de ensaios; ($\blacksquare$) e ($\bullet$) os valores médios para a concentração celular e de glicose: a) Concentração celular; b) velocidade específica de crescimento; c) concentração de glicose..... 90

Figura 4.12. Gráfico de probabilidade (a) e de resíduos (b) para a concentração celular..... 95

Figura 4.13. Gráfico de probabilidade(a) e de resíduos (b) para a concentração de retamicina..... 96

Figura 4.14. *Dotplot* para a concentração de retamicina em função da concentração celular para os ensaios no ponto central..... 97

- Figura 4.15. Gráfico de probabilidade (a) e de resíduos (b) para a concentração celular, eliminando-se os ensaios PC2 e PC3..... 101
- Figura 4.16. Gráfico de probabilidade (a) e de resíduos (b) para a concentração de retamicina, eliminando-se os ensaios PC2 e PC3..... 102
- Figura 4.17. Avaliação da curvatura: a) concentração celular em função de μ ; b) concentração de retamicina em função de μ ; c) concentração celular em função de N; d) concentração de retamicina em função de N; e) concentração celular em função de OD; e) concentração de retamicina em função de OD..... 103
- Figura 4.18. Resultados obtidos para os ensaios do planejamento fatorial e ponto central: a) Concentração celular, de retamicina e de glicose; b) fatores de conversão Y_x/s , Y_x/s corr e produtividade celular P_x ; c) Produtividade de retamicina e produções específicas Y_{ret}/x e Y_{ret}/s ; d) Produtividade específica P_{ret} / X 107
- Figura 4.19. Concentração celular (X) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 109
- Figura 4.20. Concentração de retamicina em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ110
- Figura 4.21. Concentração de substrato em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 111
- Figura 4.22. Fator de conversão de substrato em células (Y_x/s) em função Das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 113

- Figura 4.23. Fator de conversão de substrato em células corrigido ($Y_{x/s}$ corr, em $g.g^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas:
a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 114
- Figura 4.24. Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{ret/s}$, em $UA.g^{-1}.L$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 115
- Figura 4.25. Produtividade celular (P_x , em $g.L^{-1}.h^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ .116
- Figura 4.26. Produtividade de retamicina (P_{ret} , em $UA.h^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 117
- Figura 4.27. Produção específica ($Y_{ret/x}$, em $UA.g^{-1}.L$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ .118
- Figura 4.28. Produtividade celular (P_{ret} / X , em $UA.g^{-1}.L.h^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ 119
- Figura 4.29. Gráficos de probabilidade para a concentração celular, de retamicina e de glicose..... 120
- Figura 4.30. Gráficos de probabilidade para os fatores: a) $Y_{x/s}$, b) $Y_{x/s}$ corr e c) $Y_{ret/s}$ 121
- Figura 4.31. Gráficos de probabilidade para produtividade: a) celular (P_x) e b) de retamicina (P_{ret})..... 122

- Figura 4.32. Gráficos de probabilidade para: a) produção específica de retamicina (Y_{ret}/x) e b) produtividade específica de retamicina (P_{ret} / X).....123
- Figura 4.33. Concentração de retamicina em função das concentrações celular e de glicose para os ensaios I até VIII, PC1, PC4, PC5 e PC6..... 124
- Figura 4.34. Resultados do grupo 8: a) concentração celular, de retamicina e de glicose; b) plano de fases retamicina e concentração celular c) plano de fases retamicina e concentração de glicose..... 128
- Figura 4.35. Concentração de retamicina em função da concentração celular e de glicose para os ensaios do grupo 8, destacando-se os estados estacionários atingidos nos ensaios PC8 e PC9..... 129
- Figura 4.36. Concentração de retamicina em função da concentração celular para os nove ensaios no ponto central..... 129
- Figura 4.37. Concentração de retamicina em função das concentrações celular e de glicose para os ensaios I até VIII, PC1 até PC9..... 130
- Figura 4.38. Correlação entre os valores calculados pelo modelo fenomenológico e os obtidos experimentalmente para todos os ensaios deste projeto e os reportados por Pamboukian (2003). 131
- Figura 4.39. Concentração de retamicina em função da frequência de agitação e da velocidade específica de crescimento calculada pela equação 4.11..... 131

- Figura 4.40. Diâmetro do halo de inibição (mm) para os ensaios previstos no planejamento fatorial (o diâmetro do disco de papel foi igual a 5mm)..... 133
- Figura 4.41. Correlação entre o diâmetro do halo de inibição e a concentração de retamicina..... 133
- Figura 4.42. Diâmetro do halo de inibição (mm) para os ensaios previstos no planejamento fatorial (o diâmetro do disco de papel era de 5mm): a) ensaio **I**; b) ensaio **II**; c) ensaio **III**; d) ensaio **IV**; e) ensaio **PC2**; f) ensaio **VIII**..... 134
- Figura 4.43. Resultado da análise morfológica para os ensaios **I** até **VIII** e do ponto central (**PC1**, **PC4**, **PC5** e **PC6**) em porcentagem da área total medida e área média em μm^2 137
- Figura 4.44. Áreas mínima, média e máxima em μm^2 medidas para cada classe morfológica..... 138
- Figura 4.45. Resultados obtidos por Pamboukian (2003), identificados por CP onde $N = 500$ rpm e os obtidos nos ensaios **I** até **VIII** ($N = 300$ rpm ou 700 rpm) e no ponto central ($N = 500$ rpm)..... 141
- Figura 4.46. Gráficos de probabilidade normal para hifas, *pellets* e *clumps* em porcentagem da área total..... 146
- Figura 4.47. Correlação entre a porcentagem de cada classe morfológica e a concentração de retamicina – equação 4.15..... 147
- Figura 4.48. Concentração de retamicina em função da porcentagem em área dos aglomerados (*clumps* e *pellets*) e da velocidade

específica de crescimento.....	149
Figura 4.49. Gráficos de probabilidade normal para hifas, <i>pellets</i> e <i>clumps</i> em área média (μm^2).....	154
Figura 4.50. Concentração de retamicina (a), produtividade de retamicina (b) e produtividade específica de retamicina (c) em função da área média dos aglomerados.....	155
Figura 4.51. Teste de viabilidade celular com azul de metileno e fucsina: a) inóculo; b) inóculo esterilizado; c) produção; d) produção esterilizada.....	157
Figura 4.52. Teste de viabilidade celular com violeta de genciana: a) inóculo; b) inóculo esterilizado; c) produção; d) produção esterilizada.....	158
Figura 4.53. Análise da viabilidade celular com corante LIVE/DEAD® <i>BacLight</i> TM	160

LISTA DE SÍMBOLOS

a_i	coeficientes dos modelos estatísticos
cv	coeficiente de variação
EL	concentração de extrato de levedura na alimentação ($g.L^{-1}$)
i	número da ordem do resultado
m	número de efeitos para o cálculo de P
n	número de níveis do planejamento fatorial
nC	número de ensaios no ponto central
nF	número de ensaios previstos no planejamento fatorial
N	freqüência de agitação (rpm)
N	número de amostras
OD	concentração de oxigênio dissolvido (%)
p	número de variáveis do planejamento fatorial
P	probabilidade (%)
P_x	produtividade celular ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
P_{xc}	produtividade celular calculada por regressão linear múltipla ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
P_{ret}	produtividade de retamicina ($UA.h^{-1}$)
P_{retc}	produtiv. de retamicina calculada por regressão linear múltipla ($UA.h^{-1}$)
P_{ret} / X	produtividade específica ($UA.g^{-1}.L.h^{-1}$)
P_{ret} / X_c	produtividade específica por regressão linear múltipla ($UA.g^{-1}.L.h^{-1}$)
Ret	concentração de retamicina (UA)
$Retc$	concentração de retamicina calculada por regressão múltipla ou modelo não codificado ($g.L^{-1}$)
s	desvio padrão
S	concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$)
S_0	concentração inicial de subst. limitante no meio ou na alimentação ($g.L^{-1}$)
Sc	concentração de substrato calculada por regressão linear múltipla ($g.L^{-1}$)
SS	soma dos quadrados
TR	tempo de residência (h)
x	variável no cálculo do desvio padrão
xm	valor médio da variável x
X	concentração celular ($g.L^{-1}$)
X_0	concentração inicial de células no meio ou na alimentação ($g.L^{-1}$)
X_c	concentração celular calculada por regressão múltipla ($g.L^{-1}$)
y_{Cm}	média dos resultados obtidos nos ensaios no ponto central
y_{Fm}	média dos resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial

Yret/x	produção específica (UA.g ⁻¹ .L)
Yret/xc	produção específica calculada por regressão linear múltipla (UA.g ⁻¹ .L)
Yret/s	fator de conversão de substrato em produto (UA.g ⁻¹ .L)
Yret/sc	fator de conversão de substrato em produto calculado por regressão linear múltipla (UA.g ⁻¹ .L)
Yx/s	fator de conversão de substrato em células (g.g ⁻¹)
Yx/sc	fator de conversão de subst. em células calculado por regressão linear múltipla (g.g ⁻¹)
Yx/s corr	fator de conversão de substrato em células corrigido (g.g ⁻¹)
Yx/s corrc	fator de conversão de substrato em células corrigido calculado por regressão linear múltipla (g.g ⁻¹)
Ŷ	resposta do modelo estatístico por regressão linear múltipla

LETRAS GREGAS

α	nível de significância
ε	erro
μ	velocidade específica de crescimento (h^{-1})
μ_P	velocidade específica de formação de produto ($\text{UA. g}^{-1}.\text{L. h}^{-1}$)
Φ	diâmetro do halo de inibição (mm)

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico para designar mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Caracteriza-se pelo rápido crescimento de células anormais que ultrapassam seus limites usuais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e espalhar-se por outros órgãos (metástase). O câncer foi responsável por 7,6 milhões de mortes em 2005, 13% do total no mundo. Cerca de 40% dos casos da doença poderiam ser prevenidos com uma alimentação saudável, atividade física e não tabagismo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

As antraciclinas são antibióticos antitumorais eficazes largamente empregadas no tratamento de uma grande variedade de tumores sólidos. As primeiras antraciclinas identificadas com aplicação quimioterápica foram a daunorrubicina (daunomicina) e a doxorrubicina (adriamicina), isoladas a partir de *Streptomyces peucetius* na década de 1960 (FURLAN *et al.*, 2002). Porém estas drogas apresentam efeitos colaterais graves, em particular uma elevada cardiotoxicidade (STROHL *et al.*, 1997). A retamicina é um complexo antraciclínico produzido por *Streptomyces olindensis* com elevada atividade contra tumores sólidos com alguns resultados positivos no tratamento de leucemia (BIEBER *et al.*, 1989).

Actinomicetos são um grupo de bactérias que, em seu crescimento, formam redes de filamentos ramificados. O gênero *Streptomyces* é constituído por bactérias filamentosas, Gram-positivas, encontradas no solo, sendo uma de suas características mais importante a produção de antibióticos. O cultivo de microrganismos filamentosos em fermentação submersa é largamente empregado pela indústria para a produção de princípios ativos farmacêuticos e diversos metabólitos secundários, como por exemplo, antibióticos e antitumorais.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (LEB/DEQ/EPUSP) possui grande experiência no cultivo de microrganismos filamentosos, destacando-se trabalhos conduzidos com *Aspergillus* durante cerca de vinte anos (FACCIOTTI, 1986; SCHMIDELL, 1986). Mais recentemente, de 1998 a 2001, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Cândida Reginato Facciotti, foi desenvolvido o projeto intitulado “Estudo do Processo de

Produção de Antibióticos Antitumorais em Biorreatores por Linhagens Melhoradas Geneticamente” (Projeto aprovado no PADCT-III – Subprograma de Biotecnologia sob número 62.0439/98.0). Participaram deste projeto, além do LEB/DEQ/EPUSP, o Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP), o Laboratório de Simulação e Controle de Processos (LSCP) do DEQ/USP e o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química da USP (IQUSP). Resultaram deste projeto várias dissertações de Mestrado e teses de Doutorado, conforme será detalhado no item 2.8.

Este projeto de Doutorado teve por objetivo analisar a influência da frequência de agitação, da concentração de oxigênio dissolvido e da velocidade específica de crescimento simultaneamente sobre a produção de retamicina utilizando planejamento fatorial de experimentos, além de caracterizar e tentar correlacionar a produção deste antitumoral com a morfologia do microrganismo, a atividade biológica e avaliar a viabilidade celular, aspectos que não foram abordados nos trabalhos anteriores desenvolvidos no LEB/DEQ/EPUSP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *STREPTOMYCES*

O gênero *Streptomyces* pertence à ordem dos actinomicetos, bactérias filamentosas. São Gram-positivas e encontradas na natureza em diversos locais, principalmente no solo. Uma das características deste gênero é o elevado conteúdo de guanina e citosina em seu DNA (69% a 78%). As melhores condições de crescimento para a maioria das espécies são de pH entre 6,8 e 7,5 e temperaturas entre 22°C e 37°C, sendo estritamente aeróbias (LANCINI e LORENZETTI, 1993).

Do ponto de vista nutricional, são versáteis, utilizando diversas fontes de carbono como açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, etc. A maioria dos microrganismos isolados produz enzimas hidrolíticas extracelulares que permitem o metabolismo de amido, celulose, hemicelulose e, em alguns casos, borracha. (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2000). Suas necessidades incluem uma fonte de carbono, uma de nitrogênio inorgânico e alguns sais minerais para o crescimento. O complemento com extrato de levedura, de malte ou outra fonte de nitrogênio orgânico permite o crescimento mais acelerado. Elementos traço normalmente encontrados em água destilada normalmente são o suficiente, porém a adição de ferro, manganês, zinco e outros íons pode ser benéfica (LANCINI e LORENZETTI, 1993).

Streptomyces são produtores de uma grande variedade de metabólitos secundários (item 2.3) de interesse comercial como antibióticos e antitumorais. O mercado mundial de agentes anti-infecciosos foi avaliado em US\$ 23 bilhões por ano por Strohl (1997) e em US\$ 28 bilhões por ano por Wezel *et al.* (2006), sendo grande parte produzida por *Streptomyces*. A exploração comercial de microrganismos filamentosos continua crescendo em resposta à necessidade de desenvolvimento de novas drogas. Cerca de 55% dos 12.000 antibióticos conhecidos até 1995 eram produzidos por *Streptomyces* e as grandes empresas multinacionais têm investido na descoberta e produção destes metabólitos secundários (DEMAIN, 1999). Apresenta-se de forma resumida na tabela 2.1 uma relação dos mais importantes metabólitos secundários, ou seus derivados, com a sua respectiva utilização.

Tabela 2.1. Alguns importantes metabólitos secundários e suas aplicações (Demain, 1999).

Metabólito	Uso
Anfotericina B	Antifúngico
Ampicilina	Antibiótico semi-sintético
Benzilpenicilina	Antibiótico
Cefalexina	Antibiótico semi-sintético
Ciclosporina A	Imunosupressor
Daunorubicina HCl	Antitumoral
Doxorubicina	Antitumoral
Gentamicina Sulfato	Antibiótico
Mitomicina C	Antitumoral
Paclitaxel	Antitumoral
Tetraciclina HCl	Antibiótico
Vancomicina HCl	Antibiótico

2.2. RETAMICINA

A retamicina é um complexo antibiótico antitumoral da classe das antraciclinas, Bieber *et al* (1989) produzido pela bactéria filamentosa *Streptomyces olindensis* ICB20, conforme descrito por Furlan (2002). Sua vantagem potencial é apresentar menor efeito colateral que outras antraciclinas. Sua estrutura molecular difere da de outras antraciclinas conforme mostram as figuras 2.1 e 2.2.

A ação antitumoral das antraciclinas deve-se à intercalação ao DNA, conforme ilustra a figura 2.3 para a daunorrubicina, sendo sua ação citotóxica devido também à interação na condensação do DNA, à inibição da atividade da enzima topoisomerase II e à produção de radicais livres que danificam o DNA como consequência de suas propriedades redutoras (BRAÑA, 2001).

Figura 2.1: Estruturas químicas de duas antraciclina: a) daunorrubicina; b) doxorubicina (INOUE, 2006)

Figura 2.2. Estrutura química das retamicinas E1 e E2 (BIEBER *et al.*, 1989)

Figura 2.3. Intercalação da daunorrubicina ao DNA: a) Diagrama da intercalação; b) Vista perpendicular ao plano das bases. (AUBEL-SADRON e LONDOS-GAGLIARDI, 1984).

2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS - ANTIBIÓTICOS

Metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, os antibióticos são usados há décadas, sendo diversas as hipóteses sobre a origem destas substâncias. Martin e Demain (1980) descrevem como metabolismo primário aquele que produz intermediários e energia para síntese de macromoléculas como os ácidos nucleicos DNA, RNA, proteínas, lipídeos e polissacarídeos e é comum a todos os seres vivos. Já os metabólitos secundários, também chamados de idiólitos (*idiolites*), são produzidos por algumas espécies de um determinado gênero. Estas substâncias não são essenciais para o crescimento, mas provavelmente possuem alguma função na sobrevivência do microrganismo.

Tabarez (2005) observa que uma das hipóteses mais aceitas é aquela segundo a qual o uso de antibióticos por seus produtores contra seus competidores aumenta sua capacidade de sobrevivência, apesar do papel destes compostos na interação microrganismo-microrganismo não ter sido totalmente elucidado.

A síntese dos antibióticos é fortemente influenciada pela velocidade específica de crescimento do microrganismo, sendo maior quando esta é baixa em relação à velocidade específica máxima de crescimento nas mesmas condições. Uma maior produção de antibióticos em cultivos descontínuos em meio rico ocorre apenas quando não há mais crescimento celular (MARTIN e DEMAINE, 1980). Para fermentadores operados em contínuo sem reciclo de células, maiores produtividades são obtidas em baixas vazões específicas de alimentação.

2.4. CULTIVOS EM PROCESSO CONTÍNUO

O processo de fermentação contínua se caracteriza por possuir uma única alimentação contínua de meio isento de células e uma única retirada de meio fermentado do biorreator, podendo haver reciclo de células e/ou incluir um mecanismo de concentração de células ou retirada de produto.

Facciotti (2001) menciona que o processo contínuo apresenta vantagens como o aumento da produtividade (redução dos tempos mortos), a obtenção de produto

uniforme, a manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, a possibilidade de associação com outras operações contínuas, a maior facilidade de controle e menor necessidade de mão-de-obra. Porém destacam-se como dificuldades o maior investimento inicial na planta, a possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas, o maior risco de contaminação, a dificuldade em manter-se a homogeneidade do reator (microrganismos filamentosos, por exemplo) e dificuldades operacionais, como formação de espuma e problemas nos sistemas de alimentação de meio e/ou retirada do caldo fermentado.

O cultivo contínuo parte de um cultivo em batelada. A partir do instante em que se inicia a alimentação de meio e retirada do caldo o processo é dito contínuo. Este processo caracteriza-se por atingir um estado estacionário, sendo as variáveis de estado (concentração celular, de substrato e de produto) constantes. Para tal é fundamental a manutenção de um volume constante no fermentador, o que exige que as vazões de alimentação e retirada sejam as mesmas.

Não há um critério geral para afirmar-se que o estado estacionário foi atingido. Pirt e Righelato (1967) estudaram a produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum*. Os autores assumiram que o estado estacionário foi atingido quando amostras coletadas pelo menos a cada dois tempos de residência (razão entre o volume útil do reator e a vazão de alimentação) não apresentaram “uma tendência” nos parâmetros observados.

Paredes-López, Camargo-Rubio e Ornelas-Vale (1976) assumiram que o estado estacionário em cultivos de *Candida utilis* foi atingido depois de efetuadas diversas medidas da densidade óptica com resultados similares, o que exigiu a alimentação de duas a quatro vezes o volume útil do reator.

Møller et al. (2002) adotaram cinco tempos de residência para cultivos nos quais a vazão específica de alimentação (D) foi inferior a $0,30 \text{ h}^{-1}$ e vinte tempos de residência para cultivos onde $D > 0,30 \text{ h}^{-1}$, como critério para o estabelecimento do estado estacionário em cultivos de *Saccharomyces kluyveri*.

Harrison e Topiwala (1974) estudaram o efeito de alterações de algumas variáveis de processo sobre o estado estacionário. Os autores discutiram a teoria do comportamento dinâmico de sistemas contínuos para determinar se o estado

estacionário foi alcançado ou “caracterizado por oscilações estáveis”. Eles concluíram haver apenas um estado estacionário estável para uma determinada condição de processo. Exemplos sobre a influência de perturbações no sistema como mudança na vazão específica de alimentação, na concentração do substrato na alimentação, na troca de substrato limitante (xilose por glicose), na temperatura ou na concentração de oxigênio dissolvido foram descritos. Observou-se uma fase de transição, cuja duração é normalmente maior quanto maior for a magnitude da perturbação, durante a qual haveria uma adaptação do microrganismo à nova condição, após a qual um novo estado estacionário era estabelecido.

O’Neil e Liberatus (1990) estudaram a modelagem dinâmica de cultivos contínuos de *Saccharomyces cerevisiae*. Eles também observaram que quando há uma alteração no sistema, como na vazão específica de alimentação ou na concentração de substrato limitante, a velocidade específica de crescimento não respondia imediatamente. Portanto, um novo estado estacionário não era atingido imediatamente.

Patarinska, Dochain, Agathos e Ganovski (2000) propuseram o uso de modelos matemáticos que consideraram a “memória” durante a fase de transição em cultivos com alteração do estado estacionário, porém, apenas um estado estacionário era estabelecido para cada condição.

Oh e Sernetz (1993) pesquisaram a influência do tempo de troca de um volume (*turnover characteristics*) em cultivo contínuo de *Corynebacterium glutamicum* para produção de L-lisina. Foram estipulados três a quatro tempos de residência como necessários para atingir-se o estado estacionário. Para avaliar o estado de transição foi realizado um experimento em contínuo com uma primeira condição de $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ seguida por outra onde $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$ e retorno à condição de $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, conforme mostrado na figura 2.4. Há variações nas concentrações celular, de glicose e de lisina a cada alteração de D , porém o sistema atinge um estado estacionário. Observa-se que estas concentrações no estado estacionário independem da condição de cultivo anterior (figura 2.5), isto é, foram obtidas as mesmas concentrações em estado estacionário para os ensaios com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Ensari e Lim (2003) determinaram que o estado estacionário foi estabelecido quando a composição do gás de saída do bioreator, a concentração de oxigênio

dissolvido e a densidade óptica apresentaram uma variação dentro de seus respectivos desvios-padrão por “poucos” tempos de residência. Em um ensaio com diversas condições de D ($0,14 \text{ h}^{-1}$, $0,209 \text{ h}^{-1}$, $0,279 \text{ h}^{-1}$, $0,349 \text{ h}^{-1}$, $0,416 \text{ h}^{-1}$, $0,279 \text{ h}^{-1}$ e $0,14 \text{ h}^{-1}$) os autores obtiveram apenas um estado estacionário para cada condição, conforme indicado na figura 2.6. O plano de fases (figura 2.7) foi construído a partir dos dados da figura 2.6. Portanto, o estado estacionário independente da condição de cultivo anterior.

Figura 2.4. Concentração celular (∇), de glicose ($\blacksquare$) e de L-lisina ($\blacktriangle$), adaptado de Oh e Serenetz (1993).

Figura 2.5. Plano de fases, adaptado de Oh e Serenetz (1993).

Figura 2.6. Concentração celular (●), de glicose (○) e de L-lisina (▲), adaptado de Ensari e Lim (2003) para diferentes vazões específicas de alimentação: A = $0,14 \text{ h}^{-1}$, B = $0,209 \text{ h}^{-1}$, C = $0,279 \text{ h}^{-1}$, D = $0,349 \text{ h}^{-1}$, E = $0,419 \text{ h}^{-1}$, F = $0,279 \text{ h}^{-1}$ e G = $0,14 \text{ h}^{-1}$. Adaptado de Ensari e Lim (2003).

Figura 2.7. Planos de fases, adaptado de Ensari e Lim (2003).

2.5. INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CRESCIMENTO CELULAR NA SÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A fermentação submersa de microrganismos filamentosos apresenta grandes desafios. A morfologia destes microrganismos é complexa, sendo influenciada pelas condições de aeração e agitação, pela composição do meio de cultivo, por outras variáveis de processo tais como temperatura, pH e também pelo regime de operação do biorreator (processo descontínuo, descontínuo-alimentado ou contínuo).

A influência das condições de agitação e aeração sobre o crescimento celular e a síntese de metabólitos secundários de interesse é analisada por diversos autores. As técnicas mais comuns para minimizar o risco de suprimento deficiente de oxigênio são o aumento da vazão de aeração, o aumento da frequência de agitação e o aumento da pressão parcial de oxigênio no ar (enriquecimento do ar com oxigênio, ou mesmo o uso de oxigênio puro). Estas técnicas podem usadas isoladamente ou em conjunto. O aumento da frequência de agitação é particularmente importante no cultivo de microrganismos filamentosos. As altas velocidades geram um grande cisalhamento, alterando sua morfologia. Esta mudança, isto é, sua consequência sobre a produtividade de biomassa e de metabólitos secundários, tem sido objeto de interesse de diversos pesquisadores.

Maxon (1959) pesquisou a influência do tamanho da turbina e da frequência de agitação sobre a produção de novobiocina, avaliando sua importância sobre a transferência de oxigênio em cultivos descontínuos de *Streptomyces niveus* em reator de 20L. Foram testadas turbinas com diâmetros iguais a 29%, 39% e 49% do diâmetro interno do reator. A produção do antibiótico foi melhor para uma potência de 0,50hp/100gal para os dois menores *impellers*. Os autores concluíram que a concentração de oxigênio dissolvido influencia o processo, mas colocam em dúvida a correção da medida de oxigênio dissolvido (problema com o eletrodo).

Virgilio, Marcelli e Agrimino (1964) acrescentaram a variação da vazão de aeração como parâmetro a ser estudado sobre a produção de rifamicina por *Streptomyces mediterranei* em cultivos em batelada. Melhores rendimentos foram obtidos quando a transferência de oxigênio para o meio foi suficiente para suprir uma demanda (OUR =

oxygen uptake rate) de até 130 mL O₂/100 mL meio/h no final da fase de crescimento celular, considerada crítica para a produção de rifamicina.

Chen e Wilde (1991) estudaram o efeito da concentração de oxigênio dissolvido e da aeração na produção de tilosina por *Streptomyces fradiae* durante a fase de produção. Melhor rendimento foi obtido quando a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em 100% da concentração de saturação, sendo os rendimentos inferiores quando esta foi mantida em 25%.

Kempf, Theobald e Fiedler (1997) concluíram que um suprimento baixo de oxigênio no processo de produção de galidermina por *Staphylococcus gallinarum* reduziu a formação de biomassa em 65%, quando comparada à obtida em condições ótimas de fornecimento de oxigênio.

Shioya *et al.* (1999) buscaram otimizar as condições de agitação e aeração para maximizar a produção de virginiamicina por *Streptomyces virginiae*. A principal estratégia para manter a concentração de oxigênio dissolvido em 80% da saturação, considerada ótima, foi aumentar a frequência de agitação (mínima de 450 rpm; máxima de 1000 rpm) e enriquecer a concentração de oxigênio do ar com oxigênio puro, quando necessário. Houve um aumento importante da produtividade; os autores observaram uma menor velocidade específica de crescimento quando a frequência de agitação foi aumentada.

Ensari e Lim (2003) estudaram a influência da vazão de aeração (F_g), da frequência de agitação (N), da concentração de oxigênio dissolvido (OD) e da velocidade específica de crescimento (μ) sobre a produção de L-lisina em cultivos contínuos. Foram utilizados dois reatores de 2L, um com 500mL de volume útil e outro com 2L de volume útil, este último para os cultivos com controle da concentração de oxigênio dissolvido variando-se a frequência de agitação. A estratégia adotada foi de variar um fator de cada vez, mantendo os demais constantes. Para avaliar a influência da aeração foram mantidas constantes a agitação ($N = 600\text{rpm}$) e a velocidade específica de crescimento ($\mu = D = 0,209\text{ h}^{-1}$). A aeração foi controlada em 1 v.v.m, 2 v.v.m ou 3 v.v.m. A produção específica de L-lisina diminuiu com o aumento da aeração; a OD foi de 15%, 28% e 41%, para cada condição de aeração, respectivamente. Não houve influência sobre as concentrações celular e de substrato.

Para avaliar a influência da agitação foram mantidas constantes a vazão de ar ($F_g = 1$ v.v.m), $\mu = D = 0,209 \text{ h}^{-1}$ e N foi controlada em 400, 600 ou 800 rpm. As concentrações celular e de substrato aumentaram com o aumento da agitação e a concentração de L-lisina diminuiu. Os autores observaram que houve maior influência da agitação sobre o processo, em relação à vazão de aeração. Para avaliar a influência da concentração de oxigênio dissolvido, mantida em 15%, 30%, 50% ou 70% da concentração de saturação, foram mantidas constantes a aeração em 1 v.v.m e $\mu = D = 0,209 \text{ h}^{-1}$. A agitação variou de 400 a 800 rpm (controle da OD). A produção específica de L-lisina cresceu até OD=30%, bem como o consumo específico de glicose. A influência da velocidade específica de crescimento, mantida em c.a. $0,11 \text{ h}^{-1}$, $0,2 \text{ h}^{-1}$ ou $0,42 \text{ h}^{-1}$, foi avaliada para a condição de $F_g = 1$ v.v.m e OD = 50%. A produtividade específica e o consumo específico de glicose cresceram com o aumento de μ . A estratégia adotada levou à realização de 13 ensaios para avaliar a influência de quatro fatores. É importante observar que a opção de controlar a concentração de oxigênio dissolvido variando-se a agitação pode “misturar” suas influências. Um planejamento fatorial em dois níveis com repetições no ponto central permitiria avaliar não apenas a influência de cada fator, mas também suas interações, conforme será mostrado no item 2.7.

2.6. ANÁLISE DE IMAGENS – MORFOLOGIA E VIABILIDADE

O uso da técnica de análise de imagens de caldos fermentados contendo microrganismos filamentosos, inicia-se com a retirada de uma amostra e seu preparo (diluição e agitação para dispersão do micélio, dos *pellets* e dos esporos), com posterior tingimento com um corante adequado para aumentar o contraste. As lâminas devem ser preparadas de modo a evitar-se a presença de sujeira ou bolhas de gás. Tanto o *hardware* como o *software* são fundamentais neste tipo de análise. O *hardware* de um típico sistema de análise de imagens é constituído de: (a) uma fonte primária de imagem, como um microscópio, (b) um aparelho para aquisição da imagem, como um *scanner* ou uma câmera digital, (c) controles de luz e foco e (d) um sistema de processamento de imagens, como um computador pessoal ou uma estação de trabalho (*work station*). O *software* é o cérebro do sistema, controle do *hardware*. São passos

envolvidos na análise de imagens a sua aquisição, processamento (escala de cinza), detecção do objeto, processamento binário, edição da imagem, medições, cálculos e análise dos dados.

Packer e Thomas (1990) estudaram o cultivo de *Streptomyces clavuligerus* e de duas linhagens de *Penicillium chrysogenum* com o objetivo de analisar sua morfologia, dividida entre filamentos livres e *clumps*. As amostras de *Streptomyces* foram diluídas 400 vezes com água destilada e as de *Penicillium* misturadas em igual volume a uma solução de formaldeído/ácido acético glacial/ etanol e em seguida diluídas 20 vezes. As amostras foram coradas com lactofenol Tritan azul e 0,5 mL transferidos para a lâmina para análise. As análises foram feitas com um analisador Magiscan 2A (Joyce Leobl Ltd, Reino Unido) acoplado a um microscópio Nikon Optiphot (Nikon, Reino Unido). Não houve uma discussão sobre uma possível relação entre morfologia e produtividade. Porém, foi observada uma predominância de *clumps* (70-90%) nos cultivos de *Penicillium*. Os autores observaram ainda que houve influência da diluição da amostra de *Streptomyces* sobre a porcentagem de *clumps* medida (cerca de 90% para diluições de 20, 40 e 80 vezes e 50 a 70% para diluições de 160, 320, 640 e 1280 vezes). Este fato foi atribuído à fragilidade dos *clumps*, que desagregaram com a diluição.

Belmar-Beiny e Thomas (1991) variaram a frequência de agitação (490, 990 e 1300 rpm) em cultivos submersos descontínuos de *Streptomyces clavuligerus*. Seus objetivos eram avaliar a sua influência sobre a morfologia do microrganismo e a produção de ácido clavulânico. Os autores concluíram que houve uma aceleração na velocidade de fragmentação das hifas com o aumento da frequência de agitação. Contudo, as mudanças morfológicas não influenciaram a produção do ácido clavulânico. Importante observar que a concentração de oxigênio dissolvido permaneceu acima de 60% da concentração de saturação em todos os cultivos.

Wiebe e Trinci (1991) investigaram a influência de diferentes vazões específicas de alimentação (D) sobre a morfologia de *Fusarium graminearum* linhagens A3/5 e C106 em cultivos contínuos. As determinações morfológicas foram feitas com auxílio de um sistema composto por um módulo gráfico (MeasureMouse Graphics System – Analytical Measuring Systems, Pamisford, Cambridge, England) instalado em um

microcomputador acoplado a um microscópio Nikon e uma câmera de vídeo Panasonic modelo WV-CD 20. Observou-se para ambas linhagens uma redução na concentração de fragmentos com o aumento de D , em concordância com outros trabalhos mencionados pelos autores. O comprimento da unidade de crescimento de hifas aumentou com a elevação da vazão específica de alimentação para a linhagem A3/5. O oposto foi observado para a outra linhagem, sendo desconhecida a razão para esta diferença.

Cox e Thomas (1992) estudaram a classificação e medida de *pellets* formados por *Aspergillus niger*. *Pellets* com diâmetro externo inferior a 600 μm foram examinados com auxílio de um microscópio Polyvar (Reichert Jung Optische Werke AG, Austria); as imagens foram capturadas com uma câmera colorida modelo XC-007 CCD (Sony), processadas e analisadas em um analisador Quantimet 570 (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK). *Pellets* de maior diâmetro foram analisados usando-se ampliação de visão (*macro-viewer*), quando sem truncamento.

Yang *et al.* (1996) propuseram uma classificação morfológica para *Streptomyces virginiae* cultivado em batelada, dividida em filamentos livres (hifas), filamentos aglomerados (*clumps*) e *pellets* com base no maior eixo oval (MEO) dentre seis parâmetros morfológicos medidos (área, diâmetro máximo, circularidade – ou esfericidade, diâmetro equivalente, tamanho e MEO). Os cultivos foram realizados em reator de 5L (KMJ-5A, Mitsuwa Co., Osaka, Japão) com 1,5 L de volume útil. As imagens foram adquiridas e analisadas com o uso de um analisador Spectrum II (Mitani Co., Fukui, Japão) acoplado a um microscópio Optiphot-2 (Nikon, Tokyo, Japão). Dois ensaios com diferentes estratégias de controle da concentração de oxigênio dissolvido foram realizados. No primeiro houve adição de O_2 puro ao ar de entrada e no segundo foi variada a frequência de agitação. Os autores concluíram não haver uma relação clara entre a morfologia e a produção de virginiamicina, pois observou-se diferença significativa na morfologia nestes dois experimentos sem diferença na síntese do produto (dados não publicados).

Jüsten *et al.* (1996) estudaram a influência do tipo de agitador e da intensidade de agitação sobre a morfologia de *Penicillium chrysogenum*. Amostras de um cultivo contínuo ($D = 0,05 \text{ h}^{-1}$) em reator de 15 L com 10 L de volume útil foram diluídas para

reduzir a concentração celular de $6,2 \text{ g.L}^{-1}$ para aproximadamente 2 g.L^{-1} . As amostras eram transferidas para um vaso agitado com 1,4 L de volume útil e submetidas a diferentes condições de agitação por 30 min. A duração do teste foi limitada a 30 min. para minimizar a influência da falta de alimentação e de aeração sobre o microorganismo. Os autores observaram uma pequena porcentagem de hifas no início, apenas 6,7% da biomassa, com pequenas variações em seu comprimento. Avaliando os efeitos da agitação sobre os *clumps*, eles concluíram que a quebra dos *clumps* foi provocada pela agitação e não um simples processo de desaglomeração (*disentanglement*). Não foi proposta nenhuma correlação, pois os testes foram conduzidos fora do fermentador.

Tamura *et al.* (1997) adotaram um critério baseado na área e perímetro convexo para a classificação morfológica em um cultivo descontínuo de *Streptomyces fradie* produzindo tilosina. O critério para classificação dos *clumps* (*entangled filament*) foi que a relação entre a área do objeto (M_a) e o quadrado de seu perímetro convexo (M_p^2) deveria ser maior ou igual a 0,014 e o perímetro convexo (M_p) maior ou igual a $420 \mu\text{m}$. Para hifas (filamentos), o critério foi $M_a/M_p^2 \geq 0,014$ e $M_p < 420 \mu\text{m}$. Os *pellets* foram classificados pela aparência (*pellet core*). Os autores obtiveram uma porcentagem de *pellets* praticamente nula para frequência de agitação igual a 900 rpm. A área média dos *pellets* foi de aproximadamente $1.000 \mu\text{m}^2$ para frequências de agitação superiores a 550 rpm e de aproximadamente $110.000 \mu\text{m}^2$ quando a frequência de agitação foi de 250 rpm. Os autores propuseram uma correlação entre a concentração de tilosina e as áreas médias dos *pellets* e do micélio, conforme figura 2.8.

Figura 2.8. Correlação entre a área média dos *pellets* e do micélio e a produção máxima de tilosina obtida por Tamura *et al.* (1997).

Drouin *et al.* (1997) estudaram a ocorrência de zonas vazias, número de septos e espessura do micélio em cultivo de *Streptomyces ambofaciens*. O desenvolvimento de um procedimento de tingimento e análise de imagens permitiu a observação e quantificação dos fenômenos envolvidos na diferenciação celular do microrganismo em cultivo submerso. Uma câmera CCD com integração controlada (Cohu, San Diego, USA) foi acoplada a um microscópio DMRB de fluorescência (Leica, Wetzlar, Germany). O sistema era controlado via computador pessoal – CYCLOPE Card (Digital Vision Technologie, Toulouse, France). Os algoritmos para análise de imagens foram desenvolvidos em uma estação de trabalho Sparc LX com uso do software VisiologTM (Noesis, Vélizy, France).

Cui *et al.* (1998) estudaram o efeito da concentração de oxigênio dissolvido e Cui *et al.* (1997) o de forças mecânicas sobre a morfologia de *Aspergillus awamori* em cultivo submerso. Eles afirmaram que, até aquela data, apenas alguns efeitos qualitativos da influência da tensão de oxigênio dissolvido sobre a morfologia de fungos era encontrada na literatura. Porém, como alguns dados eram contraditórios, nenhuma

conclusão era possível. Também observaram que os efeitos isolados das forças mecânicas (cisalhamento) sobre a morfologia dos fungos em fermentação submersa haviam sido pouco estudados. Sabe-se que o aumento da frequência de agitação também altera a concentração de oxigênio dissolvido. Desta forma, os autores realizaram sete cultivos descontínuos em paralelo (com o mesmo inóculo), mantendo constante a frequência de agitação (600 rpm). A concentração de oxigênio no ar foi alterada para cada cultivo pela adição de oxigênio ou nitrogênio puros (porcentagem volumétrica de oxigênio no ar de entrada de 4%, 10%, 10%, 20%, 40%, 60% e 80%). Não foi possível controlar a concentração de oxigênio dissolvido. Os autores concluíram que o efeito mecânico (cisalhamento) teve maior influência sobre a morfologia, mantendo-se a concentração de oxigênio dissolvido entre 5% e 330% da concentração de saturação, concentração esta obtida pela saturação do meio de cultivo com ar puro, isto é, sem enriquecimento ou empobrecimento do mesmo com oxigênio ou nitrogênio, respectivamente.

Para Cox *et al.* (1998) a análise de imagens deveria tornar-se rotineira nos estudos de fermentação submersa de fungos filamentosos, por permitir uma boa avaliação e medida (caracterização quantitativa do tamanho e forma) das estruturas observadas em imagens eletrônicas. Este artigo de 1998 é uma revisão do “estado da arte” e discute novas técnicas e aplicações.

Pons *et al.* (1998) observaram o crescente uso de análise de imagens para a caracterização morfológica de microrganismos e o uso de corantes para auxiliar a quantificar a influência da fisiologia em fungos filamentosos. O potencial de utilização da combinação destas técnicas é confirmado em cultivos descontínuos de *Streptomyces ambofaciens*, utilizando-se três diferentes procedimentos de coloração (tingimento). Iodeto de propídio (Sigma, Saint-Louis, USA) foi empregado para monitorar a espessura e septação das hifas, CGV (*Carbol Gential Violet* – RAL, Paris, France) para monitorar a secreção de componentes intra-celulares pela membrana e INT {[2(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-(fenil-tetrazolio cloreto)], Sigma, saint-Louis, USA)} para o monitoramento da respiração.

Cox e Thomas (1999) estudaram o uso de “Mag Fura” (sal tetra potássio) para identificar partes de fungos filamentosos cujas membranas celulares estão ativas. A

técnica foi testada em quatro fungos filamentosos e três leveduras. Os resultados obtidos mostraram que o corante pode ser usado para identificar regiões ativas em fungos filamentosos, sendo seu uso não recomendado para outros microrganismos.

Sebastine *et al.* (1999) desenvolveram um procedimento para caracterização da viabilidade de *Streptomyces clavuligerus* usando análise de imagens. O objetivo foi avaliar a influência da fisiologia – sua diferenciação – do microrganismo nos processos fermentativos e sua ligação com a produtividade e morfologia. Diferenciação deve ser entendida como uma série de mudanças bioquímicas e estruturais na fisiologia do microrganismo. Estas mudanças podem ser decorrentes da não homogeneidade da biomassa. *BacLight*TM (Molecular Probes Inc., Oregon, USA) foi o corante utilizado por permitir um ensaio em duas cores da viabilidade celular. *BacLight*TM é composto por dois corantes; SYTO9 (que penetra as células cujas membranas estão ou não intactas, resultando em uma cor verde) e iodeto de propídio (que penetra apenas células cujas membranas foram danificadas – cor vermelha). O analisador de imagens utilizado foi Quantimet 570 (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK) conectado a uma câmera colorida 3CCD Sony modelo XC-003P (Sony, Japan) montada em um microscópio defluorescência Polyvar (Reichert-Jung, Wien, Austria). Os procedimentos para aquisição de imagens estão descritos em outro trabalho (Paul e Thomas, 1998). Foi possível quantificar, em cultivos em batelada, uma redução de viabilidade do micélio para 64% do total durante a fase de rápido crescimento. A viabilidade cresceu para aproximadamente 75% após um período de fragmentação e atingiu 93% ao fim do processo. Estes resultados permitiram vislumbrar a utilização desta técnica para investigar a relação entre viabilidade e produtividade, possivelmente levando ao desenvolvimento de um modelo matemático estruturado.

Wogwicharn *et al.* (1999) também avaliaram o efeito do oxigênio sobre a morfologia, o crescimento e produção de uma proteína em cultivos contínuos de *Aspergillus niger* B1-D, microrganismo geneticamente modificado. A frequência de agitação foi mantida em 500 rpm e a aeração em 1,0 v.v.m., sem controle da concentração de oxigênio dissolvido. Após ser atingido o estado estacionário, quatro níveis de enriquecimento do ar com oxigênio puro foram estudados, 0% (controle), 10%, 30% e 50% (todos em v/v – isto é, 10% significa uma mistura volumétrica de 10%

de oxigênio puro e 90% de ar). As características morfológicas foram examinadas utilizando-se um sistema de análise de imagens Seescan (Seescan plc, Cambridge, UK), um microscópio Nikon Optiphot-2 e uma câmera Sony CCD modelo XC-77CE. Os autores observaram uma diferente estratégia de crescimento, resultando em mudanças na morfologia e fisiologia, em função da concentração de oxigênio dissolvido. A produção de um pigmento e de hifas de grande aderência foi observada quando o enriquecimento do ar com oxigênio puro foi maior.

Pinto *et al.* (2001) realizaram cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em escala piloto de 500 L de volume operado em descontínuo alimentado com o objetivo de analisar sua morfologia e viabilidade. A classificação morfológica foi dividida em *pellets* ou hifas dispersas. As imagens foram adquiridas com um microscópio Olympus CX40 (Olympus, Alemanha) com uma câmera colorida COHU (COHU, EUA) acoplada e tratadas com uma placa de aquisição de imagens Matrox Meteor e *software* Inspector 2.1 (Matrox, Canadá). As análises de viabilidade foram feitas com corante L-7021 LIVE/DEAD® *BacLight*TM (Molecular Probes, EUA) com um módulo de fluorescência BX-FLA (Olympus, Alemanha) acoplado ao microscópio. Foram realizadas quatro fermentações com inóculo cultivado durante 24h (final da fase exponencial de crescimento) e quatro com inóculo cultivado durante 48h (fase estacionária). Os autores observaram pouca reprodutibilidade dos resultados, apesar dos cultivos terem sido conduzidos de forma idêntica. Parte do problema foi atribuída à variabilidade do inóculo, observando ser esta normal em um processo biológico complexo como este. Os autores não apresentaram a proporção de cada classe morfológica ao longo do cultivo, encerrando o texto com a perspectiva de estabelecer uma correlação entre morfologia e produtividade.

Roubos *et al.* (2001) observaram a influência da potência por unidade de volume – kW/m^3 (variando a frequência de agitação) sobre a lise celular em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Um modelo matemático foi proposto. Os resultados obtidos revelam a ocorrência significativa de lise celular, mesmo em baixas potências - valores entre 1,1 e 2,0 kW/m^3 (há influência do meio de cultivo), em biorreator com volume de 42 L e múltiplas turbinas Rushton, não

se podendo negligenciar a influência da operação do biorreator (descontínuo, descontínuo-alimentado ou contínuo) na morfologia do microrganismo.

Hassan *et al.* (2002) utilizaram diacetato de fluoresceína e alaranjado de acridina para avaliar a viabilidade celular em cultivos de *Trichoderma harzianum*, correlacionando a porcentagem de células viáveis com a velocidade específica de crescimento.

Robin *et al.* (2003) realizaram cultivos de *Penicillium chrysogenum* modificado geneticamente para expressar o gene da enzima expandase de *Streptomyces clavuligerus*. As fermentações foram conduzidas a 25°C, 500 rpm, 1 v.v.m. e diferentes vazões específicas de alimentação ($0,015 \text{ h}^{-1} \leq D \leq 0,10 \text{ h}^{-1}$). Amostras para análise de imagens foram diluídas, com adição do corante lactofenol, para uma concentração celular de aproximadamente $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Foram analisadas 100 hifas para cada amostra. As imagens foram obtidas com um microscópio de fluorescência Opiphot 2 (Nikon) acoplado a uma câmera monocromática Kappa CF-8/1 FMC (Kappa Messtechnik) e processadas com uso do *software* Image Pro Plus. O estado estacionário foi, a princípio, assumido quando concentrações estáveis do produto, ácido adipol-7-aminodeacetoxicefalospoânico (ad-7-ADCA), de biomassa, de adipato e de glicose residual fossem atingidas, decorridos 3 ou 4 tempos de residência. O estado estacionário para a análise morfológica foi definido com base no comprimento médio das hifas e no número de ramificações após alguns tempos de residência (3,5 tempos de residência para $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$, por exemplo). Os autores não mencionam outras formas, como *clumps* ou *pellets*. Os autores afirmaram que os valores adotados para o estado estacionário foram os do intervalo de cultivo entre 100h e 150h, observando uma correlação entre a produtividade específica de ad-7-ADCA e o comprimento médio das hifas, exceto para $D \geq 0,08 \text{ h}^{-1}$, com menor formação do produto, conforme apresentado na figura 2.9. Esta observação permitiu concluir que a velocidade específica de crescimento influenciou o processo mais que a morfologia.

Wezel *et al.* (2006) comentam que as baixas velocidades específicas de crescimento, a viscosidade elevada do meio de cultivo, as grandes dimensões dos *clumps* (normalmente ativos nas extremidades), acarretando problemas no transporte de oxigênio e nutrientes para o interior dos mesmos, implicam na necessidade de

frequências de agitação elevadas, provocando fragmentação e lise do micélio incontroladas. Os autores modificaram geneticamente diversas linhagens de *Streptomyces* aumentando a síntese de uma família de proteínas, a ssgA (composta de 6 ou 7 membros, em estreptomicetos), envolvidas nos processos de divisão celular e morfogênese. Eles observaram que as células sem modificação produziam *pellets* maiores enquanto as modificadas resultaram em micélios menores, com aumento na velocidade específica máxima de crescimento de até 67 % ($\mu_m = 0,55 \text{ h}^{-1}$), maiores produções (de 500 para 5300 unidades arbitrárias de undecilprodigiosina, um antibiótico), com conseqüente ganho em produtividade. Infelizmente não há informações sobre a distribuição morfológica (porcentagem de cada forma).

Figura 2.9. Correlação entre o comprimento médio das hifas e a produtividade de ad-7-ADCA, adaptado de Robin *et. al.* (2003): Pontos contidos no círculo e 1 são *outliers* e ponto 2 *leverage* (item 2.7)

2.7. PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial de experimentos é uma ferramenta útil para avaliar simultaneamente a influência de mais de uma variável sobre um determinado processo de interesse. Consiste na escolha apropriada, baseada em dados preliminares e/ou da

literatura, das variáveis (p), chamadas fatores e da faixa de estudo (n), denominada nível. Os níveis identificados como mínimo, central e máximo, são codificados como -1, 0 e +1, respectivamente. Há vários tipos de planejamentos, conforme exemplifica a figura 2.10, sendo sua escolha baseada em conhecimento prévio do processo, número de fatores, disponibilidade de equipamentos e outros recursos além do prazo para execução dos experimentos.

Figura 2.10. Representação de alguns modelos de planejamento fatorial com 3 fatores (adaptado de BRERETON, 2005 e BOX, HUNTER e HUNTER, 2005): a) fatorial fracionado; b) fatorial completo; c) estrela; d) repetição no ponto central; e) central composto.

O número de experimentos é mínimo para três fatores em dois níveis em um planejamento fatorial completo sem repetições no ponto central ($n^p = 2^3 = 8$ experimentos), aumentando para planejamentos estrela com 6 repetições no ponto central ($2 \times 3 + 6 = 12$ experimentos) e centrais compostos ($2^3 + 2 \times 3 + 6 = 20$). Diferentes modelos estatísticos, com variáveis codificadas, podem ser propostos, em função do planejamento fatorial adotado. Estes modelos, obtidos por regressão linear múltipla (RLM), permitem avaliar a influência dos fatores isoladamente, de suas interações 2x2, 3x3 e assim por diante. Um modelo para 3 fatores (x_1, x_2, x_3) em 2 níveis obtido com um planejamento fatorial completo para uma resposta de interesse $\hat{Y}$ é igual a $\hat{Y} = a_1 + a_2 \cdot x_1 + a_3 \cdot x_2 + a_4 \cdot x_3 + a_5 \cdot x_1 \cdot x_2 + a_6 \cdot x_1 \cdot x_3 + a_7 \cdot x_2 \cdot x_3 + a_8 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + \epsilon$, sendo a_i os coeficientes a serem determinados e ϵ o erro. Este modelo inclui as interações ($x_1 \cdot x_2$, $x_1 \cdot x_3$, $x_2 \cdot x_3$ e $x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$), mas inclui os termos denominados quadráticos (x_1^2 , x_2^2 ,

x_3^2). Os modelos sem os termos quadráticos permitem traçar superfícies de respostas que são planos ou planos distorcidos. Os modelos que incluem os termos quadráticos representam com melhor precisão os processos onde não há linearidade. Deve-se considerar a adição de ensaios no ponto central para os planejamentos fatoriais em dois níveis (RODRIGUES e IEMMA, 1995 e MONTGOMERY, 2005). Esta estratégia apresenta bons resultados, mesmo quando a linearidade é uma aproximação. A adição de ensaios no ponto central permite avaliar a significância da curvatura (não linearidade), que pode ser incorporada à análise de variância (ANOVA), conforme abordado no item 3.6. Os ensaios no ponto central também permitem avaliar a reprodutibilidade do processo, quando não há repetições dos demais ensaios. O número de repetições dos ensaios no ponto central depende do número de fatores (MONTGOMERY, 2005).

Alguns resultados podem ser considerados “anormais”. Estes são chamados *leverages* (alavancagem) ou *outliers* (discrepantes). Pode-se observar na Figura 2.11 que os pontos identificados por (a) são observações regulares, os pontos (b) e (d) desviam do padrão linear e são denominados *outliers*, mas o ponto (c) não. Os pontos (c) e (d) são identificados como *leverages*, sendo o primeiro positivo por estar acima da média e o segundo negativo, abaixo da média. A identificação de *leverages* e *outliers* nem sempre é óbvia. Neter, Wasserman e Kutner (1989) propõem o uso da matriz **H** (*hat*) de elementos h_{ij} :

$$\mathbf{H} = \mathbf{X} (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}' \quad (2.1)$$

$$h_{ij} = \mathbf{X}'_i (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'_j \quad (2.2)$$

Onde:

X = matriz sendo a primeira coluna com elementos iguais a 1 e as demais os valores das variáveis independentes.

X' = matriz **X** transposta

$(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ = matriz inversa de $(\mathbf{X}'\mathbf{X})$

$\mathbf{X}'_i$ = a i-ésima coluna da matriz **X**

Os elementos h_{ij} da matriz **H** podem ser interpretados como a influência deste resultado sobre o valor médio. Os elementos da diagonal h_{ii} são especialmente

interessantes, pois $\sum h_{ij} = p = \text{rank}(\mathbf{H}) = \text{rank}(\mathbf{X})$, sendo o *rank* de uma matriz o número máximo de colunas linearmente independentes. O valor médio de h_{ij} é igual a p/n , sendo n o número de observações. Elementos maiores que $2p/n$ são considerados *leverages*, sendo que, normalmente, $0 \leq h_{ij} \leq 1$.

Figura 2.11. *Leverages* e *outliers*, adaptado de Rousseeuw e Zomeren (1990).

Observação: É interessante comparar-se as figuras 2.11 e 2.9. Na figura 2.9, o ponto 1 e os identificados como $0,08 \leq D \leq 0,09 \text{ h}^{-1}$ são exemplos de *outliers* e o ponto 2 de *leverage*.

Um método mais simples consiste em calcular o resíduo com relação aos valores previstos no modelo obtido por regressão linear múltipla para os ensaios do planejamento fatorial e o resíduo em relação ao valor médio para os ensaios no ponto central.

Johnson e Wichern (2002) propuseram o uso de *dotplot* para identificar *outliers*. O método consiste em traçar um gráfico (figura 2.12) e calcular o quadrado da distância entre um valor observado e o valor médio destas observações. Valores inesperadamente grandes indicam observações discrepantes.

A análise pelos gráficos de probabilidade normal é uma técnica alternativa para se distinguir o que é realmente efeito e baseia-se na noção de probabilidade cumulativa (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1995). A figura 2.13 mostra, de forma simplificada, como estes gráficos são elaborados. Dada uma distribuição normal de

resultados (figura 2.13a) é possível calcular uma curva de probabilidade acumulada (figura 2.13b) e linearizá-la (figura 2.13c). A probabilidade (P em %) é calculada pela equação:

$$P (\%) = 100 * (i - 0,5)/m \quad (2.3)$$

Onde: i = número da ordem do resultado

$m = n^p - 1$ = número de efeitos

n = número de níveis do planejamento fatorial

p = número de fatores (variáveis) do planejamento fatorial

Esta ordem i deve ser crescente para os efeitos calculados.

Figura 2.12. *Dotplot*, adaptado de Johnson e Wichern (2002).

A figura 2.14 exemplifica esta avaliação, mostrando que os efeitos significativos correspondem aos pontos fora da reta traçada no gráfico de distribuição normal. Neste caso o planejamento adotado foi de quatro fatores em dois níveis, num total de 16 experimentos, sendo $m = 15$ efeitos. É possível traçar este gráfico para diferentes níveis de significância (α) com o “software” MINITAB. Para um valor de α escolhido tem-se que a probabilidade do(s) fator(es) e interações identificados como importantes é significativa a um nível de $1-\alpha$ (normalmente expressa em porcentagem). Isto é, quando

$\alpha = 10\%$, há uma probabilidade de 90% de que a influência dos fatores e interações identificados como importantes esteja correta. Maiores valores de α poderão aumentar o número de fatores e interações importantes, porém com um menor nível de significância.

Figura 2.13. Gráfico de probabilidade normal, adaptado de Box, Hunter e Hunter (2005).

Figura 2.14. Exemplo de identificação das variáveis e interações significativas.

Sarrà *et al.* (1993) utilizaram um planejamento estrela com duas variáveis em dois níveis e 4 repetições no ponto central (total de 12 experimentos) para otimizar a composição do meio de cultura em cultivos descontínuos de *Streptomyces lividans* para produção de um antibiótico. Os fatores foram as concentrações de ácido glutâmico e fosfato, sendo o modelo igual a:

$\hat{Y} = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_{11} \cdot x_1^2 + a_{22} \cdot x_2^2 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2$, onde $\hat{Y}$ é a resposta de interesse, a_i os coeficientes a serem determinados, x_1 e x_2 os fatores, x_1^2 e x_2^2 os termos quadráticos e $x_1 \cdot x_2$ a interação entre eles.

Costa *et al.* (2001) combinaram o planejamento fatorial à simulação de processos para otimizar um processo de fermentação alcoólica com extração. Neste caso o planejamento fatorial ajudou a estudar a dinâmica do processo, que serviu para determinar as melhores condições de controle. O modelo estatístico apresentou uma confiabilidade de 99%.

2.8. TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO LEB/DEQ/EPUSP

Diversos trabalhos com *Streptomyces* e *Aspergillus*, microrganismos filamentosos, foram conduzidos no LEB/DEQ/EPUSP ao longo dos últimos anos.

Pamboukian (1997) avaliou a influência do preparo do inóculo na morfologia de *Aspergillus awamori*. O aumento da concentração de esporos no preparo do inóculo conduziu a uma diminuição no diâmetro dos *pellets* e a um aumento na atividade da glicoamilase. A produção de glicoamilase foi superior quando o crescimento ocorreu na forma de *pellets* pequenos. Inóculos preparados com elevada concentração de esporos resultaram na formação de *pellets* no cultivo em fermentador, conduzindo a um crescimento celular maior e menor produção de glicoamilase. As características reológicas do caldo de fermentação mostraram-se dependentes da morfologia.

Pamboukian e Facciotti (1998) propuseram uma correlação matemática entre o tamanho do *pellet* de *Aspergillus awamori* cultivado em incubador rotativo e a produção de glicoamilase. Frascos de 1L contendo 200mL de meio de cultivo foram inoculados com diferentes concentrações de esporos e incubados a 35°C, 200 rpm por 24h. A equação ajustada mostra uma relação inversa entre a atividade enzimática e o diâmetro

do *pellet*, conforme a equação $\ln A = \ln A_0 - K \cdot D$ ($r = 0,97$), sendo A_0 uma atividade enzimática teórica (ausência de *pellets*) e K o coeficiente angular. Os autores ressaltaram que o núcleo dos *pellets* é constituído, principalmente, por células não viáveis pela limitação de nutrientes e oxigênio.

Pamboukian, Facciotti e Schmidell (1998) buscaram uma relação entre morfologia, reologia e produção de glicoamilase em cultivo submerso de *Aspergillus awamori*. O preparo do inóculo foi de fundamental importância na morfologia do microrganismo e produção de glicoamilase. Três diferentes valores de pH foram testados (2,5, 5,0 e 5,5). Melhores resultados em fermentador foram obtidos quando o inóculo foi preparado com pH de 2,5. Observou-se, neste baixo valor de pH, menor aglomeração de esporos durante a fase de germinação, o que resultou em crescimento na forma de filamentos na etapa em fermentador, minimizando a formação de *pellets*.

Guimarães (2000) estudou a influência do preparo do inóculo e do pH na produção de retamicina por *Streptomyces olindensis*. Além de definir as condições de reativação das células (pré-inóculo) e de preparo do inóculo, observou-se que o pH deve ser controlado em 7,0 e que a fase de produção de retamicina iniciou-se ao final da fase exponencial de crescimento (comportamento típico na produção de metabólitos secundários). O tempo de estocagem de células mostrou-se ser de grande relevância, sendo que diferenças neste tempo podem prejudicar a reprodutibilidade de resultados.

Martins (2001) estudou a transferência de oxigênio em cultivos de *Streptomyces olindensis*. A maior produção de retamicina foi obtida quando maiores valores de vazão de aeração (1,0 v.v.m.) e frequência de agitação (500 ou 700 rpm) foram adotadas; não houve produção de retamicina quando a frequência de agitação foi de 200 rpm, independentemente da vazão de aeração. Neste caso a concentração de oxigênio dissolvido foi próxima de zero.

Pamboukian, Guimarães e Facciotti (2002) aplicaram técnicas de análise de imagens para a caracterização de *Streptomyces olindensis* em cultivos submersos em processo descontínuo (frequência de agitação igual a 500 rpm e volume útil igual a 1,5L), o que permitiu uma diferenciação morfológica em quatro classes: *pellets*, *clumps* (filamentos emaranhados), filamentos livres com ramificações e filamentos livres sem ramificações. A classificação foi feita automaticamente com base no perímetro e

perímetro convexo das células, conforme mostra a figura 3.1, apresentada no capítulo 3. Observou-se a predominância de *pellets* (cerca de 70% em área) e *clumps* (20% em área) no início do cultivo. Decorridas 20 h de cultivo, a porcentagem de *pellets* caiu para 0%; a porcentagem de hifas aumentou ao longo do cultivo, chegando a 90% em cerca de 45h. Resultados semelhantes foram obtidos em incubador rotativo ($N = 200\text{rpm}$). Segundo os autores, esta classificação morfológica poderia ser útil para estabelecer correlações entre a produção de antibiótico e as diferentes morfologias do microrganismo.

Pamboukian (2003) estudou a produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* em cultivos descontínuos alimentados e contínuos, incluindo-se análise da reologia do caldo, análise de imagens, balanço gasoso e cálculo dos fatores de conversão, além de outros parâmetros cinéticos importantes. A produção de retamicina foi maior quando a velocidade específica de crescimento era mantida baixa ($0,03\text{ h}^{-1}$); o início da produção de retamicina mostrou-se ligado à limitação por nutrientes (provavelmente nitrogênio); elevadas concentrações de glicose não prejudicaram a produção do antitumoral; a velocidade específica de produção da retamicina total (intra e extra celular) foi relacionada com a velocidade específica de crescimento. O critério de classificação morfológica mostrou-se adequado para a análise morfológica; verificou-se um predomínio de *pellets* e *clumps* no início dos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos, com rompimento dos *pellets*, devido ao cisalhamento, no decorrer dos cultivos. A morfologia foi influenciada, em ensaios contínuos, pela vazão específica de alimentação (D); altos valores de D ($D = \mu$ no estado estacionário) conduziram a uma morfologia em forma de *pellets* e baixos valores à forma de *clumps* e hifas livres. A porcentagem de hifas (ramificadas e não ramificadas) foi de aproximadamente 12% para $D = 0,03\text{ h}^{-1}$, de 8% para $D = 0,05\text{ h}^{-1}$ e menor que 2% para as demais condições ($D = 0,20, 0,25$ e $0,30\text{ h}^{-1}$), em porcentagem da área projetada.

Martins *et al.* (2004) conduziram quatro fermentações em descontínuo para avaliar a influência da concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante a fase de crescimento celular sobre a produção de retamicina por *Streptomyces olindensis*. No primeiro cultivo a OD não foi controlada, no segundo controlada em 5% da OD de saturação com a adição de N_2 durante a fase de produção de retamicina, com vazão

específica de aeração igual a 1 v.v.m. No terceiro e quarto ensaios a vazão específica de aeração foi mantida em 0,2 v.v.m., sem controle da OD no terceiro experimento e com controle da OD em 100% da concentração de saturação na fase de crescimento e 5% na fase de produção. A produção nos dois primeiros ensaios foi aproximadamente a mesma, mas a do quarto foi o dobro da obtida no terceiro, mostrando a importância do fornecimento de oxigênio durante a fase de crescimento celular sobre o processo.

Pamboukian e Facciotti (2004) conduziram fermentações de *Streptomyces olindensis* ICB20 em fermentador com volume útil igual a 4L e frequência de agitação igual a 500 rpm em sistema contínuo sem reciclo de células. A porcentagem de *clumps* aumentou de 90% para 100% com $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$ e $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, caindo para 10% com o aumento de D até $0,30 \text{ h}^{-1}$. A porcentagem de *pellets* era praticamente nula para valores de D inferiores a $0,10 \text{ h}^{-1}$ e aumentou para 90% com o aumento de D até $0,30 \text{ h}^{-1}$. Os autores justificam este aumento na porcentagem de *pellets* devido ao menor tempo de residência (igual a $1/D$), com conseqüente menor exposição às forças de cisalhamento.

Pamboukian e Facciotti (2005) observaram em cultivos descontínuos e descontínuo alimentados de *Streptomyces olindensis* ICB20 em fermentador com volume útil igual a 4L e frequência de agitação igual a 500 rpm que a porcentagem de *pellets* caiu de 80% no início dos cultivos para 0% decorridas 30h. A porcentagem de *clumps* aumentou de 20% para cerca de 85% ao longo das fermentações. Estes resultados foram coerentes aos obtidos em processos contínuos com baixos valores de D e, conseqüentemente, maiores tempos de residência e ação das forças de cisalhamento sobre os *pellets*.

Inoue (2006) pesquisou a influência de diferentes limitações nutricionais (carbono, nitrogênio e fosfato) sobre a produção de retamicina em cultivos contínuos de *Streptomyces olindensis* ICB20. A análise morfológica indicou que maiores concentrações de retamicina foram observadas quando a porcentagem de *clumps* (em área) foi menor. Deve-se observar que as velocidades específicas de crescimento em meio definido contendo sais e uma fonte de carbono, sem extrato de levedura ou uma fonte de proteínas ou vitaminas, são muito inferiores às obtidas em meio rico. Isto

leva a tempos de residência muito superiores, com influência sobre a morfologia pela própria limitação nutricional e maior exposição do microrganismo ao cisalhamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMO

Empregou-se suspensão de células vegetativas de *Streptomyces olindensis* ICB20, mutante desenvolvido por Furlan (1997), conservado em solução de glicerol 20% a -80°C em frascos de 10 mL.

3.2. MEIOS DE CULTIVO

Meio para cultivo em reator, para inóculo e pré-inóculo (g. L^{-1}): glicose, 10,0 (Synth); extrato de levedura (Oxoid) 5,0; casaminoácidos (Merck) 0,1; tris(hidroximetil)aminometano (Merck) 3,09; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 10,12; K_2SO_4 (Merck) 0,25. O pH do meio era ajustado para 7,2-7,4. O meio era esterilizado a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização eram adicionados $2,0 \text{ mL.L}^{-1}$ de solução de elementos traço, 4 mL.L^{-1} de solução de CaCl_2 5M e 10 mL.L^{-1} de solução KH_2PO_4 (Merck) 0,5%(p/v). Solução de elementos traço (g.L^{-1}): ZnCl_2 (Merck) 0,04; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,2; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Synth) 0,01; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0,01; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Synth) 0,01.

Para prevenir a formação de espuma adicionava-se ao meio $0,15 \text{ mL.L}^{-1}$ de anti-espumante à base de silicone (Dow Corning).

3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Pré-inóculo: inoculava-se um erlenmeyer de 1000 mL contendo 90 mL de meio com 10 mL de suspensão de células em glicerol e incubava-se a 30°C e 200 rpm por 16 h em incubador rotativo.

Inóculo: inoculavam-se dois erlenmeyers de 1000 mL contendo 180 mL de meio cada com 20 mL do caldo do pré-inóculo e incubava-se a 30°C e 200 rpm por 24 h em incubador rotativo.

Teste de produção de retamicina em *shaker*: além dos dois erlenmeyers acima descritos, inoculavam-se outros três erlenmeyers de 1000 mL contendo 90 mL de meio cada com 10 mL do caldo do pré-inóculo e incubava-se a 30°C e 300 rpm por 24h em incubador rotativo. Observava-se se ocorria a produção de retamicina. O objetivo deste teste era avaliar a síntese do antitumoral antes do cultivo em biorreator e foi adotado depois dos ensaios preliminares, conforme abordado no item 4.1.

Cultivos contínuos: inoculava-se o reator com 400 mL de inóculo em 3600 mL de meio. O cultivo era conduzido em biorreator de 4 L de volume útil (BIOFLO III, New Brunswick), a 30°C e o pH era controlado em 7, com adição de NaOH 2M ou HCl 2M. Após uma etapa descontínua de 16 horas, iniciava-se a alimentação do meio a partir de um balão com 12L de volume útil com bombas peristálticas Watson-Marlow 101U, sem reciclo de células e/ou dispositivos para retirada de produto e retirada do caldo fermentado por uma bomba peristáltica Tandem modelo 1081 Sci Log Inc. para outro balão de igual volume útil. Esta bomba permitia trabalhar com uma mangueira de maior diâmetro na saída do reator. A retirada do caldo era feita por um bocal lateral, o que permitia manter constante o nível do reator. Um dispositivo de segurança foi instalado na saída de gases entre o reator e o filtro. Tratava-se de um *trap* com um erlenmeyer de 3L de capacidade. Este arranjo foi o mesmo adotado por Pamboukian (2003). O intervalo entre as amostragens variava de acordo com a vazão específica de alimentação. O estado estacionário foi definido quando o coeficiente de variação ($cv = \text{média}/\text{desvio padrão}$; em porcentagem) calculado para três amostras consecutivas foi menor ou igual a 5%, baseando-se na concentração de biomassa e de retamicina. As amostras eram retiradas a cada meio tempo de residência, a primeira a partir de dois tempos de residência contados do início da condição em estudo. Este critério não foi adotado nos ensaios preliminares. A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada com a adição de oxigênio ou nitrogênio ao ar, sendo os fluxos controlados por fluxômetros (*mass flow controller*) 5850E (Brooks Instruments) com auxílio do controlador Brooks modelo 0152BBC2A11A (Brooks Instruments) e de uma rotina desenvolvida para o *software* LabView (National Instruments).

3.4. ANÁLISES

3.4.1. Concentração celular

Filtrava-se uma alíquota de aproximadamente 5 mL previamente pesada através de uma membrana de 1,2 µm (Schleicher&Schuell); a membrana contendo o filtrado era seca em microondas, potência de 180 W por 15 minutos (GUIMARÃES, 2000). A concentração celular era calculada conforme:

$$X = [(m_{ma} - m_m)/m_a] * 1000 \quad (3.1)$$

onde: X = concentração celular em g.L⁻¹

m_{ma} = massa da membrana com o filtrado após secagem em g

m_m = massa da membrana seca em g

m_a = massa da amostra em g

Foi avaliado o erro na determinação da concentração celular em três amostras retiradas de cultivo em incubador rotativo (inóculo) nos instantes 0, 12h e 24h. As determinações foram feitas em quintuplicata. O valor médio foi de 0,49 g.L⁻¹, 2,18 g.L⁻¹ e 2,98 g.L⁻¹, o desvio padrão (item 3.5) igual a 0,06 g.L⁻¹, 0,05 g.L⁻¹ e 0,11 g.L⁻¹ e o coeficiente de variação (item 3.5) igual a 13%, 2% e 4%, respectivamente. O pior resultado corresponde ao de menor concentração celular, apesar de um volume de amostra de 20mL (este volume foi de 10mL e 5 mL para as outras condições). Pode-se admitir um coeficiente de variação inferior a 4% para concentrações celulares superiores a 2 g.L⁻¹.

3.4.2. Concentração de glicose

A glicose era dosada através da reação de glicose-oxidase, empregando-se o Auto Analyzer II (Technicon), conforme descrito por Pamboukian, 2003. Também aqui avaliou-se o erro, como descrito no item 3.4.1., com 12 e 24h de tempo de incubação em incubador rotativo. As concentrações foram iguais a $7,1 \text{ g.L}^{-1}$ e $5,5 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, desvios padrão igual a $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e coeficientes de variação de 3%.

3.4.3. Dosagem de retamicina

A metodologia utilizada foi desenvolvida por Guimarães, 2000. Centrifugava-se uma amostra de 5 mL de caldo por 15 min. a 10.000 rpm (7300g); ajustava-se o pH do sobrenadante recolhido para 6,3, diluía-se para um volume final de 10 mL com água destilada e realizava-se leitura de absorbância em espectrofotômetro digital B 342 II (Micronal) a 547 nm (PAMBOUKIAN, 2003). A concentração é expressa em unidades de absorbância (UA).

Foi avaliado o erro na determinação da concentração de retamicina. Duas amostras de um cultivo em incubador rotativo foram analisadas. As concentrações médias medidas foram iguais a 0,141 UA e 0,110 UA, os desvios padrão iguais a 0,0082 UA e 0,0036 UA e os coeficientes de variação iguais a 3% e 6%.

3.4.4. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica seguiu procedimento descrito por Pamboukian (2003). A análise de imagens foi feita utilizando-se um analisador LEICA Q 550IW acoplado a um microscópio óptico LEICA DM/LS e uma câmera de vídeo LEICA DFC300 - FX. O *software* utilizado foi o LEICA Qwin.

Para o preparo das lâminas seguiu-se o protocolo abaixo:

- retirar uma amostra de 20 mL do fermentador e proceder à diluição adequada;
- transferir 20 μL da amostra para uma lâmina de vidro;
- secar a lâmina e efetuar a fixação das células à chama, utilizando bico de Bunsen;

- aplicar uma gota de uma solução de azul de metileno (0,3 g de azul de metileno dissolvido em 30 mL de etanol 95%, completando-se com água destilada até volume final de 100 mL) e aguardar por 2 minutos;
- lavar o excesso do corante com água destilada.

Crítérios de classificação morfológica (PAMBOUKIAN *et al.*, 2002):

- hifas isoladas não ramificadas: $40 < \text{perímetro} < 600 \mu\text{m}$
número de extremidades = 2
- hifas isoladas ramificadas: $40 < \text{perímetro} < 600 \mu\text{m}$
número de extremidades > 2
- aglomerados ou *clumps* : $600 < \text{perímetro} < 1200 \mu\text{m}$ e
 $100 < \text{perímetro convexo} < 950 \mu\text{m}$
- *pellets* : $950 < \text{perímetro convexo} < 7200 \mu\text{m}$

A figura 3.1 ilustra a diferença entre o perímetro e o perímetro convexo.

A porcentagem de cada classe morfológica em termos de área foi determinada somando-se a área total de cada classe morfológica e dividindo-se essa soma pela área total de todos os objetos medidos. Foram preparadas 6 lâminas e adquiridas 50 imagens (fotos) para cada amostra analisada. As imagens foram adquiridas seguindo-se um procedimento de grade, isto é, por colunas com fotos retiradas em seqüência.

3.4.5. Testes de atividade biológica

Estes testes foram baseados em uma comunicação verbal de Renata Furlan do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, quem gentilmente cedeu o microrganismo teste, *Bacillus subtilis*, que foi recebido em glicerol 20% em eppendorf. Os testes seguem as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1961), e baseiam-se na descrição feita por Furlan, 1997. Preparou-se 100 mL de meio LB (Tryptona $10,0 \text{ g.L}^{-1}$, Extrato de levedura $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ e NaCl $5,0 \text{ g.L}^{-1}$). Cultivou-se *overnight* (12-16 h) a 37°C . O pH do meio LB não precisa ser ajustado.

Figura 3.1. Esquema do perímetro e perímetro convexo, adaptado de Pamboukian (2003).

A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 rpm (7300 g - centrífuga MR 1812, Jouan, France) por 15 min a 10⁰C e as células ressuspensas em 50 mL de solução de NaCl 0,9% para lavagem do meio de cultura restante. Procedeu-se a nova centrifugação a 10.000 rpm (7300 g – centrífuga MR 1812, Jouan, France) por 15 min a 10⁰C. As células foram ressuspensas em 15 mL de solução de glicerol 20% e congeladas em *eppendorf* contendo alíquotas de 200 µL da suspensão.

O conteúdo de um *eppendorf* com 200 µL da suspensão foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio LB. Cultivou-se até uma densidade optica em 600 nm de aproximadamente 0,5 (por cerca de 12 h). Inoculou-se com cerca de 150 µL da suspensão de células uma placa de Petri contendo meio LB sólido (triptona 10,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 10,0 g.L⁻¹, NaCl 5,0 g.L⁻¹ e agar 20,0 g.L⁻¹).

As células foram distribuídas sobre a placa com auxílio de uma alça de Drigalski de forma a obter-se um “tapete”, isto é, cobrir toda a placa de forma homogênea. Em outra placa esterilizada e seca preparou-se os discos de papel de filtro (previamente esterilizados em um frasco) com aproximadamente 5 mm de diâmetro. Sobre cada

disco adicionou-se 5 µL da solução a ser testada e aguardou-se a absorção da solução. O disco, com auxílio de uma pinça esterilizada, foi transferido para a placa contendo o microrganismo teste, tomando-se o cuidado de não tentar mudar a posição do disco sobre a placa.

A placa foi colocada em estufa a 37°C por 12h. Os halos de inibição foram medidos após este período com paquímetro.

3.4.6. Testes de viabilidade

Foram pesquisados três corantes com células obtidas em cultivos em incubador rotativo.

A metodologia para utilização do azul de metileno e fucsina foi descrita por Vanhoutte *et al.* (1995):

- Diluir 100 µL de caldo de fermentado em 2 mL de tampão fosfato (pH 7,0) 0,01 M;
- Adicionar 50 µL de azul de metileno 1 % p/v e aguardar por 10 minutos;
- Adicionar 44 µL de fucsina Ziehl e aguardar por 10 minutos;
- Observar a amostra em microscópio, com aumento de 200 vezes.

O azul de metileno é um indicador da atividade metabólica de um segmento de hifa, sendo reduzido pela mitocôndria ativa. A forma reduzida não possui coloração. Assim, o azul de metileno cora as células mortas de azul, enquanto as células vivas permanecem descoradas. Por outro lado, a fucsina cora os componentes citoplasmáticos de vermelho alaranjado. Dessa forma, os segmentos ativos das hifas, que reduzem o azul de metileno, são corados pela fucsina, aparecendo alaranjados, enquanto fragmentos de hifas menos ativos apresentam uma coloração entre a púrpura e o cinza. Esse procedimento de coloração mostrou-se estável por 1 hora, de acordo com os autores.

Outro corante testado foi violeta de genciana, seguindo metodologia descrita por Pons *et al.* (1998):

- Diluir a amostra (até 10 vezes) e fixar com ácido acético 17,5%, por 20 minutos a 4 °C;

- Centrifugar e lavar com 1 mL de água destilada (duas vezes);
- Transferir 40 µL da amostra para uma lâmina de vidro;
- Secar ao ar;
- Colorir com violeta de genciana por 30 s;
- Observar em microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

As amostras mostraram-se estáveis por duas semanas, segundo os autores.

Este corante permite identificar regiões celulares onde houve vazamento de componentes pela membrana, ou seja, regiões vazias (coloração menos intensa).

O terceiro corante testado foi *BacLight*, com o qual melhores resultados foram obtidos, conforme discutido no item 4.5.

3.4.6.1. *BacLight*TM

Este corante tinge de verde a membrana celular de células viáveis e de vermelho a membrana das células não viáveis.

Procedimento para análise da viabilidade celular com kit DEAD/LIVE[®] *BacLight*TM L-13152 (catálogo Molecular Probes/Invitrogen Detection Technologies – MP 07007):

- preparar uma solução estoque de reagentes dissolvendo-se o conteúdo de uma pipeta do componente A (contendo sólidos amarelo-alaranjados – corante SYTO 9) e uma pipeta do componente B (contendo sólidos vermelhos – Iodeto de propídio) em 5mL de água Milli-Q esterilizada por filtração (0,22 µm). Dissolver os dois componentes neste volume de 5 mL;
- misturar uma amostra da solução estoque (250 µL) com um volume igual da suspensão de células;
- agitar intensamente e incubar por 15 minutos no escuro;
- transferir 15 µL da suspensão de bactérias tingidas para uma lâmina e proteger com lamínula;
- observar no microscópio com fluorescência LEICA DM/LS com uso do filtro apropriado.

Observações:

- como medida de segurança era obrigatória a utilização de luvas cirúrgicas durante o manuseio de amostras e descartar todo material em coletor apropriado – risco biológico. Os corantes SYTO 9 e Iodeto de propídio ligam-se ao ácido nucléico; o Iodeto de propídio é mutagênico/ não há informação sobre o SYTO 9.
- foram importados os filtros de fluorescência Leica L5 S (vermelho) e TX2 S (verde).

3.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS – EQUACIONAMENTO DO BIORREATOR

Para um reator operado em processo contínuo sem reciclo de células tem-se que (o significado dos símbolos nas equações encontra-se na lista de símbolos):

Balanco material para as células:

$$\frac{d(X * V)}{dt} = (X_0 - X) * F + \mu * X * V \Rightarrow V * \frac{dX}{dt} = (X_0 - X) * F + \mu * X * V \quad (3.2)$$

mas $V = \text{constante}$, portanto $dV/dt = 0$

Dividindo-se a equação por V , obtém-se:

$$\frac{dX}{dt} = (X_0 - X) * \frac{F}{V} = \mu * X \quad (3.3)$$

No estado estacionário tem-se que $X = \text{constante}$ e, portanto, $dX/dt = 0$.

$$\text{Logo: } (X_0 - X) * \frac{F}{V} = \mu * X = 0 \quad (3.4)$$

Considerando $X_0 = 0$ (meio esterilizado); obtém-se:

$$\mu = \frac{F}{V} = D \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad (3.5)$$

Balanco material para a glicose:

$$\frac{d(S * V)}{dt} = (S_0 - S) * F - \mu * X * \frac{V}{Y_{x/s}} \Rightarrow V * \frac{d(S)}{dt} = (S_0 - S) * F - \mu * X * \frac{V}{Y_{x/s}} \quad (3.6)$$

No estado estacionário tem-se que $dS/dt = 0$ e que $\mu = D$, portanto:

$$(S_0 - S) * \frac{F}{V} - D * \frac{X}{Y_{x/s}} = 0$$

$$Y_{x/s} = \frac{X}{(S_0 - S)} \text{ (g biomassa.g glicose}^{-1}\text{, ou g.g}^{-1}\text{)} \quad (3.7)$$

O fator de conversão $Y_{x/s}$ sofre influência da concentração de extrato de levedura presente no meio ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$), que é metade da concentração inicial de glicose ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$), já que o extrato de levedura é também fonte de carbono para o microrganismo. Um fator de conversão corrigido que leva este fato em conta foi calculado conforme:

$$Y_{x/s} \text{ corr} = \frac{X}{[(S_0 - S) + 1,2195 * EL]} \text{ (g biomassa.(g glicose+EL)}^{-1}\text{, ou g.g}^{-1}\text{)} \quad (3.8)$$

Sendo a composição média de uma célula da levedura dada por $C_{H_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}}$ (NIELSEN, 1994) e assumindo-se igual para o extrato de levedura, tem-se:

$$\frac{0,4878 \text{ g de C}}{\text{g de levedura}} \text{ e para a glicose tem-se } \frac{0,4000 \text{ g de C}}{\text{g de glicose}}, \text{ resultando em}$$

$$\frac{0,4878 \text{ g de C}}{\text{g de levedura}} \cdot \frac{\text{g de glicose}}{0,4000 \text{ g de C}} = \frac{1,2195 \text{ g de glicose}}{\text{g de levedura}} = \frac{1,2195 \text{ g de glicose}}{\text{g de extrato de levedura}}$$

Balanco material para a retamicina

$$\frac{d(Ret * V)}{dt} = (Ret_0 - Ret) * F + \mu_P * X * V \quad (3.9)$$

$$V \frac{d Ret}{dt} = (Ret_0 - Ret) * F + \mu_P * X * V \quad (3.10)$$

Dividindo-se por V e fazendo-se $Ret_0 = 0$, tem-se:

$$\frac{d Ret}{dt} = \mu_P * X - \frac{F}{V} * Ret = \mu_P * X - D * Ret \Rightarrow Ret = \mu_P * \frac{X}{D} \quad (3.11)$$

A produtividade em retamicina em estado estacionário é dada por:

$$P_{ret} = D * Ret = \mu_P * X \quad (\text{UA.h}^{-1}) \quad (3.12)$$

Assim, a produção específica (Y_{ret}/x) é dada por:

$$Y_{ret}/x = \frac{Ret}{X} \quad (\text{UA. g biomassa}^{-1} \cdot \text{L}, \text{ ou UA.g}^{-1}.\text{L}) \quad (3.13)$$

A produtividade específica (P_{ret} / X) é calculada conforme:

$$P_{ret} / X = \frac{P_{ret}}{X} = \frac{D * Ret}{X} = \mu_P \quad (\text{UA.g biomassa}^{-1}.\text{L.h}^{-1}, \text{ ou UA . g}^{-1}.\text{L.h}^{-1}) \quad (3.14)$$

A produtividade em células em estado estacionário foi calculada conforme:

$$P_x = X * D \quad (\text{g biomassa} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}, \text{ ou g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \quad (3.15)$$

O fator de conversão de substrato em retamicina, sem considerar a concentração de extrato de levedura, foi calculado usando-se a equação:

$$Y_{ret/s} = \frac{Ret}{(S_o - S)} \quad (\text{UA} \cdot \text{g glicose}^{-1}, \text{ ou UA.g}^{-1}) \quad (3.16)$$

O critério adotado para considerar que o estado estacionário foi estabelecido, nos ensaios previstos no planejamento fatorial, baseou-se no coeficiente de variação (cv) calculado para a concentração celular e de retamicina durante os cultivos conforme (TRIOLA, 2005):

$$\text{coeficiente de variação} = cv = \frac{100 * s}{N} \quad (\%) \quad (3.17)$$

onde:

$$\text{desvio padrão} = s = \sqrt{\frac{\sum (x - xm)^2}{N}} \quad (3.18)$$

$$\text{e a média} = xm = \frac{\sum x}{N} \quad (3.19)$$

sendo x a grandeza em estudo, xm o valor médio calculado para esta grandeza e N o número amostras.

O uso do cv justifica-se por ser independente da ordem de grandeza das variáveis em estudo, o que facilita a comparação entre elas.

Valores de cv podem ser classificados como pequeno (baixo), moderado (médio) ou elevado (grande). Neste projeto foi adotado que o estado estacionário foi atingido quando o cv era menor ou igual a 5% ($cv \leq 5\%$).

O critério para comparar os resultados dos diferentes experimentos do ponto central (variabilidade do processo) foi baseado no proposto por Garcia (1989) e Clemente e Muniz (2002), sendo considerada baixa para valores de $cv \leq 15\%$, média para $15\% < cv \leq 30\%$ e alta para $cv > 30\%$.

A velocidade específica máxima de crescimento foi estimada considerando-se a etapa em descontinuo dos cinco grupos de ensaios definidos conforme descrito no item 3.6. Para cada amostra retirada em intervalos de tempo de 4h a partir da inoculação do biorreator, foi calculado o valor médio da concentração celular (X) e um polinômio foi ajustado pelo *software* Excel. Foram interpolados valores com intervalo de tempo de 0,5 h e calculadas as velocidades específicas de crescimento para cada instante. O valor máximo obtido foi assumido como a velocidade específica máxima de crescimento.

3.6. PLANEJAMENTO FATORIAL

Os experimentos seguiram um planejamento fatorial em dois níveis ($n = 2$), três variáveis ($p = 3$), em um total de $n^p = 2^3 = 8$ experimentos, com 6 ensaios no ponto central, conforme mostrado na Tabela 3.1.

A ordem de execução dos ensaios foi estabelecida por sorteio e dividida em grupos, sendo o grupo 1 composto pelos ensaios **V**, **PC1**, **VI**, **PC2** e **IV**, o grupo 2 pelos ensaios **PC3**, **VII** e **VIII**, o grupo 3 pelos ensaios **II**, **III**, **PC4** (descartado por dificuldade para controlar a concentração de oxigênio dissolvido) e **I**, o grupo 4 pelo ensaio **PC4** (interrompido por falta de energia) e o grupo 5 pelos ensaios **PC5** e **PC6**.

A faixa de velocidades específicas de crescimento foi definida com base nos resultados obtidos por Pamboukian (2003), onde a máxima produção de retamicina foi

obtida quando, no estado estacionário, $\mu = D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ e esta produção cessou completamente para $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$. Para a concentração de oxigênio dissolvido, procurou-se condições com possível limitação no valor mínimo igual a 20% e excesso no máximo igual a 80%. Já para a frequência de agitação, com base nos resultados reportados por Guimarães (2000), o valor mínimo foi fixado em 300 rpm; o valor máximo foi fixado em 700 rpm, dado que Pamboukian manteve uma frequência de agitação igual a 500 rpm nos ensaios em processo contínuo.

Este planejamento possibilita ajustar-se um modelo, por regressão linear múltipla, para as respostas de interesse em função das variáveis codificadas conforme:

$$\hat{Y} = a_1 + a_2 \cdot x_1 + a_3 \cdot x_2 + a_4 \cdot x_3 + a_5 \cdot x_1 \cdot x_2 + a_6 \cdot x_1 \cdot x_3 + a_7 \cdot x_2 \cdot x_3 + a_8 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + \varepsilon \quad (3.20)$$

onde a_i são os coeficientes a serem determinados, x_1 , x_2 e x_3 as variáveis codificadas e ε o erro. As respostas de interesse escolhidas foram a concentração celular X_c , a concentração de retamicina Ret_c , a concentração de glicose Sc , os fatores de conversão Y_x/sc e $Y_x/s \text{ corr}_c$, as produções P_{xc} e P_{retc} , as produtividades $Y_{ret/xc}$ e $Y_{ret/sc}$ e a produtividade específica P_{ret} / X_c .

Tabela 3.1 – Planejamento estatístico em dois níveis, três variáveis (2^3) e ponto central.

Ensaio	Frequência de agitação - N	Concentração de oxigênio dissolvido - OD	Velocidade específica de crescimento - μ
I	- 1	-1	-1
II	+1	-1	-1
III	-1	+1	-1
IV	+1	+1	-1
V	-1	-1	+1
VI	+1	-1	+1
VII	-1	+1	+1
VIII	+1	+1	+1
PC (*)	0	0	0
Valores correspondentes às variáveis codificadas:			
(-1)	300 rpm	20 %	$0,05 \text{ h}^{-1}$
(0)	500 rpm	50 %	$0,15 \text{ h}^{-1}$
(+1)	700 rpm	80 %	$0,25 \text{ h}^{-1}$

* Ponto central: realizadas seis repetições (PC1 a PC6).

A análise de variância (ANOVA), os gráficos de probabilidade normal e gráficos em três dimensões (3-D) foram calculados com uso do *software* MINITAB. *Leverages* e *outliers* foram identificados pelo erro “ ε ” para os ensaios do planejamento fatorial e pela

diferença entre o valor obtido y_i e a média destes valores, $\sum y_i / 6$, para os ensaios no ponto central e pelo método do gráfico *dotplot*, apenas para os ensaios no ponto central.

O cálculo do modelo estatístico e da ANOVA feitos com o *software* MINITAB podem ser realizados em planilha eletrônica, como o *software* Excel, conforme apresentado no anexo 2. Os gráficos em três dimensões apresentados no capítulo 4 não são as superfícies de resposta. Estas seriam planos ou planos distorcidos e só poderiam ser traçadas fixando-se o valor do fator ausente da figura, conforme ilustra a figura 3.2. Além disto o *software* não permite a inclusão dos ensaios no ponto central.

Figura 3.2. Superfície de resposta traçada com o *software* MINITAB.

As figuras em três dimensões foram desenhadas com a opção de interpolação pelo método das distâncias, mais indicado que a opção do uso do polinômio de Akima pois a superfície apresenta valores elevados e transições abruptas (para a concentração de retamicina), conforme figura 3.3.

Figura 3.3. Gráficos em três dimensões traçados com o *software* MINITAB: a) interpolação pelo método das distâncias; b) polinômio de Akima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

Foram realizados cinco ensaios em sistema descontínuo e sete em contínuo (FC1 a FC7) para treinamento, estabelecimento do procedimento para análise da atividade biológica, teste das bombas de alimentação de meio e de retirada do caldo fermentado e do sistema de controle da concentração de oxigênio dissolvido. A tabela 4.1 apresenta as condições operacionais dos ensaios FC1 e FC4. Os outros ensaios foram descartados por contaminação, queda de energia ou baixa produção de retamicina.

Tabela 4.1. Ensaios preliminares.

Ensaio	N (rpm)	Início da alimentação (h)	$D = \mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Observações
FC-1	700	30	0,05; 0,16 e 0,27	Sem controle de oxigênio dissolvido
FC-4	300	24	0,06; 0,17 e 0,28	Com controle de oxigênio dissolvido em 80%.

Foram retiradas amostras ao final dos ensaios descontínuos para análise da atividade biológica, conforme descrito no item 3.4.5. Os resultados obtidos permitiram estabelecer um tempo de incubação igual a 12 h. Foi possível correlacionar a concentração de retamicina com o diâmetro do halo de inibição dentro das concentrações testadas, conforme figura 4.1, sendo igual a 1 a concentração da amostra sem diluição. A existência desta correlação permitirá expressar a concentração de retamicina em unidades de absorbância (UA) em função do diâmetro do halo de inibição (item 4.3).

Foram preparadas lâminas para fotografar o microrganismo, conforme mostra a figura 4.2, para aprendizado da técnica de análise de imagem e teste da nova câmera.

A medida da concentração de oxigênio dissolvido poderia ser influenciada pelo acúmulo de microrganismo no eletrodo. Fotos feitas ao fim de um cultivo descontínuo (figura 4.3) mostram que não houve acúmulo excessivo de microrganismo na

extremidade do eletrodo, apesar da incrustação na parede do fermentador, indicando a possibilidade de controle da concentração de oxigênio dissolvido durante os cultivos contínuos em fermentador.

Figura 4.1. Correlação entre a concentração relativa de retamicina e o halo de inibição ao final dos ensaios descontínuos – teste de atividade biológica.

Os resultados obtidos para os ensaios FC1 e FC4 encontram-se na Tabela 4.2 e figuras 4.4, 4.5 , respectivamente.

Tabela 4.2. Resultados obtidos no estado estacionário para os ensaios FC1 e FC4.

Ensaio	D (h ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	Ret (UA)	S (g.L ⁻¹)
FC1	0,16	3,6	0,14	4,56
	0,05	3,9	0,74	1,00
	0,27	2,9	0,14	4,79
FC4	0,17	6,7	0,56	0,22
	0,06	7,1	0,95	3,68
	0,28	5,0	0,05	3,85

Figura 4.2. a) *Pellet* obtido em cultivo em incubador rotativo durante teste de produção de retamicina; lâmina sem tratamento. b). *Pellet* obtido em cultivo em fermentador; lâmina sem tratamento. c). *Pellets*, *clumps* e hifas obtidos em cultivo em fermentador; lâmina após tratamento para análise morfológica.

Figura 4.3. Fermentador ao final de um cultivo contínuo. a) Vista externa do fermentador. b) Vista interna do fermentador. c) Detalhe da extremidade do eletrodo de oxigênio dissolvido.

O ensaio FC1 foi conduzido para testar as bombas de alimentação de meio e retirada do caldo para obter-se as três diferentes velocidades específicas de

crescimento sem controle da concentração de oxigênio dissolvido, conforme mostra a figura 4.4. A análise morfológica resultou em 47% de *clumps*, 18% de *pellets* e 35% de hifas, na última condição de velocidade específica de alimentação ($D = 0,27 \text{ h}^{-1}$), em área. Este resultado é diferente do obtido por Pamboukian (2003), que foi de aproximadamente 90% de *pellets* para a mesma velocidade específica de crescimento, porém a frequência de agitação foi de 500 rpm. Em nenhuma condição Pamboukian (2003) obteve uma porcentagem de hifas totais acima de 12%. Estes resultados serão comparados aos obtidos nos demais ensaios no item 4.2.3.

O ensaio FC4 (figura 4.5) foi conduzido para testar uma rotina desenvolvida no *Labview* para controle da concentração de oxigênio dissolvido pela adição de oxigênio puro (O_2) ou de nitrogênio puro (N_2) à corrente de ar. Os resultados são mostrados na figura 4.5b e 4.5c. O controle mostrou-se eficaz quando os parâmetros PID foram fixados em -3, -3 e -2, respectivamente. Pode-se observar uma variação da concentração de oxigênio dissolvido quando a vazão específica de alimentação é alterada (aproximadamente após 50 h de cultivo). Esta variação é de curta duração, cerca de 1 h, em relação à duração do ensaio. A substituição de O_2 por N_2 também provoca uma perturbação no sistema que, novamente, é temporária. Esta estratégia foi adotada para os ensaios subseqüentes com controle da concentração de oxigênio dissolvido.

No ensaio FC4, depois de esgotado o meio no balão de alimentação, o cultivo foi conduzido por mais 12h em descontínuo, para exaustão da glicose no biorreator. Observa-se que a concentração celular e de retamicina finais são próximas das observadas no início da alimentação, indicando uma estabilidade do microrganismo.

Figura 4.4. Resultados obtidos no ensaio FC1: a) concentração celular ($\diamond$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) concentração de oxigênio dissolvido.

Figura 4.5. Resultados obtidos no ensaio FC4: a) concentração celular ($\diamond$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) concentração de oxigênio dissolvido; c) vazão de ar e de O₂ ou N₂.

4.2. ENSAIOS PREVISTOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial destes ensaios encontra-se na Tabela 3.1, item 3.6.

Na tabela 4.3 comparam-se os valores de projeto da vazão específica de alimentação aos obtidos experimentalmente.

Tabela 4.3. Comparação entre os valores de projeto da vazão específica de alimentação e os obtidos experimentalmente.

Ensaio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
D projeto (h^{-1})	0,05	0,05	0,05	0,05	0,25	0,25	0,25	0,25
D real (h^{-1})	0,05	0,05	0,05	0,05	0,25	0,24	0,25	0,25
Ensaio	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6		
D projeto (h^{-1})	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15		
D real (h^{-1})	0,15	0,17	0,16	0,15	0,14	0,14		

A concentração de glicose no balão de alimentação quando foi estabelecido o estado estacionário para as condições de cultivo é apresentada na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Concentração de glicose (g.L^{-1}) no balão de alimentação quando foi estabelecido o estado estacionário para todas as condições de cultivo.

Ensaio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
S (g.L^{-1})	10,1	9,9	10,3	9,8	10,1	10,0	10,3	10,3
Ensaio	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6		
S (g.L^{-1})	10,0	10,0	11,0	9,9	10,3	10,8		

Os resultados dos ensaios do planejamento conforme descrito no item 3.6 são apresentados na tabela 4.5 e nas figuras 4.6 a 4.10. As tabelas com todos os resultados encontram-se no Anexo 1.

Tabela 4.5. Matriz dos ensaios, concentração celular, de retamicina, de glicose, cv para definição do estado estacionário e média, desvio padrão e cv para os ensaios no ponto central (PC1 a PC6).

Ensaio	N	OD	μ	X (g.L ⁻¹)	cv (%) [*]	Ret (UA)	cv (%) [*]	S (g.L ⁻¹)	cv (%) [*]
I	-1	-1	-1	6,06	3	1,87	2	0,21	173
II	+1	-1	-1	4,97	1	0,71	3	2,74	1
III	-1	+1	-1	5,58	1	1,60	1	0,00	173
IV	+1	+1	-1	3,80	2	0,94	2	0,00	173
V	-1	-1	+1	4,02	3	0,09	4	6,90	3
VI	+1	-1	+1	3,10	5	0,02	13	7,46	4
VII	-1	+1	+1	4,37	1	0,13	8	5,87	1
VIII	+1	+1	+1	3,89	1	0,01	101	6,23	1
Variáveis codificadas				-1		0		+1	
N (rpm)				300		500		700	
OD (%)				20		50		80	
μ (h⁻¹)				0,05		0,15		0,25	
Ensaio	N	OD	μ	X (g.L ⁻¹)	cv (%) [*]	Ret (UA)	cv (%) [*]	S (g.L ⁻¹)	cv (%) [*]
PC1	0	0	0	4,59	2	0,35	2	5,50	6
PC2	0	0	0	3,94	5	0,52	2	4,94	31
PC3	0	0	0	5,51	1	0,20	5	4,43	36
PC4	0	0	0	4,45	3	0,34	2	4,52	11
PC5	0	0	0	5,17	2	0,27	5	3,67	23
PC6	0	0	0	5,11	2	0,30	4	4,40	2
média				4,79		0,33		4,59	
desvio padrão				0,57		0,11		0,62	
cv (%)^{**}				12		32		13	

Observação: * para verificação do estado estacionário.

** para avaliar a variabilidade do processo

As determinações das concentrações celular e de retamicina foram feitas durante os ensaios e as análises para determinação da concentração de glicose foram feitas posteriormente, nas amostras armazenadas congeladas. O tempo de cultivo necessário, em cada condição, para atingir-se o estado estacionário variou entre 3 e 4,8 tempos de residência ($TR = 1/D = 1/\mu$). Os coeficientes de variação (cv) calculados para a glicose foram inferiores ou iguais a 6% para os ensaios **II**, **V**, **VI**, **VII**, **VIII**, **PC1** e **PC6**. O alto valor de cv para a concentração de glicose para os ensaios **I**, **III** e **IV** justifica-se por serem as concentrações próximas de zero. Valores de cv acima de 5% também foram observados para a concentração de retamicina nos ensaios **VI**, **VII** e **VIII**, igualmente próximas de zero.

Nos ensaios do grupo 1, o controle da concentração de oxigênio dissolvido funcionou, apesar de um problema na alimentação de ar, conforme indicado na figura 4.6b. Este problema foi contornado substituindo a tubulação de entrada de ar por uma mangueira conectada diretamente ao fluxômetro, conforme mostram as figuras 4.7b, 4.8b, 4.9b e 4.10b

A figura 4.8b mostra que a modificação na alimentação de ar para o reator e a disponibilidade de nitrogênio/oxigênio permitiram o controle da concentração de oxigênio dissolvido no reator, exceto durante o ensaio **PC4**, no período entre aproximadamente 150 e 170h de cultivo. Não foi possível identificar o motivo que impossibilitou a condução do reator nesta condição. Este ensaio foi repetido no grupo 4. O ensaio **I** foi conduzido com sucesso.

O ensaio do grupo 4, **PC4**, foi interrompido por falta de energia com 45,5 h de cultivo. A figura 4.9b mostra que houve perturbação do sistema a partir deste instante. Os ensaios **PC5** e **PC6** foram realizados no grupo 5, conforme mostrado na figura 4.10. Pode-se observar na figura 4.10a que o estado estacionário definido com base na concentração celular e de retamicina no ensaio **PC5** foi mantido até o fim do ensaio **PC6**, contribuindo para a validade do critério adotado (o estabelecimento do estado estacionário pode basear-se no cálculo do coeficiente de variação e que o valor de 5% é adequado). Observa-se uma diferença entre as concentrações de glicose ao fim do ensaio **PC-5** e **PC-6**, figura 4.10b. O controle da concentração de oxigênio dissolvido

em 50% foi mantido ao longo deste cultivo, conforme mostra a figura 4.10c. A vazão total de ar + O₂/N₂ foi de 4 slpm (*standard liters per minute*), figura 4.10c.

Figura 4.6. Resultados do grupo 1: a) concentração celular (♦), de retamicina (■) e de glicose (▲); b) concentração de oxigênio dissolvido (em vermelho) e frequência de agitação (em azul).

Figura 4.7. Resultados do grupo 2: a) concentração celular ($\diamond$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido (em vermelho) e frequência de agitação (em azul); c). Vazão de ar (em azul) e de O₂ ou N₂ (em vermelho).

Figura 4.8. Resultados do grupo 3: a) concentração celular ($\blacklozenge$), de retamicina ($\blacksquare$) e glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido (em vermelho) e frequência de agitação (em azul); c) Vazão de ar (em azul), de O_2 ou N_2 (em vermelho) e de ar + O_2 ou N_2 (em preto).

Figura 4.9. Resultados do grupo 4: a) concentração celular ($\diamond$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido (N = 500 rpm); c) Vazão de ar (em azul) e de O₂/N₂ (em vermelho).

Figura 4.10. Resultados do grupo 5: a) concentração celular ($\blacklozenge$), de retamicina ($\blacksquare$) e de glicose ($\blacktriangle$); b) Concentração de oxigênio dissolvido (N = 500 rpm); c) Vazão de ar (em azul), vazão de N₂ (em vermelho) e vazão de ar + N₂ (em preto).

Na figura 4.11 apresentam-se os resultados da concentração celular, da velocidade específica de crescimento e da concentração de glicose na fase descontínua para os cinco grupos de ensaio. A velocidade específica de crescimento máxima foi estimada, em $0,33 \text{ h}^{-1}$, valor próximo ao determinado por Pamboukian (2003), igual a $0,31 \text{ h}^{-1}$. Deve-se observar que a concentração de oxigênio dissolvido foi superior a 60% durante esta fase em todos os ensaios. Pode-se perceber a boa reprodutibilidade dos resultados desta fase descontínua para a concentração celular, figura 4.11a. O mesmo, entretanto, não se observou para a concentração de glicose (figura 4.11b), que pode ser explicada por problemas no procedimento de análise (como diluição). A concentração de retamicina nesta fase foi sempre nula até 12h e atingiu um valor máximo da ordem de 0,05 UA, sendo, por estes motivos, não representada.

Figura 4.11. Fase descontínua para os cinco grupos de ensaio onde (+), (x), (), (Δ) e ($\diamond$) representam os resultados para cada grupo de ensaios; ($\blacksquare$) e ($\bullet$) os valores médios para a concentração celular e de glicose: a) Concentração celular; b) velocidade específica de crescimento; c) concentração de glicose.

Pode-se observar na tabela 4.5 em negrito que os melhores resultados para produção de retamicina foram obtidos para menor a velocidade específica de crescimento (μ). A frequência de agitação também interfere no processo, sendo os melhores resultados para os ensaios I e III, onde $N = 300\text{rpm}$. Não é evidente a influência da concentração de oxigênio dissolvido, na faixa estudada. A variabilidade do processo foi estimada calculando-se o cv para os ensaios no ponto central. O cv para a concentração celular foi igual a 12% e de glicose igual a 13% (baixos), porém este foi de 32% para a retamicina, valor que pode ser considerado elevado.

4.2.1. Tratamento estatístico

Empregou-se o *software* MINITAB para a avaliação da influência das variáveis isoladamente, suas interações duas a duas e da interação das três sobre a concentração celular e de retamicina, para o cálculo dos coeficientes do modelo por regressão linear múltipla com variáveis codificadas, para a curvatura, para o cálculo dos resíduos e para os gráficos, conforme mostram as tabelas 4.6 a 4.8 e figuras 4.12 e 4.13. O Anexo 2 apresenta estes cálculos detalhadamente.

Conforme se pode observar a partir da tabela 4.6 e figura 4.12a, apenas a velocidade específica de crescimento e a frequência de agitação apresentaram influência sobre a produção celular, conforme avaliação dos efeitos para $P \leq 0,10$ (10%). Os valores negativos dos coeficientes indicam maior produção celular para variáveis codificadas iguais a -1, $N = 300$ rpm e $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ e igual importância, pois os valores são da mesma ordem de grandeza.

A tabela 4.7 e figura 4.13a mostram que a frequência de agitação (N), a velocidade específica de crescimento (μ) e sua interação apresentaram influência sobre a produção de retamicina, analisando-se os efeitos para $P \leq 0,10$ (10%). Também aqui melhores resultados foram obtidos para menores valores de N e μ . Pode-se ainda concluir ser maior a influência de μ , pois seu coeficiente é quase 2,5 vezes o valor do coeficiente de N e ainda maior que o da interação $N*\mu$.

Tabela 4.6. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração celular (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		4,4737	0,2018	22,17	0,000	
N	-1,0675	-0,5337	0,2018	-2,64	0,046	
OD	-0,1275	-0,0637	0,2018	-0,32	0,765	
μ	-1,2575	-0,6288	0,2018	-3,12	0,026	
N*OD	-0,0625	-0,0313	0,2018	-0,15	0,405	
N* μ	0,3675	0,1837	0,2018	0,91	0,145	
OD* μ	0,6975	0,3488	0,2018	1,73	0,515	
N*OD* μ	0,2825	0,1413	0,2018	0,70	0,515	
Ponto central		0,3196	0,3083	1,04	0,347	
Coeficiente de correlação: R ² = 0,8						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	5,4742	5,4742	1,8247	5,60	0,047
Interações 2x2	3	1,2509	1,2509	0,4170	1,28	0,377
Interações 3x3	1	0,1596	0,1596	0,1596	0,49	0,515
Curvatura	1	0,3502	0,3502	0,3502	1,07	0,347
Erro residual	5	1,6289	1,6289	0,3258		
Erro puro	5	1,6289	1,6289	0,3258-		
Total	13	8,8639				

Os resíduos para a concentração celular e de retamicina, calculados com o *software* MINITAB, são detalhados na tabela 4.8 e apresentados nas figuras 4.12b e 4.13b. Pode-se observar que os resíduos são maiores tanto para a concentração celular quanto de retamicina nos ensaios PC2 e PC3 (em negrito).

Tabela 4.7. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração de retamicina (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		0,6713	0,03806	17,64	0,000	
N	-0,5025	-0,2512	0,03806	-6,60	0,001	
OD	-0,0025	-0,0012	0,03806	-0,03	0,975	
μ	-1,2175	-0,6088	0,03806	-16,00	0,000	
N*OD	0,1125	0,0562	0,03806	1,48	0,199	
N* μ	0,4075	0,2038	0,03806	5,35	0,003	
OD* μ	0,0175	0,0087	0,03806	0,23	0,827	
N*OD* μ	-0,1375	-0,0688	0,03806	-1,81	0,131	
Ponto central		-0,3419	0,05813	5,88	0,002	
Coeficiente de correlação: R² = 0,98						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	3,4696	3,4696	1,1565	99,82	0,000
Interações 2x2	3	0,3580	0,3580	0,1193	10,30	0,014
Interações 3x3	1	0,0378	0,0378	0,0378	3,26	0,131
Curvatura	1	0,4008	0,4008	0,408	34,59	0,002
Erro residual	5	0,0579	0,0579	0,0116		
Erro puro	5	0,0579	0,0579	0,0116		
Total	13	4,3242

Figura 4.12. Gráfico de probabilidade (a) e de resíduos (b) para a concentração celular.

Figura 4.13. Gráfico de probabilidade(a) e de resíduos (b) para a concentração de retamicina.

A figura 4.14 apresenta o *dotplot* para a concentração de retamicina em função da concentração celular para os ensaios no ponto central. Os retângulos em azul representam as projeções dos resultados obtidos nos ensaios PC2 e PC3 nos eixos, o ponto vermelho a média e os lados do retângulo vermelho o desvio padrão.

Figura 4.14. *Dotplot* para a concentração de retamicina em função da concentração celular para os ensaios no ponto central.

Os ensaios **PC2** e **PC3** apresentam resíduos maiores que os demais ensaios no ponto central, tanto para a concentração celular quanto de retamicina. Observa-se na figura 4.14 que estes resultados não estão contidos no retângulo vermelho. Estas discrepâncias podem ocultar a influência de fatores e interações. Descartando-se estes dois experimentos, recalculando-se o modelo estatístico e a ANOVA com quatro ensaios no ponto central, tem-se os resultados mostrados nas tabelas 4.9 e 4.10.

Tabela 4.9. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração celular; unidades codificadas (4 ensaios no ponto central).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		4,4737	0,1285	34,83	0,000	
N	-1,0675	-0,5337	0,1285	-4,16	0,025	
OD	-0,1275	-0,0637	0,1285	-0,50	0,654	
μ	-1,2575	-0,6288	0,1285	-4,89	0,016	
N*OD	-0,0625	-0,0313	0,1285	-0,24	0,823	
N* μ	0,3675	0,1837	0,1285	1,43	0,248	
OD* μ	0,6975	0,3488	0,1285	2,72	0,073	
N*OD* μ	0,2825	0,1413	0,1285	1,10	0,352	
Ponto central		0,3196	0,2225	1,60	0,208	
Coeficiente de correlação: R² = 0,94						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	5,4742	5,4742	1,8247	13,82	0,029
Interações 2x2	3	1,2509	1,2509	0,4170	3,16	0,185
Interações 3x3	1	0,1596	0,1596	0,1596	1,21	0,352
Curvatura	1	0,3384	0,3384	0,3384	2,56	0,208
Erro residual	3	0,3960	0,3960	0,1320		
Erro puro	3	0,3960	0,3960	0,1320		
Total	11	7,6192				

Os coeficientes do modelo estatístico independem dos ensaios no ponto central.

Tabela 4.10. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a concentração de retamicina; unidades codificadas (4 ensaios no ponto central).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		0,6713	0,01277	52,58	0,000	
N	-0,5025	-0,2512	0,01277	-19,68	0,000	
OD	-0,0025	-0,0012	0,01277	-0,10	0,928	
μ	-1,2175	-0,6088	0,01277	-47,68	0,000	
N*OD	0,1125	0,0562	0,01277	4,41	0,022	
N* μ	0,4075	0,2038	0,01277	15,96	0,001	
OD* μ	0,0175	0,0087	0,01277	0,69	0542	
N*OD* μ	-0,1375	-0,0688	0,01277	-5,38	0,013	
Ponto central		-0,3419	0,02211	-16,16	0,001	
Coeficiente de correlação: R² = 0,9993						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	3,4696	3,4696	1,1565	886,92	0,000
Interações 2x2	3	0,3580	0,3580	0,1193	91,52	0,002
Interações 3x3	1	0,0378	0,0378	0,0378	29,00	0,013
Curvatura	1	0,3403	0,3403	0,3403	261,00	0,001
Erro residual	3	0,0039	0,0039	0,0013		
Erro puro	3	0,0039	0,0039	0,0013		
Total	11	4,2097				

A eliminação dos ensaios **PC2** e **PC3** permite melhor avaliar a influência dos fatores isoladamente e suas interações, além de resultar em um melhor coeficiente de correlação. Com relação à concentração celular (tabela 4.9 e figura 4.15), pode-se observar que, além da influência de N e μ , há influência da interação OD* μ , com coeficiente igual a 0,3488. Para a concentração de retamicina (tabela 4.10 e figura 4.16), além da influência de N, μ e N* μ , há influência das interações N*OD coeficiente igual a 0,0562 e N*OD* μ , com coeficiente igual a -0,0688. Portanto, percebe-se pouca influência das interações N*OD e N*OD* μ sobre a produção de retamicina, pelos baixos valores dos coeficientes calculados por regressão linear múltipla.

Os resultados obtidos estão em concordância com a literatura no que se refere à influência da frequência de agitação e da velocidade específica de crescimento. Porém, estes resultados diferem dos discutidos no item 2.5 com relação à influência da concentração de oxigênio dissolvido, no intervalo estudado (de 20% a 80%). Chen e Wilde (1991) e Shioya *et al.* (1999) obtiveram melhores resultados garantindo uma concentração de oxigênio dissolvido acima de 80% da concentração de saturação em cultivos de *Streptomyces fradie* e *Streptomyces virginiae*, respectivamente. Martins (2001) obteve melhores resultados quando a frequência de agitação foi igual a 500 ou 700 rpm e maior aeração. Também Martins (2004) concluiu ser importante o fornecimento de oxigênio durante a fase de crescimento celular. Por outro lado, Shioya *et al.* (1999) observaram uma diminuição da velocidade específica de crescimento com o aumento da frequência de agitação.

A análise da curvatura com relação a μ (figura 4.17a e 4.17b), fator que mostrou maior influência, mostra que ela é significativa apenas para a concentração de retamicina. Conforme mostra a figura 4.17a, para a concentração celular não há diferença importante entre o valor médio previsto pelo modelo e os obtidos experimentalmente. Para a concentração de retamicina, figura 4.17b, esta diferença não pode ser desprezada. A linha tracejada mostra o valor médio previsto pelo modelo enquanto a cheia os valores experimentais. Esta mesma avaliação sobre os resultados obtidos no ponto central e os previstos pelo modelo aplica-se aos demais fatores, conforme mostram as figuras 4.17c, 4.17d, 4.17e e 4.17f.

O cálculo do resíduo para a concentração celular e de retamicina, excluindo-se os ensaios **PC2** e **PC3** é detalhado na tabela 4.11.

Figura 4.15. Gráfico de probabilidade (a) e de resíduos (b) para a concentração celular, eliminando-se os ensaios PC2 e PC3.

Figura 4.16. Gráfico de probabilidade (a) e de resíduos (b) para a concentração de retamicina, eliminando-se os ensaios PC2 e PC3.

Figura 4.17. Avaliação da curvatura: a) concentração celular em função de μ ; b) concentração de retamicina em função de μ ; c) concentração celular em função de N ; d) concentração de retamicina em função de N ; e) concentração celular em função de OD ; e) concentração de retamicina em função de OD .

Tabela 4.11. Cálculo do resíduo (Y = resposta de interesse, X ou Ret) – 4 ensaios no ponto central.

	X (g/L)	X calc	resíduo	Ret (UA)	Ret calc	resíduo
I	6,06	6,06	0,00	1,87	1,87	0,00
II	4,97	4,97	0,00	0,71	0,71	0,00
III	5,58	5,58	0,00	1,60	1,6	0,00
IV	3,80	3,8	0,00	0,94	0,94	0,00
V	4,02	4,02	0,00	0,09	0,09	0,00
VI	3,10	3,1	0,00	0,02	0,02	0,00
VII	4,37	4,37	0,00	0,13	0,13	0,00
VIII	3,89	3,89	0,00	0,01	0,01	0,00
		Xmpc			Ret mpc	
PC1	4,59	4,83	-0,24	0,35	0,31	0,04
PC4	4,45	4,83	-0,38	0,34	0,31	0,02
PC5	5,17	4,83	0,34	0,27	0,31	-0,04
PC6	5,11	4,83	0,28	0,30	0,31	-0,01
Y calc = valor calculado pelo modelo por regressão linear múltipla Y mpc = valor médio para os ensaios no ponto central Resíduo = (Y - Y calc) para ensaios I até VIII (Y - Y mpc) para ensaios no PC						

O cálculo dos modelos por regressão linear múltipla, dos efeitos e ANOVA para todas as respostas de interesse encontra-se no anexo 2. As equações obtidas, incluindo-se os ensaios no ponto central e desprezados os fatores e interações não significativos, foram (variáveis codificadas):

$$X_c = 4,4737 - 0,5337*N - 0,0637*OD - 0,6288*\mu + 0,3488*OD*\mu, R^2 = 0,8 \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} Ret_c = & 0,6713 - 0,2512*N - 0,0012*OD - 0,6088*\mu + 0,0562*N*OD + 0,2038*N*\mu \\ & - 0,0688*N*OD*\mu, R^2 = 0,9990 \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$S_c = 3,6763 - 0,6512*OD + 2,9388*\mu, R^2 = 0,93 \quad (4.3)$$

$$Y_{x/sc} = 0,8319 - 0,1140*OD + 0,2728*\mu, R^2 = 0,90 \quad (4.4)$$

$$Y_{x/s \text{ corr}} = 0,3652 - 0,0264*N - 0,0212*OD + 0,032*\mu + 0,0226*OD*\mu + 0,0173*N*OD*\mu, R^2 = 0,8 \quad (4.5)$$

$$Y_{ret/sc} = 0,0759 - 0,02456*N - 0,05896*\mu, R^2 = 0,93 \quad (4.6)$$

$$P_{xc} = 0,6082 - 0,0617*N + 0,0253*OD + 0,3531*\mu + 0,0459*OD*\mu, R^2 = 0,98 \quad (4.7)$$

$$P_{retc} = 0,0398 - 0,0173*N + 0,0007*OD - 0,0242*\mu + 0,0054*N*\mu - 0,0047*N*OD*\mu, R^2 = 0,98 \quad (4.8)$$

$$Y_{ret/xc} = 0,1308 - 0,0310*N + 0,0108*OD - 0,1155*\mu + 0,0144*N*OD + 0,0202*N*\mu - 0,0172*N*OD*\mu, R^2 = 0,997 \quad (4.9)$$

$$P_{ret} / X_c = 0,00807 - 0,00263*N - 0,00425*\mu, R^2 = 0,8 \quad (4.10)$$

A Tabela 4.12 apresenta os coeficientes dos fatores e suas interações sobre as respostas. Pode-se observar que a velocidade específica de crescimento é mais significativa, pois aparece em todas as equações e com maior valor em módulo.

A figura 4.18 apresenta as respostas de interesse, conforme apresentadas na tabela 4.13. Pode-se observar nos ensaios **I** até **IV** ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$), conforme figuras 4.18a, 4.18c e 4.18d, uma maior produção de retamicina, melhores produções específicas e produtividade específica e, ainda, a influência da frequência de agitação $N = 300 \text{ rpm}$ nos ensaios **I** e **III**. Houve maior produtividade celular nos ensaios **V** a **VIII**, com igual influência de N , mostrada a figura 4.18b. O fator de conversão $Y_{x/s \text{ corr}}$ apresenta menor variação que o $Y_{x/s}$, como indicado na figura 4.18b.

Tabela 4.12. Coeficientes dos fatores e interações significativos.

Resposta	N	OD	μ	N*OD	N* μ	OD* μ	N*OD* μ
X	-0,5337	-0,0637	0,6288	-----	-----	0,3488	-----
Ret	-0,2512	-0,0012	-0,6088	0,0562	0,2038	-----	-0,0688
S	-----	-0,6512	2,9388	-----	-----	-----	-----
Yx/s	-----	-0,1140	0,2728	-----	-----	-----	-----
Yx/s corr	-0,0264	-0,0212	0,032	-----	-----	0,0226	0,0173
Yret/s	-0,0246	-----	-0,059	-----	-----	-----	-----
Px	-0,0617	0,0253	0,3531	-----	-----	0,0459	-----
Pret	-0,0173	0,0007	-0,0242	-----	0,0054	-----	-0,0047
Yret/x	-0,0310	0,0108	-0,1155	0,0144	0,0202	-----	-0,0172
Pret / X	-0,0026	-----	-0,0042	-----	-----	-----	-----

Tabela 4.13. Concentração celular, de retamicina, de glicose, produtividades, fatores de conversão e produtividade específica para os ensaios do planejamento fatorial e ponto central, exceto PC2 e PC3.

	X	Ret	S	Px	Pret	Yret/x	Yx/s	Yx/s corr	Yret/s	Pret / X
	(g/L)	(UA)	(g/L)	(g/(L.h))	(UA/h)	(UA/(g/L))	(g/g)	(g/g)	(UA/(g/L))	(UA/((g/L)*h))
I	6,06	1,87	0,21	0,303	0,094	0,309	0,61	0,38	0,189	0,015
II	4,97	0,71	2,74	0,249	0,036	0,143	0,69	0,37	0,099	0,007
III	5,58	1,60	0,00	0,279	0,080	0,287	0,54	0,34	0,155	0,014
IV	3,80	0,94	0,00	0,190	0,047	0,247	0,39	0,24	0,096	0,012
V	4,02	0,09	6,90	1,005	0,023	0,022	1,26	0,43	0,028	0,006
VI	3,10	0,02	7,46	0,775	0,005	0,006	1,22	0,36	0,008	0,002
VII	4,37	0,13	5,87	1,093	0,033	0,030	0,99	0,42	0,029	0,007
VIII	3,89	0,01	6,23	0,973	0,003	0,003	0,96	0,38	0,002	0,001
PC1	4,59	0,35	5,50	0,689	0,053	0,076	1,02	0,43	0,078	0,011
PC4	4,45	0,34	4,52	0,668	0,050	0,076	0,83	0,39	0,062	0,011
PC5	5,17	0,27	3,67	0,780	0,043	0,055	0,78	0,41	0,043	0,008
PC6	5,11	0,30	4,40	0,762	0,044	0,058	0,79	0,41	0,046	0,009
média	4,83	0,31	4,52	0,725	0,047	0,066	0,86	0,41	0,057	0,010
desv pad	0,36	0,04	0,75	0,055	0,005	0,011	0,11	0,02	0,016	0,002
cv (%)	8	12	17	8	10	17	13	5	28	17

Figura 4.18. Resultados obtidos para os ensaios do planejamento fatorial e ponto central: a) Concentração celular, de retamicina e de glicose; b) fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{x/s\ corr}$ e produtividade celular P_x ; c) Produtividade de retamicina e produções específicas $Y_{ret/x}$ e $Y_{ret/s}$; d) Produtividade específica P_{ret} / X .

Os coeficientes de variação calculados para o ponto central, tabela 4.13, para a concentração celular e de retamicina foram baixos (ambos inferiores a 15%). O fator de conversão $Y_{x/s}$ apresentou um coeficiente de variação superior ao $Y_{x/s\ corr}$. O valor médio de $Y_{x/s}$ igual a $0,86 \pm 0,11 \text{ g.g}^{-1}$ é muito maior que o obtido por Inoue (2006) em cultivos contínuos com meio definido e limitação da fonte de carbono, igual a $0,41 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$. O valor médio de $Y_{x/s\ corr}$ para os ensaios no ponto central foi igual a $0,41 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$ e igual a $0,38 \pm 0,05 \text{ g.g}^{-1}$ para todos os ensaios.

As figuras 4.19 a 4.28 apresentam os gráficos em três dimensões para melhor visualização da influência dos fatores sobre as variáveis de interesse. É importante enfatizar que as superfícies de resposta obtidas com o modelo estatístico adotado são planos ou planos distorcidos por não incluir os termos quadráticos, x_1^2 , x_2^2 e x_3^2 (RODRIGUES e IEMMA, 2005). O *software* MINITAB apresenta duas opções para o planejamento dos experimentos de forma a obter-se superfícies de resposta distintas da adotada neste projeto, modelo composto central ou modelo de Box-Behnken.

A figura 4.19a mostra a menor influência da frequência de agitação (N) e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) sobre a concentração celular. Observou-se maior coerência entre os planos e os resultados quando um destes fatores foi substituído pela velocidade específica de crescimento (μ), figuras 4.19b e 4.19c.

A figura 4.20 apresenta a concentração de retamicina em função das variáveis codificadas; pode-se notar a maior influência de μ pelas figuras 4.20b e 4.20c.

A figura 4.21 mostra a menor influência da interação entre a frequência de agitação (N) e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) sobre a concentração de substrato. Observa-se o mesmo para o fator de conversão Yx/s , figura 4.22.

A figura 4.23 mostra que o fator de conversão de substrato em células corrigido (Yx/s corr) varia pouco em função dos fatores na faixa escolhida, conforme observado anteriormente.

Figura 4.19. Concentração celular (X) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD ; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.20. Concentração de retamicina em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.21. Concentração de substrato em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ .

A figura 4.24 mostra que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{ret/s}$) varia pouco em função da frequência de agitação (N) e a concentração de oxigênio dissolvido (OD); há maior influência da velocidade específica de crescimento (μ).

De uma forma geral, observa-se que a interação entre a frequência de agitação (N) e a concentração de oxigênio dissolvido (OD) tem pouca influência sobre o processo nos intervalos de estudo dos fatores, figuras 4.25 a 4.28.

A influência dos fatores isoladamente e de suas interações pode ser visualizada com os gráficos de probabilidade, figuras 4.29 a 4.32, destacando-se aqueles significativos (equações 4.1 a 4.10).

Figura 4.22. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD ; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.23. Fator de conversão de substrato em células corrigido ($Y_{x/s} \text{ corr}$, em g.g^{-1}) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.24. Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{ret/s}$, em $UA \cdot g^{-1} \cdot L$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD ; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.25. Produtividade celular (P_x , em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD ; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.26. Produtividade de retamicina (Pret, em $\text{UA}\cdot\text{h}^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.27. Produção específica ($Y_{ret/x}$, em $UA \cdot g^{-1} \cdot L$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD ; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.28. Produtividade celular ($Pret / X$, em $UA.g^{-1}.L.h^{-1}$) em função das variáveis codificadas, duas a duas: a) N e OD ; b) N e μ ; c) OD e μ .

Figura 4.29. Gráficos de probabilidade para a concentração celular, de retamicina e de glicose.

Figura 4.30. Gráficos de probabilidade para os fatores: a) Yx/s, b) Yx/s corr e c) Yret/s.

Figura 4.31. Gráficos de probabilidade para produtividade: a) celular (P_x) e b) de retamicina (P_{ret}).

Figura 4.32. Gráficos de probabilidade para: a) produção específica de retamicina (Y_{ret}/x) e b) produtividade específica de retamicina ($Pret / X$).

A figura 4.33 apresenta a concentração de retamicina em função das concentrações celular e de glicose para os ensaios I até VIII e os quatro ensaios no ponto central (PC1, PC4, PC5 e PC6). Uma avaliação sobre a variabilidade no ponto central será feita no item 4.2.2.

Figura 4.33. Concentração de retamicina em função das concentrações celular e de glicose para os ensaios I até VIII, PC1, PC4, PC5 e PC6.

4.2.2. Variabilidade no ponto central.

Conforme mencionado no item 2.7, a adição de ensaios no ponto central permite avaliar a reprodutibilidade do processo. A execução dos ensaios previstos no item 3.6, tabela 3.1, foi definida por sorteio. Desta forma apenas no grupo 1 houve mais de um experimento no ponto central, os ensaios **PC1** e **PC2**, sendo o último descartado. Foi executado mais um grupo de ensaios conforme mostra a tabela 4.14 para avaliar a variabilidade no ponto central e traçar os planos de fases $Ret = f(X)$ e $Ret = f(S)$. Estes planos ajudam a visualizar a dinâmica do processo até atingirem-se os estados estacionários nos ensaios no ponto central. O gráfico em três dimensões também

permite visualizar a diferença entre os estados estacionários atingidos para os ensaios no ponto central.

Tabela 4.14. Experimentos para avaliar a variabilidade no ponto central.

	Ensaio	N (rpm)	OD (%)	μ (h^{-1})	TR (h)
Grupo 7	PC7	500	50	0,15	7
Grupo 8	C1	700	50	0,15	7
	PC8	500	50	0,15	7
	C2	500	50	0,05	20
	PC9	500	50	0,15	7

O grupo 7 foi interrompido por problemas com o anti-espumante, aproveitando-se apenas o ensaio PC7. Os ensaios C1 e C2, diferentes dos previstos no planejamento fatorial, serviram para que os ensaios PC8 e PC9 fossem iniciados com condições diferentes das anteriores.

A tabela 4.15 mostra os resultados obtidos nos grupos 7 e 8 e a figura 4.34a, mostra os resultados obtidos no grupo 8; as tabelas correspondentes encontram-se no anexo 1. As concentrações celular, de retamicina e de glicose medidas no estado estacionário para os ensaios PC8 e PC9 foram próximas, sendo as diferenças entre elas inferiores ao desvio padrão calculado para os nove ensaios no ponto central, conforme mostra a tabela 4.16. Os planos de fases, figuras 4.34b e 4.34c ilustram esta proximidade de resultados, indicando reprodutibilidade do estado estacionário, independentemente da condição de cultivo anterior. Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por Oh e Serentz (1993), mostrados na figura 2.5 e por Ensari e Lim (2003), mostrados na figura 2.7 (capítulo 2). Os autores também atingiram estados estacionários independentemente da condição de cultivo anterior.

Tabela 4.15. Resultados para os ensaios dos grupos 7 e 8.

	X (g/L)	Ret (UA)	S (g/L)
PC7	5,19	0,26	5,57
C - 1	4,63	0,22	5,50
PC8	5,71	0,47	4,80
C - 2	6,15	1,18	0,00
PC9	6,07	0,43	5,36

Tabela 4.16. Resultados para os nove ensaios no ponto central.

	X (g/L)	Ret (UA)	S (g/L)	Px (g/(L.h))	Pret (UA/h)	Pret/x (UA/(g/L))	Yx/s (g/g)	Yx/s corr (g/g)	Yret/s (UA/(g/L))	Pret / X (UA/((g/L)*h))
PC1	4,59	0,35	5,50	0,689	0,053	0,076	1,02	0,43	0,08	0,011
PC2	3,94	0,52	4,94	0,591	0,078	0,132	0,78	0,35	0,10	0,020
PC3	5,50	0,20	4,53	0,825	0,030	0,036	0,85	0,44	0,03	0,005
PC4	4,45	0,34	4,52	0,668	0,050	0,076	0,83	0,39	0,06	0,011
PC5	5,17	0,27	3,67	0,776	0,041	0,052	0,78	0,41	0,04	0,008
PC6	5,11	0,30	4,40	0,767	0,045	0,059	0,80	0,41	0,05	0,009
PC7	5,19	0,26	5,60	0,779	0,039	0,050	1,00	0,46	0,05	0,008
PC8	5,71	0,47	4,80	0,857	0,071	0,082	0,95	0,47	0,08	0,012
PC9	6,07	0,43	5,36	0,911	0,065	0,071	1,12	0,53	0,08	0,011
média	5,08	0,35	4,81	0,76	0,05	0,07	0,90	0,43	0,06	0,01
desv pad	0,66	0,11	0,62	0,10	0,02	0,03	0,12	0,05	0,02	0,00
cv (%)	13	30	13	13	30	39	14	12	36	39

A figura 4.35 facilita a visualização da proximidade dos estados estacionários obtidos nos ensaios **PC8** e **PC9**.

A figura 4.36 apresenta os nove resultados no ponto central para a concentração de retamicina em função da concentração celular, incluindo-se os desvios padrão. O ponto em vermelho representa o valor médio e o retângulo os desvios padrão. Pode-se observar a grande variabilidade para a concentração de retamicina, com concentração mínima medida igual a 0,20 UA e máxima igual a 0,52 UA. Estes valores para a concentração celular foram iguais a 3,94 g.L⁻¹ e 6,07 g.L⁻¹, respectivamente. Os coeficientes de variação foram iguais a 13% para as concentrações celular e de glicose, considerados baixos. O cv para a retamicina foi igual a 30%, considerado elevado.

A figura 4.37 igualmente ilustra a variabilidade dos ensaios no ponto central, pois inclui os nove ensaios (**PC1** a **PC9**), em contraste com a figura 4.33, que inclui apenas os ensaios **PC1**, **PC4**, **PC5** e **PC6** no ponto central.

4.2.3. Proposta de um modelo fenomenológico para a produção de retamicina

Um modelo não estatístico foi ajustado usando-se a ferramenta SOLVER do *software* Excel (HARRIS, 1998) para a concentração de retamicina em função da frequência de agitação (N) e da velocidade específica de crescimento (μ), desprezando-se a influência da concentração de oxigênio dissolvido incluindo-se os ensaios I até VIII e os ensaios PC1, PC4, PC5 e PC6. Estas considerações basearam-se na avaliação da influência dos fatores e interações feita com auxílio dos modelos estatísticos, conforme discutido no item 4.2.1. Também baseou-se no comportamento observado na figura 4.17b, onde a partir de valores médios calculados para cada valor de μ foi possível ajustar uma equação exponencial negativa (não apresentada) e na observação de uma relação inversa entre a concentração de retamicina e a frequência de agitação. Assim, propõe-se o seguinte modelo fenomenológico para a concentração de retamicina em estado estacionário:

$$\text{Retc} = (1005/N) * \exp (-12,79 * \mu) \quad (4.11)$$

Sendo:

- $\mu = D$ para o cultivo contínuo sem reciclo de células e $0,05 \text{ h}^{-1} \leq \mu \leq 0,25 \text{ h}^{-1}$
- $300 \text{ rpm} \leq N \leq 700 \text{ rpm}$.
- $\text{Ret} = 0,9982 * \text{Retc} + 0,0021$, $R^2 = 0,97$ (4.12)

Este modelo foi validado comparando-se os valores obtidos experimentalmente para todos os experimentos deste projeto e os reportados por Pamboukian (2003), para valores de μ entre $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,25 \text{ h}^{-1}$ e os calculados pela equação 4.11, mostrados na tabela 4.17. A correlação entre os valores medidos e calculados encontra-se na figura 4.38. Pamboukian (2003) propôs uma correlação entre a produtividade específica de retamicina e a velocidade específica de crescimento para cultivos descontínuo alimentados, sem incluir a frequência de agitação, com coeficiente de correlação R^2 igual a 0,8.

A figura 4.39 é a representação gráfica da equação 4.11.

Figura 4.34. Resultados do grupo 8: a) concentração celular, de retamicina e de glicose; b) plano de fases retamicina e concentração celular c) plano de fases retamicina e concentração de glicose.

Figura 4.35. Concentração de retamicina em função da concentração celular e de glicose para os ensaios do grupo 8, destacando-se os estados estacionários atingidos nos ensaios PC8 e PC9.

Figura 4.36. Concentração de retamicina em função da concentração celular para os nove ensaios no ponto central.

Figura 4.37. Concentração de retamicina em função das concentrações celular e de glicose para os ensaios I até VIII, PC1 até PC9.

Tabela 4.17. Comparação entre os resultados obtidos experimentalmente (Ret) em diversos ensaios e os calculados (Retc) pela equação 4.11, modelo fenomenológico.

Ensaio	μ (h^{-1})	N (rpm)	Ret (UA)	Retc (UA)
I	0,05	300	1,87	1,77
II	0,05	700	0,71	0,76
III	0,05	300	1,60	1,77
IV	0,05	700	0,94	0,76
V	0,25	300	0,09	0,14
VI	0,25	700	0,02	0,06
VII	0,25	300	0,13	0,14
VIII	0,25	700	0,01	0,06
PC1	0,15	500	0,35	0,30
PC4	0,15	500	0,34	0,30
PC5	0,15	500	0,27	0,30
PC6	0,15	500	0,30	0,30
C1	0,15	700	0,22	0,21
C2	0,05	500	1,18	1,06
Pamboukian (2003)	0,05	500	1,14	1,06
	0,1	500	0,37	0,56
	0,2	500	0,12	0,16
	0,25	500	0,09	0,08
PC8	0,15	500	0,47	0,30
PC9	0,15	500	0,43	0,30
PC7	0,15	500	0,26	0,30
PC2	0,15	500	0,20	0,30
PC3	0,15	500	0,52	0,30

Figura 4.38. Correlação entre os valores calculados pelo modelo fenomenológico e os obtidos experimentalmente para todos os ensaios deste projeto e os reportados por Pamboukian (2003).

Figura 4.39. Concentração de retamicina em função da freqüência de agitação e da velocidade específica de crescimento calculada pela equação 4.11.

4.3. RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os resultados obtidos na análise de atividade biológica descritos no item 3.4.5, encontram-se na tabela 4.17 e na figura 4.40. Uma correlação entre o diâmetro do halo de inibição (Φ , em mm) e a concentração de retamicina, expressa em absorbância, foi calculada por regressão linear, conforme mostrado na figura 4.41:

$$\text{Ret} = 0,2889 * \Phi - 1,4437 \quad (R^2 = 0,93) \quad (4.13)$$

Resultado semelhante foi obtido anteriormente, conforme ilustra a figura 4.1. Martins (1998) também obteve uma boa correlação entre o diâmetro do halo de inibição e a concentração de ciclamicina, um complexo antraciclínico produzido por *Streptomyces capoamus*. Esta metodologia pode ajudar a correlacionar a atividade biológica da retamicina com a de um antitumoral comercial, desde que o mesmo tipo de teste seja feito com o produto comercial, devido ao bom coeficiente de correlação.

Em cada placa foram colocados três discos, conforme mostrado na figura 4.42, sendo o resultados a média aritmética deles. O cv para os resultados obtidos nos ensaios no ponto central é de 3% (tabela 4.18).

Tabela 4.18. Teste de atividade biológica: diâmetro do halo de inibição (Φ) para os ensaios previstos no planejamento fatorial.

Ensaio	diâmetro halo inibição - Φ (mm)	Ret (UA)		
I	10,5	1,88		
II	7,9	0,72		
III	10,8	1,59		
IV	8,8	0,94		
V	5,1	0,09		
VI	6,0	0,02		
VII	5,7	0,13		
VIII	5,0	0,01		
PC1	5,7	0,35		Φ
PC4	5,7	0,34	média (mm)	5,8
PC5	6,0	0,27	desvio padrão	0,15
PC6	5,9	0,30	cv (%)	3

Figura 4.40. Diâmetro do halo de inibição (mm) para os ensaios previstos no planejamento fatorial (o diâmetro do disco de papel foi igual a 5mm).

Figura 4.41. Correlação entre o diâmetro do halo de inibição e a concentração de retamicina.

Figura 4.42. Diâmetro do halo de inibição (mm) para os ensaios previstos no planejamento fatorial (o diâmetro do disco de papel era de 5mm): a) ensaio I; b) ensaio II; c) ensaio III; d) ensaio IV; e) ensaio no ponto central; f) ensaio VIII.

4.4. RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Na tabela 4.19 e na figura 4.43 apresentam-se os resultados obtidos na análise morfológica para os ensaios **I** até **VIII** e no ponto central. Pode-se observar a não formação de *pellets* para maiores vazões específicas de alimentação, que correspondem a menores tempos de residência, ensaios **V** até **VIII**. A influência da frequência de agitação (N) faz-se notar na porcentagem de hifas, ensaios **I** até **VIII**. A frequência de agitação foi mantida em 300 rpm nos ensaios **I**, **III**, **V** e **VII** e 700 rpm nos ensaios **II**, **IV**, **VI** e **VIII**; observa-se uma maior porcentagem de hifas no segundo conjunto de experimentos, com maiores valores de N. Não parece haver influência da concentração de oxigênio dissolvido.

Tabela 4.19. Resumo da análise morfológica (porcentagem da área e área média expressa em μm^2 para cada classe morfológica).

porcentagem da area total				area media				
ensaio	hifas	pellets	clumps	ensaio	hifas	pellets	clumps	
I	23	21	56	I	221	30.488	2.826	
II	36	7	57	II	213	19.467	2.368	
III	23	18	60	III	207	27.195	3.660	
IV	41	0	59	IV	267	0	2.061	
V	2	0	98	V	428	0	4.118	
VI	33	0	67	VI	198	0	2.316	
VII	9	0	91	VII	243	0	3.156	
VIII	26	0	74	VIII	228	0	2.654	
PC1	7	0	93	PC1	256	0	5.479	
PC4	8	15	76	PC4	396	30.988	4.177	
PC5	6	16	78	PC5	352	48.699	6.056	
PC6	3	46	51	PC6	313	54.529	6.029	
MEDIA	6	19	75	MEDIA*	329	44.739	5.435	
DESVPAD	2	19	17	DESVPAD*	59	12.260	880	
cv (%)	36	100	23	cv (%)*	18	27	16	
				* Apenas para PC4, PC5 e PC6.				
				Geral	MEDIA**	277	35.228	3.742
					DESVPAD**	78	13.471	1.448
					cv (%)**	28	38	39
				** Não inclui ensaios IV ao PC1 para os pellets.				

A figura 4.43a mostra que a porcentagem de *pellets* foi igual a zero nos ensaios **V** até **VIII**, conduzidos com $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ (tempo de residência = TR = 4h) e N = 300rpm ou 700 rpm. Estes resultados diferem do obtido por Pamboukian (2003), que obteve mais de 80% de *pellets* para este valor de μ e N = 500 rpm. A porcentagem de *pellets* para os ensaios com $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (TR = 20h) variou em função de N, sendo maior para uma frequência de agitação igual a 300 rpm, ensaios **I** e **III** (21% e 18%, respectivamente).

A porcentagem de *clumps* foi praticamente constante para os ensaios **I** até **IV**. Portanto a porcentagem de hifas variou em função da porcentagem de *pellets*. Para os ensaios **V** a **VIII**, com $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (TR = 20h) observou-se uma influência de N, com maior porcentagem de *clumps* para os ensaios onde N = 300 rpm. Pamboukian (2004) observou cerca de 90% de *clumps* nestas condições de μ e com N = 500rpm.

A variabilidade do processo com relação à porcentagem em área de cada classe morfológica foi calculada para os ensaios no ponto central. Os valores de cv, apresentados na tabela 4.19 (fundo verde), são altos para hifas (36%) e *pellets* (100%) e foi médio para os *clumps* (23%).

A quantidade de *pellets* (número de objetos medidos classificados como *pellets*) foi muito inferior à das demais classes morfológicas. Porém sua área média foi muito maior, conforme mostram a tabela 4.19 e a figura 4.43b. Desta forma, esta pequena quantidade de objetos exerce grande influência sobre o resultado expresso em porcentagem da área total.

A área média dos *clumps* é aproximadamente 13,5 vezes a área média das hifas e a dos *pellets* é cerca de 9,5 vezes a dos *clumps*. Os coeficientes de variação foram elevados para os *pellets* e *clumps* ($cv > 30\%$) e médio para as hifas ($cv = 28\%$, fundo azul na tabela 4.19). Esta variação pode ser visualizada com auxílio da figura 4.44. Os dados reportados por Pamboukian (2003) foram incluídos na tabela 4.20, que observou coeficientes de variação ainda maiores (acima de 50%). Nenhum dos fatores, N, OD ou μ parece influir sobre a área média.

Figura 4.43. Resultado da análise morfológica para os ensaios **I** até **VIII** e do ponto central (**PC1**, **PC4**, **PC5** e **PC6**) em porcentagem da área total medida e área média em μm^2 .

Tabela 4.20. Área média (expressa em μm^2), desvio padrão e coeficiente de variação para as classes morfológicas medidas por Pamboukian (2003).

	<i>Clumps</i>	<i>Pellets</i>	Hifas
Área média	2.000	60.000	200
cv (%)	85	50	70

Figura 4.44. Áreas mínima, média e máxima em μm^2 medidas para cada classe morfológica.

A tabela 4.21 apresenta os ensaios por ordem de execução nos grupos. Dentre os ensaios iniciados depois da fase descontínua (o primeiro ensaio de cada grupo), apenas os ensaios **PC4** e **PC5** apresentaram uma distribuição morfológica (% da área) próxima. No grupo 1, houve pouca variação entre os ensaios **PC1** e **V**, mas esta foi grande entre os ensaios **PC1** e **VI**. No grupo 2 observou-se uma diferença significativa nas porcentagens de hifas e *clumps* entre os ensaios **VII** e **VIII**. Esta diferença ocorreu entre as porcentagens de hifas e *pellets* nos ensaios **II** e **III** (grupo 3) nos ensaios **PC5** e **PC6** para *pellets* e *clumps* (grupo 5). Estas observações sugerem que não há influência de um estado estacionário sobre o seu subsequente, com relação à distribuição morfológica.

Tabela 4.21. Análise morfológica para os ensaios ordenados conforme execução.

	ensaio	porcentagem da área total			ensaio	área média		
		hifas	pellets	clumps		hifas	pellets	clumps
GRUPO 1	V	2	0	98	V	428	0	4.118
	PC1	7	0	93	PC1	256	0	5.479
	VI	33	0	67	VI	198	0	2.316
	PC2	descartado						
	IV	41	0	59	IV	267	0	2.061
GRUPO 2	PC3	descartado						
	VII	9	0	91	VII	243	0	3.156
	VIII	26	0	74	VIII	228	0	2.654
GRUPO 3	II	36	7	57	II	213	19.467	2.368
	III	23	18	60	III	207	27.195	3.660
	PC4	descartado						
	I	23	21	56	I	221	30.488	2.826
GRUPO 4	PC4	8	15	76	PC4	396	30.988	4.177
GRUPO 5	PC5	6	16	78	PC5	352	48.699	6.056
	PC6	3	46	51	PC6	313	54.529	6.029

Na figura 4.45 comparam-se os resultados obtidos por Pamboukian (2003), nos quais a frequência de agitação foi de 500rpm e os obtidos neste projeto para a porcentagem de cada classe morfológica em área. Pamboukian (2003) obteve um aumento da porcentagem de *pellets* e uma diminuição da de *clumps* para maiores velocidades específicas de crescimento, ou menores tempos de residência (maiores valores de D). Neste trabalho a porcentagem de *clumps* foi de aproximadamente 60% e de *pellets* de 15% para $D = \mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. A porcentagem de *clumps* aumentou para cerca de 85% para $D = \mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$; não observou-se *pellets* para $D = \mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$. Deve-se lembrar que apenas nos ensaios no ponto central ($D = \mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$) a frequência de agitação foi a mesma utilizada por Pamboukian (2003), igual a 500 rpm. O resultado obtido por Pamboukian (2003) para $D = \mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$ foi próximo aos obtidos neste projeto para $N = 500 \text{ rpm}$ e $D = \mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$. As diferenças observadas em outras condições de cultivo podem ser entendidas pelo fato da inclusão neste projeto da frequência de agitação e concentração de oxigênio dissolvido como fatores a serem estudados. Também o tamanho médio dos *pellets* medido por Pamboukian (2003) foi maior que o medido neste projeto, sendo aproximadamente 30 vezes a área média dos *clumps* e 300 vezes a das hifas (tabelas 4.19 e 4.20).

4.4.1. Tratamento estatístico aplicado à análise morfológica

Uma análise estatística foi feita para avaliar a influência dos fatores e suas interações sobre a morfologia, em porcentagem da área total e área média. Repetiu-se o procedimento apresentado no item 4.2.1 para ajuste de um modelo estatístico e análise da variância.

Figura 4.45. Resultados obtidos por Pamboukian (2003), identificados por CP onde $N = 500\text{rpm}$ e os obtidos nos ensaios I até VIII ($N = 300\text{ rpm}$ ou 700 rpm) e no ponto central ($N = 500\text{ rpm}$).

4.4.1.1. Tratamento estatístico aplicado à análise morfológica – porcentagem em área

A análise de variância (ANOVA), calculada com o *software* MINITAB, para porcentagem em área de cada classe morfológica em função dos fatores encontra-se nas tabelas 4.22, 4.23 e 4.24.

Tabela 4.22. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a porcentagem da área total de hifas (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		24,13	0,7638	31,60	0,000	
N	19,51	9,75	0,7638	12,77	0,001	
OD	1,06	0,53	0,7638	0,70	0,537	
μ	-13,21	-6,61	0,7638	-8,65	0,003	
N*OD	-2,03	-1,02	0,7638	-1,33	0,276	
N* μ	3,96	1,98	0,7638	2,59	0,081	
OD* μ	-0,88	-0,44	0,7638	-0,58	0,604	
N*OD* μ	-4,80	-2,40	0,7638	-3,14	0,052	
Ponto central		-18,13	1,3229	-13,71	0,001	
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	1112,59	1112,59	370,862	79,47	0,002
Interações 2x2	3	41,19	41,19	13,731	2,94	0,200
Interações 3x3	1	46,08	46,08	46,078	9,87	0,052
Curvatura	1	876,87	876,87	876,868	187,90	0,001
Erro residual	3	14,00	14,00	4,667		
Erro puro	3	14,00	14,00	4,667		
Total	11	2090,73				
Hifas (%) = 24,13 + 9,75*N + 0,53*OD – 6,61*μ –1,02*N*OD + 1,98*N*μ – 0,44*OD*μ – 2,40*N*OD*μ						
Coeficiente de correlação: R² = 0,993						

Tabela 4.23. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a porcentagem da área total de *pellets* (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		5,718	6,815	0,84	0,463	
N	-7,827	-3,913	6,815	-0,57	0,606	
OD	-2,509	-1,254	6,815	-0,18	0,866	
μ	-11,436	-5,718	6,815	-0,84	0,463	
N*OD	-1,100	-0,550	6,815	-0,08	0,941	
N* μ	7,827	3,913	6,815	0,57	0,606	
OD* μ	2,509	1,254	6,815	0,18	0,866	
N*OD* μ	1,100	0,550	6,815	0,08	0,941	
Ponto central	13,532	11,804	1,15	0,335		
Coeficiente de correlação: R ² = 0,4						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	396,64	396,64	132,215	0,36	0,791
Interações 2x2	3	137,52	137,52	45,841	0,12	0,940
Interações 3x3	1	2,42	2,42	2,421	0,01	0,941
Curvatura	1	488,32	488,32	488,32	1,31	0,335
Erro residual	3	1114,75	1114,75	371,583		
Erro puro	3	1114,75	1114,75	371,583		
Total	11	2139,66				

Tabela 4.24. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a porcentagem da área total de *clumps* (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		70,149	6,154	11,40	0,001	
N	-11,680	-5,840	6,154	-0,95	0,413	
OD	1,445	0,723	6,154	0,12	0,914	
μ	24,650	12,325	6,154	2,00	0,139	
N*OD	3,131	1,566	6,154	0,25	0,816	
N* μ	-11,788	-5,894	6,154	-0,96	0,409	
OD* μ	-1,626	-0,813	6,154	-0,13	0,903	
N*OD* μ	3,700	1,850	6,154	0,30	0,783	
Ponto central	4,351	10,660	0,41	0,711		
Coeficiente de correlação: R ² = 0,6						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	1492,32	1492,32	497,44	1,64	0,347
Interações 2x2	3	302,82	302,82	100,94	0,33	0,805
Interações 3x3	1	27,38	27,38	27,38	0,09	0,783
Curvatura	1	50,49	50,49	50,49	0,17	0,711
Erro residual	3	909,00	909,00	303,00		
Erro puro	3	909,00	909,00	303,00		
Total	11	2782,01				

Os gráficos de probabilidade normal para cada classe morfológica em porcentagem da área total foram feitos com o *software* MINITAB e encontram-se na figura 4.46.

Um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0,993$) foi obtido apenas para a porcentagem de hifas. O coeficiente do modelo estatístico calculado por regressão linear múltipla para o fator N (9,75) é positivo e negativo para μ (-6,61). Isto significa que quanto maior a frequência de agitação (variável codificada +1) e quanto menor o valor de μ (variável codificada -1) maior a porcentagem de hifas, além de indicar uma maior influência de N.

Pode-se identificar uma maior influência de μ sobre a porcentagem de *clumps* (tabela 4.24) a um nível de significância inferior a 10% ($P=0,139$), porém não houve influência dos fatores e suas interações sobre a porcentagem de *pellets* e de *clumps*.

Dois modelos foram calculados, visando correlacionar a concentração de retamicina com a morfologia. O primeiro, calculado utilizando-se a sub-rotina SOLVER do *software* Excel foi:

$$\text{Ret c} = A \cdot \text{hifas}(\%) + B \cdot \text{pellets}(\%) + C \cdot \text{clumps}(\%) \quad (4.14)$$

O ajuste de todos os resultados pela equação 4.14 foi ruim ($R^2 = 0,3$). Excluindo-se os ensaios no ponto central obteve-se:

$$\text{Ret c} = 0,01077 \cdot \text{hifas}(\%) + 0,07636 \cdot \text{pellets}(\%) - 0,00036 \cdot \text{clumps}(\%) \quad (4.15)$$

$$\text{Ret} = \text{Ret c} \cdot 1,0001 - 0,0002 \quad (R^2 = 0,8) \quad (4.16)$$

A figura 4.47 apresenta a relação entre os valores previstos pela equação 4.15 e os obtidos experimentalmente. Pode-se observar pelos valores dos coeficientes da equação 4.15 que há menor influência da porcentagem de *clumps* sobre a concentração de retamicina. Os coeficientes para a porcentagem de hifas e *pellets* são 30 e 211 vezes o coeficiente para a porcentagem de *clumps*. A concentração de retamicina obtida nos ensaios **V** até **VIII** foi muito baixa e não foram detectados *pellets*. Excluindo-se a porcentagem de *clumps* da equação 4.15 obteve-se a equação 4.17:

$$\text{Ret c} = 0,01077 \cdot \text{hifas}(\%) + 0,07636 \cdot \text{pellets}(\%) \quad (R^2 = 0,8) \quad (4.17)$$

Observa-se que o coeficiente de correlação R^2 manteve-se o mesmo. Portanto pode-se, a princípio, estimar a concentração de retamicina a partir apenas das porcentagens de hifas e de *pellets*.

Figura 4.46. Gráficos de probabilidade normal para hifas, *pellets* e *clumps* em porcentagem da área total.

Figura 4.47. Correlação entre a porcentagem de cada classe morfológica e a concentração de retamicina – equação 4.15.

A seguir, buscou-se um segundo modelo combinando o modelo fenomenológico (equação 4.11) e o estatístico (tabela 4.22), sem incluir os ensaios no ponto central.

Para combinar ambos os modelos, foi necessário calcular o modelo estatístico em unidades não codificadas, desprezando-se a interação $N \cdot OD \cdot \mu$, conforme mostra a equação 4.19:

$$\%hifas = 17,0884 + 0,0339 \cdot N - 115,593 \cdot \mu + 0,0990 \cdot N \cdot \mu \quad (R^2 = 0,96) \quad (4.18)$$

Com base nas equações 4.15 (pouca influência dos *clumps*) e 4.17 (considera apenas a porcentagem de hifas e *pellets*), optou-se por classificar os objetos em hifas e aglomerados ($aglomerados = AGL(\%) = clumps + pellets$), portanto:

$$\%AGL + \%hifas = 100, \text{ ou } \%hifas = 100 - \%AGL \quad (4.19)$$

Substituindo-se na equação 4.18, tem-se:

$$\%AGL = 82,9116 - 0,0339 \cdot N + 115,593 \cdot \mu - 0,0990 \cdot N \cdot \mu \quad (4.20)$$

Isolando-se N, obtém-se:

$$N = (82,9116 - \%AGL + 115,593 \mu) / (0,0339 + 0,0990 \cdot \mu) \quad (4.21)$$

Combinadas as equações 4.11 e 4.21, obteve-se:

$$\text{Retc} = \frac{(34 + 100 * \mu)}{(83 - \%AGL + 116 * \mu)} * \exp(-12,79 * \mu) \quad (4.22)$$

O coeficiente de correlação entre os valores calculados pela equação 4.22 e os dados experimentais foi calculado, obtendo-se:

$$\text{Ret} = 0.9885 * \text{Retc} + 0,0087 \quad (R^2 = 0,95) \quad (4.23)$$

O modelo prevê maiores concentrações de retamicina para menores valores de μ e maiores porcentagens de aglomerados. A equação 4.22 determina um limite para a porcentagem de aglomerados, pois a concentração de retamicina não pode assumir valores negativos. Desta forma, o denominador deve ser positivo, ou seja:

$$83 - \%AGL + 116 * \mu \geq 0$$

Para $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, obtém-se que $\%AGL \leq 88\%$.

A equação 4.22 superestima a concentração de retamicina para valores de $\%AGL$ entre 82 e 88%. Portanto o modelo foi considerado válido somente para $\%AGL < 82\%$, conforme mostra a figura 4.48. O modelo também mostra a maior influência de μ em relação à influência da morfologia. Estas considerações estão de acordo com os resultados experimentais apresentados na tabela 4.19, que mostram que maiores concentrações de retamicina foram obtidas para $\%AGL$ iguais 77 - 78% que para 60 - 64%, para um mesmo valor de $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, conforme previsto pela equação 4.22. Infelizmente não foram encontrados na literatura outros modelos baseados na distribuição morfológica para comparação.

Figura 4.48. Concentração de retamicina em função da porcentagem em área dos aglomerados (*clumps* e *pellets*) e da velocidade específica de crescimento.

4.4.1.2. Tratamento estatístico aplicado à análise morfológica – em área média

A análise de variância (ANOVA), calculada com o *software* MINITAB, para porcentagem em área de cada classe morfológica em função dos fatores encontra-se nas tabelas 4.25, 4.26 e 4.27.

Não se observou a influência dos fatores ou suas interações sobre a área média dos *clumps*, *pellets* ou hifas, conforme análise feita dos gráficos de probabilidade normal, figura 4.49. A grande variabilidade das áreas médias pode dificultar esta observação. Apenas para a curvatura calculada para os *clumps* obteve-se uma probabilidade inferior a 10%. Não obteve-se uma correlação entre a área média e a concentração de retamicina.

Apesar dos diversos trabalhos pesquisados, apenas Tamura *et al.* (1997) propuseram uma correlação entre a área média dos *pellets* e micélios de *Streptomyces fradie* e a produção máxima do produto de interesse, conforme mostra a figura 2.8

(capítulo 2). Os autores também obtiveram uma grande variação na área média dos *pellets* em função da frequência de agitação, dificultando o estabelecimento desta correlação. Neste sentido, a figura 4.50, que considera os ensaios do planejamento fatorial e os 4 ensaios no ponto central (12 experimentos), mostra que não houve correlação entre a área média de aglomerados (*clumps* e *pellets*) e a concentração de retamicina (figura 4.50a). Pode-se observar um aumento na produtividade Pret (figura 4.50b) e na produtividade específica Pret / X (figura 4.50c) quando a área média dos aglomerados aumenta de 2.000 até 4.000 μm^2 . Depois observa-se uma queda em ambas as produtividades até uma área média igual a 7.000 μm^2 , a partir da qual as produtividades tendem a um valor constante. Os melhores resultados correspondem aos ensaios I e III. Os maiores desvios foram observados para os ensaios IV (N = 700 rpm, OD = 80% e $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$) e V (N = 300 rpm, OD = 20% e $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$).

Utilizando-se a rotina SOLVER do *software* EXCEL obteve-se um modelo conforme a equação 4.24, apresentado na figura 4.50c:

$$\text{Pret} / \text{Xc} = 0,015 * \left[\frac{(\text{AM} - 3,75)}{\text{AM}} + \exp(-0,3 * (\text{AM} - 3,75)^2) \right] \quad (4.24)$$

O coeficiente de correlação calculado, desprezando-se os pontos em aberto na figura 4.50c, foi igual a 0,8. Pode-se observar que o coeficiente 3,75 corresponde à área média próxima ao valor máximo. O modelo indica que o cultivo não deve favorecer o crescimento de aglomerados de dimensões muito diferentes desta. Como a análise estatística não mostrou uma correlação entre a área média dos aglomerados (AM) e os fatores (N, OD, μ), não foi possível pré-estabelecer uma condição de cultivo baseada nestes fatores que permitisse atingir esta AM favorável à síntese de retamicina.

Tabela 4.25. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a área média das hifas (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		250,63	21,02	11,92	0,001	
N	-48,25	-24,12	21,02	-1,15	0,334	
OD	-28,75	-14,37	21,02	-0,68	0,543	
μ	47,25	23,63	21,02	1,12	0,343	
N*OD	70,75	35,37	21,02	1,68	0,191	
N* μ	-74,25	-37,13	21,02	-1,77	0,176	
OD* μ	-48,75	-24,38	21,02	-1,16	0,330	
N*OD* μ	36,75	18,38	21,02	0,87	0,446	
Ponto central		78,63	36,41	2,16	0,120	
Coeficiente de correlação: R² = 0,8						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	10774	10774	3591	1,02	0,495
Interações 2x2	3	25790	25790	8597	2,43	0,242
Interações 3x3	1	2701	2701	2701	0,76	0,446
Curvatura	1	16485	16485	16485	4,66	0,120
Erro residual	3	10603	10603	3534		
Erro puro	3	10603	10603	3534		
Total	11	66354				

Tabela 4.26. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a área média dos *pellets* (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P (≤ 0,1)	
Constante		9644	8665	1,11	0,347	
N	-9554	-4747	8665	-0,55	0,620	
OD	-5690	-2845	8665	-0,33	0,764	
μ	-19288	-9644	8665	-1,11	0,347	
N*OD	-4044	-2022	8665	-0,23	0,831	
N* μ	9554	4777	8665	0,55	0,620	
OD* μ	5690	2845	8665	0,33	0,764	
N*OD* μ	4043	2022	8665	0,23	0,831	
Ponto central		23910	15007	1,59	0,209	
Coeficiente de correlação: R² = 0,6						
ANOVA						
Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P (≤ 0,1)
Efeitos principais	3	991325345	991325345	330441782	0,55	0,682
Interações 2x2	3	280009817	280009817	93336606	0,16	0,920
Interações 3x3	1	32699784	32699784	32699784	0,05	0,831
Curvatura	1	1524533480	1524533480	1524533480	2,54	0,209
Erro residual	3	1801776922	1801776922	600592307		
Erro puro	3	1801776922	1801776922	600592307		
Total	11	4630345348				

Tabela 4.27. Cálculo dos efeitos, dos coeficientes, da significância e ANOVA para a área média de *clumps* (unidades codificadas).

Termo	Efeito	Coeficiente	SE coeficiente	T	P ($\leq 0,1$)
Constante		2894,9	311,1	9,30	0,003
N	-1090,2	-545,1	311,1	-1,75	0,178
OD	-24,2	-12,1	311,1	-0,04	0,971

μ	332,2	166,1	311,1	0,53	0,630
N*OD	39,7	19,9	311,1	0,06	0,953
N* μ	-61,8	-30,9	311,1	-0,10	0,927
OD* μ	-287,8	-143,9	311,1	-0,46	0,675
N*OD* μ	610,2	305,1	311,1	0,98	0,399
Ponto central		2540,4	538,9	4.71	0,018

Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,8$

ANOVA

Fonte	Graus de liberdade	SQ Seq	SQ Aj	MS Aj	F	P ($\leq 0,1$)
Efeitos principais	3	2599246	2599246	866415	1,12	0,464
Interações 2x2	3	176386	176386	58795	0,08	0,969
Interações 3x3	1	744810	744810	744810	0,96	0,399
Curvatura	1	17209347	17209347	17209347	22,22	0,018
Erro residual	3	2322977	2322977	774326		
Erro puro	3	2322977	2322977	774326		
Total	11	23052767

Figura 4.49. Gráficos de probabilidade normal para hifas, *pellets* e *clumps* em área média (μm^2).

Figur

a 4.50. Concentração de retamicina (a), produtividade de retamicina (b) e produtividade específica de retamicina (c) em função da área média dos aglomerados (linha corresponde ao modelo – equação 4.24).

4.5. RESULTADOS DA ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares para verificar quais corantes apresentariam melhores resultados nos testes de viabilidade celular, conforme descrito no item 4.5.1.

4.5.1. Ensaios preliminares

Conforme descrito no item 3.4.6, os testes foram conduzidos em incubador rotativo com células em fase de crescimento (inóculo) e em fase de produção de retamicina. Foram testados como corantes o azul de metileno e a fucsina, que tingem células não viáveis e a violeta de genciana, que não tinge células ocas. Os resultados encontram-se nas figuras 4.51 e 4.52. Nestas figuras, as imagens b e d referem-se a uma amostra retirada do mesmo erlenmeyer de onde foram colhidas as amostras referentes às imagens a e c, porém após esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos. Os resultados obtidos não foram coerentes com o reportado na literatura. Não foi possível identificar diferenças entre as células viáveis e não-viáveis antes e depois da esterilização, quando coradas com azul de metileno e fucsina (figura 4.51). Igualmente o uso de violeta de genciana não apresentou esta diferença, principalmente comparando-se a figura 4.52b (inóculo esterilizado) com as demais.

Figura 4.51. Teste de viabilidade celular com azul de metileno e fucsina: a) inóculo; b) inóculo após esterilização; c) em fase de produção; d) em fase de produção, após esterilização.

Figura 4.52. Teste de viabilidade celular com violeta de genciana: a) inóculo; b) inóculo após esterilização; c) em fase de produção; d) em fase de produção, após esterilização.

4.5.2. Corante BacLight™

Conforme descrito no item 3.4.6.1, as análises preliminares da viabilidade celular serviram para desenvolver a metodologia com o corante *BacLight*™. Foram realizados cultivos em incubador rotativo nas condições de preparo do inóculo (visando obter células viáveis) e de produção de retamicina (fim da fase de crescimento). Foram também analisadas amostras depois de decorridas 24h a mais de incubação. Os melhores resultados obtidos até agora são apresentados na figura 4.53.

A figura 4.53a foi obtida a partir da suspensão de células na forma usada para inocular o biorreator, podendo-se perceber que a região central do objeto é vermelha e,

portanto, não viável, em contraste com a parte externa na cor verde (viável). Portanto a quase totalidade é viável no início do cultivo. Este mesmo erlenmeyer permaneceu mais 24h em cultivo, e o objeto fotografado (figura 4.53b) continua a apresentar coloração predominantemente verde. As figuras 4.53c e 4.53d foram obtidas de células incubadas em incubador rotativo na forma descrita como teste de produção (item 3.3). Como na figura 4.53a, a parte central do objeto da figura 4.53c é vermelha e a externa verde, indicando alta viabilidade celular. O objeto, *pellet* ou *clump*, na figura 4.53d, obtido depois de mais 24h de incubação, é completamente vermelho, indicando sua inviabilidade. Esta avaliação preliminar permite concluir que o inóculo contém uma maior porcentagem de células viáveis, em relação àquelas em fase de produção de retamicina.

Convém esclarecer que lamentavelmente não foi possível prosseguir com estas análises, pois o processo de importação dos filtros de fluorescência atrasou consideravelmente. Estes filtros servem para filtrar a luz verde ou vermelha, simplificando o processo de medição da área celular tingida e permitindo sua quantificação (% da área celular viável).

De todos os corantes utilizados, o LIVE/DEAD® *BacLight*™ foi o que permitiu uma melhor diferenciação entre células viáveis e não viáveis, conforme ilustra a figura 4.53.

Figura 4.53. Análise da viabilidade celular com corante LIVE/DEAD[®] *BacLight*[™].

5. CONCLUSÕES

1. O planejamento fatorial permitiu avaliar a influência das três variáveis, frequência de agitação (N), concentração de oxigênio dissolvido (OD) e velocidade específica de crescimento (μ) sobre as variáveis de interesse no processo de produção de retamicina em cultivo contínuo em estado estacionário.

2. O processo de produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20 foi fortemente influenciado pela velocidade específica de crescimento, sendo as outras variáveis de menor importância nos intervalos testados. Maiores concentrações, produtividades e fatores de conversão de retamicina foram obtidos para o menor valor de μ ($0,05 \text{ h}^{-1}$), típico de processo para obtenção de metabólitos secundários e menores valores de N (300 rpm).

3. Maiores produtividades em biomassa foram obtidas para o maior valor de μ ($0,25 \text{ h}^{-1}$) e menores valores de N (300 rpm).

4. O cálculo do fator de conversão de substrato em células corrigido levando-se em conta a utilização do extrato de levedura como fonte de carbono é mais coerente que o calculado sem correção, sendo igual a $0,38 \pm 0,05 \text{ g.g}^{-1}$.

5. Os coeficientes de variação calculados para os nove ensaios no ponto central foram iguais a 13%, 30% e 13% para a concentração celular, de retamicina e de glicose, respectivamente. Estes valores podem ser considerados baixos para a biomassa e a glicose e elevado para a retamicina.

6. Foi proposto um modelo fenomenológico entre a concentração de retamicina e a frequência de agitação (N) e a velocidade específica de crescimento (μ) obtendo-se um coeficiente de correlação $R^2 = 0,97$, considerando-se todos os ensaios realizados:

$$\text{Retc} = (1005/N) * \exp(-12,79 * \mu)$$

7. O teste de atividade biológica permitiu avaliar a ação da retamicina sobre o microrganismo teste. A correlação obtida foi:

$$\text{Ret (UA)} = 0.2887 * \Phi - 1,4415 \quad (R^2 = 0,93)$$

8. Não houve influência dos fatores N, OD, μ e suas interações nos limites abrangidos neste projeto sobre a porcentagem em área de *pellets* e *clumps*; houve influência da velocidade específica de crescimento (μ), da frequência de agitação (N), da interação entre estes fatores e da interação entre os três fatores sobre a porcentagem de hifas.

9. Não houve influência dos fatores N, OD, μ e suas interações nos limites abrangidos neste projeto sobre a área média das hifas, dos *pellets* e dos *clumps*.

10. Os coeficientes de variação calculados para a porcentagem em área para os ensaios PC1, PC4, PC5 e PC6 foram iguais a 36% para as hifas, 100% para os *pellets* (elevados) e 23% (médio) para os *clumps*.

11. Combinando-se o modelo fenomenológico ao estatístico para a porcentagem de hifas em unidades não codificadas obteve-se uma correlação entre a morfologia na forma de aglomerados (*pellets* + *clumps*) e a velocidade específica de crescimento com a concentração de retamicina:

$$\text{Retc} = \frac{(34 + 100 * \mu)}{(83 - \%AGL + 116 * \mu)} * \exp(-12,79 * \mu) \quad (R^2 = 0,95)$$

13. Obteve-se uma correlação entre a área média dos aglomerados e a produtividade específica de retamicina (Pret / X):

$$\text{Pret} / X_c = 0,015 * \left(\frac{(AM - 3,75)}{AM} + \exp(-0,3 * (AM - 3,75)^2) \right) \quad R^2 = 0,8$$

14. O teste de viabilidade celular com o corante *BacLight* permitiu identificar partes do microrganismo viáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AUBEL-SANDRON, G.; LONDOS-GAGLIARDI, D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. **Biochemie**, Paris, v. 66, n. 5, p. 333-352, May, 1984.

BARROS NETO, B. N., SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 299p.

BELMAR-BEINY, M. T.; THOMAS, C. R. Morphology and clavulanic acid production of *streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, n. 5, p. 456-462, Mar. 1991.

BIEBER, L. W.; DA SILVA FILHO, A. A.; SILVA, E. C.; DE MELLO, J. F.; LYRA, F. D., DO NASCIMENTO, M. S.; BOTTA, B.; DE ANGELIS, F. The anthracycline complex retamycin, 1: structure determination of the mayor constituents. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 52, n. 2, p. 385-388, Mar. 1989. Disponível em: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/archive.cgi/jnprdf/1989/52/i02/pdf/np50062a029.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2007.

BOX, G. E. P., HUNTER, J. S. ; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters**. 2.ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005. 633p.

BRAÑA, M. F.; CACHO, M.; GRADILLAS, A.; PASCUALI-TERESA, B.; RAMOS, A. Intercalators as anticancer drugs. **Current Pharmaceutical Design**, Bussum, v. 7, n. 17, p. 1745-1780, Nov. 2001.

BRERETON, R.G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. 1.ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2002. 489p.

CHEN, H. C.; WILDE, F. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *streptomyces fradiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, n. 6, p. 591-595, Marc. 1991.

CLEMENTE, A. L.; MUNIZ, J. A. Avaliação do coeficiente de variação em experimentos com gramíneas forrageiras. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p.197-203, jan./fev. 2002. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/revista/26_1/art23.PDF. Acesso em 26 jun. 2006.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. Experimental designs. 2.ed. New York: John Wiley, 1957. 630p.

COSTA, A.C.; ATALA, D.I.P.; MAUGERI, F.; MACIEL,R. Factorial Design and Simulation for the Optimization and Determination of Control Structures for na Extractive Alcoholic Fermentation Process. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, p.125-137, 2001.

COX, P. W.; THOMAS, C. R. Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 39, n. 9, p. 945-952, Abr. 1992.

COX, P. W.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. **Microbiology**, Reading, v.144, n.4, p.817-827, 1998. Disponível em: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/reprint/144/4/817?ck=nck>. Acesso em: 26 jun. 2006.

COX, P. W.; THOMAS, C. R. Mag fura staining of fungi. **Biotechnology Techniques** Surrey, v. 13, n. 10, p. 719-723, Oct. 1999. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/k246q652r556t657/fulltext.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2006.

CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Effects of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 55, n. 5, p. 715-726, Set. 1997. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/71003986/PDFSTART>. Acesso em: 21 ago. 2007.

CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 57, n. 4, p. 409-419, Feb. 1998. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/71002243/PDFSTART>. Acesso em: 21 ago. 2007.

DEKLEVA, M. L.; STROHL, W. R. Biosynthesis of β -rhodomycinone from glucose by *streptomyces* C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 34, n. 11, p. 1235-1240, Nov. 1988.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiological and Biotechnology**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 455-463, Oct. 1999. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/7jtmb74kpepg0gd4/fulltext.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2007.

DROUIN, J. F.; LOUVEL, L.; VANHOUTTE, B.; VIVIER, H.; PONS, M. N.; GERMAIN, P. Quantitative characterization of cellular differentiation of *streptomyces ambofaciens* in submerged culture by image analysis. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v. 11, n. 11, p. 819-824, Nov. 1997. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/vm966m53r458g531/fulltext.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2006.

ENSARI, S.; LIM, H. C. Apparent effects of operational variables on the continuous culture of *corynebacterium lactofermentum*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 1,

p. 1531-1538, Jun. 2003. Disponível em:
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6THB-48F5K3X-1-S&_cdi=5278&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=06%2F30%2F2003&_sk=999619988&_view=c&_wchp=dGLbVlzzSkzk&_md5=82e30afe084dbf54a3eddd40a686dac9&_i=/sdarticle.pdf. Acesso em: 15 fev. 2006.

ENSARI, S.; LIM, H. C. Kinetics of L-lysine fermentation: a continuous culture model incorporating oxygen uptake rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 62, n. 1, p. 35-40, Jul. 2003. Disponível em:
<http://www.springerlink.com/content/3275uk590vcnxj45/fulltext.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2006.

FACCIOTTI, M. C. R. **Produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa**: estudo do processo semicontínuo e da influência da concentração inicial de polissacarídeo no processo descontínuo. 1986. 245p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In. SCHMIDELL NETTO, W. et al.(Coord.). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, p. 223-246.

FURLAN, R. L. A. **Obtenção e estudo de mutantes com produção alterada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622**. 1997. 76p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FURLAN, R. L. A. **O antitumoral retamicina**: produção e efeitos biológicos. 2002. 102p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FURLAN, R. L. A.; GARRIDO, L. M.; BRUMATTI, G.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MARTINS, R. A.; FACCIOTTI, M. C. R.; PADILLA, G. A rapid and sensitive method for screening of DNA intercalating antibiotics. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 24. n. 21; p. 1807-1813, Nov. 2002. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/t5150570l2141888/fulltext.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2006.

GARCIA, C. H. Tabelas para classificação do coeficiente de variação. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1989. (Circular Técnica, n. 171).

GUIMARÃES, L. M. **Influência do preparo do inóculo e do pH na produção do antibiótico retamicina por *Streptomyces olindensis* So20**. 2000. 122p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HARRIS, D. C. Nonlinear least-squares curve fitting with microsoft excel solver. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 75, n. 1, p. 119-121, Jan. 1998. Disponível em: <http://jchemed.chem.wisc.edu/Journal/Issues/1998/Jan/PlusSub/V75N01/p119.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2006.

HARRISON, D. E. F.; TOPIWALA, H. H. Transient and oscillatory states of continuous culture. In: GHOSE, T. K., FIECHTER, A.; BLAKEBROUGH, N. (Ed.). **Advances in Biochemical Engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. v. 3, p. 167-219.

HASSAN, M.; CORKIDI, G.; GALINDO, E.; FLORES, C.; SERRANO-CARREÓN, L. Accurate and rapid viability assessment of trichoderma harzianum using fluorescence-based digital image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 80, n. 6, p. 677-684, Dec. 2002. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/99017245/PDFSTART>. Acesso em: 05 set. 2007.

INOUE, O.O. Influência de Diferentes Limitações Nutricionais sobre a Produção de Retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20. 2006. 132p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 5.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2002. 767p.

JÜSTEN, P.; PAUL, G.C.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Dependence of Mycelial Morphology on Impeller Type and Agitation Intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.52, n.6, p.672-684, Dec. 1996.

KEMPF, M.; THEOBALD, U.; FIEDLER, H. P. Influence of dissolved O₂ on the fermentative production of gallidermin by *staphylococcus gallinarum*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 11, p. 1063-1065, Nov. 1997. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/ghh8863mw7h3v15n/fulltext.pdf>. Acesso em: 05 set. 2007.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites**. New York: Plenum Press, 1993. 236p.

LIMA, O. G.; LYRA, F. D. A.; ALBUQUERQUE, M. M. F.; MACIEL, G. M.; COELHO, J. S. B. Primeiras observações sobre o complexo antibiótico e antitumoral – retamicina produzido pelo *streptomyces olindensis* nov. sp. IAUFPe. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v. 9, p. 27-37, 1969.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 991p.

MARTIN, J. F.; DEMAINE, A. L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological reviews**, Washington, v. 44, n. 2, p. 230-251, 1980.

MARTINS, C. S. **Estudo cinético da produção de ciclamicina.** 1998 72p. Dissertação de (Mestrado) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

MARTINS, R. A. **Transferência de oxigênio e respiração microbiana em cultivos de *Streptomyces olindensis* So20 visando a produção do antibiótico retamicina.** 2001. 157p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MARTINS, R. A.; GUIMARÃES, L. M.; PAMBOUKIAN, C. R.; TONSO, A.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. The effect of dissolved oxygen concentration control on cell growth and antibiotic retamycin production in *streptomyces olindensis* So20 fermentations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 185-192, Apr./Jun. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjce/v21n2/a07v21n2.pdf>. Acesso em: 05 set. 2007.

MAXON, W. D. Aeration-agitation studies on the novobiocin fermentation. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, New York, v. 1, n. 3, p. 311-324, Nov. 1959.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments.** 6.ed. Hoboken: John Wiley, 2005. 643p.

MØLLER, K.; BRO, C.; PIŠKUR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Steady-state and transient-state analyses of aerobic fermentation in *saccharomyces kluyveri*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 233-244, May, 2002.

NETER, J., WASSERMAN, W.; KUTNER, M. H. **Applied linear regression models.** 2.ed. Homewood: Irwin, Boston, 1989. 667p.

NIELSEN, J. H.; VILLADSEN, J. **Bioreaction engineering principles**. New York: Plenum Press, 1994. 456p.

O' NEIL, D.G.; LYBERATOS, G. Dynamic Model Development for a Continuous Culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 36, p.437-445, Aug. 1990.

OH, N. S.; SERNETZ, M. Turnover characteristics in continuous L-lysine fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 39, n. 6, p. 691-695, Aug. 1993.

PACKER, H. L.; THOMAS, C. R. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 35, n. 9, p.870-881, Apr. 1990.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *aspergillus awamori***. 1997. 189p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do antitumoral retamicina por *streptomyces olindensis* em processos descontínuo alimentado e contínuo**. 2003. 163p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PAMBOUKIAN, C. R. D.; FACCIOITTI, M. C. R. Correlation between pellet size and glucoamylase production in submerged cultures of *aspergillus awamori*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 23-26, 1998.

PAMBOUKIAN, C. R. D.; FACCIOITTI, M. C. R. Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *streptomyces olindensis*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 2249-2255, Oct. 2004. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6THB-4BDM2XS-9-

[1F& cdi=5278& user=5674931& orig=browse& coverDate=10%2F29%2F2004& sk=999609987&view=c&wchp=dGLbVlzzSkWz&md5=bd52492585dcba29cc050436676616db&ie=/sdarticle.pdf](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66321998000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en). Acesso em: 05 fev. 2007.

PAMBOUKIAN, C. R. D.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL NETTO, W. Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by aspergillus awamori: in submerged cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 265-272, set. 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66321998000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 05 fev. 2007.

PAMBOUKIAN, C. R. D.; GUIMARÃES, L. M.; FACCIOTTI, M. C. R. Applications of image analysis in the characterization of streptomyces olindensis in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 17-21, jan. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v33n1/11084.pdf>. Acesso em: 17 out. 2006.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CAMARGO-RUBIO, E.; ORNELAS-VALE, A. Influence of specific growth rate on biomass yield, productivity, and composition of candida utilis in batch and continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 31, n. 4, p. 487-491, Apr. 1976. Disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/31/4/487>. Acesso em: 17 out. 2006.

PATARINSKA, T.; DOCHAIN, D.; AGATHOS, S.N.; GANOVSKI. Modelling of continuous microbial cultivation taking into account the memory effects. **Bioprocess Engineering**, Berlin, v. 22, p. 517-527, 2000.

PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Characterization of mycelial morphology using image analysis. **Advances in biochemical engineering biotechnology**, Berlin, v. 60, p. 1-59, 1998.

PINTO, L. S.; VIEIRA, L. M.; PONS, M. N.; FONSECA, M. M. R.; MENEZES, J. C. Monitorização de processos biológicos: III Análise digital de imagem. **Boletim de Biotecnologia**, n. 70, p. 12-21, dez. 2001. Disponível em: <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/70/pdf/Analise_Digital_de_Imagem.pdf>. Acesso em: 24/12/2002.

PIRT, S. J.; RIGHELATO, R. C. Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by *penicillium chrysogenum* in batch and chemostat cultures. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 15, n. 6, p. 1284-1290, Nov. 1967. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=547184&blobtype=pdf>. Acesso em: 27 out. 2006.

PONS, M. N.; DROUIN, J. F.; LOUVEL, L.; VANHOUTTE, B.; VIVIER, H.; GERMAIN, P. Physiological investigations by image analysis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 65, n.1, p. 3-14, Sep. 1998. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T3C-3TYW4W4-2-W&_cdi=4943&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=09%2F19%2F1998&_sk=999349998&_view=c&_wchp=dGLbVlb-zSkWW&_md5=dfbd50001540909d91b5e154dd23ea05&_ie=/sdarticle.pdf. Acesso em: 27 out. 2006.

ROBIN, J.; LETTIER, G.; McINTYRE, M.; NOORMAN, H.; NIELSEN, J. Continuous Cultivations of a *Penicillium chrysogenum* Strain Expressing the Expandase Gene From *Streptomyces clavuligerus*: Growth Yields and Morphological Characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 83, n. 3, p.361-368, Aug. 2003.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos – uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326p.

ROUBOS, J. A.; KRABBE, P.; LUITEN, R. G. M.; VERBRUGGEN, H. B.; HEIJNEN, J. J. A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by mechanical agitation of *streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 17, n. 2, p. 336-347, Apr. 2001. Disponível em: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/bipret/2001/17/i02/pdf/bp0001617.pdf>. Acesso em: 27 out. 2006.

ROUSSEAU, P. J.; van ZOMEREN, B. C. Unmasking multivariate outliers and leverage points. **Journal of the American Statistical Association**, Boston, v. 85, n. 411, p. 633-639, Sep. 1990. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/pdfplus/2289995.pdf>. Acesso em: 27 out. 2006.

SARRÀ, M.; REDIN, I.; OCHIN, F.; GÓDIN, F.; CASAS, C. 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, Nov. 1993.

SCHMIDELL NETTO, W. **Estudo do processo fermentativo contínuo de produção de amiglosidase por *aspergillus niger* NRRL 337 – comparação com o processo descontínuo**. 1986. 1v. Tese de (Livre Docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

SEBASTINE, I. M.; STOCKS, S. M.; COX, P. W.; THOMAS, C. R. Characterisation of percentage viability of *streptomyces clavuligerus* using image analysis. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v. 13, n. 6, p. 419-423, Jun. 1999. Disponível em: <http://www.springerlink.com/w10077.dotlib.com.br/content/g53453l38t6ltn1t/fulltext.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2007.

SHIOYA, S.; MORIKAWA, M.; KAJIHARA, Y.; SHIMIZU, H. Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, n. 2, p. 164-169, Feb. 1999. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/envknjr3tauji0hup/fulltext.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2007.

STOCKS, S. M.; BacLight. Determination of the site of antibiotic production within a mycelium using image analysis. Disponível em: <http://web.bham.ac.uk/s.m.stocks.cen/Imageanalysis.htm> Acesso em: 18/06/2003.

STROHL, W. R. **Biotechnology of antibiotics**. 2.ed. rev. exp. New York: Marcel Dekker, 1997. 842p.

TABAREZ, M. R. **Discovery of the new antimicrobial compound 7-O-malonyl macrolactina A**. 2005. 167p. Tese de (Doutorado) - Universidade Técnica Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, Alemanha, 2005.

TAMURA, S.; PARK, Y.; TORIYAMA, M.; OKABE, M. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *streptomyces fradiae* under various shear conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 83, n. 6, p. 523-528, 1997. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T8G-3RY5F41-3-1&_cdi=5086&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=12%2F31%2F1997&_sk=999169993&_view=c&_wchp=dGLbVIW-zSkWA&_md5=ef9ce9a33a730c5a84cc2bb46556c07e&_ie=/sdarticle.pdf. Acesso em: 21 ago. 2007.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 656p.

VANHOUTTE, B.; PONS, M.N.; THOMAS, C.R.; LOUVEL, L.; VIVIER, H. Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 48, p.1-11, 1995.

VIRGILIO, A.; MARCELLI, E.; AGRIMINO, A. Aeration-agitation studies on the rifamycin fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 6, n. 3, p. 271-283, Sep. 1964.

WEZEL, G. P.; KRABBen, P.; TRAAG, B. A.; KEIJSER, B. J. F.; KERSTE, R.; VIJGENBOOM, E.; HEIJNEN, J. J.; KRAAL, B. Unlocking *streptomyces* spp.: use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, n. 8, p. 5283-5288, Aug. 2006. Disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/72/8/5283>. Acesso em: 21 ago. 2007.

WIEBE, M. G.; TRINCI, A. P. J. Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 38, n. 1, p. 75-81, Jun. 1991.

WONGWICHARN, A.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *aspergillus niger* B1-D. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 65, n. 4, p. 416-424, Nov. 1999. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/71003560/PDFSTART>. Acesso em: 21 ago. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests**. Geneva: WHO, 1961. (Technical Report Series, n. 210) Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_210.pdf. Acesso em: 15 out. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. [S.l]: [S.n.], 2006. (Fact Sheet, n. 297). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>. Acesso em: 09 fev. 2008.

YANG, Y. K.; MORIKAWA, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA, K. I.; NIHIRA, J.; YAMADA, Y. Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by

batch culture of *streptomyces virginiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 7-12, 1996. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T8G-3VXF8FS-2-1&_cdi=5086&_user=5674931&_orig=browse&_coverDate=12%2F31%2F1996&_sk=999189998&_view=c&_wchp=dGLbVlb-zSkWA&_md5=9240a55e65e3e9523aadc1b7a8b6f9ea&_ie=/sdarticle.pdf. Acesso em: 21 ago. 2007.

ANEXO 1

Resultados dos ensaios do planejamento fatorial – tabelas completas

Tabela A1.2. Resultados dos ensaios do grupo 2.

GRUPO 2													
ensaio	N (rpm)	OD (%)	D (1/h)	TR (h)									
PC3	500	50	0,15	7									
VII	300	80	0,25	4									
VIII	700	80	0,25	4									
II	700	20	0,05	20									
III	300	80	0,05	20									

t (h)	X (g/L)	Ret (UA)	GLC (g/L)		TR = tempo de residência								
0	0,41	0,00	11,22	descontínuo	média = média de três análises consecutivas								
4	0,36	0,00	10,86		desv pad = desvio padrão								
8	1,15	0,00	4,20		cv = coeficiente de variação (%)								
12	2,80	0,00	3,26		conc. celular			retamicina			glicose		
16	4,42	0,12	4,85		media	desv pad	cv	media	desv pad	cv	media	desv pad	cv
25	4,46	0,17	4,67	início 16h									
29,5	3,85	0,26	5,11	PC3	4,40	0,52	11,8	0,21	0,05	22,7	4,82	0,25	5,2
33	4,88	0,20	4,67		4,71	0,79	16,8	0,22	0,03	15,4	4,01	1,54	38,5
37	5,40	0,20	2,24		5,24	0,31	5,9	0,21	0,01	4,2	3,86	1,40	36,3
39,5	5,43	0,22	4,67		5,45	0,05	1,0	0,20	0,01	4,8	3,82	1,36	35,7
48	5,51	0,20	4,53										
53	4,76	0,14	5,79	início 49h									
57	4,01	0,20	5,94	VII	4,37	0,38	8,6	0,16	0,03	21,5	5,87	0,07	1,2
59	4,34	0,14	5,87		4,24	0,20	4,7	0,16	0,03	19,0	5,84	0,11	1,9
61	4,38	0,15	5,72		4,36	0,02	0,5	0,14	0,01	8,0	5,82	0,08	1,4
63	4,37	0,13	5,87										
71,5	3,78	0,08	6,30										
73,5	3,83	0,05	6,30	início 63,5 h									
75	3,93	0,01	6,37	VIII	3,85	0,08	2,0	0,05	0,04	76,9	6,33	0,04	0,7
76,5	3,89	0,01	6,23		3,88	0,06	1,4	0,02	0,02	101	6,30	0,07	1,2
101,5	5,11	1,69	0,05										
116	4,62	1,14	4,46										
133	3,94	1,68	4,24										
143,5	4,33	0,95	2,14	início 77 h									
154	4,11	0,66	1,16	II	4,56	0,59	12,9	1,50	0,31	20,9	2,91	2,48	85,2
166	4,07	0,52	1,05		4,30	0,34	8,0	1,26	0,38	30,1	3,61	1,28	35,5
176	4,70	0,63	2,57										
190	5,01	0,55	0,00										
200	5,67	0,48	0,00										
214	5,34	0,43	0,00	início 144h									
221,5	5,44	0,41	0,00	III	4,29	0,35	8,2	0,60	0,08	12,7	1,59	0,85	53,3
					4,73	0,69	14,5	0,52	0,11	21,4	1,21	1,05	87,1
					3,24	0,22	6,9	0,39	0,06	14,4	0,86	1,15	134,2
					3,56	0,46	13,0	0,34	0,05	14,4	0,00	0,00	
					3,67	0,23	6,2	0,30	0,04	11,7	0,00	0,00	

Tabela A1.5 Resultados dos ensaios do grupo 5.

GRUPO 5										
ensaio	N (rpm)	OD (%)	D (1/h)	TR (h)						
PC5	500	50	0,15	7						
PC6	500	50	0,15	7						

t (h)	X (g/L)	Ret (UA)	GLC (g/L)		TR = tempo de residência média = média de três análises consecutivas desv pad = desvio padrão <div>cv = coeficiente de variação (%)</div>								
0	0,46	0,00	11,85	descontínuo	conc. celular			retamicina			glicose		
4	0,47	0,00	5,77		media	desv pad	cv	media	desv pad	cv	media	desv pad	cv
8	1,44	0,00	5,32										
16	6,59	0,07	5,92										
30	5,14	0,29	5,58										
33,5	5,29	0,30	5,66	PC5 3,15 TR	5,20	0,08	1,5	0,287	0,01	4,9	4,97	1,13	22,73
37	5,17	0,27	3,67										
51	5,17	0,28	4,27										
54,5	4,96	0,29	4,36										
58	5,11	0,30	4,40										
				PC6 3,15 TR	5,08	0,11	2,2	0,293	0,01	4,1	4,34	0,06	1,49

ANEXO 2**REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA E ANOVA
PARA PLANEJAMENTO FATORIAL
COM QUATRO ENSAIOS NO PONTO CENTRAL**

Os cálculos podem ser feitos conforme descrito por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2005), por Rodrigues e lemma (2005) e por Montgomery (2005) para um planejamento fatorial em dois níveis com três fatores sem repetição, incluindo-se 4 ensaios no ponto central. Os cálculos considerando-se apenas os fatores significativos é descrito por Neter, Wasserman e Kutner (1989).

Sendo:

- SSseq = soma dos quadrados sequencial (efeitos principais e interações):

$$SS_{seq} = \sum (y_i - y_m)^2$$

- SSaj = soma dos quadrados do modelo ajustado:

$$SS_{aj} = \sum (\hat{y}_i - y_m)^2$$

- Resíduo = $\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$

- Curvatura: $SS = nF * nC * \frac{(yFm - yCm)^2}{nF + nC}$

- Erro puro = $\sum (y_{PCi} - y_{Cm})^2$

- Quadrado da média = MSaj = SQaj/GL

- fator F = MSaj/erro

Onde:

GL = graus de liberdade

nF = número de ensaios previstos no planejamento fatorial

nC = número de ensaios no ponto central

SS = soma dos quadrados

y_i = resultado experimental “i”

$\hat{y}_i$ = valor calculado pelo modelo para a amostra “i”

y_{Cm} = média dos resultados obtidos nos ensaios no ponto central

y_{Fm} = média dos resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial

y_{PCi} = resultado experimental no ponto central “i”

**Efeitos e coeficientes para X (g.L⁻¹) (unidades codificadas) com 4 ensaios no PC
- MINITAB**

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		4,4737	0,1285	34,83	0,000
N	-1,0675	-0,5337	0,1285	-4,16	0,025
OD	-0,1275	-0,0637	0,1285	-0,50	0,654
μ	-1,2575	-0,6288	0,1285	-4,89	0,016
N*OD	-0,0625	-0,0313	0,1285	-0,24	0,823
N*μ	0,3675	0,1838	0,1285	1,43	0,248
OD*μ	0,6975	0,3488	0,1285	2,72	0,073
N*OD*μ	0,2825	0,1412	0,1285	1,10	0,352
Ct Pt		0,3563	0,2225	1,60	0,208

$R^2 = 94,80\%$

Análise de Variância (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Aj SS	Aj MS	F	P
Efeitos principais	3	5,4742	5,4742	1,8247	13,82	0,029
Interações 2x2	3	1,2509	1,2509	0,4170	3,16	0,185
Interações 3x3	1	0,1596	0,1596	0,1596	1,21	0,352
Curvatura	1	0,3384	0,3384	0,3384	2,56	0,208
Erro residual	3	0,3960	0,3960	0,1320		
Erro puro	3	0,3960	0,3960	0,1320		
Total	11	7,6192				

Obs: Seq SS: efeitos principais + interações 2x2 + interações 3x3 = 6,8847

Considerando-se apenas os fatores e interações significativos:

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		4,4737	0,1318	33,95	0,000
N	-1,0675	-0,5337	0,1318	-4,05	0,007
OD	-0,1275	-0,0637	0,1318	-0,48	0,646
μ	-1,2575	-0,6288	0,1318	-4,77	0,003
OD*μ	0,6975	0,3488	0,1318	2,65	0,038
Ct Pt		0,3563	0,2282	1,56	0,170

$R^2 = 89,06\%$

Análise de Variância (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Aj SS	Aj MS	F	P
Efeitos principais	3	5,4742	5,4742	1,8247	13,13	0,005
Interações 2x2	1	0,9730	0,9730	0,9730	7,00	0,038
Curvatura	1	0,3384	0,3384	0,3384	2,44	0,170
Erro residual	6	0,8335	0,8335	0,1389		
Lack of Fit	3	0,4375	0,4375	0,1458	1,10	0,468
Erro puro	3	0,3960	0,3960	0,1320		
Total	11	7,6192				

Cálculo com o software Excel:

PARA CONCENTRAÇÃO CELULAR

y				y	
N	OD	μ	X (g/L)	Xc (g/L)	ym
-1	-1	-1	6,06	6,0600	4,47375
1	-1	-1	4,97	4,9700	4,47375
-1	1	-1	5,58	5,5800	4,47375
1	1	-1	3,8	3,8000	4,47375
-1	-1	1	4,02	4,0200	4,47375
1	-1	1	3,1	3,1000	4,47375
-1	1	1	4,37	4,3700	4,47375
1	1	1	3,89	3,8900	4,47375
0	0	0	4,59	4,4738	4,8300
0	0	0	4,45	4,4738	4,8300
0	0	0	5,17	4,4738	4,8300
0	0	0	5,11	4,4738	4,8300

algoritmo de Yates		
11,03	20,41	35,79
9,38	15,38	-4,27
7,12	-2,87	-0,51
8,26	-1,4	-0,25
-1,09	-1,65	-5,03
-1,78	1,14	1,47
-0,92	-0,69	2,79
-0,48	0,44	1,13

efeitos	
-1,0675	N
-0,1275	OD
-0,0625	N * OD
-1,2575	μ
0,3675	N * μ
0,6975	OD * μ
0,2825	N * OD * μ

coeficientes	
RLM	
4,4738	Constante (yFm)
-0,5338	N
-0,0638	OD
-0,0313	N * OD
-0,6288	μ
0,1838	N * μ
0,3488	OD * μ
0,1413	N * OD * μ

RLM = regressão linear múltipla

nF = 8

nC = 4

$\Sigma (y_i - y_m)^2$

2,516189
0,246264
1,223789
0,453939
0,205889
1,887189
0,010764
0,340764

$\Sigma (y_i - y_m)^2$

2,51618906
0,24626406
1,22378906
0,45393906
0,20588906
1,88718906
0,01076406
0,34076406

$\Sigma (y_i - y_i)^2$

0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000

$\Sigma (ypc - yCm)^2$

0,0576
0,1444
0,1156
0,0784

Erro puro = 0,3960

$\Sigma (y_i - y_m)^2$ **6,8848**

$\Sigma (y_i - y_m)^2 =$ **6,8848**

$\Sigma (y_i - y_i)^2$ **0,0000**

Curvatura: $SS = ((nF * nC) * (yFm - yCm)^2) / (nF + nC) =$ **0,3384**

TOTAL = 7,6192

MS Aj = Erro da regressão/graus de liberdade

F = MS Aj/Erro puro

R² = coeficiente de correlação = 1 - SQ Erro/SQ Total

	SQ Aj	Graus Lib	MS Aj	F
Efeitos principais	5,4742	3	1,8247	13,82
Interações 2x2	1,2509	3	0,4170	3,16
Interações 3x3	0,1596	1	0,1596	1,21
Curvatura	0,3384	1	0,3384	2,56
Erro puro	0,396	3	0,132	

R² = 1 - 0,396/7,6192 = **0,9480**

Lack of fit (modelo inclui apenas fatores e interações significativos):

N (rpm)	OD(%)	μ (1/h)	X	Xc	(X-Xc) ²	CONSTANTE	
-1	-1	-1	6,06	6,05	0,00012769	N	4,4737
1	-1	-1	4,97	4,98	0,00012769	OD	-0,5337
-1	1	-1	5,58	5,22	0,12694969	μ	-0,6288
1	1	-1	3,80	4,16	0,12694969	OD * μ	0,3488
-1	-1	1	4,02	4,09	0,00540225		
1	-1	1	3,10	3,03	0,00546121		
-1	1	1	4,37	4,66	0,08625969		
1	1	1	3,89	3,60	0,08625969		

0,4375

Efeitos e coeficientes para Ret (UA) (unidades codificadas) com 4 ensaios no PC - MINITAB

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,6713	0,01277	52,58	0,000
N	-0,5025	-0,2512	0,01277	-19,68	0,000
OD	-0,0025	-0,0012	0,01277	-0,10	0,928
μ	-1,2175	-0,6088	0,01277	-47,68	0,000
N*OD	0,1125	0,0562	0,01277	4,41	0,022
N* μ	0,4075	0,2038	0,01277	15,96	0,001
OD* μ	0,0175	0,0088	0,01277	0,69	0,542
N*OD* μ	-0,1375	-0,0688	0,01277	-5,38	0,013
Ct Pt		-0,3573	0,02211	-16,16	0,001

$R^2 = 0,9991$

Análise de Variância (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Aj SS	Aj MS	F	P
Efeitos principais	3	3,46964	3,46964	1,15655	886,92	0,000
Interações 2x2	3	0,35804	0,35804	0,11935	91,52	0,002
Interações 3x3	1	0,03781	0,03781	0,03781	29,00	0,013
Curvatura	1	0,34034	0,34034	0,34034	261,00	0,001
Erro residual	3	0,00391	0,00391	0,00130		
Erro puro	3	0,00391	0,00391	0,00130		
Total	11	4,20974				

Obs: Seq SS: efeitos principais + interações 2x2 + interações 3x3 = 3,8654

Considerando-se apenas os fatores e interações significativos:

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,6713	0,01189	56,45	0,000
N	-0,5025	-0,2512	0,01189	-21,13	0,000
OD	-0,0025	-0,0012	0,01189	-0,11	0,921
μ	-1,2175	-0,6088	0,01189	-51,20	0,000
N*OD	0,1125	0,0562	0,01189	4,73	0,009
N* μ	0,4075	0,2038	0,01189	17,14	0,000
N*OD* μ	-0,1375	-0,0688	0,01189	-5,78	0,004
Ct Pt		-0,3573	0,02060	-17,35	0,000

$R^2 = 0,998$

Análise de Variância (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Aj SS	Aj MS	F	P
Efeitos principais	3	3,46964	3,46964	1,15655	1022,47	0,000
Interações 2x2	2	0,35743	0,35743	0,17871	158,00	0,000
Interações 3x3	1	0,03781	0,03781	0,03781	33,43	0,004
Curvatura	1	0,34034	0,34034	0,34034	300,89	0,000
Erro residual	4	0,00452	0,00452	0,00113		
Lack of Fit	1	0,00061	0,00061	0,00061	0,47	0,542
Erro puro	3	0,00391	0,00391	0,00130		
Total	11	4,20974				

Cálculo com software Excel:

PARA CONCENTRAÇÃO DE RETAMICINA

y			
N	OD	μ	Ret (UA)
-1	-1	-1	1,87
1	-1	-1	0,71
-1	1	-1	1,6
1	1	-1	0,94
-1	-1	1	0,09
1	-1	1	0,02
-1	1	1	0,13
1	1	1	0,01
0	0	0	0,35
0	0	0	0,336
0	0	0	0,27
0	0	0	0,3

ypc

y	ym
Ret c (UA)	
1,8700	0,67125
0,7100	0,67125
1,6000	0,67125
0,9400	0,67125
0,0900	0,67125
0,0200	0,67125
0,1300	0,67125
0,0100	0,67125
0,6713	0,314
0,6713	0,314
0,6713	0,314
0,6713	0,314

yFm

yCm

algoritmo de Yates		
2,58	5,12	5,37
2,54	0,25	-2,01
0,11	-1,82	-0,01
0,14	-0,19	0,45
-1,16	-0,04	-4,87
-0,66	0,03	1,63
-0,07	0,5	0,07
-0,12	-0,05	-0,55

efeitos	
-0,5025	N
-0,0025	OD
0,1125	N * OD
-1,2175	μ
0,4075	N * μ
0,0175	OD * μ
-0,1375	N * OD * μ

coeficientes	
RLM	
0,6713	Constante (yFm)
-0,2513	N
-0,0013	OD
0,0563	N * OD
-0,6088	μ
0,2038	N * μ
0,0088	OD * μ
-0,0688	N * OD * μ

RLM = regressão linear múltipla

nF = 8

nC = 4

$\Sigma (y_i - y_m)^2$

1,437002
0,001502
0,862577
0,072227
0,337852
0,424127
0,292952
0,437252

$\Sigma (y_i - y_m)^2$

1,437002
0,001502
0,862577
0,072227
0,337852
0,424127
0,292952
0,437252

Resíduo: $\Sigma (y_i - y_i)^2$

0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000
0,0000

$\Sigma (ypc - yCm)^2$

0,001296
0,000484
0,001936
0,000196

0,00391

$\Sigma (y_i - y_m)$ **3,8655**

$\Sigma (y_i - y_m)^2 =$ **3,8655**

$\Sigma (y_i - y_i)$ **0,0000**

Curvatura SS = $((nF * nC) * (yFm - yCm)^2) / (nF + nC) =$ **0,3403**

TOTAL = **4,2097**

MS Aj = Erro da regressão/graus de liberdade

F = MS Aj/Erro puro

R² = coeficiente de correlação = 1- SQ Erro/SQ Total

	SQ Aj	Graus Lib	MS Aj	F
Efeitos principais	3,4696	3	1,1565	889,64
Interações 2x2	0,358	3	0,1193	91,79
Interações 3x3	0,0378	3	0,0126	9,69
Curvatura	0,3403	1	0,3403	261,77
Erro puro	0,0039	3	0,0013	

R² = $1 - 0,0039/4,2097 =$ **0,9991**

Lack of fit (modelo inclui apenas fatores e interações significativos):

N (rpm)	OD(%)	μ (1/h)	Ret	Retc	(Ret-Retc)'	CONSTANTE
-1	-1	-1	1,87	1,86	7,57E-05	N
1	-1	-1	0,71	0,70	7,57E-05	OD
-1	1	-1	1,60	1,61	7,92E-05	μ
1	1	-1	0,94	0,95	7,92E-05	N * OD
-1	-1	1	0,09	0,10	7,22E-05	N * μ
1	-1	1	0,02	0,03	7,92E-05	OD * μ
-1	1	1	0,13	0,12	7,57E-05	
1	1	1	0,01	0,00	7,57E-05	

0,0006

Os cálculos que seguem foram feitos considerando-se apenas os fatores e interações significativos com o *software* MINITAB, incluindo-se 4 ensaios no PC.

Efeitos e coeficientes para S (g.L⁻¹) (unidades codificadas) com 4 ensaios no PC - MINITAB

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		3,6763	0,2659	13,82	0,001
N	0,8625	0,4312	0,2659	1,62	0,203
OD	-1,3025	-0,6512	0,2659	-2,45	0,092
μ	5,8775	2,9388	0,2659	11,05	0,002
N*OD	-0,6825	-0,3413	0,2659	-1,28	0,290
N* μ	-0,4025	-0,2013	0,2659	-0,76	0,504
OD* μ	0,1725	0,0863	0,2659	0,32	0,767
N*OD* μ	0,5825	0,2913	0,2659	1,10	0,353
Ct Pt		0,8463	0,4606	1,84	0,163

Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,97$

ANOVA para S (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	73,9708	73,9708	24,6569	43,58	0,006
Interações 2x2	3	1,3151	1,3151	0,4384	0,77	0,581
Interações 3x3	1	0,6786	0,6786	0,6786	1,20	0,353
Curvatura	1	1,9097	1,9097	1,9097	3,38	0,163
Erro residual	3	1,6973	1,6973	0,5658		
Erro puro	3	1,6973	1,6973	0,5658		
Total	11	79,5716				

Efeitos e coeficientes para Yx/s (g.g⁻¹) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,8424	0,03790	22,23	0,000
N	0,0170	0,0085	0,03790	0,22	0,837
OD	-0,2351	-0,1175	0,03790	-3,10	0,053
μ	0,5521	0,2761	0,03790	7,28	0,005
N*OD	-0,1025	-0,0512	0,03790	-1,35	0,269
N* μ	0,0664	0,0332	0,03790	0,88	0,446
OD* μ	-0,0582	-0,0291	0,03790	-0,77	0,499
N*OD* μ	0,0204	0,0102	0,03790	0,27	0,805
Ct Pt		0,0480	0,06564	0,73	0,517

Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,95$

ANOVA para Yx/s ($g.g^{-1}$) (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,720794	0,720794	0,240265	20,91	0,016
Interação 2x2	3	0,036588	0,036588	0,012196	1,06	0,481
Interação 3x3	1	0,000835	0,000835	0,000835	0,07	0,805
Curvatura	1	0,006151	0,006151	0,006151	0,54	0,517
Erro Residual	3	0,034468	0,034468	0,011489		
Erro puro	3	0,034468	0,034468	0,011489		
Total	11	0,798837				

Efeitos e coeficientes para Yx/s corr ($g.g^{-1}$) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constant		0,37098	0,01458	25,44	0,000
N	-0,05562	-0,02781	0,01458	-1,91	0,153
OD	-0,03411	-0,01706	0,01458	-1,17	0,327
μ	0,06701	0,03350	0,01458	2,30	0,105
N*OD	-0,01778	-0,00889	0,01458	-0,61	0,585
N* μ	0,01265	0,00632	0,01458	0,43	0,694
OD* μ	0,04637	0,02318	0,01458	1,59	0,210
N*OD* μ	0,03342	0,01671	0,01458	1,15	0,335
Ct Pt		0,05220	0,02526	2,07	0,131

Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,8$ ANOVA para Yx/s corr ($g.g^{-1}$) (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,0174952	0,0174952	0,005832	3,43	0,169
Interação 2x2	3	0,0052516	0,0052516	0,001751	1,03	0,491
Interação 3x3	1	0,0022333	0,0022333	0,002233	1,31	0,335
Curvatura	1	0,0072650	0,0072650	0,007265	4,27	0,131
Erro Residual	3	0,0051028	0,0051028	0,001701		
Erro puro	3	0,0051028	0,0051028	0,001701		
Total	11	0,0373478				

Efeitos e coeficientes para $Yret/s$ ($UA.g^{-1}.L$) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,07720	0,003528	21,88	0,000
N	-0,05142	-0,02571	0,003528	-7,29	0,005
OD	-0,00834	-0,00417	0,003528	-1,18	0,323
μ	-0,11958	-0,05979	0,003528	-16,95	0,000
N*OD	0,00302	0,00151	0,003528	0,43	0,697
N*μ	0,02801	0,01401	0,003528	3,97	0,029
OD* μ	0,00718	0,00359	0,003528	1,02	0,384
N*OD* μ	-0,00786	-0,00393	0,003528	-1,11	0,347
Ct Pt		-0,01733	0,006111	-2,84	0,066

Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,991$

ANOVA para Yret/s (UA.g⁻¹.L) (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,0340259	0,0340259	0,0113420	113,91	0,001
Interação 2x2	3	0,0016906	0,0016906	0,0005635	5,66	0,094
Interação 3x3	1	0,0001235	0,0001235	0,0001235	1,24	0,347
Curvatura	1	0,0008005	0,0008005	0,0008005	8,04	0,066
Erro Residual	3	0,0002987	0,0002987	0,0000996		
Erro puro	3	0,0002987	0,0002987	0,0000996		
Total	11	0,0369392				

Efeitos e coeficientes para Px (g.L⁻¹.h⁻¹) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,60894	0,01940	31,39	0,000
N	-0,12638	-0,06319	0,01940	-3,26	0,047
OD	0,05062	0,02531	0,01940	1,30	0,283
μ	0,70463	0,35231	0,01940	18,16	0,000
N*OD	0,02037	0,01019	0,01940	0,53	0,636
N*μ	-0,04863	-0,02431	0,01940	-1,25	0,299
OD*μ	0,09187	0,04594	0,01940	2,37	0,099
N*OD*μ	0,03462	0,01731	0,01940	0,89	0,438
Ct Pt		0,11556	0,03360	3,44	0,041

Coeficiente de correlação: R² = 0,991ANOVA para Px (g.L⁻¹.h⁻¹) (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	1,03006	1,03006	0,343353	114,05	0,001
Interação 2x2	3	0,02244	0,02244	0,007480	2,48	0,237
Interação 3x3	1	0,00240	0,00240	0,002398	0,80	0,438
Curvatura	1	0,03561	0,03561	0,035613	11,83	0,041
Erro Residual	3	0,00903	0,00903	0,003011		
Erro puro	3	0,00903	0,00903	0,003011		
Total	11	1,09954				

Efeitos e coeficientes para Pret (UA.h⁻¹) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,03983	0,001656	24,05	0,000
N	-0,03449	-0,01724	0,001656	-10,41	0,002
OD	0,00099	0,00049	0,001656	0,30	0,785
μ	-0,04841	-0,02421	0,001656	-14,62	0,001
N*OD	0,00334	0,00167	0,001656	1,01	0,388
N*μ	0,01074	0,00537	0,001656	3,24	0,048
OD*μ	0,00276	0,00138	0,001656	0,83	0,465
N*OD*μ	-0,00959	-0,00479	0,001656	-2,89	0,063
Ct Pt		0,00764	0,002868	2,67	0,076

Coeficiente de correlação: R² = 0,991

ANOVA para Pret (UA.h⁻¹) (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,00706827	0,00706827	0,00235609	107,40	0,002
Interação 2x2	3	0,00026813	0,00026813	0,00008938	4,07	0,139
Interação 3x3	1	0,00018384	0,00018384	0,00018384	8,38	0,063
Curvatura	1	0,00015581	0,00015581	0,00015581	7,10	0,076
Erro Residual	3	0,00006581	0,00006581	0,00002194		
Erro puro	3	0,00006581	0,00006581	0,00002194		
Total	11	0,00774185				

Efeitos e coeficientes para Yret/x (UA.g.L⁻¹) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,1300	0,003987	32,61	0,000
N	-0,0588	-0,0294	0,003987	-7,37	0,005
OD	0,0205	0,0102	0,003987	2,57	0,083
μ	-0,2294	-0,1147	0,003987	-28,77	0,000
N*OD	0,0283	0,0141	0,003987	3,55	0,038
N*μ	0,0372	0,0186	0,003987	4,67	0,019
OD*μ	-0,0187	-0,0094	0,003987	-2,35	0,101
N*OD*μ	-0,0339	-0,0169	0,003987	-4,25	0,024
Ct Pt		-0,0638	0,006905	-9,25	0,003

Coeficiente de correlação: R² = 0,997ANOVA para Yret/x (UA.g.L⁻¹) (unidades codificadas)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,113008	0,113008	0,0376693	296,26	0,000
Interação 2x2	3	0,005071	0,005071	0,0016903	13,29	0,031
Interação 3x3	1	0,002298	0,002298	0,0022978	18,07	0,024
Curvatura	1	0,010868	0,010868	0,0108678	85,47	0,003
Erro Residual	3	0,000381	0,000381	0,0001272		
Erro puro	3	0,000381	0,000381	0,0001272		
Total	11	0,131626				

Efeitos e coeficientes para Pret / X (UA.g.L⁻¹.h⁻¹) (unidades codificadas)

Termo	Efeito	Coef	SE Coef	T	P
Constante		0,008029	0,000598	13,43	0,001
N	-0,005095	-0,002547	0,000598	-4,26	0,024
OD	0,001197	0,000598	0,000598	1,00	0,391
μ	-0,008413	-0,004206	0,000598	-7,03	0,006
N*OD	0,000852	0,000426	0,000598	0,71	0,528
N*μ	-0,000294	-0,000147	0,000598	-0,25	0,821
OD*μ	-0,000762	-0,000381	0,000598	-0,64	0,569
N*OD*μ	-0,002257	-0,001128	0,000598	-1,89	0,156
Ct Pt		0,001895	0,001036	1,83	0,165

Coeficiente de correlação: R² = 0,96

ANOVA para Pret / X (UA.g.L⁻¹.h⁻¹) (coded units)

Fonte	GL	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,00019633	0,00019633	0,00006544	22,87	0,014
Interação 2x2	3	0,00000278	0,00000278	0,00000093	0,32	0,810
Interação 3x3	1	0,00001019	0,00001019	0,00001019	3,56	0,156
Curvatura	1	0,00000957	0,00000957	0,00000957	3,35	0,165
Erro Residual	3	0,00000858	0,00000858	0,00000286		
Erro puro	3	0,00000858	0,00000858	0,00000286		
Total	11	0,00022745				

ERRATA

Página/linha	Onde se lê	Leia-se
Resumo / 9	... modelos estatísticos e a reprodutibilidade do	... modelos estatísticos e a variabilidade do ...
Abstract / 8	... statistical models and reproducibility ...	... statistical models and variability ...
Abstract / 15	... reatmycin ...	... retamycin ...
24 / 29	... <i>Aspergillus</i> ...	... <i>Aspergilli</i> ...
26 / 15	... fonte de carbono, uma de nitrogênio ...	... fonte de carbono orgânico, uma de nitrogênio ...
54 / 21	... quando o crescimento ocorreu na forma de <i>pellets</i> pequenos ...	... quando o pH foi igual a 2,5, levando à obtenção de <i>pellets</i> pequenos ...
61 / 14	Foi avaliado o erro na determinação...	Foi avaliada a variabilidade na determinação ...
67 / 26 eq. 3.3	$\frac{dX}{dt} = (X_0 - X) \cdot \frac{F}{V} = \mu * X$	$\frac{dX}{dt} = (X_0 - X) \cdot \frac{F}{V} + \mu * X$
70 / 1 eq. 3.17	$cv = \frac{100 * s}{N} (\%)$	$cv = \frac{100 * s}{X_m} (\%)$
84 / 31	 figura 4.10b.	... figura 4.10a.