CELSO RICARDO DENSER PAMBOUKIAN

**Produção do Antitumoral Retamicina por
Streptomyces olindensis em Processos Descontínuo
Alimentado e Contínuo**

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

São Paulo
2003

CELSO RICARDO DENSER PAMBOUKIAN

**Produção do Antitumoral Retamicina por
Streptomyces olindensis em Processos Descontínuo
Alimentado e Contínuo**

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

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Cândida Reginato Facciotti

São Paulo
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Pamboukian, Celso Ricardo Denser

Produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis* em processos descontínuo alimentado e contínuo. São Paulo, 2003.

163p.

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

1. Retamicina - Síntese 2. *Streptomyces olindensis* - Morfologia 3. *Streptomyces olindensis* - Análise de imagens 4. Processos descontínuos alimentados e contínuos I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química. II. t.

A Excelência da Caridade

¹Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver caridade, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine.

²Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, não sou nada. ⁴A caridade é paciente, a caridade é bondosa. Não tem inveja. A caridade não é orgulhosa. Não é arrogante. ⁵Nem escandalosa. Não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor. ⁶Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. ⁷Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. ⁸A caridade jamais acabará.

Agradecimentos

À Professora Maria Cândida Reginato Facciotti, pela orientação, amizade e dedicação, pelas longas conversas e sugestões, essenciais para a realização de todas as etapas do Doutorado.

Aos meus pais Íris e Vicente por todo o apoio e incentivo durante toda a vida.

Aos Professores Aldo Tonso, Andreas Karoly Gombert, Beatriz Vahan Kilikian, Reinaldo Giudici e Willibaldo Schmidell pelo agradável convívio ao longo destes anos e também por todas as sugestões apresentadas no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Gabriel Padilla, do Laboratório de Genética de Microrganismos do ICB-USP, pelo fornecimento da cepa mutante de *Streptomyces olindensis* So20.

Ao Professor Roberto Guardani, pela disponibilidade na utilização do equipamento de análise de imagens, no início do trabalho.

A todos os amigos e amigas do LEB, Daniela, Elis, Fabiano, Gisele, Grace, Harm Jorge, Heloísa, Iara, Jorge Gustavo, Lana, Letícia, Luciana, Marcelo, Nuno, Olavo, Patrícia, Renata, Rogério, Sandra, por toda a ajuda na parte experimental do trabalho, mas, principalmente, pela amizade e pelo convívio ao longo destes anos, que sem dúvida tornaram o Doutorado muito mais agradável.

Aos funcionários Andréa, Orlinda, Valter e Vanessa pelo importante apoio técnico durante os ensaios e também pelo carinho e amizade que sempre demonstraram.

Aos funcionários Alexandre, Elisete e Graça, da secretaria; às funcionárias Fátima, Maria e Maria Lúcia, da biblioteca por todo o auxílio durante o Doutorado.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos

Resumo

Abstract

1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	03
2.1 O gênero <i>Streptomyces</i>	03
2.2 Retamicina	04
2.3 Análise de imagens	07
2.3.1 Histórico sobre análise de imagens	07
2.3.2 Aplicações de análise de imagens	09
2.4 Metabolismo secundário	16
2.5 Condução de processos fermentativos em reatores descontínuos alimentados	18
2.6 Condução de processos fermentativos em reatores contínuos.....	21
3. Materiais e Métodos	26
3.1 Microrganismo	26
3.2 Meios de cultura	26
3.2.1 Cultivos em fermentador	26
3.2.2 Meio de alimentação dos ensaios descontínuos alimentados.....	27
3.2.2.1 Ensaios DA-1 e DA-2	28
3.2.2.2 Ensaios DA-3, DA-4 e DA-5	28
3.2.2.3 Ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b	29
3.2.3 Meio de alimentação dos ensaios contínuos	29

3.3	Ensaaios realizados	30
3.3.1	Ensaaios descontínuos alimentados	30
3.3.2	Ensaaios contínuos	34
3.3.2.1	Aspectos práticos na execução dos ensaios contínuos	35
3.3.3	Ensaaios descontínuos padrão	40
3.4	Preparo do inóculo para o fermentador	41
3.5	Metodologias analíticas	42
3.5.1	Determinação da concentração celular (X)	42
3.5.2	Determinação da concentração de glicose (S)	44
3.5.3	Determinação da concentração de retamicina extracelular (Re)	45
3.5.4	Determinação da concentração de retamicina intracelular (Ri)	46
3.5.5	Caracterização morfológica do microrganismo	49
3.5.5.1	Preparo das lâminas	49
3.5.5.2	Análise de imagens	50
3.5.6	Caracterização reológica do caldo de fermentação	53
3.5.7	Determinação da concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$)	54
3.6	Cálculo dos parâmetros cinéticos dos ensaios	56
3.6.1	Cálculo do volume de reação	56
3.6.2	Cálculo de QO_2 e QO_2X pelo método do balanço gasoso	57
3.6.3	Cálculo das velocidades específicas nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos	59
3.6.4	Cálculo das velocidades específicas nos ensaios contínuos ..	61
3.6.5	Cálculo dos fatores de conversão e produtividades nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos	62
3.6.6	Cálculo dos fatores de conversão e produtividades nos ensaios contínuos	64
4.	Resultados e Discussão	66
4.1	Caracterização morfológica de <i>Streptomyces olindensis</i>	66
4.2	Ensaaios DA-1, DA-2 e DA-3b (descontínuos alimentados)	75
4.2.1	Ensaaios DA-1 e D-1	76
4.2.2	Ensaaios DA-2 e D-2	80
4.2.3	Ensaaios DA-3b e D-3b	84

4.2.4	Comparação entre os ensaios DA-1, DA-2 e DA-3b	88
4.3	Ensaio DA-3, DA-4 e DA-5 (descontínuos alimentados) e Ensaio D-3+ (descontínuo com maior concentração de glicose)	91
4.3.1	Ensaio DA-3, D-3 e D-3+	91
4.3.2	Ensaio DA-4 e D-4	99
4.3.3	Ensaio DA-5 e D-5	103
4.3.4	Comparação entre os ensaios DA-3, DA-4, DA-5 e D-3+	107
4.4	Ensaio DA-3b, DA-4b e DA-5b (descontínuos alimentados)	109
4.4.1	Ensaio DA-4b e D-4b	110
4.4.2	Ensaio DA-5b e D-5b	114
4.4.3	Comparação entre os ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b	118
4.5	Correlações obtidas utilizando-se os resultados dos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos	122
4.6	Ensaio contínuo C-1, C-2, C-3 e C-4	125
4.6.1	Ensaio contínuo C-1	126
4.6.2	Ensaio contínuo C-2	129
4.6.3	Ensaio contínuo C-3	133
4.6.4	Ensaio contínuo C-4	137
4.6.5	Comparação entre os ensaios contínuos	142
5.	Conclusões	149
6.	Referências Bibliográficas	153

Apêndice A (Equacionamento dos reatores descontínuos alimentados)

Apêndice B (Equacionamento dos reatores contínuos)

Apêndice C (Fundamentos de análise de imagens)

**Apêndice D (Rotinas desenvolvidas para a análise de imagens de
Streptomyces olindensis)**

**Apêndice E (Artigo publicado no *Brazilian Journal of Microbiology*.
Volume 33, páginas 17-21, 2002. “Applications of image
analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis*
in submerged culture”)**

Apêndice F (Resultados experimentais obtidos nos ensaios)

Apêndice G (Parâmetros morfológicos obtidos nos ensaios)

Lista de Figuras

Figura 2.1	Estruturas dos dois maiores constituintes do complexo retamicina (E1 e E2), de acordo com Bieber et al. (1989)	05
Figura 3.1	Esquema de alimentação de meio e de retirada de caldo de fermentação, nos ensaios contínuos	36
Figura 3.2	Esquema da montagem do reator, em operação contínua.....	36
Figura 3.3	Conexão de balões em série, para alimentação contínua do reator.....	38
Figura 3.4	Sistema de segurança na saída de gases do biorreator.....	38
Figura 3.5	Esquema do perímetro e do perímetro convexo de um aglomerado de hifas (Tucker et al., 1992)	52
Figura 4.1	Imagem obtida com uma diluição inadequada	66
Figura 4.2	Imagem obtida com uma diluição adequada	66
Figura 4.3	Imagem de um <i>pellet</i> obtida sem o corante	67
Figura 4.4	Deteção da imagem obtida sem o corante	67
Figura 4.5	Imagem de um <i>pellet</i> obtida com o corante	67
Figura 4.6	Deteção da imagem obtida com o corante	67
Figura 4.7	Imagem de um <i>pellet</i>	68
Figura 4.8	Imagem de um <i>clump</i>	68
Figura 4.9	Imagem de uma hifa ramificada	68
Figura 4.10	Imagem de uma hifa não ramificada	68
Figura 4.11	Área média de <i>pellets</i> (A_p), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.12	Área média de <i>clumps</i> (A_{cl}), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.13	Área média de hifas ramificadas (A_{hr}), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.14	Área média de hifas não ramificadas (A_{hnr}), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.15	Área convexa média de <i>pellets</i> (AC_p), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.16	Área convexa média de <i>clumps</i> (AC_{cl}), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.17	Área convexa média de hifas ramificadas (AC_{hr}), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.18	Área convexa média de hifas não ramificadas (AC_{hnr}), no ensaio D-5.....	72
Figura 4.19	Perímetro médio de <i>pellets</i> (P_p), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.20	Perímetro médio de <i>clumps</i> (P_{cl}), no ensaio D-5.....	73

Figura 4.21	Perímetro médio de hifas ramificadas (P_{hr}), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.22	Perímetro médio de hifas não ramificadas (P_{hnr}), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.23	Perímetro convexo médio de <i>pellets</i> (PC_p), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.24	Perímetro convexo médio de <i>clumps</i> (PC_{cl}), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.25	Perímetro convexo médio de hifas ramificadas (PC_{hr}), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.26	Perímetro convexo médio de hifas não ramificadas (PC_{hnr}), no ensaio D-5.....	73
Figura 4.27	Dimensão média de <i>pellets</i> (D_p), no ensaio D-5.....	74
Figura 4.28	Dimensão média de <i>clumps</i> (D_{cl}), no ensaio D-5.....	74
Figura 4.29	Comprimento total de hifas ramificadas (L_{hr}), no ensaio D-5.....	74
Figura 4.30	Comprimento total de hifas não ramificadas (L_{hnr}), no ensaio D-5.....	74
Figura 4.31	Número de extremidades (<i>tips</i>) de hifas ramificadas (N_{hr}), no ensaio D-5.....	74
Figura 4.32	Unidade de crescimento hifal de hifas ramificadas (HGU_{hr}), no ensaio D-5.....	74
Figura 4.33	Porcentagem de <i>clumps</i> (F_{cl}), de <i>pellets</i> (F_p), de hifas ramificadas (F_{hr}) e de hifas não ramificadas (F_{hnr}), em termos de número de objetos, no ensaio D-5.....	74
Figura 4.34	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-5.....	74
Figura 4.35	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-1.....	77
Figura 4.36	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-1.....	77
Figura 4.37	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-1.....	77
Figura 4.38	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-1.....	77
Figura 4.39	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-1.....	77

Figura 4.40	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-1.....	77
Figura 4.41	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-1.....	78
Figura 4.42	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-1.....	78
Figura 4.43	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-1.....	78
Figura 4.44	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-1.....	78
Figura 4.45	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-2.....	82
Figura 4.46	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-2.....	82
Figura 4.47	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-2.....	82
Figura 4.48	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-2.....	82
Figura 4.49	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-2.....	82
Figura 4.50	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-2.....	82
Figura 4.51	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-2.....	83
Figura 4.52	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-2.....	83

Figura 4.53	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio D-2.....	83
Figura 4.54	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-3b.....	86
Figura 4.55	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-3b.....	86
Figura 4.56	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-3b.....	86
Figura 4.57	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-3b.....	86
Figura 4.58	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-3b.....	86
Figura 4.59	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-3b.....	86
Figura 4.60	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-3b.....	87
Figura 4.61	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-3b.....	87
Figura 4.62	Velocidade de consumo de oxigênio (QO ₂ X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO ₂), no ensaio DA-3b.....	87
Figura 4.63	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-3b.....	87
Figura 4.64	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio D-3b.....	87
Figura 4.65	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-3.....	95
Figura 4.66	Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio D-3.....	95

Figura 4.67	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-3+.....	95
Figura 4.68	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-3.....	95
Figura 4.69	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-3.....	95
Figura 4.70	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-3+.....	95
Figura 4.71	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-3.....	96
Figura 4.72	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-3.....	96
Figura 4.73	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-3+.....	96
Figura 4.74	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio DA-3.....	96
Figura 4.75	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio D-3.....	96
Figura 4.76	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio D-3+.....	96
Figura 4.77	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-3.....	97
Figura 4.78	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-3.....	97
Figura 4.79	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-3+.....	97
Figura 4.80	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-3.....	97

Figura 4.81	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-3.....	98
Figura 4.82	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio D-3.....	98
Figura 4.83	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio D-3+.....	98
Figura 4.84	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-4.....	101
Figura 4.85	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-4.....	101
Figura 4.86	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-4.....	101
Figura 4.87	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-4.....	101
Figura 4.88	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-4.....	101
Figura 4.89	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-4.....	101
Figura 4.90	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-4.....	102
Figura 4.91	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-4.....	102
Figura 4.92	Velocidade de consumo de oxigênio (QO ₂ X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO ₂), no ensaio DA-4.....	102
Figura 4.93	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-4.....	102
Figura 4.94	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA _{cl}), de <i>pellets</i> (FA _p), de hifas ramificadas (FA _{hr}) e de hifas não ramificadas (FA _{hnr}), em termos de área, no ensaio D-4.....	102

Figura 4.95	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-5.....	105
Figura 4.96	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-5.....	105
Figura 4.97	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-5.....	105
Figura 4.98	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-5.....	105
Figura 4.99	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-5.....	105
Figura 4.100	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-5.....	105
Figura 4.101	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-5.....	106
Figura 4.102	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-5.....	106
Figura 4.103	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-5.....	106
Figura 4.104	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-5.....	106
Figura 4.105	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-5.....	106
Figura 4.106	Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio DA-4b.....	111
Figura 4.107	Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio D-4b.....	111
Figura 4.108	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-4b.....	111

Figura 4.109	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-4b.....	111
Figura 4.110	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-4b.....	111
Figura 4.111	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-4b.....	111
Figura 4.112	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio DA-4b.....	112
Figura 4.113	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio D-4b.....	112
Figura 4.114	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-4b.....	112
Figura 4.115	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-4b.....	112
Figura 4.116	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-4b.....	112
Figura 4.117	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-4b.....	112
Figura 4.118	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-5b.....	116
Figura 4.119	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-5b.....	116
Figura 4.120	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-5b.....	116
Figura 4.121	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-5b.....	116
Figura 4.122	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-5b.....	116

Figura 4.123	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-5b.....	116
Figura 4.124	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio DA-5b.....	117
Figura 4.125	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio D-5b.....	117
Figura 4.126	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-5b.....	117
Figura 4.127	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-5b.....	117
Figura 4.128	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-5b.....	117
Figura 4.129	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-5b.....	117
Figura 4.130	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-5b.....	117
Figura 4.131	Parâmetro R em função da velocidade específica de crescimento (controle) durante a alimentação nos ensaios descontínuos alimentados (DA-3, DA-4, DA-5, DA-3b, DA-4b e DA-5b). As linhas pontilhadas representam os ensaios descontínuos padrão e o ensaio D-3+.....	121
Figura 4.132	Correlação entre o índice de consistência (K) e a concentração celular (X) nos ensaios realizados.....	122
Figura 4.133	Correlação entre o índice de comportamento (n) e a concentração celular (X) nos ensaios realizados.....	123
Figura 4.134	Correlação entre a velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}) e a velocidade específica de crescimento (μ_x) nos ensaios realizados.....	123
Figura 4.135	Correlação entre a concentração de retamicina total (Rt) e a concentração de retamicina extracelular (Re) nos ensaios realizados.....	124
Figura 4.136	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio C-1.....	128
Figura 4.137	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-1.....	128

Figura 4.138	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-1.....	128
Figura 4.139	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio C-1.....	128
Figura 4.140	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-1.....	128
Figura 4.141	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-1.....	128
Figura 4.142	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-1.....	129
Figura 4.143	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio C-2.....	131
Figura 4.144	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-2.....	131
Figura 4.145	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-2.....	131
Figura 4.146	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio C-2.....	131
Figura 4.147	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-2.....	131
Figura 4.148	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-2.....	131
Figura 4.149	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-2.....	132
Figura 4.150	Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio C-3.....	136
Figura 4.151	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-3.....	136

Figura 4.152	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-3.....	136
Figura 4.153	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio C-3.....	136
Figura 4.154	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-3.....	136
Figura 4.155	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-3.....	136
Figura 4.156	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-3.....	137
Figura 4.157	Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio C-4.....	140
Figura 4.158	Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-4.....	140
Figura 4.159	Biorreator, no ensaio C-4, com 168 horas de cultivo (término da primeira etapa contínua).....	140
Figura 4.160	Biorreator, no ensaio C-4, com 172 horas de cultivo (segunda etapa contínua).....	140
Figura 4.161	Biorreator, no ensaio C-4, com 176 horas de cultivo (segunda etapa contínua).....	140
Figura 4.162	Biorreator, no ensaio C-4, com 180 horas de cultivo (segunda etapa contínua).....	140
Figura 4.163	Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-4.....	141
Figura 4.164	Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio C-4.....	141
Figura 4.165	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-4.....	141
Figura 4.166	Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-4.....	141
Figura 4.167	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-4.....	141

Figura 4.168	Concentração celular no estado estacionário (X_f), em função da vazão específica de alimentação (D).....	145
Figura 4.169	Concentração de substrato no estado estacionário (S_f), em função da vazão específica de alimentação (D)	145
Figura 4.170	Concentração de íons amônio no estado estacionário (C_{NH4+}), em função da vazão específica de alimentação (D)	145
Figura 4.171	Concentração de retamicina total no estado estacionário (R_{tf}), em função da vazão específica de alimentação (D)	145
Figura 4.172	Velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), em função da vazão específica de alimentação (D)	145
Figura 4.173	Velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), em função da vazão específica de alimentação (D).....	145
Figura 4.174	Velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), em função da vazão específica de alimentação (D).....	146
Figura 4.175	Fator de conversão substrato a células ($Y_{X/S}$), em função da vazão específica de alimentação (D).....	146
Figura 4.176	Fator de conversão substrato a retamicina total ($Y_{Rt/S}$), em função da vazão específica de alimentação (D).....	146
Figura 4.177	Produtividade em células (P_X) e Produtividade em retamicina total (P_{Rt}), em função da vazão específica de alimentação (D)...	146
Figura 4.178	Produção específica em retamicina total (PE_{Rt}), em função da vazão específica de alimentação (D).....	146
Figura 4.179	Porcentagem de <i>clumps</i> (FA_{cl}), de <i>pellets</i> (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, em função da vazão específica de alimentação (D).....	146
Figura C.1	Esquema dos níveis de cinza em uma imagem	C3
Figura C.2	Elemento estrutural ou operador	C5
Figura C.3	Imagem binária	C13
Figura C.4	(A) Imagem binária sobreposta à imagem cinza (B) Imagem binária isolada	C13
Figura C.5	(A) Imagem original (B) Processo de erosão (C) Imagem erodida	C15
Figura C.6	Separação de objetos (erosão) (A) Imagem original (B) Imagem erodida	C15
Figura C.7	(A) Imagem original (B) Processo de dilatação (C) Imagem dilatada	C15
Figura C.8	(A) Imagem original (B) Imagem após esqueletização exaustiva (C) Imagem após encurtamento	C17

Lista de Tabelas

Tabela 3.1	Composição dos meios de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados (DA-1, DA-2, DA-3, DA-4, DA-5, DA-3b, DA-4b e DA-5b).....	29
Tabela 3.2	Resumo das condições dos ensaios descontínuos alimentados realizados	31
Tabela 3.3	Ensaio descontínuo alimentado realizado (DA-1, DA-2 e DA-3b).....	32
Tabela 3.4	Ensaio descontínuo alimentado realizado (DA-3, DA-4 e DA-5).....	33
Tabela 3.5	Ensaio descontínuo alimentado (DA-3b, DA-4b e DA-5b)....	35
Tabela 3.6	Ensaio contínuo realizado (C-1, C-2, C-3 e C-4).....	39
Tabela 3.7	Diluições utilizadas no preparo das lâminas para caracterização morfológica de <i>Streptomyces olindensis</i> , em função do tempo de cultivo.....	49
Tabela 3.8	Ferramentas do <i>software</i> QWin, selecionadas para o processamento das imagens, para cada classe morfológica.....	51
Tabela 4.1	Resumo dos resultados dos ensaios DA-1, DA-2, DA-3b, D-1, D-2 e D-3b.....	90
Tabela 4.2	Resumo dos resultados dos ensaios DA-3, DA-4, DA-5, D-3+, D-3, D-4 e D-5.....	108
Tabela 4.3	Resumo dos resultados dos ensaios DA-3b, DA-4b, DA-5b, D-3b, D-4b e D-5b.....	120
Tabela 4.4	Resumo dos resultados dos ensaios contínuos C-1, C-2, C-3 e C-4 e média dos ensaios descontínuos padrão.....	143
Tabela A1	Estimativas utilizadas nos cálculos das vazões de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados	A5
Tabela A2	Valores reais para os cálculos das vazões de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados (baseado no Apêndice F), considerando-se $Y_{X/S} = 0,43 \text{ g/g}$	A5
Tabela F1	Resultados experimentais do ensaio DA-1	F1
Tabela F2	Resultados experimentais do ensaio D-1	F2
Tabela F3	Resultados experimentais do ensaio DA-2	F3
Tabela F4	Resultados experimentais do ensaio D-2	F4
Tabela F5	Resultados experimentais do ensaio DA-3	F5

Tabela F6	Resultados experimentais do ensaio D-3	F6
Tabela F7	Resultados experimentais do ensaio D-3+	F8
Tabela F8	Resultados experimentais do ensaio DA-4	F9
Tabela F9	Resultados experimentais do ensaio D-4	F11
Tabela F10	Resultados experimentais do ensaio DA-5	F12
Tabela F11	Resultados experimentais do ensaio D-5	F13
Tabela F12	Resultados experimentais do ensaio DA-3b	F14
Tabela F13	Resultados experimentais do ensaio D-3b	F16
Tabela F14	Resultados experimentais do ensaio DA-4b	F17
Tabela F15	Resultados experimentais do ensaio D-4b	F18
Tabela F16	Resultados experimentais do ensaio DA-5b	F19
Tabela F17	Resultados experimentais do ensaio D-5b	F20
Tabela F18	Resultados experimentais do ensaio C-1	F21
Tabela F19	Resultados experimentais do ensaio C-2	F23
Tabela F20	Resultados experimentais do ensaio C-3	F24
Tabela F21	Resultados experimentais do ensaio C-4	F27
Tabela F22	Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$, em mM) nos ensaios	F32
Tabela G1	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-1	G1
Tabela G2	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-2	G1
Tabela G3	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-2.....	G2
Tabela G4	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-3.....	G2
Tabela G5	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3.....	G3
Tabela G6	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3+.....	G3
Tabela G7	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-4.....	G4
Tabela G8	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-4.....	G5
Tabela G9	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-5.....	G5
Tabela G10	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-5.....	G6
Tabela G11	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-3b.....	G7
Tabela G12	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3b.....	G7
Tabela G13	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-4b.....	G8
Tabela G14	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-4b.....	G8
Tabela G15	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-5b.....	G9
Tabela G16	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-5b.....	G9

Tabela G17	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-1.....	G10
Tabela G18	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-2.....	G10
Tabela G19	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-3.....	G11
Tabela G20	Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-4.....	G12

Lista de Símbolos

A	Parâmetro na equação de vazão de alimentação no equacionamento dos ensaios descontínuos alimentados (mL/h)
ABS	Absorbância a 547 nm
AC_{cl}	Área convexa média de <i>clumps</i> (μm^2)
AC_{hr}	Área convexa média de hifas ramificadas (μm^2)
A_{cl}	Área média de <i>clumps</i> (μm^2)
AC_{nh}	Área convexa média de hifas não ramificadas (μm^2)
AC_p	Área convexa média de <i>pellets</i> (μm^2)
A_{hr}	Área média de hifas ramificadas (μm^2)
A_{nh}	Área média de hifas não ramificadas (μm^2)
A_p	Área média de <i>pellets</i> (μm^2)
B	Parâmetro na equação de vazão de alimentação no equacionamento dos ensaios descontínuos alimentados (h^{-1})
C	Concentração de oxigênio dissolvido no meio (mmol/L)
C_{NH4+}	Concentração de íons amônio no caldo de fermentação (mM)
d	Densidade da amostra (considerada 1000 g/L)
D	Vazão específica de alimentação (h^{-1})
d_A	Densidade da solução de HCl 2N = 1009,46 g/L (Perry; Chilton, 1973)
d_{água}	Densidade da água (1000 g/L)
d_B	Densidade da solução de NaOH 2N = 1075,93 g/L (Perry; Chilton, 1973)
D_{cl}	Dimensão média de <i>clumps</i> (μm)
Dil	Fator de diluição da amostra (adimensional)
D_p	Dimensão média de <i>pellets</i> (μm)
FA_{cl}	Porcentagem de <i>clumps</i> , em termos de área (%)
FA_{hr}	Porcentagem de hifas ramificadas, em termos de área (%)
FA_{nh}	Porcentagem de hifas não ramificadas, em termos de área (%)
FA_p	Porcentagem de <i>pellets</i> , em termos de área (%)
F_{cl}	Porcentagem de <i>clumps</i> , em termos de número de objetos (%)
F_{hr}	Porcentagem de hifas ramificadas, em termos de número de objetos (%)
F_{nh}	Porcentagem de hifas não ramificadas, em termos de número de objetos (%)
F_p	Porcentagem de <i>pellets</i> , em termos de número de objetos (%)

HGU_{hr}	Unidade de Crescimento Hifal (<i>Hyphal Growth Unit</i>) de hifas ramificadas (μm)
K	Índice de consistência do caldo ($\text{dina.s}^n/\text{cm}^2 = 100 \text{ cP.s}^{n-1}$)
K_f	Índice de consistência do caldo em estado estacionário, nos ensaios contínuos ($\text{dina.s}^n/\text{cm}^2$)
L_{hr}	Comprimento total de hifas ramificadas (μm)
L_{nh}	Comprimento total de hifas não ramificadas (μm)
M_a	Massa da amostra (g)
M_A	Massa de solução de HCl 2N adicionada até o instante t (g)
M_B	Massa de solução de NaOH 2N adicionada até o instante t (g)
M_p	Massa da membrana ou do papel de filtro (g)
M_{pc}	Massa da membrana contendo a massa seca de células (g)
M_{ri}	Massa de retamicina no líquido após a extração (g)
M_s	Massa das células secas (g)
M_t	Massa do tubo de centrífuga (g)
M_{ts}	Massa do tubo de centrífuga com as células secas (g)
M_{tu}	Massa do tubo de centrífuga com as células úmidas (g)
M_u	Massa das células úmidas (g)
m_s	Consumo de glicose para manutenção celular ($\text{g}/(\text{g.h})$)
m_o	Consumo de oxigênio para manutenção celular ($\text{mmol}/(\text{g.h})$)
n	Índice de comportamento do escoamento (adimensional)
N_{hr}	Número de extremidades de hifas ramificadas (adimensional)
OD	Oxigênio dissolvido (%)
PC_{cl}	Perímetro convexo médio de <i>clumps</i> (μm)
PC_{hr}	Perímetro convexo médio de hifas ramificadas (μm)
P_{cl}	Perímetro médio de <i>clumps</i> (μm)
PC_{nh}	Perímetro convexo médio de hifas não ramificadas (μm)
PC_p	Perímetro convexo médio <i>pellets</i> (μm)
PE_{Re}	Produção específica em retamicina extracelular (g/g)
PE_{Ri}	Produção específica em retamicina intracelular (g/g)
PE_{Rt}	Produção específica em retamicina total (g/g)
P_f	Concentração produto no reator no estado estacionário (g/L)
P_{hr}	Perímetro médio de hifas ramificadas (μm)

P_{nhf}	Perímetro médio de hifas não ramificadas (μm)
P_p	Perímetro médio de <i>pellets</i> (μm)
P_{Re}	Produtividade em retamicina extracelular ($\text{g}/(\text{L.h})$)
P_{Ri}	Produtividade em retamicina intracelular ($\text{g}/(\text{L.h})$)
P_{Rt}	Produtividade em retamicina total ($\text{g}/(\text{L.h})$)
P_X	Produtividade em células ($\text{g}/(\text{L.h})$)
QO_{2f}	Velocidade específica de consumo de oxigênio em estado estacionário, nos ensaios contínuos ($\text{mmol}/(\text{g.h})$)
QO₂	Velocidade específica de consumo de oxigênio ($\text{mmol}/(\text{g.h})$)
QO_{2max}	Velocidade específica máxima de consumo de oxigênio ($\text{mmol}/(\text{g.h})$)
QO_{2X}	Velocidade de consumo de oxigênio ($\text{mmol}/(\text{L.h})$)
R	Relação entre a produção específica em retamicina total obtida no ensaio descontínuo alimentado e a produção específica em retamicina total obtida no ensaio descontínuo padrão realizado em paralelo (adimensional)
Re	Concentração de retamicina extracelular no reator no instante t (g/L)
Re*	Concentração de retamicina na amostra diluída (g/L)
Re_f	Concentração de retamicina extracelular no estado estacionário, nos ensaios contínuos (g/L)
Re_f	Concentração máxima de retamicina extracelular, nos ensaios descontínuos e descontínuos alimentados (g/L)
Re_m	Massa de retamicina extracelular no reator no instante t (g)
Ri	Concentração de retamicina intracelular no reator no instante t (g/L)
Ri_f	Concentração de retamicina intracelular no estado estacionário, nos ensaios contínuos (g/L)
Ri_f	Concentração máxima de retamicina intracelular, nos ensaios descontínuos e descontínuos alimentados (g/L)
Ri_m	Total de retamicina intracelular no reator no instante t (g)
Rt	Concentração de retamicina total no reator no instante t (g/L)
Rt_f	Concentração de retamicina total no estado estacionário, nos ensaios contínuos (g/L)
Rt_f	Concentração máxima de retamicina total, nos ensaios descontínuos e descontínuos alimentados (g/L)
Rt_m	Massa de retamicina total no reator no instante t (g)

S	Concentração de glicose no reator no instante t (g/L)
S₀	Concentração de substrato limitante (glicose) no reator no instante t_0 (g/L)
S_f	Concentração de substrato limitante (glicose) no reator no estacionário (g/L)
S_i	Concentração de substrato limitante (glicose) na alimentação (g/L)
S_{ini}	Concentração inicial de substrato (glicose) nos ensaios (g/L)
S_m	Massa de substrato limitante (glicose) no reator no instante t (g)
S_t	Concentração total de substrato, que corresponde à massa total de glicose no ensaio (inicial + alimentada) dividida pelo volume total de fermentação (g/L)
t'''_f	Instante da concentração máxima de retamicina total (h)
t''_f	Instante da concentração máxima de retamicina intracelular (h)
t'_f	Instante da concentração máxima de retamicina extracelular (h)
t₀	Instante de início da alimentação, nos ensaios descontínuos alimentados (h)
t_f	Instante da concentração celular máxima (h)
U_p	Teor de umidade da membrana ou do papel de filtro (%)
V	Volume de reação no instante t (L)
V₀	Volume de reação no instante t_0 (L)
V_A	Volume acumulado de retirada de amostras até o instante t (L)
V_a	Volume da amostra, aproximadamente igual à massa da amostra pesada inicialmente, considerando-se sua densidade igual a 1,0 g/mL (mL)
V_{água}	Volume de água contida nas células úmidas (mL)
V_{Alim}	Volume de meio alimentado até o instante t (L)
V_{ARR}	volume perdido por arraste até o instante t (L)
V_D	Volume acumulado de amostras desprezadas até o instante t (L)
V_{ini}	Volume inicial, após a inoculação (L)
V_{liq}	Volume total de líquido na extração com metanol (mL)
V_{met}	Volume de metanol para ressuspender as células (mL)
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
X	Concentração celular, em termos de massa seca, no reator no instante t (g/L)
X'	Concentração celular no instante t'_f (g/L)
X''	Concentração celular no instante t''_f (g/L)
X'''	Concentração celular no instante t'''_f (g/L)
X₀	Concentração celular no reator no instante t_0 (g/L)

X_f	Concentração celular no reator no estado estacionário, nos ensaios contínuos (g/L)
X_f	Concentração celular máxima, nos ensaios descontínuos e descontínuos alimentados (g/L)
X_i	Concentração celular no início do ensaio (g/L)
X_m	Massa de células no reator no instante t (g)
$Y_{N_2}^e$	Fração molar de N_2 no ar de entrada (0,79, adimensional)
$Y_{O_2}^e$	Fração molar de O_2 no ar de entrada (0,2095, adimensional)
Y_O	Fator de conversão oxigênio a células (g/mmol)
$Y_{Re/S}$	Fator de conversão substrato a retamicina extracelular (g/g)
$Y_{Ri/S}$	Fator de conversão substrato a retamicina intracelular (g/g)
$Y_{Rt/S}$	Fator de conversão substrato a retamicina total (g/g)
$Y_{CO_2}^s$	Fração molar de CO_2 no gás de saída do reator (adimensional)
$Y_{N_2}^s$	Fração molar de N_2 no gás de saída do reator (adimensional)
$Y_{O_2}^s$	Fração molar de O_2 no gás de saída do reator (adimensional)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão substrato a células (g/g)

Letras gregas:

Φ	Vazão volumétrica de alimentação (L/h)
ϕ_{ar}^e	Vazão molar de ar na entrada do reator (mmol/h)
$\phi_{gás}^s$	Vazão molar de gás na saída do reator (mmol/h)
γ	Gradiente de velocidade (s^{-1})
μ_P	Velocidade específica de produção (g/(g.h))
μ_{Re}	Velocidade específica de produção de retamicina extracelular (g/(g.h))
$\mu_{Re \max}$	Velocidade específica máxima de produção de retamicina extracelular (g/(g.h))
μ_{Ri}	Velocidade específica de produção de retamicina intracelular (g/(g.h))
$\mu_{Ri \max}$	Velocidade específica máxima de produção de retamicina intracelular (g/(g.h))
μ_{Rt}	Velocidade específica de produção de retamicina total (g/(g.h))
$\mu_{Rt \max}$	Velocidade específica máxima de produção de retamicina total (g/(g.h))

μ_s	Velocidade específica de consumo de substrato (g/(g.h))
μ_x	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
$\mu_{x\max}$	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
μ_{x0}	Velocidade específica de crescimento no instante t_0 (h^{-1})
τ	Tensão de cisalhamento (dina/cm ²)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do processo fermentativo de produção de retamicina, em biorreatores de bancada, utilizando-se a linhagem mutante *Streptomyces olindensis* So20, visando a obtenção de elevadas quantidades deste antibiótico, em processo descontínuo alimentado (*fed-batch*) e contínuo, bem como a implementação de técnicas de análise de imagens para a caracterização morfológica do microrganismo durante os cultivos.

Os ensaios descontínuos alimentados visaram o controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação em três valores distintos ($0,03\text{ h}^{-1}$, $0,10\text{ h}^{-1}$ e $0,17\text{ h}^{-1}$), por meio do emprego de vazões exponenciais de alimentação. Foram realizados três conjuntos de ensaios descontínuos alimentados.

No primeiro conjunto, foi verificada a influência da concentração de nutrientes utilizada na alimentação, mantendo-se a velocidade específica de crescimento em $0,03\text{ h}^{-1}$, durante a alimentação. De uma maneira geral, o aumento da concentração de nutrientes na alimentação, levou a um aumento na produção do antibiótico.

No segundo conjunto de ensaios, foi estudada a influência da velocidade específica de crescimento sobre a produção de retamicina, empregando-se como alimentação o meio R5 modificado com apenas a concentração de glicose quadruplicada. Nesse conjunto de ensaios, ocorreu limitação de outros nutrientes, o que prejudicou o controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação. No entanto, essa limitação nutricional mostrou-se importante para a produção do antibiótico.

No terceiro conjunto de ensaios, foi novamente estudada a influência da velocidade específica de crescimento sobre a produção de retamicina, empregando-se como alimentação o meio R5 modificado, agora com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas, o que evitou limitações nutricionais e permitiu o controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação. Estes ensaios mostraram que o processo de produção de retamicina é favorecido pela manutenção de baixas velocidades específicas de crescimento, por ser este um metabólito secundário. A maior produção de retamicina ocorreu quando a velocidade específica de crescimento foi fixada em $0,03\text{ h}^{-1}$, durante a alimentação.

Nos ensaios contínuos realizados, foi estudada a influência da vazão específica de alimentação (D) e, conseqüentemente, da velocidade específica de crescimento (μ_x) sobre a produção do antibiótico retamicina. Foram realizados quatro ensaios contínuos, variando-se D entre $0,03\text{ h}^{-1}$ e $0,30\text{ h}^{-1}$. A máxima produção de retamicina (tanto em termos de concentração, como em termos de produtividade e produção específica em retamicina total) ocorreu para $D = 0,05\text{ h}^{-1}$. O aumento de D levou a uma diminuição da produção do antibiótico, a qual cessou para $D = 0,30\text{ h}^{-1}$, mostrando um comportamento típico de um metabólito secundário.

Foram utilizadas técnicas de análise de imagens na caracterização morfológica do microrganismo. O cisalhamento mostrou-se um importante fator no rompimento de *pellets* e na formação de *clumps* e hifas livres, principalmente nos ensaios contínuos. Em geral, a maior produção do antibiótico esteve associada a altas porcentagens de *clumps* no meio de cultivo.

ABSTRACT

The objective of the present work was to study retamycin production in fed-batch and continuous cultivations of *Streptomyces olindensis* So20, a mutant strain, in order to obtain high antibiotic concentrations and analyse microorganism morphology employing image analysis techniques.

The fed-batch runs were performed in order to control the specific growth rate in three different values, during feed (0.03 h^{-1} , 0.10 h^{-1} and 0.17 h^{-1}), employing exponential feed rates. Three sets of fed-batch runs were carried-out.

The first set, feed composition was varied, controlling the specific growth rate in a low value (0.03 h^{-1}) during feed. In general, higher nutrient concentrations in the feed led to higher antibiotic production.

In the second set of fed-batch runs, the control of the specific growth rate in three different values during feed was studied. The feed was composed by R5 Modified medium, with four-fold the glucose concentration only, which led to nutrient limitation during runs. This nutrient limitation prejudiced the specific growth rate control, but led to high antibiotic production. This fact showed that nutrient limitation is an important factor in retamycin production.

In the third set of fed-batch runs, the control of the specific growth rate in three different values during feed was studied. In these runs, the feed was composed by R5 Modified medium, with four-fold all the nutrient concentrations, which avoided nutrient limitation, during runs. In these runs, the control of the specific growth rate during feed was possible. Results showed that retamycin production is favored by the maintenance of low specific growth rates, since it is a secondary metabolite. Higher antibiotic production was achieved controlling the specific growth rate in 0.03 h^{-1} , during feed.

In the continuous runs, the influence of the dilution rate (D), and consequently, of the specific growth rate (μ_x) on the retamycin production was studied. Four continuous runs were performed, varying D in the range from 0.03 h^{-1} to 0.30 h^{-1} . The highest antibiotic production (in terms of retamycin concentration, retamycin productivity and retamycin specific production) was obtained at $D = 0.05\text{ h}^{-1}$. The increase in the dilution rate led to lower antibiotic production, which ceased at $D = 0.30\text{ h}^{-1}$, showing a typical behavior of a secondary metabolite.

Image analysis was used to assess the morphological characteristics of the microorganism. Shear showed to be an important factor in pellet disruption and in clump and free filaments formation, mainly in the continuous runs. In general, higher antibiotic production was obtained with the growth mainly in the form of clumps.

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos antibióticos utilizados na medicina é sintetizada por microrganismos filamentosos, com destaque para os actinomicetos e alguns tipos de fungos filamentosos, como o *Penicillium* e o *Cephalosporium*. Aproximadamente 65 % a 70 % dos antibióticos são produzidos por actinomicetos, principalmente por bactérias do gênero *Streptomyces*. Entre os antibióticos produzidos por *Streptomyces* estão as antraciclinas, antibióticos antitumorais, como a daunorrubicina e a doxorrubicina, largamente empregadas no tratamento quimioterápico de diversos tipos de tumores (Delle Monache et al., 1970; El Khaden et al., 1982; Grein, 1987; Strohl et al., 1990; Niemi et al., 1994; Grafe et al., 1997; Monneret, 2001).

A daunorrubicina e a doxorrubicina são os antibióticos antraciclínicos mais empregados atualmente, mas apresentam alguns sérios problemas na sua utilização, principalmente uma elevada toxicidade e um elevado custo de produção. A utilização de antraciclinas no tratamento de tumores causa uma série de efeitos indesejáveis, como distúrbios cardíaco-pulmonares. Diversos trabalhos têm sido realizados a fim de se isolar actinomicetos produtores de novas antraciclinas que sejam menos tóxicas (Yoshimoto et al., 1986; Yoshimoto et al., 1993; Kojiri et al., 1991; Johdo et al., 1992), como é o caso da retamicina. Embora eficaz no tratamento de câncer, a retamicina não chegou ainda ao mercado devido à baixa produtividade do processo de produção por *Streptomyces* e a dificuldades na sua purificação, o que conduz a um alto custo do medicamento. Dessa forma, torna-se necessário o melhoramento do processo de produção deste antibiótico, seja através da obtenção de cepas com maior capacidade de produção, seja através da otimização das condições empregadas nos cultivos em biorreatores ou ainda pelo melhoramento dos processos de purificação do antibiótico, a fim de se reduzir os custos de produção.

Assim, desde a década de 1960, o Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco vem realizando pesquisas que visam o isolamento de diferentes linhagens produtoras de antraciclinas. Dessa forma, foi isolada a linhagem selvagem *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, a partir da qual foi obtido o mutante So20, através de um tratamento químico com metilmetano-sulfonato, pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sendo ambas as cepas produtoras de retamicina.

Resultados prévios obtidos por Furlan (1997), em cultivos em incubador rotativo, indicaram uma grande superioridade da cepa mutante em relação à selvagem, apresentando uma produtividade específica significativamente superior para a cepa mutante.

A partir de 1998, o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP passou a desenvolver estudos de produção de retamicina em biorreatores em processos descontínuos (Guimarães, 2000; Martins, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo do processo fermentativo de produção de retamicina, em biorreatores de bancada, utilizando-se a linhagem mutante *Streptomyces olindensis* So20, visando a obtenção de elevadas quantidades deste antibiótico, em processo descontínuo alimentado (*fed-batch*) e contínuo, bem como a implementação de técnicas de análise de imagens para a caracterização morfológica do microrganismo durante os cultivos.

Dessa forma, nos ensaios descontínuos alimentados, procurou-se fixar a velocidade específica de crescimento (μ_x) em diferentes níveis, através do emprego de vazões exponenciais de alimentação. A manutenção de períodos razoavelmente longos de alimentação, a fim de caracterizar melhor o controle de μ_x , implicou na necessidade do fornecimento de maiores quantidades totais de nutrientes, principalmente no caso dos altos valores de μ_x , que correspondiam à necessidade de altas vazões de alimentação de meio de cultura. Por esta razão, foram efetuados, nos ensaios descontínuos alimentados, estudos adicionais para verificar a influência da concentração de nutrientes no meio de alimentação sobre a produção de retamicina, além da influência do controle de μ_x .

Nos ensaios contínuos, por sua vez, objetivou-se obter estados estacionários em uma ampla faixa de valores de vazão específica de alimentação (D entre $0,03\text{ h}^{-1}$ e $0,30\text{ h}^{-1}$), a fim de se verificar a produção de retamicina nestas condições, bem como analisar a influência da velocidade específica de crescimento sobre a produção do antibiótico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Streptomyces*

Streptomyces spp. são bactérias filamentosas encontradas no solo e em ambientes aquáticos, Gram-positivas, aeróbias estritas, sendo o principal gênero da família *Streptomycetaceae*, ordem dos *Actinomycetales* (Lechevalier; Lechevalier, 1981).

Esses microrganismos apresentam um ciclo de vida complexo, que se inicia com a germinação do esporo, dando origem a um micélio formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas (polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos) pela ação de enzimas extracelulares (Padilla, 1998). Esse micélio vegetativo (hifas primárias) dá origem ao micélio aéreo (hifas aéreas). As hifas aéreas passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos (Chater, 1989). Nessa fase, ativa-se o metabolismo secundário, em que são produzidos principalmente antibióticos e pigmentos (Chater, 1989; Demain, 1989; Bibb, 1996).

Tanto os metabólitos primários (enzimas produzidas durante a fase de crescimento) como os secundários produzidos por *Streptomyces* apresentam grande importância econômica e industrial. Estes microrganismos têm uma extraordinária capacidade para produzir grandes quantidades de enzimas de uso industrial, sendo as principais: oxidoredutases, transferases, hidrolases, isomerases e sintases (Padilla, 1998). No caso dos metabólitos secundários, mais de 6000 antibióticos foram descobertos nos últimos anos, entre os quais cerca de 65 % a 70 % são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* (Araújo, 1998).

A linhagem selvagem de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 foi isolada na década de 1960 em Pernambuco e mostrou-se promissora na produção do antibiótico antitumoral retamicina (Lyra et al., 1968). A fim de se aumentar a produtividade em retamicina, foi obtida uma cepa mutante de *Streptomyces olindensis*, denominada So20, pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), a qual apresentou uma produtividade em retamicina significativamente superior à linhagem selvagem, em

cultivos prévios em incubador rotativo (Furlan, 1997). Essa linhagem foi obtida por mutagênese da linhagem selvagem, pela utilização de metil-metano-sulfonato.

2.2 Retamicina

A retamicina é um antibiótico antitumoral, da classe das antraciclinas, a qual foi detectada pela primeira vez em cultivos da linhagem selvagem de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 na década de 1960, no Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Lyra et al., 1968).

O complexo retamicina apresenta-se na forma de um pó de coloração vermelha, pouco solúvel em água e solúvel em álcoois (metanol, etanol, n-propanol e n-butanol), acetona e clorofórmio, com ponto de fusão em torno de 160 °C, sendo uma mistura de glicosídeos e antraciclinoas (Lima et al., 1969). Possui forte poder de inibição de bactérias Gram-positivas, com menor ação sobre as Gram-negativas. Mostrou-se forte inibidor de neoplasias (carcino-sarcoma de Walker 256 e sarcoma de Yoshida), inibindo entre 76 % e 79 % o crescimento desses tipos de tumores (Lima et al., 1969).

De acordo com Bieber et al. (1989), o complexo retamicina é um antibiótico policetônico, composto basicamente por dois constituintes, derivados da γ -rodomicinona: retamicinas E1 e E2, cujas estruturas são apresentadas na figura 2.1.

Apesar de uma possível menor toxicidade em relação às antraciclinas atualmente utilizadas (daunorrubicina e doxorubicina), a retamicina ainda apresentou efeitos colaterais, como arritmias, em estudos realizados em ratos (Cotias et al., 1971).

Esses resultados levaram a estudos preliminares do uso da retamicina em pacientes portadores de leucemias agudas (Asfora et al., 1972) mostrando que, na maioria dos casos, houve uma regressão nos sintomas e uma melhora no estado geral dos pacientes. Semelhante ao obtido por Cotias et al. (1971), a retamicina apresentou um elevado grau de toxicidade. Os efeitos colaterais variaram de acordo com os pacientes, o tempo de uso e a dosagem do medicamento. Em alguns casos, não foram constatados efeitos tóxicos.

Mais recentemente, Lima et al. (1992) também estudaram os efeitos de citotoxicidade e a ação antitumoral do complexo retamicina, isolando algumas

frações do complexo retamicina, por meio de cromatografia, a fim de identificar os componentes mais ativos e menos tóxicos. A maioria das frações apresentou grande toxicidade e inibição tumoral de até 70 % (sobre Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich e Carcinosarcoma de Yoshida). Uma das frações obtidas (fração H) mostrou-se promissora para futuros estudos químicos e biológicos.

Figura 2.1 Estruturas dos dois maiores constituintes do complexo retamicina (E1 e E2), de acordo com Bieber et al. (1989).

Apesar de poucos trabalhos terem sido realizados visando o estudo do complexo retamicina, esse tema foi retomado recentemente, na década de 1990, com

a obtenção de uma cepa mutante de *Streptomyces olindensis*, denominada So20, pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do ICB-USP (Furlan, 1997). Alguns estudos foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), a fim de caracterizar a instabilidade genética da cepa selvagem de *Streptomyces olindensis*, produtora de retamicina (Gomes, 1999). Outros trabalhos na área de genética, visaram o estudo do genoma de *Streptomyces olindensis* (Aikawa et al., 1999; Garrido, 2000). Também foram realizados estudos sobre a purificação da retamicina (Silva et al., 2000; Furlan et al., 1999; Esmanhoto, 2002). Em relação à purificação, Latorre (2001) conseguiu isolar parcialmente algumas substâncias do complexo antibiótico retamicina, realizando testes quanto à atividade antimicrobiana, contra *Bacillus subtilis* e quanto à capacidade de intercalação em fragmentos de DNA, indicando resultados promissores quanto à atividade antitumoral.

Com esta cepa mutante, alguns trabalhos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (LEB/DEQ/EPUSP), a fim de se aumentar a produção deste antibiótico em biorreatores.

Guimarães (2000) estudou a influência do preparo do inóculo e do pH na produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* So20, em biorreatores, estabelecendo o processo de inoculação em duas etapas: um pré-cultivo de 16 horas e um cultivo de 24 horas, em incubador rotativo a 30 °C e 200 rpm. O pH 7,0 foi o que conduziu a melhores resultados no processo de produção de retamicina. Nesse trabalho também foi desenvolvida a metodologia preliminar de dosagem de retamicina extracelular e intracelular por um método espectrofotométrico.

Martins et al. (2002) analisaram a transferência de oxigênio e a respiração microbiana durante cultivos de *Streptomyces olindensis* So20, mostrando que houve um aumento de cerca de duas vezes na produção de retamicina quando o oxigênio dissolvido foi controlado em 100 % da saturação, apenas durante a fase de crescimento, em relação aos cultivos sem controle de oxigênio. Por outro lado, a manutenção de altas concentrações de oxigênio dissolvido na fase de produção não levou a uma maior produção do antibiótico.

Esmanhoto (2002) aplicou extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) na purificação do complexo retamicina, estudando diferentes sistemas de extração e obtendo melhores resultados para o sistema

Polietilenoglicol(PEG)/fosfato de potássio, para purificação do meio fermentado contendo células. Nesse trabalho também começaram a ser desenvolvidas outras metodologias de dosagem do antibiótico retamicina, com a utilização de HPLC e do antibiótico aclarrubicina como padrão para o levantamento da curva de calibração, uma vez que ainda não existe o complexo retamicina totalmente purificado. Apesar de todos os esforços para a obtenção do complexo retamicina puro, ainda não foi possível o isolamento e a purificação deste antibiótico.

2.3 Análise de imagens

2.3.1 Histórico sobre análise de imagens

Não se sabe ao certo quando ocorreu o surgimento dos primeiros microscópios, mas os microscópios primitivos já eram conhecidos desde a Antiguidade. Eram microscópios de lentes simples (lupas), que não permitiam uma ampliação muito grande das imagens. Apenas no século XVII, surgiu o primeiro microscópio moderno, que utilizava duas lentes (ocular e objetiva) e com isso já se tornou possível a observação de microrganismos com mais detalhes. A descrição desses microrganismos, no entanto, era apenas qualitativa e muitas vezes, os cientistas desenhavam à mão livre o que eles viam ao microscópio, a fim de ter um registro destas imagens.

Mais tarde surgiram as oculares micrométricas, que passaram a permitir uma quantificação das dimensões de alguns microrganismos. Por ser um método manual, era muito trabalhoso, demorado e subjetivo, pois dependia muito de decisões do operador. No entanto, esse foi o primeiro passo para o surgimento das técnicas de análise de imagens aplicadas à microbiologia. Essas técnicas, que utilizavam oculares micrométricas, podem ser consideradas as precursoras da análise de imagens.

Por volta de 1963, a análise de imagens começou a se tornar uma ciência, com o surgimento do equipamento chamado *Quantitative Television Microscope (QTM A)*, projetado pela empresa *Metals Research Ltd.*, que mais tarde tornou-se parte da *LEICA Imaging Systems Ltd.*, a principal empresa que atua no

desenvolvimento de equipamentos e *softwares* para a análise de imagens (Leica, 1996).

Os primeiros procedimentos de análise de imagens consistiam em fotografar o microrganismo, com uma câmera fotográfica acoplada a um microscópio. As fotos precisavam então ser reveladas e digitalizadas. Com a digitalização das fotos, estas eram transferidas para o computador, onde podiam ser feitas as medições manualmente. Continuava sendo um processo lento e trabalhoso, pois envolvia a revelação de fotos e a digitalização. Além disso, as medições eram subjetivas, pois era o operador quem determinava quais pontos da imagem deviam ser medidos, marcando esses pontos na tela do computador (Metz et al., 1981).

Com o desenvolvimento de equipamentos, tanto na parte de microscopia como na parte de computação, a análise de imagens tem avançado cada vez mais, principalmente a partir da década de 1990, tornando-se um procedimento menos subjetivo e mais sistematizado. Na parte da microscopia, os diferentes tipos de microscópio que surgiram (fluorescência, contraste de fase, eletrônico) permitiram a obtenção de imagens mais nítidas, com maior ampliação e proporcionaram o reconhecimento de diferentes estados fisiológicos das células (Paul et al., 1993; Sebastine et al., 1999; Cox; Thomas, 1999). Na parte da computação, o surgimento de computadores cada vez mais velozes e com mais memória levou a uma maior rapidez nas análises, uma vez que imagens geralmente ocupam um grande espaço de memória computacional. Nessa área também surgiram os *softwares* que permitem a análise das imagens de uma forma mais automática, onde o próprio computador é programado para decidir quais regiões da imagem devem ser medidas (regiões de interesse), diminuindo a intervenção do operador e a subjetividade do método.

Dessa forma, análise de imagens pode ser definida como a ciência que visa a execução de medições geométricas a partir de imagens provenientes de máquinas fotográficas, câmeras de vídeo ou de qualquer outra fonte, proporcionando a obtenção de resultados rápidos, precisos e estatisticamente significativos, em substituição a outros métodos subjetivos (Leica, 1996).

2.3.2 Aplicações da análise de imagens

A aplicação da análise de imagens pode ser encontrada em diversas áreas. Os primeiros equipamentos, projetados por uma empresa de metalurgia, como citado anteriormente, eram destinados a laboratórios de metalurgia, particularmente no controle de qualidade de aços e em medidas de microestruturas de metais (Leica, 1996). Com o avanço das técnicas e dos equipamentos, as aplicações difundiram-se para as mais diversas áreas, desde a Medicina até a Geologia.

Podczek et al. (1999) utilizaram a análise de imagens no estudo do tamanho e da forma (esfericidade) de comprimidos, na área farmacêutica, destacando que essas propriedades são importantes na liberação controlada das doses do medicamento no organismo.

Wang et al. (1999), em uma área completamente diferente (Geologia), utilizaram técnicas de análise de imagens na determinação da qualidade (tamanho, forma) de pedregulhos produzidos por uma pedreira.

A Medicina é o campo que tem utilizado cada vez mais essas técnicas, tanto no diagnóstico de câncer e na visualização e caracterização de células tumorais (Nigar; Dervan, 1998; Laak et al., 1998; Solórzano et al., 2002; Gil et al., 2002) como no diagnóstico de outras doenças (por exemplo, pela análise de radiografias pulmonares).

Outro campo que tem aplicado bastante a análise de imagens é a Microbiologia, para a caracterização morfológica de microrganismos, sejam eles bactérias não filamentosas, leveduras ou microrganismos filamentosos, uma vez que a morfologia desempenha um papel fundamental em processos fermentativos, influenciando consideravelmente a produção de metabólitos primários e secundários (Braun; Vecht-Lifshitz, 1990; Ratledge, 1993; Ruohang; Webb, 1995; Carlsen et al., 1996; Pamboukian, 1997; Pamboukian; Facciotti, 1998).

Na caracterização de leveduras, a análise de imagens mostrou-se útil na determinação das dimensões e da forma das células e na caracterização de células em processo de gemulação, como foi mostrado por Huls et al. (1992). Nesse trabalho, foi possível a determinação do volume das células, a partir das medições de duas dimensões celulares perpendiculares (maior e menor eixo), considerando as células com formato elipsóide.

Outra aplicação importante em cultivos de leveduras recombinantes foi a quantificação da proporção de células contendo plasmídeo em relação à quantidade total de células (Endo et al., 1991). O processo de quantificação de células contendo plasmídeo foi baseado na utilização de corantes que tingem apenas essas células, permitindo a sua diferenciação pelo *software* de análise de imagens. O método de análise de imagens mostrou boa concordância com o método convencional, de plaqueamento e contagem de colônias, com a vantagem de ser um método mais rápido do que o tradicional.

Zalewski; Buchholz (1996) também utilizaram a análise de imagens na caracterização morfológica de *Saccharomyces cerevisiae* a fim de quantificar a proporção entre células isoladas, células em duplicação e aglomerados de três ou quatro células, durante o cultivo. A contagem de células foi feita utilizando-se uma câmara de Neubauer, analisada automaticamente pelo computador.

Bittner et al. (1998) desenvolveram uma metodologia para a determinação da concentração celular, em cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de um sistema de análise de imagens *on-line*, com a utilização de um microscópio acoplado ao reator (*In Situ Microscope*). Os resultados obtidos com esse sistema apresentaram boa concordância com o método tradicional de determinação da concentração celular por massa seca, para concentrações entre 0,01 g/L e 12 g/L, com a vantagem de ser um método rápido com a obtenção de resultados mais imediatos.

Ao contrário das leveduras e bactérias não filamentosas, que apresentam células individuais (isoladas) ou aglomerados com poucas células, a aplicação das técnicas de análise de imagens para os cultivos de microrganismos filamentosos apresenta algumas dificuldades adicionais, devido à presença de ramificações e à formação de uma verdadeira rede de filamentos. No caso dos microrganismos filamentosos, a preparação da amostra (lâminas) deve ser feita com mais cuidado, a fim de que as hifas se apresentem bem espalhadas, evitando a superposição de filamentos. Dois filamentos sobrepostos poderiam ser erroneamente interpretados como apenas uma hifa ramificada. Apesar dessas dificuldades, a aplicação da análise de imagens é bastante ampla nos cultivos de microrganismos filamentosos.

Packer et al. (1992) utilizaram análise de imagens para estimar a densidade das hifas e a concentração celular, em cultivos de *Penicillium chrysogenum*, a partir do comprimento e da largura das hifas, considerando-as como cilindros perfeitos. Os

resultados obtidos mostraram boa concordância com o método tradicional de determinação da concentração celular por massa seca, para concentração celular de até 30 g/L, desde que o meio de cultura não apresentasse sólidos em suspensão.

Paul et al. (1993) estudaram a germinação de esporos de *Penicillium chrysogenum*, medindo o volume dos esporos, o comprimento dos tubos germinativos e a porcentagem de germinação, destacando que em processos de produção de penicilina, a qualidade do inóculo influencia o crescimento, a morfologia e a produção do antibiótico. Dessa forma, a análise de imagens poderia ser útil na determinação da qualidade do inóculo, em processos fermentativos industriais, uma vez que esporos geralmente são utilizados na manutenção de culturas em laboratório e, muitas vezes, como inóculo em processos fermentativos.

Olsvik et al. (1993), trabalhando em cultivos contínuos de *Aspergillus niger*, relacionaram as propriedades reológicas do caldo de fermentação com a concentração celular e com a forma dos agregados de micélio, determinada por análise de imagens. Nesses cultivos, a morfologia de crescimento do microrganismo apresentou-se principalmente na forma de aglomerados de hifas (*clumps*), os quais representavam uma proporção de 87 % do total de microrganismos. Nesse trabalho foram levantadas correlações entre o índice de consistência do escoamento (K), a concentração celular e um fator de forma definido como sendo a circularidade do aglomerado. Esse fator de forma foi definido como $R = (\text{Perímetro})^2 / (4 \cdot \pi \cdot \text{Área})$. Nos ensaios contínuos, a diminuição da velocidade específica de crescimento conduziu a uma diminuição da circularidade, devido ao rompimento de *clumps*.

Da mesma forma, Mohseni; Allen (1995) estudaram o efeito da biomassa e da morfologia nas características reológicas do caldo de fermentação, em cultivos de *Aspergillus niger* e *Streptomyces levoris*. A morfologia do microrganismo foi caracterizada por meio da circularidade, mostrando uma dependência entre as características reológicas do caldo de fermentação, a concentração celular e a morfologia do microrganismo.

Entre os vários trabalhos que mostram a relação entre morfologia e reologia está o estudo feito por Warren et al. (1995) em cultivos de actinomicetos. Por meio de técnicas de análise de imagens, a morfologia de crescimento foi determinada, com as medições de comprimento de hifa. Os cultivos apresentaram hifas relativamente curtas e pouco ramificadas, com poucos aglomerados de micélio. A morfologia quase

não variou ao longo dos cultivos, mas as características reológicas mudaram bastante devido ao crescimento celular.

Johansen et al. (1998) destacaram o efeito da morfologia sobre a viscosidade do caldo, em cultivos de *Aspergillus awamori*. Nas determinações realizadas, os autores obtiveram um aumento de sete vezes na viscosidade aparente do caldo devido a um aumento de três vezes no comprimento das hifas. Nesse processo de produção de enzima (cutinase) por *Aspergillus*, as diferenças morfológicas influenciaram apenas na viscosidade do caldo, aparentemente sem nenhum efeito sobre a formação do produto. Mesmo neste caso, a morfologia apresenta-se economicamente importante para o processo, uma vez que o aumento da viscosidade afeta a transferência de massa, tornando mais difícil a agitação e causando um gasto maior de energia, o que pode tornar o processo economicamente inviável.

Amanullah et al. (1999) estudaram os efeitos da frequência de agitação sobre a fragmentação das hifas em cultivos contínuos de *Aspergillus oryzae* recombinante e as consequências dessa fragmentação na produção de enzimas (α -amilase e glicoamilase). A mudança da frequência de agitação durante o cultivo de 1000 rpm para 500 rpm provocou uma diminuição na proporção de hifas livres e, conseqüentemente, um aumento na proporção de aglomerados, mostrando que o cisalhamento é um fator importante no rompimento ou na aglomeração do microrganismo. No entanto, essa variação morfológica não provocou nenhuma alteração na produção das enzimas de interesse.

Da mesma forma, utilizando análise de imagens, Paul et al. (1999) estudaram a relação entre a frequência de agitação, a morfologia de crescimento de *Aspergillus niger* e a produção de ácido cítrico. O aumento da frequência de agitação de 500 rpm para 800 rpm provocou uma rápida fragmentação dos *pellets*, com uma diminuição do seu diâmetro em praticamente 50 %. A produção de ácido cítrico apresentou-se maior nos cultivos onde o crescimento ocorreu na forma filamentosa do que nos cultivos onde o crescimento ocorreu na forma de *pellets*. Os autores destacaram que esses resultados entram em conflito com outros trabalhos, que afirmam que a produção de ácido cítrico é maior quando o crescimento ocorre na forma de *pellets* (Gómez et al., 1988). Essa divergência foi atribuída a uma deficiência na quantificação morfológica do microrganismo, devido à ausência de

métodos apropriados nos trabalhos mais antigos, o que não ocorre com a utilização das técnicas atuais de análise de imagens. Dessa forma, para a produção de ácido cítrico, ainda não existe um consenso sobre a morfologia de crescimento que conduz a uma maior produção.

Apesar de ser um método mais preciso e menos subjetivo do que os métodos antigos, a análise de imagens pode apresentar maiores erros dependendo do tipo de parâmetro a ser medido. Cui et al. (1998) analisaram a morfologia de *pellets* de *Aspergillus awamori*, medindo o tamanho do núcleo dos *pellets*. As medições foram feitas por dois pesquisadores diferentes e os resultados apresentaram uma diferença de 20 % entre os dois. No entanto, medições feitas em duplicata pelo mesmo pesquisador não apresentaram divergência. Essa divergência entre os resultados obtidos pelos dois pesquisadores foi atribuída à definição que cada um deles fazia da fronteira entre o núcleo e a região periférica dos *pellets*.

McNeil et al. (1998) estudaram o processo de lise celular em cultivos de *Penicillium chrysogenum* por vários métodos (decaimento da concentração celular, liberação de íons amônio (NH_4^+) e análise de imagens), chegando à conclusão que a análise de imagens era o método mais preciso para esse estudo, uma vez que o decaimento da concentração celular pode ser devido à respiração endógena e não à lise celular; e a liberação de íons amônio pode estar associada a estágios mais avançados de lise celular.

Especificamente em cultivos de *Streptomyces*, muitos trabalhos têm sido publicados sobre a morfologia de crescimento, quantificada por análise de imagens Belmar-Beiny; Thomas (1991) mostraram que o aumento da frequência de agitação aumentou a fragmentação de hifas, embora não tenha interferido na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Reichl et al. (1992) cultivaram *Streptomyces tendae*, aplicando técnicas de análise de imagens na caracterização dos *pellets* obtidos durante os cultivos.

Tamura et al. (1997) estudaram a morfologia de *Streptomyces fradiae* sob várias condições de cisalhamento, propondo uma classificação em três categorias: *pellets*, aglomerados de hifas (*clumps*) e filamentos livres. Essa classificação foi feita com base nas dimensões do microrganismo (área e perímetro). De acordo com suas dimensões, o microrganismo era classificado em uma das três categorias. Essa mesma classificação já tinha sido utilizada por Yang et al. (1996), em cultivos de

Streptomyces virginiae. No trabalho de Tamura et al. (1997), a relação entre a produção do antibiótico tilosina e o tamanho dos *pellets* foi estudada. A maior produção do antibiótico foi obtida com *pellets* de até 4000 μm^2 de área, enquanto que cultivos de *pellets* de área maior do que 4000 μm^2 provocaram uma drástica queda na produção de tilosina. Por outro lado, Yang et al. (1996) não encontraram nenhuma correlação entre a produção do antibiótico virginamicina e a morfologia de *Streptomyces virginiae*.

Outros avanços têm sido realizados na metodologia de análise de imagens. Treskatis et al. (1997) desenvolveram uma metodologia para a caracterização morfológica *on-line*, em cultivos de *Streptomyces tendae*. Nesse caso, o processo de automatização da análise foi praticamente total, com o próprio computador controlando o processo de amostragem, diluição, aquisição e tratamento das imagens. Os resultados mostraram mudanças na morfologia, principalmente durante a transição entre a fase de crescimento (trofofase) e a fase de produção (idiofase). Na fase de produção do antibiótico (nikkomicina), ocorreu uma diminuição na porcentagem de *pellets* rugosos, com um aumento na porcentagem de *pellets* lisos.

De maneira análoga, Spohr et al. (1998) construíram um dispositivo para monitorar *on-line* o desenvolvimento do microrganismo. Esse dispositivo (*Flow-through Cell*) consistia de uma pequena câmara onde ocorria o crescimento do microrganismo. No início do processo, 30 a 50 esporos eram fixados nessa câmara, com o meio de cultura fluindo continuamente sobre ela. Com o crescimento, as hifas podiam flutuar livremente no meio de cultura, mas o ponto com o esporo inicial mantinha-se na mesma posição, permitindo que aquele elemento fosse observado durante o crescimento. Com isso, foi possível a observação dos diferentes estágios de crescimento, desde o aumento do tamanho dos esporos e do aparecimento do tubo germinativo até o aparecimento das primeiras ramificações. Foi possível também quantificar a velocidade de aparecimento das ramificações.

Trabalhos mais recentes foram realizados aplicando-se as técnicas de análise de imagens no estudo morfológico de microrganismos. Amanullah et al. (2000) estudaram a fragmentação de hifas durante cultivos de *Aspergillus oryzae* e *Penicillium chrysogenum*, mostrando que o aumento da agitação provoca uma diminuição na área de *clumps*. De modo similar, Heydarian et al. (2000) estudaram a fragmentação de *Streptomyces erythraea*, durante cultivos descontínuos, mostrando

que o aumento da frequência de agitação conduz a uma diminuição nas dimensões dos *clumps*. Dessa forma, o cisalhamento é um fator importante no processo de fragmentação do microrganismo.

Jonsbu et al. (2002) analisaram o processo de produção do antibiótico nistatina, mostrando que o crescimento na forma de *pellets* acima de um certo tamanho crítico prejudicou o crescimento e a produção do antibiótico, provavelmente devido à limitação de oxigênio e outros nutrientes no interior dos *pellets*.

Em relação a cultivos de *Streptomyces olindensis*, Pamboukian et al. (2002) estabeleceram alguns critérios para a classificação automática do microrganismo em quatro classes morfológicas distintas (*pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas), de acordo com suas dimensões, aplicando técnicas de análise de imagens. De uma maneira geral, durante cultivos descontínuos, o cisalhamento no reator levou ao rompimento de *pellets* e à formação de *clumps* e hifas livres.

A utilização de corantes tem sido cada vez mais importante para a caracterização morfológica de microrganismos. A maioria dos trabalhos utiliza corantes apenas para melhorar o contraste das imagens que serão analisadas pelo computador. No entanto, é cada vez mais comum a utilização de corantes específicos, para a diferenciação entre células viáveis e não viáveis e para a caracterização do estado fisiológico do microrganismo.

Vanhoutte et al. (1995) conseguiram identificar seis estados fisiológicos em cultivos de *Penicillium chrysogenum*, utilizando a combinação de dois corantes (azul de metileno e fucsina), por meio de microscopia de contraste de fase, mostrando a evolução de cada um destes estados fisiológicos durante os cultivos.

Pons et al. (1998) estudaram diferentes estados fisiológicos em cultivos de *Streptomyces ambofaciens*, utilizando corantes para a caracterização dos septos e dos espaços vazios (vacúolos) das hifas, por meio de análise de imagens. Na análise dos vacúolos, foi preciso a utilização de um microscópio de contraste de fase com um aumento de 1500 vezes.

Sebastine et al. (1999) desenvolveram um procedimento para a determinação da porcentagem de viabilidade em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, com a utilização de corantes e microscopia de fluorescência. A porcentagem de células viáveis mostrou-se alta no início dos cultivos, diminuindo com o tempo até atingir cerca de 64 %, do final da fase de crescimento. Na fase de

produção do ácido clavulânico, a viabilidade aumentou novamente até atingir cerca de 93 %. Da mesma forma, Pinto et al. (2001) estudaram a viabilidade celular em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, concluindo que a porcentagem de células viáveis foi bastante elevada nos cultivos realizados e que a morfologia desse microrganismo foi significativamente influenciada pelo estado do inóculo utilizado (inóculo transferido em fase exponencial e inóculo transferido em fase estacionária).

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

A análise de imagens, aplicada aos processos biotecnológicos, não é restrita apenas à caracterização morfológica dos microrganismos, mas pode ter utilidade em outras determinações. Aplicando essas técnicas de uma forma diferente, Birnbaum; Bailey (1991) empregaram análise de imagens para quantificar proteínas isoladas em géis de eletroforese em cultivos de *Escherichia coli* recombinante. Dessa forma, pode-se perceber como é amplo o campo de aplicação desta ciência.

2.4 Metabolismo secundário

As atividades metabólicas associadas ao crescimento celular compõem o metabolismo primário, onde os metabólitos produzidos (conhecidos como metabólitos primários) são principalmente enzimas, ácidos orgânicos e etanol, entre outros. No entanto, em muitos microrganismos, verifica-se a síntese de compostos não essenciais ao crescimento, os quais são produzidos no final da fase de crescimento ou durante a fase estacionária. Esses compostos são denominados metabólitos secundários, sendo produzidos por diversos tipos de microrganismos (Vining, 1986).

O metabolismo secundário torna-se interessante devido à variedade de compostos de interesse comercial produzidos (antibióticos, fungicidas, antitumorais, inibidores de enzimas, toxinas, pigmentos), os quais são moléculas orgânicas complexas que requerem um grande número de reações enzimáticas para sua síntese, as quais não fazem parte do metabolismo primário (Vining, 1986).

Bu'Lock (1961) utilizou os termos trofofase e idiofase para indicar a fase de crescimento e a fase de produção, respectivamente, após observar que certos metabólitos somente eram produzidos depois que o crescimento celular decaía (Bu'Lock, 1961 apud Betina, 1995; Bu'Lock, 1967 apud Betina, 1995).

A produção de metabólitos secundários geralmente é maior em condições de limitação de um ou mais nutrientes. Os fatores que controlam o início do metabolismo secundário são complexos e pouco compreendidos (Demain; Fang, 1995). Vining (1986) destacou que o padrão bifásico, no qual a fase de produção (idiofase) se inicia com o término da fase de crescimento (trofofase), nem sempre ocorre, ou seja, o produto do metabolismo secundário pode ser formado durante a trofofase.

O crescimento de microrganismos é mais rápido quando fontes de carbono, nitrogênio e fosfato facilmente assimiláveis estão presentes no meio de cultivo. A glicose é uma eficiente fonte de carbono para o crescimento de microrganismos, apresentando um efeito negativo sobre a síntese de diversos metabólitos secundários. Assim, no processo de produção do antibiótico actinomicina por *Streptomyces antibioticus*, a glicose reprime a síntese de fenoxazinona sintase, uma enzima da via metabólica de síntese deste antibiótico (Vining, 1986). Outras fontes de carbono, como polissacarídeos, são mais eficientes para a produção de metabólitos secundários (Demain; Fang, 1995). Dessa forma, o emprego de substratos rapidamente catabolisados, como é o caso da glicose, conduz a uma menor produção de metabólitos secundários (Vining, 1986).

Demain; Fang (1995) destacaram que fontes de nitrogênio favoráveis ao crescimento, como é o caso dos sais de amônio, afetam negativamente o metabolismo secundário, embora existam poucas informações sobre os efeitos negativos dos íons amônio sobre a síntese de metabólitos secundários. Leбриhi et al. (1992) estudaram a inibição da enzima valina desidrogenase por íons amônio, em um processo de produção do antibiótico espiramicina por *Streptomyces ambofaciens*. O aumento da concentração de íons amônio causava a inibição desta enzima, envolvida no catabolismo de valina, leucina e isoleucina, aminoácidos que fornecem precursores para a biossíntese deste antibiótico. Dessa forma, a limitação em fontes de nitrogênio pode ser um fator importante na produção de metabólitos secundários.

De forma semelhante, concentrações elevadas de fosfato inorgânico apresentam influência negativa sobre a produção de metabólitos secundários, uma vez que o fosfato controla a síntese de DNA, RNA e proteínas, o metabolismo de carboidratos, a respiração celular e os níveis de ATP, favorecendo o crescimento celular e limitando a síntese dos metabólitos secundários (Martin, 1977).

2.5 Condução de processos fermentativos em reatores descontínuos alimentados

A condução de processos fermentativos em biorreatores pode ser realizada de várias formas: processos descontínuos, semicontínuos, descontínuos alimentados (*fed-batch*) e contínuos.

Principalmente no caso de reatores biológicos, a forma de operação descontínua alimentada tem sido bastante empregada, a qual foi desenvolvida praticamente para os processos fermentativos, como destacam Yamané; Shimizu (1984). Essa forma de condução do processo fermentativo permite exercer um controle da concentração de nutrientes no reator e da velocidade específica de crescimento em um valor desejado. No caso de processos de produção de metabólitos secundários, como é o caso de antibióticos, diversos trabalhos ressaltam a importância do controle da velocidade específica de crescimento em valores baixos, a fim de se obter uma elevada velocidade específica de produção do metabólito secundário (Ates et al., 1997; Melzoch et al., 1997; Seidel et al., 2002a; Seidel et al., 2002b).

Facciotti (1997) apresenta um equacionamento matemático detalhado para os vários tipos de reatores, com o destaque para os reatores descontínuos alimentados utilizando diferentes tipos de vazão de alimentação (exponencial e constante) do meio de cultura.

Assim, a partir do balanço material de células e de substrato limitante no reator descontínuo alimentado pode-se demonstrar (conforme detalhado no Apêndice A) que é possível o controle da velocidade específica de crescimento (μ_x) em um valor desejado (μ_{x0}), por meio da imposição de uma vazão exponencial de alimentação do substrato limitante. Nesse caso, a vazão de alimentação deve ser:

$$\Phi = A \cdot e^{B \cdot (t - t_0)} \quad (2.1)$$

Onde:

$$A = \frac{\mu_{X0} \cdot X_0 \cdot V_0}{Y_{X/S} \cdot (S_i - S_0)} \quad (2.2)$$

$$B = \mu_{X0} \quad (2.3)$$

S_0 = concentração de substrato limitante (glicose) no reator no instante t_0 (g/L);

S_i = concentração de substrato limitante (glicose) na alimentação (g/L);

t_0 = instante de início da alimentação (h);

V_0 = volume de reação no instante t_0 (L);

X_0 = concentração celular no reator no instante t_0 (g/L);

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato a células (g/g);

Φ = vazão volumétrica de alimentação (L/h);

μ_{X0} = velocidade específica de crescimento no instante t_0 , que é o valor desejado de μ_x (h^{-1}).

Dessa forma, impondo-se uma vazão de alimentação exponencial de acordo com as equações 2.1 a 2.3, tanto a velocidade específica de crescimento como a concentração de substrato limitante deverão permanecer constantes no reator, durante a alimentação, desde que não haja limitação por outros nutrientes.

Essa forma de condução é muito útil no estudo de processos fermentativos, como foi destacado por Whitaker (1980), para vários processos de produção de metabólitos primários e secundários, com destaque para enzimas, vitaminas, hormônios e ácidos orgânicos.

Pirt (1975) destacou que o excesso de glicose no meio de cultura interfere na biossíntese de penicilina e, portanto, a condução do processo na forma descontínua alimentada permite o controle da concentração de glicose em baixos níveis, através da adição lenta de glicose ao reator, conduzindo a um aumento na produtividade de penicilina do processo.

Paul et al. (1994) estudaram vacuolização e fragmentação em cultivos de *Penicillium*, em reatores descontínuos alimentados, aplicando técnicas de análise de imagens na caracterização morfológica do microrganismo. Com isso, observaram uma relação entre a vacuolização e o processo de fragmentação de hifas, tanto em processos com vazão de alimentação constante, como em processos com vazão de

alimentação variável, mantendo baixos os níveis de glicose no meio de cultura. A fragmentação mostrou-se dependente não apenas das condições de cisalhamento no reator, mas também das condições de limitação de substrato.

Ates et al. (1997) estudaram o processo de produção de antibióticos por *Streptomyces coelicolor* e obtiveram um aumento de duas vezes na produtividade em relação ao processo descontínuo convencional, utilizando uma vazão constante de alimentação de glicose.

A condução de processos fermentativos na forma descontínua alimentada também se mostra útil em cultivos visando a obtenção de elevada concentração celular. Castillo (1997) estudou a produção de troponina C por *Escherichia coli* recombinante, utilizando cultivos descontínuos alimentados, a fim de maximizar a concentração celular, com uma produção mínima de ácido acético, o qual inibe o crescimento celular em concentrações elevadas. Nesse caso, a velocidade específica de produção de ácido acético apresentou um aumento exponencial com a velocidade específica de crescimento e o valor de $\mu_x = 0,30 \text{ h}^{-1}$ mostrou-se mais adequado para se evitar o acúmulo elevado de ácido acético, com a obtenção de uma elevada concentração celular.

Gordillo et al. (1998) aplicaram diferentes estratégias para a condução de processos descontínuos alimentados e, com isso, obtiveram uma melhoria no processo de produção de lipase por *Candida rugosa*. Nesse estudo, foi empregada uma vazão exponencial de alimentação, com a finalidade de se controlar a velocidade específica de crescimento do microrganismo. O controle da velocidade específica de crescimento em valores baixos conduziu a uma maior produção de lipase. A condução do processo na forma descontínua alimentada levou a uma produção de lipase dez vezes maior do que a condução na forma descontínua.

Paul et al. (1998) propuseram um modelo estruturado para a produção de penicilina em processos descontínuos alimentados. Os processos foram conduzidos com vazões de alimentação constantes. O modelo proposto respondeu bem à aplicação de degraus na vazão de alimentação de glicose, tanto em relação à produção de penicilina quanto em relação às características morfológicas do microrganismo, avaliadas por meio de análise de imagens.

Papagianni et al. (1999) compararam processos descontínuos e processos descontínuos alimentados aplicados a cultivos de *Aspergillus niger* para a produção

de ácido cítrico. Os resultados mostraram que os baixos níveis de glicose nos processos descontínuos alimentados conduziram a um aumento na vacuolização e favoreceram a fragmentação do micélio.

Da mesma forma, Li et al. (2000) estudaram fragmentação de *Aspergillus oryzae* em reatores descontínuos alimentados de larga escala (80 m³), em um processo de produção de enzimas, concluindo que a baixa velocidade de crescimento devido à lenta adição de substrato limitante contribuiu bastante para o processo de fragmentação do microrganismo.

Giridhar; Srivastava (2001) destacaram que os processos descontínuos alimentados são uma alternativa interessante na produção de L-sorbose, etapa intermediária na produção industrial de vitamina C. A utilização de processos descontínuos nesse caso prejudica a produção de L-sorbose, por provocar inibição pelo substrato. A utilização de processos descontínuos alimentados permite a eliminação desta inibição e um aumento na produção de L-sorbose, a partir do sorbitol.

Em trabalhos mais recentes, a aplicação de processos descontínuos alimentados mostrou-se útil na produção de cefalosporina C por *Acremonium chrysogenum*, permitindo a obtenção de altas concentrações deste antibiótico, a partir de meios complexos (Seidel et al., 2002a; Seidel et al., 2002b).

Dessa forma, em muitos processos de produção de antibióticos, a condução do processo na forma descontínua alimentada conduz a uma melhoria na produção do metabólito de interesse, mostrando que esse tipo de processo pode ser vantajoso para a produção de antibióticos.

2.6 Condução de processos fermentativos em reatores contínuos

O processo contínuo é realizado por meio de uma alimentação contínua de meio de cultura ao reator a uma determinada vazão constante e por uma retirada contínua de caldo fermentado, de forma a ser ter o volume de reação constante, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário (*steady-state*). O estado estacionário é a situação na qual todas as condições no interior do reator permanecem constantes ao longo do tempo.

Como foi destacado por Facciotti (2001), o processo contínuo de operação de reatores bioquímicos apresenta várias vantagens em comparação com o processo descontínuo tradicional, entre as quais pode-se citar:

- Aumento da produtividade do processo, devido à redução de tempos mortos e não-produtivos;
- Obtenção de caldo de fermentação uniforme, o que facilita o projeto dos processos de recuperação do produto de interesse;
- Manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, facilitando estudos sobre o processo, como mecanismos de regulação metabólica e estudos visando a otimização da composição do meio de cultura;
- Possibilidade de associação com outras operações contínuas da linha de produção;
- Maior facilidade no emprego de controles avançados;
- Menor necessidade de mão de obra.

Por outro lado, Facciotti (2001) também destaca algumas desvantagens do processo contínuo, como por exemplo:

- Maior investimento inicial na planta;
- Possibilidade da ocorrência de mutações genéticas espontâneas, com a seleção de mutantes menos produtivos;
- Dificuldade de manutenção de homogeneidade no reator, principalmente quando o caldo de fermentação torna-se pseudoplástico, o que acontece no caso de fungos filamentosos.
- Dificuldade de manutenção do estado estacionário no reator, principalmente quando ocorre formação de espuma, crescimento do microrganismo na parede do reator ou nos sistemas de entrada de meio de cultura e saída de caldo de fermentação, o que pode causar entupimento. Outro problema que pode tornar-se crítico na manutenção do estado estacionário é a morfologia de crescimento do microrganismo. O crescimento de microrganismos filamentosos na forma de *pellets* pode trazer problemas para a manutenção das condições no interior do reator.
- Maior possibilidade de ocorrência de contaminações, por se tratar de um sistema aberto, operando por longos períodos de tempo.

A condução do processo contínuo pode ser realizada de diversas formas: com ou sem reciclo de células, com operação em um único estágio ou em múltiplos

estágios em série, com uma ou com várias alimentações, perfazendo assim uma ampla diversidade de formas de operação dos reatores bioquímicos.

O processo contínuo mais simples é baseado em um único reator, com uma alimentação e uma retirada de caldo, sem reciclo de células. O equacionamento do processo (detalhado no Apêndice B), por meio de equações de balanço material de células, de substrato limitante e de produto, conduz às seguintes equações, válidas após o estabelecimento da condição de estado estacionário no reator:

$$\mu_x = D \quad (2.4)$$

$$X_f = Y_{X/S} \cdot (S_i - S_f) \quad (2.5)$$

$$P_f = \frac{X_f \cdot \mu_P}{D} \quad (2.6)$$

$$D = \frac{\Phi}{V} \quad (2.7)$$

Onde:

D = vazão específica de alimentação (h^{-1});

P_f = concentração produto no reator no estado estacionário (g/L);

S_f = concentração de substrato limitante no reator no estacionário (g/L);

S_i = concentração de substrato limitante na alimentação (g/L);

V = volume de meio no reator (L);

X_f = concentração celular no reator no estado estacionário (g/L);

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato a células (g/g);

Φ = vazão volumétrica de alimentação (L/h);

μ_P = velocidade específica de produção (g/(g.h));

μ_x = velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

Observa-se, a partir da equação 2.4, que é possível controlar a velocidade específica de crescimento do microrganismo por meio da imposição de uma certa vazão específica de alimentação, o que permite exercer um bom controle sobre o processo contínuo.

A facilidade de controle da oferta de substrato nos processos contínuos faz com que seja possível o estudo do efeito de limitações por nutrientes em processos fermentativos, o que tem sido feito por vários autores.

Gray; Bhuwathanapun (1980) compararam a produção do antibiótico tilosina em processos descontínuos e contínuos. A condução do processo na forma contínua promoveu um aumento de 40 % na velocidade específica de produção do antibiótico em relação ao cultivo descontínuo.

Bhatnagar et al. (1988) analisaram a influência da fonte de carbono na produção de cloranfenicol por *Streptomyces*, em cultivos contínuos, que se mostraram úteis no estudo de processos fermentativos limitados por fonte de carbono e de nitrogênio.

James et al. (1991) promoveram a limitação por glutamato, em um processo contínuo de produção do antibiótico granaticina. Da mesma forma, por tratar-se de um metabólito secundário, a velocidade específica de produção deste antibiótico atingiu valores máximos com a utilização de uma vazão específica de alimentação de $0,10 \text{ h}^{-1}$, declinando para maiores valores de D.

Melzoch et al. (1997) estudaram o processo de produção do antibiótico actinorhodina em processo contínuo, promovendo limitações por alguns nutrientes (glicose, fosfatos, sulfatos e cloretos). As maiores produções de antibiótico foram obtidas quando o processo foi limitado por glicose e por cloreto de amônio. Nesse mesmo trabalho, a velocidade específica de produção do antibiótico apresentou valores maiores quando foi utilizada uma baixa vazão específica de alimentação ($D = 0,06 \text{ h}^{-1}$).

Lee (1997) utilizou cultivos contínuos de *Streptomyces* para determinar a influência de íons amônio na produção de tilosina. Os resultados mostraram que baixas concentrações do íon amônio na alimentação conduziram a uma maior produção de tilosina. Além disso, confirmando resultados obtidos em outros trabalhos, a velocidade específica de produção do antibiótico apresentou maiores valores quando foi utilizada uma baixa vazão específica de alimentação ($D = 0,05 \text{ h}^{-1}$), decrescendo para maiores valores de D. O aumento da vazão específica de alimentação também conduziu a uma diminuição na concentração de antibiótico produzido.

Sarrà et al. (1997), utilizando reatores de leito fluidizado operando em processo contínuo, conseguiram um aumento na produtividade específica de antibiótico em relação ao processo descontínuo tradicional, devido à possibilidade de operação desse tipo de reator por longos períodos de tempo, diminuindo os tempos

não-produtivos do processo.

Utilizando processos contínuos mais complexos, McIntyre et al. (1999) estudaram a produção do antibiótico vancomicina em processos contínuos com reciclo de células. A utilização de reciclo de células conduziu a um aumento de sete vezes na velocidade específica de produção do antibiótico, mostrando uma grande vantagem na recirculação de células em processos contínuos.

A utilização de processos contínuos também se mostra útil no levantamento de dados para estudos metabólicos, como foi feito por Gulik et al. (2000), que utilizaram esse tipo de processo para o levantamento de modelos estequiométricos de produção de penicilina G, por meio de análise de fluxos metabólicos.

Assim, em muitos processos de produção de antibióticos, a condução do processo na forma contínua conduz a uma melhoria na produção do metabólito de interesse, mostrando que o processo contínuo pode ser vantajoso para a produção de antibióticos, de forma semelhante ao processo descontínuo alimentado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Nos ensaios realizados, foi utilizada uma linhagem mutante de *Streptomyces olindensis* denominada So20, fornecida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Essa linhagem foi obtida por mutagênese da linhagem selvagem de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, por utilização de metil-metano-sulfonato (Furlan, 1997). Entre as características principais da cepa mutante destaca-se a perda da capacidade de esporulação, o que dificulta o preparo de um estoque de células. Dessa forma, uma suspensão do micélio vegetativo era conservada sob congelamento em glicerol 20 % a - 20 °C, conforme descrito por Guimarães (2000).

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Cultivos em fermentador

Nos cultivos realizados em fermentador (exceto no ensaio D-3+) e em incubador rotativo (preparo do inóculo), foi utilizado o meio R5 modificado, empregado por Furlan (1997) em cultivos de *Streptomyces olindensis* e empregado também nos trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/EPUSP (Guimarães, 2000; Martins, 2001), o qual possui a seguinte composição:

Glicose	10,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Casaminoácidos	0,1 g/L
Tris(hidroximetil)aminometano	3,09 g/L
K ₂ SO ₄	0,25 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,12 g/L

O pH era ajustado entre 7,2 e 7,4 e o meio era autoclavado por 20 minutos a 120 °C. Após a esterilização eram adicionadas as seguintes soluções (esterilizadas separadamente):

KH_2PO_4 0,5 % p/v	2,5 mL para cada 250 mL de meio de cultura
CaCl_2 5M	1,0 mL para cada 250 mL de meio de cultura
Solução de elementos traço	0,5 mL para cada 250 mL de meio de cultura

A solução de elementos traço (esterilizada por filtração) possuía a seguinte composição:

ZnCl_2	40 mg/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L

Esse meio de cultura foi utilizado em todos os ensaios (descontínuos padrão, descontínuos alimentados e contínuos), com exceção do ensaio D-3+, no qual foi utilizada uma maior concentração inicial de glicose (16,7 g/L), a fim de se ter a mesma quantidade total de nutrientes fornecida nos ensaios descontínuos alimentados DA-3, DA-4 e DA-5 (conforme detalhado no item 3.3.3). Dessa forma, o ensaio D-3+ foi realizado com um meio de cultura com a seguinte composição inicial:

Glicose	16,7 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Casaminoácidos	0,1 g/L
Tris(hidroximetil)aminometano	3,09 g/L
K_2SO_4	0,25 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,12 g/L

No ensaio D-3+, as demais soluções foram utilizadas mantendo-se as concentrações descritas anteriormente.

3.2.2 Meio de alimentação dos ensaios descontínuos alimentados

Nos ensaios descontínuos alimentados, foram utilizadas vazões exponenciais de alimentação, calculadas de forma a se manter fixa a velocidade específica de crescimento durante o período de alimentação, conforme as equações

apresentadas no item 3.3.1, transferindo-se 1,0 L de meio de cultura para o fermentador, conforme descrito nos itens 3.2.2.1 a 3.2.2.3.

3.2.2.1 Ensaios DA-1 e DA-2

Foi realizado um primeiro conjunto de ensaios descontínuos alimentados (ensaios DA-1 e DA-2) com diferentes concentrações de glicose na alimentação, fixando-se a velocidade específica de crescimento em um valor baixo ($\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$, que corresponde a cerca de 10 % da velocidade específica máxima de crescimento). No ensaio DA-1, o meio de alimentação era composto por 1,0 L do meio R5 modificado. No ensaio DA-2, o meio de alimentação era composto por 1,0 L de meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes duplicadas, como mostra a tabela 3.1.

3.2.2.2 Ensaios DA-3, DA-4 e DA-5

Foi realizado também um segundo conjunto de ensaios descontínuos alimentados, com maior concentração de glicose (40 g/L) na alimentação, a fim de se ter períodos de alimentação maiores do que os obtidos nos ensaios DA-1 e DA-2. Nesses ensaios (DA-3, DA-4 e DA-5), a velocidade específica de crescimento foi fixada em diferentes valores, durante a alimentação, como descrito no item 3.3.1.

O meio de alimentação nos ensaios DA-3, DA-4 e DA-5 era composto por 1,0 L do meio R5 modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada, conforme mostrado na tabela 3.1. Neste conjunto de ensaios optou-se por não quadruplicar as concentrações dos demais nutrientes, pois a quantidade excessivamente elevada dos mesmos (em particular, do extrato de levedura) poderia mascarar o efeito do controle da velocidade específica de crescimento sobre a produção de retamicina, uma vez que as vazões exponenciais foram calculadas considerando-se apenas a glicose como fonte de carbono na alimentação.

3.2.2.3 Ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b

Da mesma forma que o conjunto de ensaios anterior, foi realizado um terceiro conjunto de ensaios descontínuos alimentados, com maior concentração de glicose (40 g/L) na alimentação, a fim de se ter períodos de alimentação maiores do que os obtidos nos ensaios DA-1 e DA-2. Nesses ensaios (DA-3b, DA-4b e DA-5b), a velocidade específica de crescimento foi fixada em diferentes valores, durante a alimentação, como descrito no item 3.3.1.

O meio de alimentação nos ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b era composto por 1,0 L do meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas, conforme mostrado na tabela 3.1. Neste conjunto de ensaios optou-se por quadruplicar as concentrações de todos os nutrientes na alimentação e não apenas a concentração de glicose, a fim de se obter um melhor controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação, conforme será discutido nos itens 4.3 e 4.4.

Tabela 3.1 Composição dos meios de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados (DA-1, DA-2, DA-3, DA-4, DA-5, DA-3b, DA-4b e DA-5b).

	DA-1	DA-2	DA-3 DA-4 DA-5	DA-3b DA-4b DA-5b
Glicose	10,0 g/L	20,0 g/L	40,0 g/L	40,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L	10,0 g/L	5,0 g/L	20,0 g/L
Casaminoácidos	0,1 g/L	0,2 g/L	0,1 g/L	0,4 g/L
Tris(hidroximetil)aminometano	3,09 g/L	6,18 g/L	3,09 g/L	12,36 g/L
K ₂ SO ₄	0,25 g/L	0,50 g/L	0,25 g/L	1,0 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,12 g/L	20,24 g/L	10,12 g/L	40,48 g/L

3.2.3 Meio de alimentação dos ensaios contínuos

Nos ensaios contínuos, foi utilizado como meio de alimentação, o próprio meio de cultura R5 modificado, descrito no item 3.2.1. O meio de alimentação era preparado em balões de fundo chato de 12 L de capacidade. Adicionava-se a cada balão cerca de 0,5 mL de antiespumante (antiespumante à base de silicone,

Daltomare Química Ltda. Código Q2-3255, diluído 1:20 com água destilada) para cada litro de meio de cultura, a fim de se evitar a formação de espuma durante os ensaios contínuos. Os balões eram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Após a autoclavação, soluções complementares (KH_2PO_4 , CaCl_2 e elementos traço, conforme descrito no item 3.2.1) eram adicionadas aos balões, antes da conexão dos sistemas de transferência de meio.

3.3 Ensaios realizados

3.3.1 Ensaios descontínuos alimentados

Os ensaios descontínuos alimentados foram realizados em reatores BIOFLO III (*New Brunswick Scientific Co.*), de 5 L de capacidade, nas seguintes condições: agitação de 500 rpm, vazão específica de aeração de 1 vvm (vvm = volume de ar por volume de meio por minuto), temperatura de 30 °C e pH 7,0, com um volume inicial de 3,5 L (sendo 3,15 L de meio de cultura e 0,35 L de inóculo preparado em incubador rotativo, conforme descrito no item 3.4). A alimentação foi realizada transferindo-se 1,0 L de meio de cultura para o reator, com vazão exponencial. Portanto, o volume total nos ensaios descontínuos alimentados foi de 4,5 L.

A composição do meio de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados encontra-se descrita no item 3.2.2.

Em paralelo a cada ensaio descontínuo alimentado, foi realizado um ensaio descontínuo, em condições padrão (500 rpm, aeração de 1 vvm, 30 °C e pH 7,0) com um volume inicial de cultivo de 4 L, sendo 3,6 L de meio de cultura e 0,4 L de inóculo, preparado em incubador rotativo, conforme descrito no item 3.4.

A tabela 3.2 mostra um resumo das condições dos ensaios descontínuos alimentados realizados e as tabelas 3.3 a 3.5 mostram um detalhamento das condições destes ensaios.

Nos ensaios descontínuos alimentados, a utilização de uma vazão exponencial de alimentação visa obter o controle da velocidade específica de crescimento (μ_x), durante a alimentação, no valor desejado. Foram escolhidos três valores para o controle da velocidade específica de crescimento: um valor baixo ($\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$, que representa cerca de 10 % do valor da velocidade específica

máxima de crescimento ($\mu_{x_{max}}$) obtida para esse microrganismo), um valor intermediário ($\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$, cerca de 30 % do valor da velocidade específica máxima de crescimento) e um valor alto ($\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$, cerca de 56 % do valor da velocidade específica máxima de crescimento).

Conforme destacado por Facciotti (1997), a alimentação deve se iniciar quando a velocidade específica de crescimento for igual ou estiver muito próxima ao valor desejado μ_{xo} , a fim de se obter sucesso no controle da velocidade específica de crescimento. Dessa forma, o instante de início da alimentação foi determinado a partir de resultados preliminares, variando entre 13 e 21 horas de cultivo, dependendo da velocidade específica de crescimento desejada no ensaio, conforme mostra as tabelas 3.3 a 3.5.

Convém destacar que os fermentadores BIOFLO III permitem o controle da vazão de alimentação por meio do software AFS (*Advanced Fermentation Software*), a partir da inserção de uma equação de alimentação pelo operador (Castillo, 1997) com a utilização de uma bomba peristáltica disponível no próprio gabinete do fermentador. As equações para as vazões exponenciais de alimentação utilizadas, apresentadas nas tabelas 3.3 a 3.5, foram obtidas conforme as equações 2.1 a 2.3 (item 2.4). Os valores dos parâmetros utilizados no cálculo destas vazões encontram-se no Apêndice A.

Tabela 3.2 Resumo das condições dos ensaios descontínuos alimentados realizados.

Ensaio	Controle de $\mu_x \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Meio de alimentação
DA-1	0,03	Meio R5 Modificado
DA-2	0,03	Meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes duplicadas
DA-3b	0,03	Meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas
DA-3	0,03	Meio R5 Modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada
DA-4	0,10	
DA-5	0,17	
DA-4b	0,10	Meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas
DA-5b	0,17	

Tabela 3.3 Ensaios descontínuos alimentados realizados (DA-1 e DA-2).

Ensaio	Descrição
DA-1	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,156 \cdot e^{0,03 \cdot (t-21)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 21 e 27 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-1</p>
DA-2	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes duplicadas.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0585 \cdot e^{0,03 \cdot (t-21)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 21 e 32 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-2</p>

Tabela 3.4 Ensaios descontínuos alimentados realizados (DA-3, DA-4 e DA-5).

Ensaio	Descrição
DA-3	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0269 \cdot e^{0,03 \cdot (t-18)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 18 e 42 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-3</p>
DA-4	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 30 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0596 \cdot e^{0,10 \cdot (t-16)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 16 e 26 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-4</p>
DA-5	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 56 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,1205 \cdot e^{0,17 \cdot (t-13)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 13 e 18 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-5</p>

Tabela 3.5 Ensaios descontínuos alimentados (DA-3b, DA-4b e DA-5b).

Ensaio	Descrição
DA-3b	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0256 \cdot e^{0,03 \cdot (t-21)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 21 e 47 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-3b</p>
DA-4b	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 30 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0569 \cdot e^{0,10 \cdot (t-14)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 14 e 24 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-4b</p>
DA-5b	<p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas.</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de $\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 56 % de $\mu_{x\text{max}}$).</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0903 \cdot e^{0,17 \cdot (t-13)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 13 e 19 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo padrão executado em paralelo: D-5b</p>

3.3.2 Ensaios contínuos

Foram realizados quatro ensaios contínuos, utilizando-se reatores BIOFLO III (*New Brunswick Scientific Co.*) de 5 L de capacidade, nas seguintes condições: agitação de 500 rpm, vazão específica de aeração de 1 vvm, 30 °C e pH 7,0.

Nesses ensaios, foi realizada uma etapa descontínua inicial de 16 horas (correspondente ao final da fase exponencial de crescimento) e, a partir desse

instante, promoveu-se a alimentação de meio de cultura e de retirada de caldo, a uma vazão constante, mantendo-se um volume útil de 4,0 L.

O ensaio C-1 foi realizado com uma vazão específica de alimentação $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ (400 mL/h). O ensaio C-2 foi realizado com uma vazão específica de alimentação $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ (800 mL/h), conforme esquematizado na tabela 3.6. No ensaio C-3, foram estudados dois estados estacionários: no primeiro (C-3a), utilizou-se um valor de $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (200 mL/h) e no segundo estado estacionário (C-3b), a vazão foi aumentada, para que se tivesse um valor de $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ (1000 mL/h), conforme a tabela 3.6. No ensaio C-4, foram estudados mais dois estados estacionários: no primeiro (C-4a), utilizou-se um valor de $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (120 mL/h) e no segundo estado estacionário (C-4b), a vazão foi aumentada, para que se tivesse um valor de $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ (1200 mL/h), conforme a tabela 3.6.

3.3.2.1 Aspectos práticos na execução dos ensaios contínuos

De uma maneira geral, a implementação dos ensaios contínuos não apresentou grandes dificuldades, para cultivos desta cepa de *Streptomyces olindensis*, com uma rápida estabilização do sistema e a obtenção de um estado estacionário bem definido. No entanto, durante a execução dos ensaios, algumas dificuldades apareceram, entre as quais podemos destacar:

a. Montagem do sistema contínuo

A alimentação de meio de cultura nos ensaios contínuos foi realizada por meio de uma bomba peristáltica (Scilog Tandem Modelo 1081), o mesmo acontecendo com a retirada de caldo de fermentação (bomba peristáltica Easy Load Masterflex Scilog Modelo 7518-00). A bomba de entrada era previamente calibrada na vazão desejada e a bomba de saída era acionada continuamente a uma vazão muito maior do que a bomba de entrada. A retirada de caldo de fermentação era realizada de forma a se manter o nível constante, através de um dispositivo de saída lateral, ajustado para que o nível do tanque se mantivesse em 4,0 L (sistema adotado por Agüero (1998), em cultivos de *Aspergillus awamori*), de acordo com a figura 3.1.

Figura 3.1 Esquema de alimentação de meio e de retirada de caldo de fermentação, nos ensaios contínuos

Esse sistema de retirada de caldo, entretanto, não é o mais indicado. O ideal seria a utilização de um sistema de retirada que controlasse o nível do líquido pela massa do reator (reator sobre uma balança acoplada à bomba de saída), o qual possibilitaria um controle mais preciso do processo. No entanto, o sistema utilizado conduziu a bons resultados. A figura 3.2 mostra um esquema da montagem do reator.

Figura 3.2 Esquema da montagem do reator, em operação contínua.

b. Formação de espuma e utilização de antiespumante

Durante o crescimento, geralmente ocorre a formação de espuma nos cultivos de microrganismos. A formação de espuma traz alguns inconvenientes, como alteração do nível de líquido no reator, o que pode prejudicar o estabelecimento do estado estacionário. A adição de antiespumante, por outro lado, altera as propriedades do caldo de fermentação, interferindo principalmente no oxigênio dissolvido, como será discutido no item 4.6.1 (figura 4.136). Nessa figura, o perfil de oxigênio dissolvido durante o ensaio C-1 apresentou algumas perturbações, as quais coincidiram com os instantes de adição de antiespumante. Nesse ensaio foi utilizado um antiespumante à base de silicone, diluído na proporção 1:2 com água destilada, o qual era injetado no reator quando havia a formação de espuma. A injeção do antiespumante provocava diminuição no nível de líquido no reator, prejudicando a saída de caldo de fermentação. Para evitar essas perturbações, optou-se por utilizar nos ensaios seguintes uma suspensão de antiespumante diluída na proporção de 1:20 com água destilada. Além disso, nos balões de alimentação também foi adicionado o antiespumante, a fim de que este fosse introduzido continuamente no reator. Esses procedimentos praticamente resolveram o problema da formação de espuma durante o cultivo, evitando interferências no cultivo.

c. Troca de balões de alimentação

Nos ensaios contínuos, o período de alimentação deve ser suficiente para a estabilização do sistema e a obtenção de um estado estacionário bem caracterizado. Nos ensaios realizados, em cada estado estacionário, a alimentação foi realizada durante cerca de 5 a 8 tempos de residência, o que resultou em ensaios longos. Para isso, vários balões de alimentação (balões de 10 L) tiveram que ser utilizados durante os cultivos. A fim de se evitar horários inconvenientes de troca de balões, optou-se por se utilizar balões ligados em série. Dessa forma, o primeiro balão era ligado à bomba de alimentação e o segundo balão era ligado em série ao primeiro, como mostra a figura 3.3.

Figura 3.3 Conexão de balões em série, para alimentação contínua do reator.

d. Sistema de segurança para a saída de gases do reator

Um outro problema que pode acontecer não só durante os cultivos contínuos, mas também em outros tipos de processos (descontínuos, descontínuos alimentados) é o entupimento do filtro presente na saída de gases do reator, o que pode causar pressurização e até explosão do reator. Por isso, torna-se necessário implementar um sistema de segurança na saída de gases do reator, de forma a proteger o filtro de saída de entupimentos. A figura 3.4 apresenta o esquema do sistema de segurança adotado, composto por um frasco *erlenmeyer* de 1,0 L de capacidade, conectado na saída do condensador do reator, antes do filtro. No caso de entupimento do filtro, esse frasco é pressurizado e em caso de pressão excessiva, ocorre a liberação da rolha, evitando a pressurização do biorreator.

Figura 3.4 Sistema de segurança na saída de gases do biorreator.

Tabela 3.6 Ensaios contínuos realizados (C-1, C-2, C-3 e C-4).

Ensaio	Descrição
C-1	<p>Volume Inicial = 4,0 L</p> <p>Início da alimentação = 16 horas</p> <p>Vazão de alimentação = 400 mL/h</p> <p>Vazão específica de alimentação: $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$</p> <p>Tempo de residência = 10 horas</p> <p>Tempo total de alimentação = 80 horas</p> <p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado.</p>
C-2	<p>Volume Inicial = 4,0 L</p> <p>Início da alimentação = 16 horas</p> <p>Vazão de alimentação = 800 mL/h</p> <p>Vazão específica de alimentação: $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$</p> <p>Tempo de residência = 5 horas</p> <p>Tempo total de alimentação = 36 horas</p> <p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado.</p>
C-3a	<p>Primeira etapa do ensaio contínuo C-3</p> <p>Volume Inicial = 4,0 L</p> <p>Início da alimentação = 16 horas</p> <p>Vazão de alimentação = 200 mL/h</p> <p>Vazão específica de alimentação: $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$</p> <p>Tempo de residência = 20 horas</p> <p>Tempo total de alimentação = 80 horas</p> <p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado.</p>
C-3b	<p>Segunda etapa do ensaio contínuo C-3</p> <p>Vazão de alimentação = 1000 mL/h</p> <p>Vazão específica de alimentação: $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$</p> <p>Tempo de residência = 4 horas</p> <p>Tempo total de alimentação = 24 horas</p> <p>Composição da alimentação: meio R5 Modificado.</p>

Tabela 3.6 Ensaios contínuos realizados (C-1, C-2, C-3 e C-4) - continuação

Ensaio	Descrição
C-4a	Primeira etapa do ensaio contínuo C-4 Volume Inicial = 4,0 L Início da alimentação = 16 horas Vazão de alimentação = 120 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 33 horas Tempo total de alimentação = 152 horas Composição da alimentação: meio R5 Modificado.
C-4b	Segunda etapa do ensaio contínuo C-4 Vazão de alimentação = 1200 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 3,3 horas Tempo total de alimentação = 32 horas Composição da alimentação: meio R5 Modificado.

3.3.3 Ensaios descontínuos padrão

Conforme destacado anteriormente, para cada ensaio descontínuo alimentado foi realizado um ensaio descontínuo padrão em paralelo, para a comparação dos resultados, uma vez que foram observadas variabilidades nos ensaios descontínuos, de acordo com estudos prévios (Guimarães, 2000; Martins, 2001).

Dessa forma, o ensaio descontínuo padrão D-1 foi realizado em paralelo com o ensaio descontínuo alimentado DA-1; o ensaio descontínuo D-2 foi realizado em paralelo com o ensaio descontínuo alimentado DA-2 e assim por diante, conforme as tabelas 3.3 a 3.5.

As condições dos ensaios descontínuos padrão foram as seguintes: agitação de 500 rpm, vazão específica de aeração de 1 vvm, 30 °C e pH 7,0, com um volume inicial de cultivo de 4,0 L, sendo 3,6 L de meio de cultura e 0,4 L de inóculo, preparado em incubador rotativo, conforme o item 3.4. O meio de cultura utilizado

foi o meio R5 modificado, com uma concentração inicial de glicose de 10 g/L, conforme descrito no item 3.2.1.

Em paralelo com os ensaios DA-3 e D-3 foi realizado o ensaio descontínuo D-3+. Esse ensaio foi realizado nas mesmas condições dos ensaios padrão (500 rpm, aeração de 1 vvm, 30 °C e pH 7,0).

No ensaio D-3+ foi utilizado o meio de cultura R5 Modificado, mas com uma concentração inicial de glicose de 16,7 g/L, para que se tivesse uma quantidade total de glicose fornecida igual aos ensaios descontínuos alimentados DA-3, DA-4 e DA-5, conforme a equação abaixo.

$$St = 16,7 \text{ g/L} = \frac{(40 \text{ g/L} \times 1,0 \text{ L}) + (10 \text{ g/L} \times 3,5 \text{ L})}{4,5 \text{ L}}$$

Onde:

St é a concentração total de substrato nos ensaios descontínuos alimentados (g/L);

40 g/L é a concentração de glicose na alimentação, nos ensaios descontínuos alimentados;

1,0 L é o volume de meio de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados;

10 g/L é a concentração de glicose inicial nos ensaios descontínuos alimentados;

3,5 L é o volume inicial nos ensaios descontínuos alimentados;

4,5 L é o volume total nos ensaios descontínuos alimentados.

O volume inicial de fermentação no ensaio D-3+ foi de 4,5 L, correspondente ao volume total dos ensaios descontínuos alimentados (volume inicial mais volume de alimentação), sendo 4,05 L de meio de cultura e 0,45 L de inóculo.

3.4 Preparo do inóculo para o fermentador

Para os ensaios realizados em fermentador, o inóculo era preparado em duas etapas, de acordo com a metodologia proposta por Guimarães (2000), da seguinte forma:

a. Primeira etapa (pré-inóculo ou reativação)

1. Inoculavam-se 2 *erlenmeyers* de 1 L, contendo 90 mL de meio de cultura (meio R5 Modificado), com 10 mL de uma suspensão de células conservadas sob congelamento em solução de glicerol 20 % v/v a -20°C ;

2. Os *erlenmeyers* eram mantidos em incubador rotativo por 16 horas, a 30°C e 200 rpm. Ao final, os conteúdos dos dois frascos eram reunidos para utilização na segunda etapa.

b. Segunda etapa (inóculo)

1. Inoculavam-se 2 *erlenmeyers* de 1 L, contendo 180 mL de meio de cultura, com 20 mL da suspensão de células obtida na primeira etapa;

2. Os *erlenmeyers* eram mantidos em incubador rotativo por 24 horas, a 30°C e 200 rpm. Ao final, os conteúdos dos dois frascos eram reunidos para a inoculação do reator (350 mL de inóculo nos ensaios descontínuos alimentados; 400 mL de inóculo nos ensaios descontínuos padrão e contínuos e 450 mL de inóculo no ensaio D-3+).

3.5 Metodologias analíticas

3.5.1 Determinação da concentração celular (X)

Durante os cultivos, a concentração celular do microrganismo, em termos de massa seca, era determinada da seguinte forma (Guimarães, 2000):

a. Até 20 horas de cultivo

1. Retirava-se a amostra do fermentador, media-se o pH e pesavam-se cerca de 20 g da amostra em balança analítica (Mettler Toledo AB204);

2. Filtrava-se a amostra a vácuo, em membrana $1,2\ \mu\text{m}$ previamente pesada;

3. O filtrado era utilizado para as determinações de glicose e de retamicina extracelular;

4. As células retidas na membrana eram secas em microondas a uma potência 20 (180 W) por 15 minutos, tempo suficiente para a obtenção de massa constante;

5. As células secas eram resfriadas em dessecador por 15 minutos;

6. Pesavam-se as células juntamente com a membrana em balança analítica;

7. A concentração celular, em termos de massa seca, era determinada pela seguinte equação:

$$X = \frac{\left[M_{pc} - M_p \left(1 - \frac{U_p}{100} \right) \right] \cdot d}{M_a} \quad (3.1)$$

Onde :

d = densidade da amostra (considerada 1000 g/L);

M_a = massa da amostra (g);

M_p = massa da membrana ou do papel de filtro (g);

M_{pc} = massa da membrana contendo a massa seca de células (g);

U_p = teor de umidade da membrana ou do papel de filtro (%);

X = concentração celular, em termos de massa seca (g/L).

b. Após 20 horas de cultivo

Após as 20 horas de cultivo, a filtração tornava-se difícil, tornando-se necessária a realização de uma centrifugação prévia. O procedimento adotado era o seguinte:

1. Retirava-se a amostra do fermentador, media-se o pH e pesavam-se cerca de 20 g da amostra em um tubo de centrífuga, em balança analítica (Mettler Toledo AB204);

2. Centrifugava-se a amostra por 20 minutos a 10000 rpm (7300 g) e 5 °C em uma centrífuga refrigerada MR1812 (Jouan, France);

3. O sobrenadante era utilizado para a determinação de glicose e de retamicina extracelular;

4. O sedimento era ressuspensão em água e filtrado a vácuo em papel de filtro Framex 389² previamente pesado;

5. As células retidas no papel eram secas em estufa a 85 °C por 6 horas, tempo suficiente para a obtenção de massa constante (devido à massa celular mais alta atingida após as 20 horas de cultivo, a utilização de microondas não era conveniente para a secagem das células, causando rompimento e perda de massa celular);
6. As células secas eram resfriadas em dessecador por 15 minutos;
7. Pesavam-se as células juntamente com o papel de filtro em balança analítica;
8. A concentração celular, em termos de massa seca, era determinada pela equação 3.1.

3.5.2 Determinação da concentração de glicose (S)

A dosagem de glicose das amostras era realizada pelo método da glicose-oxidase, implantado em um equipamento Technicon Auto-Analyser II. Era empregado um conjunto de reagentes Merck (Glucose Enzimatique Color Liquid) para a dosagem de glicose por este método enzimático.

O princípio do método é baseado em técnicas colorimétricas, sendo descrito por Barham; Trinder (1972). Inicialmente, a amostra a ser analisada passa por uma membrana onde é realizada uma diálise, a fim de se eliminar macromoléculas que possam interferir na análise. A glicose que passa pela membrana é oxidada a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio em presença de glicose-oxidase, segundo a seguinte reação :

O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, oxida uma ou mais substâncias chamadas de aceptores de oxigênio, com a formação de um cromógeno vermelho, segundo a seguinte reação:

Existem vários sistemas que podem atuar como aceptores de oxigênio nesta reação. O mais empregado é o sistema que utiliza fenol e 4-aminofenazona. Estas duas substâncias reagem entre si, na presença de peróxido de oxigênio e peroxidase, formando um cromógeno vermelho, a 4-p-benzoquinona-monoimino fenazona. A

concentração desta substância, determinada por métodos colorimétricos, é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Utilizavam-se soluções padronizadas de glicose, com concentrações entre 0,2 g/L e 1,0 g/L, para o levantamento de uma curva de calibração relacionando a concentração de cromógeno com a concentração de glicose presente na amostra.

O acompanhamento da concentração de glicose durante os cultivos também era realizado com a utilização do aparelho Advantage II (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.), utilizado para a dosagem de glicose no sangue de pessoas diabéticas, o qual proporciona resultados mais rápidos. A obtenção de resultados mais imediatos de concentração de substrato mostrou-se útil no monitoramento dos cultivos descontínuos alimentados e contínuos.

3.5.3 Determinação da concentração de retamicina extracelular (Re)

A determinação da concentração de retamicina extracelular durante os cultivos era realizada, utilizando-se a metodologia desenvolvida por Guimarães (2000), da seguinte forma:

1. Retirava-se uma alíquota de 5 mL do filtrado ou do sobrenadante obtido (item 3.5.1) e transferia-se para um béquer de 50 mL;
2. Ajustava-se o pH da alíquota para 6,3 com HCl 0,02 N;
3. Transferia-se quantitativamente a alíquota para um balão volumétrico de 10 mL e completava-se o volume com água destilada;
4. Transferiam-se cerca de 3 mL da amostra para uma cubeta de acrílico;
5. Lia-se a absorbância em espectrofotômetro digital B 342 II (Micronal), a 547 nm;
6. A concentração de retamicina extracelular era determinada a partir de uma curva de calibração obtida pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química da USP, conforme as equações 3.2 e 3.3:

$$Re^* = 2,7326 \cdot ABS - 0,016 \quad (r^2 = 0,998) \quad (3.2)$$

$$Re = Re^* \cdot Dil \quad (3.3)$$

Onde:

ABS = absorvância a 547 nm;

Dil = fator de diluição da amostra (Dil = 2);

Re = concentração de retamicina na amostra do fermentador (g/L);

Re* = concentração de retamicina na amostra diluída (g/L).

Essa curva de calibração foi levantada empregando-se soluções de diferentes concentrações do complexo retamicina parcialmente purificado, a pH 6,3, em metanol. A curva é válida para a faixa de absorvância entre 0,2 e 0,8 e para pH 6,3. Devido ao fato de as antraciclinas serem compostos com propriedades de indicadores de pH (Arcamone, 1969), possuindo coloração vermelha em meio ácido e violeta em meio básico, era necessário o ajuste do pH para 6,3, a fim de se evitar erro na determinação.

Devido ao fato de não se possuir um produto comercial puro, a curva de calibração foi levantada a partir do complexo retamicina parcialmente purificado. Portanto, essa curva de calibração superestima a concentração de retamicina, embora proporcione a obtenção de resultados comparativos entre os ensaios. Outros trabalhos continuam sendo realizados a fim de purificar o complexo retamicina e aprimorar as rotinas de determinação das concentrações de retamicina extracelular e intracelular, com a utilização de HPLC e espectrofotômetro de varredura.

3.5.4 Determinação da concentração de retamicina intracelular (Ri)

A determinação da concentração de retamicina intracelular era realizada utilizando-se a metodologia desenvolvida por Guimarães (2000), com as alterações propostas por Silva et al. (2000) da seguinte forma:

1. Retirava-se a amostra do fermentador e pesavam-se cerca de 30 g da amostra em balança analítica (Mettler Toledo AB204) em um tubo de centrifuga previamente pesado;
2. Centrifugava-se a amostra por 15 minutos a 10000 rpm (7300 g) e 5 °C em uma centrífuga refrigerada MR1812 (Jouan, France);
3. Descartava-se o sobrenadante e ressuspendiam-se as células em água destilada (lavagem das células, para retirada do resíduo de retamicina extracelular);

4. Centrifugava-se novamente por 15 minutos a 10000 rpm (7300 g) e 5 °C em uma centrífuga refrigerada MR1812 (Jouan, France);

5. Descartava-se o sobrenadante e pesava-se o tubo de centrífuga com as células úmidas;

6. Ressuspendiam-se as células em metanol, na proporção de 16 mL de metanol por grama de células úmidas, como mostram as equações 3.4 e 3.5;

$$M_u = M_{tu} - M_t \quad (3.4)$$

$$V_{met} = 16 \cdot M_u \quad (3.5)$$

Onde:

M_t = massa do tubo de centrífuga (g);

M_{tu} = massa do tubo de centrífuga com as células úmidas (g);

M_u = massa das células úmidas (g);

V_{met} = volume de metanol para ressuspender as células (mL).

7. Mantinham-se as células suspensas em metanol em banho de ultra-som (Thornton Inpec Eletrônica Ltda., Brasil) por 25 minutos, para promover a extração da retamicina intracelular;

8. A seguir, mantinham-se as células suspensas em metanol sob agitação em incubador rotativo a 200 rpm, por uma hora;

10. Centrifugava-se por 20 minutos a 10000 rpm (7300 g) e 5 °C;

11. Transferiam-se cerca de 3 mL do sobrenadante para uma cubeta de quartzo;

12. Lia-se a absorbância em espectrofotômetro a 547 nm;

13. Secava-se o sedimento em estufa a 85 °C por 6 horas, tempo necessário para se obter massa constante;

14. Resfriava-se o tubo de centrífuga com as células em dessecador por 15 minutos e pesava-se o tubo de centrífuga com as células secas em balança analítica.

A concentração de retamicina intracelular, expressa por volume de meio, era calculada da seguinte forma:

Cálculo da massa de células secas:

$$M_s = M_{ts} - M_t \quad (3.6)$$

Onde:

M_s = massa das células secas (g);

M_t = massa do tubo de centrifuga (g);

M_{ts} = massa do tubo de centrifuga com as células secas (g).

Cálculo do volume de água contida nas células úmidas:

$$V_{\text{água}} = (M_u - M_s) / d_{\text{água}} \quad (3.7)$$

Onde:

$d_{\text{água}}$ = densidade da água (1,0 g/mL);

M_s = massa das células secas (g);

M_u = massa das células úmidas (g);

$V_{\text{água}}$ = volume de água contida nas células úmidas (mL).

Cálculo do volume total de líquido na extração com metanol:

$$V_{\text{liq}} = V_{\text{met}} + V_{\text{água}} \quad (3.8)$$

Onde:

$V_{\text{água}}$ = volume de água contida nas células úmidas (mL);

V_{liq} = volume total de líquido na extração com metanol (mL);

V_{met} = volume de metanol para ressuspender as células (mL).

Cálculo da massa de retamicina no líquido após a extração:

$$M_{\text{Ri}} = (2,7326 \cdot \text{ABS} - 0,0116) \cdot (V_{\text{liq}}/1000) \quad (3.9)$$

Onde:

ABS = absorbância a 547 nm;

M_{Ri} = massa de retamicina no líquido após a extração (g);

V_{liq} = volume total de líquido na extração com metanol (mL).

Cálculo da concentração de retamicina intracelular por volume de meio:

$$R_i = M_{Ri}/V_a \quad (3.10)$$

Onde:

M_{Ri} = massa de retamicina no líquido após a extração (g);

V_a = volume da amostra, aproximadamente igual à massa da amostra pesada inicialmente, considerando-se sua densidade igual a 1,0 g/mL (mL).

3.5.5 Caracterização morfológica do microrganismo

3.5.5.1 Preparo das lâminas

As lâminas para a caracterização morfológica do microrganismo eram preparadas de acordo com a metodologia apresentada por diversos autores (Paul; Thomas, 1998; Tucker et al., 1992; Adams; Thomas, 1988) para cultivos de actinomicetos, da seguinte forma:

1. Retirava-se a amostra do fermentador e fazia-se uma diluição adequada (1, 10, 20, 50 ou 100 vezes), de acordo com a tabela 3.7, a fim de se evitar sobreposição de “objetos” (hifas, *clumps* e *pellets*) no preparo das lâminas;

Tabela 3.7 Diluições utilizadas no preparo das lâminas para caracterização morfológica de *Streptomyces olindensis*, em função do tempo de cultivo.

Tempo de cultivo (h)	Diluição
0	Sem diluição
4	1:5
8	1:10
12	1:20
16	1:50
a partir de 16	1:100

2. Transferiam-se cerca de 20 µL da amostra diluída, espalhando-a sobre a lâmina;

3. Procedia-se à secagem da lâmina e fixação das células ao bico de Bunsen;

4. Aplicava-se uma gota de solução de azul de metileno sobre a amostra seca, por 2 minutos (0,3 g de azul de metileno, dissolvido em 30 mL de etanol 95 %

(v/v) com o volume completado para 100 mL com água destilada);

5. Fazia-se a lavagem do excesso de corante com água destilada.

3.5.5.2 Análise de imagens

A análise de imagens era realizada utilizando-se um analisador LEICA Q550IW acoplado a um microscópio óptico LEICA DM/LS e uma câmera de vídeo SONY DXC-950P. O *software* utilizado era o LEICA QWin. As imagens eram geradas com uma resolução de 764 x 574 pontos e 256 níveis de cinza.

A metodologia foi desenvolvida no início deste trabalho de Doutorado, baseada em procedimentos adotados por vários autores para caracterização de microrganismos filamentosos (Adams; Thomas, 1988; Packer; Thomas, 1990; Tucker et al., 1992; Belmar-Beiny; Thomas, 1991; Vanhoutte et al., 1995; Tamura et al., 1997, Paul; Thomas, 1998).

No tratamento das imagens eram utilizadas ferramentas de correção da imagem cinza (erosão e dilatação) antes da detecção (produção da imagem binária). Após a detecção, eram utilizadas ferramentas de correção da imagem binária (erosão, dilatação, esqueletização e encurtamento). A esqueletização e o encurtamento (*prune*) mostraram-se úteis na análise de ramificações e número de extremidades (*tips*) das hifas isoladas. A tabela 3.8 apresenta as ferramentas disponíveis no *software* QWin que conduziram a melhores resultados no tratamento das imagens cinza e binária, as quais foram empregadas na rotina de análise de imagens. O Apêndice C apresenta os fundamentos da análise de imagens e as características principais destas ferramentas de transformação de imagens.

Eram medidos cerca de 100 objetos em cada amostra, que eram classificados em quatro classes morfológicas: *pellets*, aglomerados (*clumps*), hifas ramificadas e hifas não ramificadas. Essa classificação era feita automaticamente, por meio de uma rotina implementada no analisador de imagens, utilizando o ambiente de programação QUIPS (*Quantitative Interactive Programming System*), parte do *software* LEICA QWin, a partir dos seguintes critérios de classificação desenvolvidos no início deste trabalho de Doutorado (Pamboukian et al., 2002, que se encontra no Apêndice E):

Hifas isoladas não ramificadas: $40 < \text{Perímetro} \leq 600 \mu\text{m}$

Número de extremidades = 2

Hifas isoladas ramificadas: $40 < \text{Perímetro} \leq 600 \mu\text{m}$

Número de extremidades > 2

Aglomerados ou *clumps*: $600 < \text{Perímetro} < 12000 \mu\text{m}$

e

$100 < \text{Perímetro Convexo} \leq 950 \mu\text{m}$

Pellets: $950 < \text{Perímetro Convexo} < 7200 \mu\text{m}$

As rotinas de aquisição de imagens e de medição dos objetos, construídas no ambiente de programação QUIPS, são apresentadas no Apêndice D.

Tabela 3.8 Ferramentas do *software* QWin, selecionadas para o processamento das imagens, para cada classe morfológica.

Classe	Ferramentas (imagem cinza)	Ferramentas (imagem binária)
<i>Clumps</i>	<i>Linear Close</i> <i>Black Sharpen</i> <i>Fill Black</i> <i>Enhance</i>	<i>Spots</i> <i>Edge Feat</i>
<i>Pellets</i>	<i>Linear Close</i> <i>Black Sharpen</i> <i>Fill Black</i> <i>Enhance</i>	<i>Spots</i> <i>Edge Feat</i>
Hifas Livres	<i>Black Sharpen</i>	<i>Spots</i> <i>White Exhaustive Skeletonization</i> <i>Prune (5 pixels)</i>

Para cada objeto eram medidos os seguintes parâmetros: área, área convexa, perímetro, perímetro convexo, dimensão média, comprimento total de hifa e número de extremidades. Para cada amostra eram também determinadas as porcentagens de cada classe morfológica (em termos de número de objetos e em termos de área total).

Convém esclarecer que o perímetro convexo é o perímetro do objeto, obtido após o preenchimento de todas as suas concavidades e a área convexa é a área do objeto obtida após o preenchimento de todas as suas concavidades, como esquematizado na figura 3.5.

Figura 3.5 Esquema do perímetro e do perímetro convexo de um aglomerado de hifas (Tucker et al., 1992).

A dimensão média é definida para *clumps* e *pellets* como sendo a média das dimensões do objeto, tomadas em 8 direções diferentes, sendo portanto um parâmetro que caracteriza o tamanho do objeto. Para hifas ramificadas e não ramificadas, o tamanho é caracterizado pelo comprimento total de hifa (soma do comprimento da hifa principal com os comprimentos das ramificações). No caso das hifas ramificadas, define-se ainda a unidade de crescimento hifal (HGU_{hr} , *hyphal growth unit*) como sendo a relação entre o comprimento total da hifa ramificada e o número de extremidades.

A porcentagem de cada classe morfológica em termos de número de objetos era determinada, em cada amostra, medindo-se um certo número de objetos (*clumps*, *pellets*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas) e determinando-se o número de objetos de cada classe morfológica em relação ao número total de objetos. Para boa precisão eram medidos mais de 100 objetos em cada amostra. A porcentagem de cada classe morfológica em termos de área era determinada somando-se a área total de cada classe morfológica e dividindo-se essa soma pela área total de todos os objetos medidos.

Nas figuras 4.11 a 4.32, que representam as dimensões dos objetos durante o ensaio D-5, as barras de erro foram calculadas considerando-se o intervalo de confiança (95 %), da seguinte forma:

$$\Delta = t_{n-1, \alpha/2} \cdot \frac{DP}{\sqrt{n}} \quad (3.11)$$

Onde:

$\bar{X}$ = média

DP = Desvio Padrão

n = número de elementos da amostra

$t_{n-1, \alpha/2}$ = Valor tabelado (distribuição t de Student)

α = nível de significância

$$\text{Intervalo de Confiança} = \bar{X} \pm \Delta$$

Exemplo:

Ensaio D-5 (0 horas)

Dimensão média de *clumps*

$\bar{X}$ = 183 μm

DP = 66 μm

n = 37

α = 0,05 (95 % de confiança)

$$t_{n-1, \alpha/2} = t_{36, 0,025} = 1,96$$

$$\Delta = t_{n-1, \alpha/2} \cdot \frac{DP}{\sqrt{n}} = 1,96 \cdot \frac{66}{\sqrt{37}} = 21$$

$$\text{Intervalo de Confiança} = \bar{X} \pm \Delta = 183 \pm 21 \mu\text{m}$$

3.5.6 Caracterização reológica do caldo de fermentação

A caracterização reológica do meio de cultura foi realizada utilizando-se um reômetro digital Brookfield LVDV-III, acoplado a um microcomputador. A aquisição de dados era feita utilizando o *software Rheocalc*.

O procedimento adotado foi o seguinte:

1. Montava-se o reômetro, nivelando-o e acoplado a jaqueta para controle da temperatura a um banho termostático a 30 °C;
2. Colocava-se o *spindle* adequado para a faixa de viscosidade do caldo a ser caracterizado. Os *spindles* utilizados foram: o *SSA-ULAdapter*, para baixas viscosidades (entre 0 e 8 horas de cultivo) e o *SSA-18/13R*, para viscosidades mais elevadas (a partir de 12 horas de cultivo);

3. Colocava-se a amostra no recipiente cilíndrico adequado e acoplava-se este recipiente à jaqueta, mergulhando-se o *spindle* na amostra. O volume de amostra dependia do *spindle* utilizado (16 mL para o *SSA-ULAdapter* e 8 mL para o *SSA-18/13R*);

4. Executava-se um programa a partir do *software Rheocalc*. Esse programa estabelecia uma frequência de rotação (e, conseqüentemente, um gradiente de velocidade) para o *spindle*, durante 30 segundos, registrando a tensão de cisalhamento a cada segundo. Após esses 30 segundos, o programa passava automaticamente para outra frequência de rotação. Com isso obtinha-se a tensão de cisalhamento em função do gradiente de velocidade, para várias rotações (2, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 150 rpm);

Com os valores da tensão de cisalhamento em função do gradiente de velocidade eram determinadas as constantes reológicas do caldo de fermentação: K (índice de consistência do fluido) e n (índice de comportamento do escoamento), conforme a lei de potência:

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (3.12)$$

Onde :

K = índice de consistência ($\text{dina.s}^n/\text{cm}^2 = 100 \text{ cP.s}^{n-1}$);

n = índice de comportamento do escoamento (adimensional);

γ = gradiente de velocidade (s^{-1});

τ = tensão de cisalhamento (dina/cm^2).

3.5.7 Determinação da concentração de íons amônio ($\text{C}_{\text{NH}_4^+}$)

A determinação da concentração de íons amônio no caldo de fermentação era realizada a partir de uma alíquota do caldo filtrado, utilizando o procedimento adotado por Martins (2001). Essa determinação fornece uma estimativa da quantidade de nitrogênio presente no caldo em determinado instante, embora não seja uma metodologia muito adequada, pois mede apenas a quantidade de nitrogênio na forma de íons amônio e não a quantidade de nitrogênio total, cujo método mais adequado é o método de digestão ácida (Método *Kjeldhal*).

Para tal determinação, foi utilizado um eletrodo de amônia (ORION modelo 95-12) conectado a um pH-metro (MICRONAL modelo B-474) com capacidade para leitura em milivolts (mV).

O funcionamento do eletrodo baseia-se no equilíbrio químico entre o íon amônio (NH_4^+) e o gás amônia (NH_3) em solução aquosa:

As quantidades relativas de amônia e íon amônio são determinadas pelo pH da solução. Acima de pH 11, praticamente todo íon amônio converte-se em gás amônia. Dessa forma, o pH da amostra de interesse é elevado a 11 com o uso de uma solução de ajuste de força iônica (ORION 951211), composta basicamente por NaOH 5M. Assim, todo o NH_4^+ é convertido em NH_3 , que difunde pela membrana do eletrodo, hidrofóbica e permeável ao gás amônia, provocando uma alteração no pH da solução interna do eletrodo, a qual corresponde a uma leitura em milivolts.

O procedimento era realizado levantando-se uma curva de calibração a partir de soluções padrão de cloreto de amônio e, em seguida, analisando-se as amostras dos ensaios.

A concentração de íons amônio foi realizada apenas nos seguintes ensaios: DA-3, D-3, D-3+, DA-4b, D-4b, DA-5b, D-5b, C-1, C-2, C-3 e C-4. Nos demais ensaios não foi realizada a determinação de íons amônio.

a. Levantamento da curva de calibração do eletrodo

1. Preparavam-se cinco soluções padrão de cloreto de amônio (NH_4Cl), nas seguintes concentrações: 10^{-1} M, 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M e 10^{-5} M;
2. Colocavam-se 30 mL da solução de NH_4 10^{-5} M em um béquer de 50 mL de capacidade;
3. Adicionava-se uma barra magnética ao béquer contendo a solução, submetendo-o a uma agitação moderada;
4. Adicionavam-se 2 mL da solução de ajuste de força iônica (ISA, ORION 951211) para o ajuste do pH;

5. Colocava-se o eletrodo na solução e aguardava-se a estabilização da leitura em milivolts;
6. Repetiam-se as etapas 2 a 5 para as outras soluções padrão de cloreto de amônio;
7. Construía-se a curva de calibração, colocando-se as leituras em milivolts em um eixo linear e as concentrações das soluções padrão em um eixo logarítmico.

b. Análise das amostras

1. Colocavam-se 5 mL da amostra filtrada em um béquer de 50 mL de capacidade;
2. Adicionavam-se 25 mL de água destilada;
3. Adicionava-se uma barra magnética ao béquer contendo a solução, submetendo-o a uma agitação moderada;
4. Adicionavam-se 2 mL da solução de ajuste de força iônica (ISA, ORION 951211) para o ajuste do pH;
5. Colocava-se o eletrodo na solução e aguardava-se a estabilização da leitura em milivolts;
6. Utilizando a curva de calibração e levando-se em conta a diluição aplicada às amostras, determinava-se a concentração de íons amônio (C_{NH4+}), expressa em mmol/L (mM).

3.6 Cálculos dos parâmetros cinéticos nos ensaios

3.6.1 Cálculo do volume de reação

O volume de reação nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos era calculado da seguinte forma:

$$V = V_{ini} + \frac{M_B}{d_B} + \frac{M_A}{d_A} + V_{Alim} - V_A - V_D - V_{ARR} \quad (3.13)$$

Onde:

d_A = densidade da solução de HCl 2N = 1009,46 g/L (Perry; Chilton, 1973);

d_B = densidade da solução de NaOH 2N=1075,93 g/L (Perry; Chilton, 1973);

M_A = massa de solução de HCl 2N adicionada até o instante t (g);

M_B = massa de solução de NaOH 2N adicionada até o instante t (g);

V = volume de reação no instante t (L);

V_A = volume acumulado de retirada de amostras até o instante t (L);

V_{Alim} = volume de meio alimentado até o instante t (L);

V_{ARR} = volume perdido por arraste até o instante t (L);

V_D = volume acumulado de amostras desprezadas até o instante t (L);

V_{ini} = volume inicial, após a inoculação (L).

As massas M_A e M_B e os volumes V_A e V_D eram medidos durante os cultivos e o volume total perdido por arraste (V_{ARR}) era calculado através dos volumes inicial e final do caldo de fermentação, levando-se em conta as retiradas de amostras e as adições de soluções (HCl e NaOH) e de meio de alimentação.

Nos ensaios contínuos, o volume era calculado a partir da equação 3.13 até as 16 horas de cultivo, instante de início da fase contínua. A partir desse instante, o volume de reação era considerado como sendo 4,0 L (nível de retirada do caldo de fermentação).

3.6.2 Cálculo de Q_{O_2} e Q_{O_2X} pelo método do balanço gasoso

O método do balanço gasoso permite o cálculo da velocidade global de consumo de oxigênio (Q_{O_2X}) e da velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}), a partir das frações molares de O_2 e de CO_2 no gás de saída do reator, através da combinação do balanço material de O_2 nas fases líquida e gasosa no sistema de reação (Schmidell, 2001).

$$\frac{d(CV)}{dt} = Y_{O_2}^e \cdot \phi_{ar}^e - Y_{O_2}^s \cdot \phi_{gás}^s - Q_{O_2} \cdot X \cdot V \quad (3.14)$$

Onde:

C = concentração de oxigênio dissolvido no meio (mmol/L);

Q_{O_2X} = velocidade de consumo de oxigênio (mmol/(L.h));

V = volume de líquido no reator (L);

$Y_{O_2}^e$ = fração molar de O_2 no ar de entrada;

$Y_{O_2}^s$ = fração molar de O_2 no gás de saída do reator;

ϕ_{ar}^e = vazão molar de ar na entrada do reator (mmol/h);

$\phi_{gás}^s$ = vazão molar de gás na saída do reator (mmol/h).

Sendo a variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo pequena, podemos considerar $d(CV)/dt = 0$, obtendo-se a seguinte equação:

$$QO_2 \cdot X = \frac{Y_{O_2}^e \cdot \phi_{ar}^e - Y_{O_2}^s \cdot \phi_{gás}^s}{V} \quad (3.15)$$

As frações molares de O_2 e de CO_2 no gás de saída do reator ($Y_{O_2}^s$ e $Y_{CO_2}^s$) eram monitoradas por um analisador de gases da *New Brunswick Scientific Co.*, dotado de um analisador de oxigênio da *Beckman Industrial* (modelo 755) e de um analisador de CO_2 da *Fuji Electric* (modelo IR-730). A fração molar de oxigênio no ar de entrada ($Y_{O_2}^e$) foi considerada igual a 0,2095.

A vazão molar de ar na entrada do reator (ϕ_{ar}^e) era medida e controlada por um fluxômetro de massa (*Brooks Instruments* modelo 5850E).

A vazão molar do gás na saída do reator ($\phi_{gás}^s$) era calculada por meio de um balanço de N_2 (gás inerte), da seguinte forma:

$$Y_{N_2}^e \cdot \phi_{ar}^e = 0,79 \cdot \phi_{ar}^e = Y_{N_2}^s \cdot \phi_{gás}^s \quad (3.16)$$

Ou, ainda:

$$0,79 \cdot \phi_{ar}^e = \phi_{gás}^s \cdot (1 - Y_{O_2}^s - Y_{CO_2}^s) \quad (3.17)$$

Onde:

$Y_{N_2}^e$ = fração molar de N_2 no ar de entrada = 0,79;

$Y_{CO_2}^s$ = fração molar de CO_2 no gás de saída do reator;

$Y_{N_2}^s$ = fração molar de N_2 no gás de saída do reator.

A equação 3.17, finalmente, conduz a:

$$\phi_{gás}^s = \frac{0,79 \cdot \phi_{ar}^e}{(1 - Y_{O_2}^s - Y_{CO_2}^s)} \quad (3.18)$$

3.6.3 Cálculo das velocidades específicas nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos

As velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicose e de produção de retamicina nos ensaios descontínuos alimentados foram determinadas a partir das seguintes equações:

$$\mu_X = \frac{1}{X_m} \frac{d X_m}{dt} \quad (3.19)$$

$$\mu_S = \frac{\phi \cdot S_i}{X_m} - \frac{1}{X_m} \frac{d S_m}{dt} \quad (3.20)$$

$$\mu_{Re} = \frac{1}{X_m} \frac{d Re_m}{dt} \quad (3.21)$$

$$\mu_{Ri} = \frac{1}{X_m} \frac{d Ri_m}{dt} \quad (3.22)$$

$$\mu_{Rt} = \frac{1}{X_m} \frac{d Rt_m}{dt} \quad (3.23)$$

Onde:

Re = concentração de retamicina extracelular no reator no instante t (g/L);

Re_m = Re.V = massa de retamicina extracelular no reator no instante t (g);

Ri = concentração de retamicina intracelular no reator no instante t (g/L);

Ri_m = Ri.V = massa de retamicina intracelular no reator no instante t (g);

Rt = concentração de retamicina total no reator no instante t (g/L);

Rt_m = Rt.V = massa de retamicina total no reator no instante t (g);

S = concentração de glicose no reator no instante t (g/L);

S_i = concentração de glicose na alimentação (g/L);

S_m = S.V = massa de substrato limitante (glicose) no reator no instante t (g);

V = volume de reação (L);

X = concentração celular no reator no instante t (g/L);

$X_m = X.V$ = massa de células no reator no instante t (g);

Φ = vazão volumétrica de alimentação (L/h);

μ_{Re} = velocidade específica de produção de retamicina extracelular (g/(g.h));

μ_{Ri} = velocidade específica de produção de retamicina intracelular (g/(g.h));

μ_{Rt} = velocidade específica de produção de retamicina total (g/(g.h));

μ_S = velocidade específica de consumo de substrato (g/(g.h));

μ_X = velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

A retamicina total refere-se à soma da retamicina intracelular com a retamicina extracelular.

Os cálculos das velocidades específicas foram efetuados em termos de massa, devido à variação no volume de reação nos ensaios descontínuos alimentados. Os valores das velocidades específicas, calculados a cada uma hora, encontram-se no Apêndice F.

No caso dos ensaios descontínuos padrão, as velocidades específicas foram calculadas com a utilização das equações 3.19 a 3.23, considerando-se $\Phi = 0$ (equação 3.20).

As curvas de velocidades específicas foram calculadas utilizando-se o *software Logiciel de Lissage*, desenvolvido por Simões et al. (1994). Esse *software* calcula as velocidades específicas utilizando um método *spline*, que ajusta um polinômio de grau 3 ou 4 a um intervalo de dois pontos experimentais consecutivos da variável em questão (por exemplo, X), incorporando um número de pontos à frente deste intervalo; além disso, o método obriga que a derivada do polinômio ajustado no intervalo anterior seja igual à derivada do polinômio ajustado no novo intervalo, no ponto de intersecção (Bonomi; Schmidell, 2001). Os polinômios obtidos são, então, derivados algebricamente em relação ao tempo, tornando possível o cálculo das velocidades específicas.

3.6.4 Cálculo das velocidades específicas nos ensaios contínuos

As velocidades específicas de crescimento, de consumo de glicose e de produção de retamicina nos ensaios contínuos, cujos valores encontram-se no Apêndice F, foram determinadas a partir das seguintes equações, considerando-se o volume constante no reator:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + D \quad (3.24)$$

$$\mu_S = \frac{D}{X} (S_i - S) - \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3.25)$$

$$\mu_{Re} = \frac{D \cdot Re}{X} + \frac{1}{X} \frac{dRe}{dt} \quad (3.26)$$

$$\mu_{Ri} = \frac{D \cdot Ri}{X} + \frac{1}{X} \frac{dRi}{dt} \quad (3.27)$$

$$\mu_{Rt} = \frac{D \cdot Rt}{X} + \frac{1}{X} \frac{dRt}{dt} \quad (3.28)$$

Onde:

D = vazão específica de alimentação (h^{-1});

S_i = concentração de glicose na alimentação (g/L).

As equações 3.24 a 3.28 são válidas também para a etapa de cultivo entre o início da alimentação e o estado estacionário (período transiente). No estado estacionário, as equações reduzem-se a:

$$\mu_X = D \quad (3.29)$$

$$\mu_S = \frac{D}{X_f} (S_i - S_f) \quad (3.30)$$

$$\mu_{Re} = \frac{D \cdot Re_f}{X_f} \quad (3.31)$$

$$\mu_{Ri} = \frac{D \cdot Ri_f}{X_f} \quad (3.32)$$

$$\mu_{Rt} = \frac{D \cdot Rt_f}{X_f} \quad (3.33)$$

Onde:

D = vazão específica de alimentação (h^{-1});

Re_f = concentração de retamicina extracelular no estado estacionário (g/L);

Ri_f = concentração de retamicina intracelular no estado estacionário (g/L);

Rt_f = concentração de retamicina total no estado estacionário (g/L);

S_f = concentração de glicose no estado estacionário (g/L);

S_i = concentração de glicose no meio de alimentação (g/L);

X_f = concentração celular no estado estacionário (g/L).

3.6.5 Cálculo dos fatores de conversão e produtividades nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos

Os fatores de conversão e produtividades para os ensaios descontínuos alimentados e descontínuos eram calculados pelas seguintes equações:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_t} \quad (3.34)$$

$$Y_{Re/S} = \frac{Re_f}{S_t} \quad (3.35)$$

$$Y_{Ri/S} = \frac{Ri_f}{S_t} \quad (3.36)$$

$$Y_{Rt/S} = \frac{Rt_f}{S_t} \quad (3.37)$$

$$P_X = \frac{X_f - X_i}{t_f} \quad (3.38)$$

$$P_{Re} = \frac{Re_f}{t'_f} \quad (3.39)$$

$$P_{Ri} = \frac{Ri_f}{t''_f} \quad (3.40)$$

$$P_{Rt} = \frac{Rt_f}{t'''_f} \quad (3.41)$$

$$PE_{Re} = \frac{Re_f}{X' - X_i} \quad (3.42)$$

$$PE_{Ri} = \frac{Ri_f}{X'' - X_i} \quad (3.43)$$

$$PE_{Rt} = \frac{Rt_f}{X''' - X_i} \quad (3.44)$$

Onde:

PE_{Re} = produção específica em retamicina extracelular (g/g);

PE_{Ri} = produção específica em retamicina intracelular (g/g);

PE_{Rt} = produção específica em retamicina total (g/g);

P_{Re} = produtividade em retamicina extracelular (g/(L.h));

P_{Ri} = produtividade em retamicina intracelular (g/(L.h));

P_{Rt} = produtividade em retamicina total (g/(L.h));

P_X = produtividade em células (g/(L.h));

Re_f = concentração máxima de retamicina extracelular (g/L);

Ri_f = concentração máxima de retamicina intracelular (g/L);

Rt_f = concentração máxima de retamicina total (g/L);

S_t = concentração total de substrato, que corresponde à massa total de glicose no ensaio (inicial + alimentada) dividida pelo volume total de meio no reator (g/L);

t_f = instante da concentração celular máxima (h);

t'_f = instante da concentração máxima de retamicina extracelular (h);

t''_f = instante da concentração máxima de retamicina intracelular (h);

t'''_f = instante da concentração máxima de retamicina total (h);

X' = concentração celular no instante t'_f (g/L);

X'' = concentração celular no instante t''_f (g/L);

X''' = concentração celular no instante t'''_f (g/L);

X_f = concentração celular máxima (g/L);

X_i = concentração celular no início do ensaio (g/L);

$Y_{Re/S}$ = fator de conversão substrato a retamicina extracelular (g/g);

$Y_{Ri/S}$ = fator de conversão substrato a retamicina intracelular (g/g);

$Y_{Rt/S}$ = fator de conversão substrato a retamicina total (g/g);

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato a células (g/g).

Nos ensaios descontínuos alimentados também foi definido o seguinte fator adimensional (R), como sendo a relação entre a produção específica em retamicina total obtida no ensaio descontínuo alimentado e a produção específica em retamicina total obtida no ensaio descontínuo padrão realizado em paralelo:

$$R = \frac{[PE_{Rt}]_{\text{Ensaio descontínuo alimentado}}}{[PE_{Rt}]_{\text{Ensaio descontínuo padrão realizado em paralelo}}} \quad (3.45)$$

Dessa forma, pode-se considerar $R = 1,0$ para os ensaios descontínuos padrão. Essa é uma forma de normalizar os resultados, levando-se em conta as variabilidades dos ensaios descontínuos padrão, conforme será visto no item 4.4.

3.6.6 Cálculo dos fatores de conversão e produtividades nos ensaios contínuos

Os fatores de conversão e produtividades para os ensaios contínuos eram calculados pelas seguintes equações:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f}{S_i - S_f} \quad (3.46)$$

$$Y_{Re/S} = \frac{Re_f}{S_i - S_f} \quad (3.47)$$

$$Y_{Ri/S} = \frac{Ri_f}{S_i - S_f} \quad (3.48)$$

$$Y_{Rt/S} = \frac{Rt_f}{S_i - S_f} \quad (3.49)$$

$$P_X = D \cdot X_f \quad (3.50)$$

$$P_{Re} = D \cdot Re_f \quad (3.51)$$

$$P_{Ri} = D \cdot Ri_f \quad (3.52)$$

$$P_{Rt} = D \cdot Rt_f \quad (3.53)$$

$$PE_{Re} = \frac{Re_f}{X_f} \quad (3.54)$$

$$PE_{Ri} = \frac{Ri_f}{X_f} \quad (3.55)$$

$$PE_{Rt} = \frac{Rt_f}{X_f} \quad (3.56)$$

Onde:

D = vazão específica de alimentação (h^{-1});

PE_{Re} = produção específica em retamicina extracelular (g/g);

PE_{Ri} = produção específica em retamicina intracelular (g/g);

PE_{Rt} = produção específica em retamicina total (g/g);

Re_f = concentração de retamicina extracelular no estado estacionário (g/L);

Ri_f = concentração de retamicina intracelular no estado estacionário (g/L);

Rt_f = concentração de retamicina total no estado estacionário (g/L);

S_f = concentração de glicose no estado estacionário (g/L);

S_i = concentração de glicose no meio de alimentação (g/L);

X_f = concentração celular no estado estacionário (g/L).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica de *Streptomyces olindensis*

Durante a fase inicial do trabalho, foi desenvolvida a metodologia para a caracterização morfológica do microrganismo, o que culminou com o estabelecimento de critérios de classificação, como apresentado no item Materiais e Métodos.

Inicialmente, foi estabelecida a rotina para a preparação das lâminas. Para a preparação de uma lâmina adequada, deve-se diluir a amostra a fim de que os objetos não se encontrem sobrepostos. A figura 4.1 mostra *pellets* sobrepostos, em uma amostra sem diluição, o que inviabiliza a medição. A figura 4.2 apresenta *pellets* separados por meio de uma diluição da amostra, facilitando o processo de medição.

Figura 4.1 Imagem obtida com uma diluição inadequada.

Figura 4.2 Imagem obtida com uma diluição adequada.

Um outro aspecto importante no preparo das lâminas é a utilização de um corante, a fim de melhorar o contraste da imagem obtida no microscópio. Na metodologia desenvolvida foi utilizado o corante azul de metileno. A utilização deste corante melhorou bastante as imagens e facilitou a detecção da região de interesse. A figura 4.3 mostra a imagem de um *pellet*, obtida sem a utilização do corante e a figura 4.4 mostra a detecção dessa imagem, a qual apresentou falhas. A figura 4.5 mostra a imagem de um *pellet*, obtida com a utilização do corante e a figura 4.6 mostra a detecção dessa imagem. Pode-se observar que a detecção da imagem com o corante é muito mais perfeita, o que conduz a medições mais precisas.

Figura 4.3 Imagem de um *pellet* obtida sem o corante.

Figura 4.4 Detecção da imagem obtida sem o corante.

Figura 4.5 Imagem de um *pellet* obtida com o corante.

Figura 4.6 Detecção da imagem obtida com o corante.

Foi estabelecido também um critério de classificação do microrganismo, em quatro classes morfológicas distintas (*pellets*, *clumps* ou aglomerados de hifas, hifas ramificadas e hifas não ramificadas), de acordo com suas dimensões. *Pellets* são formações bastante compactas de hifas (figura 4.7); *clumps* são aglomerados de hifas menos compactos que os *pellets* (figura 4.8); hifas ramificadas são formações lineares, com ramificações, que apresentam mais de duas pontas ou *tips* (figura 4.9) e hifas não ramificadas são formações lineares, sem ramificações, que apresentam somente duas pontas ou *tips* (figura 4.10). A rotina implementada no analisador de imagens (Apêndice D) classifica automaticamente o microrganismo em uma das quatro classes morfológicas, levando em conta as suas dimensões, como detalhado no item Materiais e Métodos. Para o estabelecimento desse critério, foram medidos cerca de 2110 objetos, sendo 641 *clumps*, 529 *pellets* e 940 hifas (ramificadas e não ramificadas). Com as medições desse conjunto de objetos, a partir de histogramas de

freqüência das dimensões, foram determinadas as dimensões características de cada classe morfológica, estabelecendo-se os critérios utilizados (Pamboukian et al., 2002). O Apêndice E apresenta uma cópia do artigo publicado, com os detalhes do critério de classificação estabelecido.

Figura 4.7 Imagem de um *pellet*.

Figura 4.8 Imagem de um *clump*.

Figura 4.9 Imagem de uma hifa ramificada.

Figura 4.10 Imagem de uma hifa não ramificada

Durante os cultivos, foram determinadas as porcentagens de cada classe morfológica, em termos de área projetada e em termos de número de objetos. Para cada classe morfológica, foram determinadas também as dimensões características, ao longo dos cultivos (área, área convexa, perímetro, perímetro convexo, comprimento total de hifas não ramificadas, comprimento total de hifas ramificadas, número de extremidades de hifas ramificadas, unidade de crescimento hifal das hifas ramificadas, dimensão média de *clumps* e dimensão média de *pellets*). Como a quantidade de parâmetros morfológicos é muito grande, serão apresentados os resultados de todas as dimensões apenas para um dos ensaios (ensaio descontínuo padrão D-5), uma vez que não foram observadas variações muito grandes nas dimensões do microrganismo durante os ensaios.

As figuras 4.11 a 4.14 apresentam a área média de *pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas, respectivamente, durante o ensaio descontínuo padrão D-5. Os desvios padrão obtidos foram altos (em torno de 50 % da média para os *pellets*, 85 % da média para os *clumps*, 68 % para as hifas não ramificadas e 70 % para as hifas ramificadas, considerando-se medições de mais de 100 objetos), indicando uma larga distribuição de dimensões da população de microrganismos. As barras de erro apresentadas nas figuras representam o intervalo de confiança (95 %) das dimensões. Até as 20 horas de cultivo, a área média dos *pellets* não variou significativamente, como mostra a figura 4.11. A partir das 20 horas de cultivo, o fato de a área média de *pellets* cair para zero reflete o fato de que praticamente não havia mais *pellets* no meio de cultivo, após esse instante. Considerando-se as barras de erro, pode-se observar uma ligeira queda da área dos *clumps* durante o ensaio D-5, provavelmente devido ao cisalhamento no reator, como mostrado na figura 4.12. Em relação à área média de hifas livres ramificadas e não ramificadas, praticamente não foram observadas mudanças significativas, levando-se em conta os intervalos de confiança obtidos (figuras 4.13 e 4.14).

As figuras 4.15 a 4.18 apresentam a área convexa média de *pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas, respectivamente, durante o ensaio descontínuo padrão D-5. Da mesma forma que para a área média, os desvios padrão foram altos (em torno de 57 % da média para os *pellets*, 74 % da média para os *clumps*, 83 % para as hifas não ramificadas e 90 % para as hifas ramificadas, considerando-se medições de mais de 100 objetos), indicando uma larga distribuição

de dimensões da população de microrganismos. Os perfis obtidos para a área convexa média foram semelhantes aos obtidos para a área média, discutidos anteriormente.

Também foram medidos perímetro e perímetro convexo para cada uma das classes morfológicas durante os ensaios. Convém lembrar que esses dois parâmetros foram utilizados no critério de classificação adotado, para a identificação das classes morfológicas. As figuras 4.19 a 4.22 apresentam o perímetro médio de *pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas, respectivamente, durante o ensaio descontínuo padrão D-5. As figuras 4.23 a 4.26 apresentam o perímetro convexo médio de *pellets*, *clumps*, hifas ramificadas e hifas não ramificadas, respectivamente, durante o ensaio descontínuo padrão D-5. Os perfis foram muito semelhantes aos obtidos para a área média e para a área convexa média, discutidos anteriormente.

Além da área, área convexa, perímetro e perímetro convexo, foram medidos outros parâmetros morfológicos que são mais intuitivos em relação à dimensão do microrganismo: dimensão média de *pellets* (figura 4.27), dimensão média de *clumps* (figura 4.28), comprimento total de hifas ramificadas (figura 4.29) e comprimento total de hifas não ramificadas (figura 4.30). Esses parâmetros também apresentaram altos desvios padrão, embora menores do que os obtidos para a área e perímetro. A dimensão média de *pellets* manteve-se em torno de 400 μm , até cerca de 20 horas de cultivo; após esse período, praticamente não havia mais a presença de *pellets* no reator (figura 4.27). Pode-se observar que a dimensão média de *clumps* iniciou-se em torno de 180 μm , decaindo para cerca de 95 μm até o final do ensaio, provavelmente devido ao cisalhamento no interior do reator (figura 4.28). O comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em cerca de 60 μm , aumentando ligeiramente no início do cultivo, atingindo cerca de 150 μm e decaindo no final do cultivo para cerca de 80 μm , como mostra a figura 4.29. O comprimento total de hifas não ramificadas foi de cerca de 40 μm , com poucas variações durante o ensaio D-5, mostrando uma ligeira queda a partir das 20 horas de cultivo, como mostra a figura 4.30.

As figuras 4.31 e 4.32 apresentam o número de extremidades (*tips*) e a unidade de crescimento hifal para as hifas ramificadas, durante o ensaio D-5. No ensaio D-5, o número de extremidades das hifas manteve-se em torno de 6, não apresentando variações significativas. A unidade de crescimento hifal manteve-se

entre 15 μm e 20 μm , não apresentando variações significativas no decorrer do cultivo.

Os parâmetros que apresentaram diferenças mais significativas entre os ensaios foram as porcentagens de cada classe morfológica, em termos de número de objetos e em termos de área projetada. A metodologia desenvolvida apresentou erros menores do que 10 % na classificação automática do microrganismo nas quatro classes morfológicas, como mostrado no Apêndice E.

A figura 4.33 apresenta as porcentagens de cada classe morfológica, em termos de número de objetos, durante o ensaio descontínuo padrão D-5. Pode-se observar que no início do cultivo havia cerca de 60 % de *clumps*, porcentagem que caiu ao longo do ensaio, chegando a apenas 10 % no final. Em relação aos *pellets*, estes estiveram presentes no reator até cerca de 20 horas de cultivo, desaparecendo a partir daí. Durante o cultivo, a porcentagem de hifas livres ramificadas e não ramificadas (em termos de número de objetos) aumentou. Essa diminuição na quantidade de *clumps* e *pellets*, com um correspondente aumento na quantidade de hifas livres, é devida ao cisalhamento no interior do reator, que causa rompimento de *pellets* e *clumps*.

Uma vez que as dimensões dos *pellets* são muito maiores do que as dimensões dos *clumps* e das hifas livres, é importante se fazer uma análise em termos de porcentagem em área de cada classe morfológica, pois esse parâmetro é mais diretamente relacionado com a quantidade de biomassa presente. A variação da porcentagem de cada classe morfológica, em termos de área, no ensaio D-5 é ilustrada na figura 4.34. Observa-se que, praticamente durante todo o ensaio, houve um predomínio de *clumps*. Até as 20 horas de cultivo, ocorreu um aumento da porcentagem de *clumps* e uma diminuição na porcentagem de *pellets*; a partir das 20 horas de cultivo, a porcentagem de *clumps* começou a diminuir, provavelmente devido ao rompimento, com a formação de hifas livres (ramificadas e não ramificadas). A porcentagem de hifas livres aumentou durante o cultivo e os *pellets* estiveram presentes no reator apenas até as 20 horas de cultivo, o que está coerente com a figura 4.27.

Figura 4.11 Área média de *pellets* (A_p), no ensaio D-5.

Figura 4.12 Área média de *clumps* (A_{cl}), no ensaio D-5.

Figura 4.13 Área média de hifas ramificadas (A_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.14 Área média de hifas não ramificadas (A_{hnr}), no ensaio D-5.

Figura 4.15 Área convexa média de *pellets* (AC_p), no ensaio D-5.

Figura 4.16 Área convexa média de *clumps* (AC_{cl}), no ensaio D-5.

Figura 4.17 Área convexa média de hifas ramificadas (AC_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.18 Área convexa média de hifas não ramificadas (AC_{hnr}), no ensaio D-5.

Figura 4.19 Perímetro médio de *pellets* (P_p), no ensaio D-5.

Figura 4.20 Perímetro médio de *clumps* (P_{cl}), no ensaio D-5.

Figura 4.21 Perímetro médio de hifas ramificadas (P_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.22 Perímetro médio de hifas não ramificadas (P_{hnr}), no ensaio D-5.

Figura 4.23 Perímetro convexo médio de *pellets* (PC_p), no ensaio D-5.

Figura 4.24 Perímetro convexo médio de *clumps* (PC_{cl}), no ensaio D-5.

Figura 4.25 Perímetro convexo médio de hifas ramificadas (PC_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.26 Perímetro convexo médio de hifas não ramificadas (PC_{hnr}), no ensaio D-5.

Figura 4.27 Dimensão média de *pellets* (D_p), no ensaio D-5.

Figura 4.28 Dimensão média de *clumps* (D_{cl}), no ensaio D-5.

Figura 4.29 Comprimento total de hifas ramificadas (L_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.30 Comprimento total de hifas não ramificadas (L_{hnr}), no ensaio D-5.

Figura 4.31 Número de extremidades (*tips*) de hifas ramificadas (N_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.32 Unidade de crescimento hifal de hifas ramificadas (HGU_{hr}), no ensaio D-5.

Figura 4.33 Porcentagem de *clumps* (F_{cl}), de *pellets* (F_p), de hifas ramificadas (F_{hr}) e de hifas não ramificadas (F_{hnr}), em termos de número de objetos, no ensaio D-5.

Figura 4.34 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-5.

De todas os parâmetros morfológicos medidos durante os ensaios, a porcentagem de cada classe morfológica em termos de área apresentou resultados mais interessantes e, por isso, será apresentada e analisada em todos os ensaios. Os outros parâmetros morfológicos (dimensão média e *clumps*, dimensão média de *pellets*, comprimento total de hifas ramificadas, comprimento total de hifas não ramificadas, número de extremidades e unidade de crescimento hifal) são apresentados no Apêndice G, juntamente com os respectivos intervalos de confiança.

4.2 Ensaios DA-1, DA-2 e DA-3b (descontínuos alimentados)

O primeiro conjunto de ensaios descontínuos alimentados realizado teve como objetivo verificar a influência da concentração dos nutrientes no meio de alimentação sobre a produção de retamicina. Para isso, fixou-se a velocidade específica de crescimento, a ser controlada durante a alimentação, em um valor baixo ($\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$, cerca de 10 % da velocidade específica máxima de crescimento).

No ensaio DA-1, foi utilizado como meio de alimentação 1,0 L de meio R5 modificado; no ensaio DA-2, foi utilizado 1,0 L de meio R5 modificado com as concentrações de todos os nutrientes duplicadas e no ensaio DA-3b, foi utilizado 1,0 L de meio R5 modificado com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas, como descrito no item 3.2.2.

Para a alimentação do reator, foram utilizadas equações exponenciais (calculadas de acordo com as equações 2.1 a 2.3), que permitem o controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação, no valor desejado, conforme as tabelas 3.3 a 3.5, iniciando-se a alimentação em instante (t_0) no qual a velocidade específica de crescimento encontrava-se em um valor próximo ao desejado (μ_{x0}), conforme mostrado no Apêndice A.

Em paralelo com cada ensaio descontínuo alimentado, foi realizado um ensaio descontínuo padrão, para a comparação dos resultados.

Assim, será apresentada inicialmente nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, uma discussão comparativa entre os ensaios descontínuos alimentados e os respectivos ensaios padrão e, no item 4.2.4, uma comparação entre os ensaios DA-1, DA-2 e DA-3b.

Os resultados experimentais dos ensaios encontram-se no apêndice F e os dados dos parâmetros morfológicos, no Apêndice G.

4.2.1 Ensaios DA-1 e D-1

Conforme já mencionado anteriormente, o ensaio descontínuo alimentado DA-1 foi realizado utilizando-se como alimentação 1,0 L de meio R5 modificado. Em paralelo foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-1.

As figuras 4.35 e 4.36 mostram os perfis de concentração celular (X), de concentração de glicose (S) e de oxigênio dissolvido (OD) durante os ensaios DA-1 e D-1, respectivamente. Na figura 4.35, as linhas verticais representam os instantes de início (21 horas) e término (27 horas) da alimentação. A concentração celular máxima no ensaio DA-1 foi de cerca de 4,6 g/L enquanto o ensaio D-1 atingiu um valor de cerca de 5,0 g/L. Em relação ao substrato (glicose), no ensaio DA-1 foi mantida uma concentração de glicose entre 4,0 e 2,0 g/L, durante a alimentação. Com o término da alimentação, a glicose exauriu-se em torno de 34 horas de cultivo. No ensaio D-1, a glicose exauriu-se um pouco mais cedo (em torno de 28 horas de cultivo). O oxigênio dissolvido atingiu um valor mínimo de cerca de 75 % no ensaio DA-1 e de 65 % no ensaio D-1, valores estes bem elevados não limitantes para o crescimento celular (Martins, 2001).

As figuras 4.37 e 4.38 apresentam as concentrações de retamicina (extracelular, intracelular e total) nos ensaios DA-1 e D-1, respectivamente. Conforme se pode observar, a produção de retamicina iniciou-se após as 16 horas de cultivo, o que corresponde à fase final de crescimento celular. A maior parte da produção ocorreu, portanto, na fase estacionária de crescimento celular. No ensaio DA-1 foi atingida uma concentração de retamicina total de cerca de 4,8 g/L, cerca de 30 % superior à obtida no ensaio D-1 (3,7 g/L). Em todos os ensaios, foi determinada a concentração de retamicina extracelular e intracelular, bem como a soma destas duas parcelas (retamicina total). Conforme será apresentado no item 4.5, de uma maneira geral, a concentração de retamicina extracelular representa cerca de 84 % da concentração de retamicina total. Dessa forma, a discussão dos resultados será feita apenas em termos de concentração de retamicina total.

Figura 4.35 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-1.

Figura 4.36 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-1.

Figura 4.37 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-1.

Figura 4.38 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-1.

Figura 4.39 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-1.

Figura 4.40 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-1.

Figura 4.41 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-1.

Figura 4.42 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-1.

Figura 4.43 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-1.

Figura 4.44 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-1.

Os perfis de velocidades específicas nos ensaios DA-1 e D-1 são mostrados nas figuras 4.39 e 4.40. Pode-se observar que os perfis de velocidades específicas de crescimento e de produção apresentam-se significativamente defasados, comportamento característico de processos de produção de metabólitos secundários, como é o caso dos antibióticos (Guimarães, 2000; Martins, 2001). Durante a alimentação, no ensaio DA-1, a velocidade específica de crescimento foi mantida em torno do valor desejado ($0,03 \text{ h}^{-1}$). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x \text{ max}}$) ficou em torno de $0,23 \text{ h}^{-1}$ no ensaio DA-1 e de $0,26 \text{ h}^{-1}$ no ensaio D-1, em torno das 10 horas de cultivo. É interessante notar que o consumo de glicose foi muito pequeno até aproximadamente as 12 horas de cultivo. No entanto, a velocidade específica de crescimento atingiu seu valor máximo em torno das 10 horas de cultivo. Esse fato mostra que, no início do cultivo, o crescimento celular ocorreu devido ao consumo de outra fonte de carbono (extrato de levedura), sendo a glicose consumida a partir das 12 horas de cultivo. Dessa forma, a velocidade específica de

consumo de glicose (μ_s) apresentou-se muito baixa até as 12 horas de cultivo, em ambos os ensaios (DA-1 e D-1), atingindo um valor máximo de cerca de 0,25 g/(g.h), em torno das 15 horas de cultivo. Em relação ao antibiótico, a velocidade específica máxima de produção de retamicina total ($\mu_{Rt \text{ max}}$) foi de cerca de 0,093 g/(g.h) no ensaio DA-1, enquanto o ensaio D-1 atingiu um valor máximo inferior (cerca de 0,071 g/(g.h)).

Em relação às propriedades reológicas do caldo de fermentação, as figuras 4.41 e 4.42 apresentam a variação do índice de consistência (K) e do índice de comportamento (n) nos ensaios DA-1 e D-1. Nos dois ensaios, os perfis foram semelhantes, com o índice de consistência atingindo um valor máximo em torno de 6,8 dina.sⁿ/cm² no ensaio DA-1 e de 7,4 dina.sⁿ/cm² no ensaio D-1. O índice de comportamento (n) iniciou-se próximo a 1,0 nos dois ensaios, mostrando um comportamento newtoniano no início dos cultivos, decaindo com o crescimento celular até aproximadamente 0,30 (comportamento pseudoplástico, característico de cultivos de microrganismos filamentosos), como citado em vários trabalhos (Allen; Robinson, 1990; Schmidell et al., 1994; Ruohang; Webb, 1995; Queiroz et al., 1997; Pamboukian et al., 1998; Badino et al., 1999).

Em relação ao consumo de oxigênio, a figura 4.43 apresenta os perfis de QO_2 e de QO_2X , durante o ensaio DA-1, determinados pelo método do balanço gasoso. A velocidade global de consumo de oxigênio (QO_2X) atingiu cerca de 9,5 mmol/(L.h) no final do cultivo (36 horas), enquanto a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) atingiu um valor de 2,1 mmol/(g.h), também no final do cultivo. Esses valores são um pouco inferiores aos obtidos por Martins (2001) para cultivos de *Streptomyces olindensis* So20, em cultivos descontínuos nas condições padrão (cerca de 12,5 mmol/(L.h) para o valor máximo de QO_2X e cerca de 3,5 mmol/(g.h) para o valor máximo de QO_2). As velocidades de consumo de oxigênio foram determinadas apenas para o ensaio DA-1. Nos ensaios descontínuos padrão não foram determinadas as velocidades de consumo de oxigênio, devido à impossibilidade de medição das concentrações de O_2 e CO_2 no gás de saída, em dois ensaios simultâneos.

A figura 4.44 mostra a porcentagem de cada classe morfológica em termos de área, durante o ensaio DA-1. Apesar das flutuações apresentadas, pode-se observar que, em termos de área, os *pellets* representaram uma grande parcela da

população durante todo o cultivo (20 a 40 %), juntamente com os *clumps*. A porcentagem de hifas livres (ramificadas e não ramificadas), em termos de área, foi pequena durante todo o cultivo. No ensaio D-1 não foi possível a determinação dos parâmetros morfológicos. Em relação à dimensão média de *clumps*, obteve-se um valor médio de cerca de 150 μm e em relação à dimensão média de *pellets*, obteve-se um valor médio de cerca de 350 μm , no ensaio DA-1. As dimensões médias não apresentaram variações significativas durante o ensaio DA-1, considerando-se os intervalos de confiança (95 % de confiança). O comprimento total de hifas não ramificadas manteve-se em torno de 50 μm , sem variações significativas durante o ensaio DA-1. O comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em torno de 80 μm , aumentando ligeiramente para cerca de 150 μm até as 24 horas de cultivo, período correspondente à fase de crescimento do microrganismo. O microrganismo apresentou cerca de 6 extremidades durante todo o cultivo e uma unidade de crescimento hifal de cerca de 20 μm , sem variações significativas. Os resultados das dimensões do microrganismo, com os respectivos intervalos de confiança, encontram-se no Apêndice G.

4.2.2 Ensaios DA-2 e D-2

O ensaio descontínuo alimentado DA-2 foi realizado utilizando-se como alimentação 1,0 L de meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes duplicadas. Em paralelo foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-2.

As figuras 4.45 e 4.46 apresentam a concentração celular, a concentração de glicose e de oxigênio dissolvido, durante os ensaios DA-2 e D-2. Em relação à concentração celular máxima, o ensaio DA-2 atingiu um valor de cerca de 6,0 g/L, próximo ao valor obtido no ensaio D-2 (5,5 g/L). No ensaio DA-2, pode-se observar que, durante a alimentação (entre 21 e 32 horas de cultivo, instantes representados pelas linhas verticais nos gráficos), a concentração de glicose permaneceu praticamente constante, em torno de 3,2 g/L, como consequência da utilização de uma vazão de alimentação exponencial. Devido à alimentação, a glicose exauriu-se apenas em cerca de 40 horas de cultivo no ensaio DA-2. No ensaio D-2, a glicose exauriu-se em torno de 32 horas de cultivo.

A produção de retamicina (extracelular, intracelular e total) nos ensaios

DA-2 e D-2 está representada nas figuras 4.47 e 4.48, onde se observa uma significativa defasagem do início da produção em relação ao crescimento celular, conforme discutido anteriormente (ensaios DA-1 e D-1). No ensaio DA-2, a produção de retamicina total atingiu cerca de 6,0 g/L, cerca de 32 % superior ao ensaio D-2 (4,5 g/L). Convém lembrar, no entanto, que devido à alimentação, a quantidade de glicose fornecida no ensaio DA-2 foi um pouco superior ao ensaio D-2. Dessa forma, a concentração de substrato total (St) foi de 12,2 g/L no ensaio DA-2 e de cerca de 10,0 g/L no ensaio D-2. Por essa razão, é importante se fazer uma análise dos resultados em termos de fatores de conversão, produtividades e produção específica do antibiótico, o que será apresentado no item 4.2.4. O oxigênio dissolvido atingiu uma concentração mínima de 65 % no ensaio DA-2, ligeiramente inferior à obtida no ensaio D-2 (75 %).

As velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de retamicina, nos ensaios DA-2 e D-2, são apresentadas nas figuras 4.49 e 4.50. As velocidades específicas máximas de crescimento atingidas nos ensaios DA-2 e D-2 foram semelhantes (cerca de $0,20 \text{ h}^{-1}$). A velocidade específica máxima de crescimento foi atingida entre 8 e 10 horas de cultivo, nos dois ensaios. No ensaio DA-2, durante a alimentação, conseguiu-se um bom controle da velocidade específica de crescimento próximo ao valor desejado ($0,03 \text{ h}^{-1}$). Da mesma forma que os ensaios DA-1 e D-1, o consumo de glicose foi lento no início do cultivo (até cerca de 10 h), mostrando que houve o consumo do extrato de levedura para o crescimento celular. Dessa forma, a velocidade específica de consumo de glicose apresentou valores baixos no início dos ensaios DA-2 e D-2, atingindo um valor máximo de cerca de $0,25 \text{ g/(g.h)}$, em torno das 18 horas de cultivo. Em relação ao antibiótico, a velocidade específica de produção de retamicina total atingiu um valor máximo de cerca de $0,08 \text{ g/(g.h)}$ nos dois ensaios. O perfil de velocidade específica de produção de retamicina apresentou-se defasado em relação à velocidade específica de crescimento, conforme discutido anteriormente.

Figura 4.45 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-2.

Figura 4.46 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-2.

Figura 4.47 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-2.

Figura 4.48 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-2.

Figura 4.49 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-2.

Figura 4.50 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-2.

Figura 4.51 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-2.

Figura 4.52 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-2.

Figura 4.53 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-2.

A figura 4.51 apresenta os perfis de QO_2 e de QO_2X , durante o ensaio DA-2. A velocidade global de consumo de oxigênio (QO_2X) atingiu um valor máximo de cerca de 14,0 mmol/(L.h), durante a alimentação (26 horas de cultivo), enquanto a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) atingiu um valor máximo de 3,2 mmol/(g.h), em torno de 14 horas de cultivo, valores semelhantes aos obtidos por Martins (2001). Com o término do cultivo (em torno de 40 horas), praticamente cessou a respiração celular, com a velocidade de consumo de oxigênio caindo para zero. No ensaio D-2 não foram determinadas as velocidades de consumo de oxigênio.

Nos ensaios DA-2 e D-2, não foi possível a determinação das características reológicas do caldo de fermentação.

Em relação à morfologia, as figuras 4.52 e 4.53 apresentam a porcentagem de cada classe morfológica durante os ensaios DA-2 e D-2. No início do cultivo (fase de crescimento), pode-se destacar um predomínio de *clumps* e *pellets*. Devido ao

cisalhamento, ocorreu rompimento de *pellets* e a formação de *clumps*, os quais representavam mais de 90 % no final dos ensaios. Em termos de área, a porcentagem de hifas livres foi muito baixa durante todo o cultivo, nos dois ensaios.

Nos ensaios DA-2 e D-2, a dimensão média dos *clumps* ficou em torno de 150 μm e a dimensão média dos *pellets* ficou em torno de 350 μm , não apresentando variações significativas durante os ensaios, face aos intervalos de confiança considerados. No ensaio DA-2, o comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em torno de 70 μm , atingindo um máximo de cerca de 140 μm em torno das 16 horas de cultivo (fase de crescimento), decaindo para cerca de 90 μm no final do cultivo. O ensaio D-2 apresentou um comportamento semelhante em relação ao comprimento total de hifas ramificadas. Em relação ao comprimento de hifas não ramificadas, os dois ensaios apresentaram um valor de cerca de 35 μm , sem variações significativas, o mesmo ocorrendo com o número de extremidades de hifas ramificadas (cerca de 6 extremidades) e com a unidade de crescimento hifal (cerca de 20 μm), conforme o Apêndice G.

4.2.3 Ensaios DA-3b e D-3b

Para completar esse conjunto de ensaios, foi realizado o ensaio descontínuo alimentado DA-3b, utilizando-se como alimentação 1,0 L de meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas. Em paralelo foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-3b.

As figuras 4.54 e 4.55 apresentam a concentração celular, a concentração de glicose e de oxigênio dissolvido, nos ensaios DA-3b e D-3b. A alimentação no ensaio DA-3b foi realizada entre 21 e 47 horas de cultivo (linhas verticais nos gráficos). A concentração celular atingiu um valor máximo em torno de 7,8 g/L no ensaio DA-3b, cerca de 45 % superior ao ensaio D-3b (5,38 g/L). No entanto, a concentração total de substrato fornecida no ensaio DA-3b (16,7 g/L de glicose) foi significativamente maior do que no ensaio D-3b (10 g/L de glicose), o que torna necessária uma análise em termos de produtividades, fatores de conversão e produções específicas (item 4.2.4). Durante a alimentação no ensaio DA-3b, a concentração de glicose manteve níveis baixos (entre 1,5 g/L e 0,5 g/L de glicose), com o término da fonte de carbono por volta das 50 horas de cultivo. No ensaio

D-3b, a glicose terminou com cerca de 28 horas de cultivo. O oxigênio dissolvido atingiu um valor mínimo de cerca de 55 % no ensaio DA-3b, inferior ao do ensaio D-3b (75 %).

A produção de retamicina nos ensaios DA-3b e D-3b é mostrada nas figuras 4.56 e 4.57, respectivamente. De forma semelhante ao observado nos ensaios anteriores, a produção de retamicina apresentou-se defasada em relação ao crescimento celular, comportamento típico de um metabólito secundário. No ensaio DA-3b, foi atingida uma concentração de retamicina total de 9,9 g/L, cerca de 2,15 vezes superior ao ensaio descontínuo padrão realizado em paralelo (D-3b), onde se obteve uma concentração de cerca de 4,6 g/L de retamicina total.

As figuras 4.58 e 4.59 mostram as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção do antibiótico nos ensaios DA-3b e D-3b. A velocidade específica de crescimento atingiu um valor máximo em torno de $0,26 \text{ h}^{-1}$ nos dois ensaios. Durante a alimentação, a velocidade específica de crescimento manteve-se próxima ao valor de controle desejado ($0,03 \text{ h}^{-1}$). A velocidade específica de consumo de glicose apresentou um valor máximo de cerca de $0,27 \text{ g/(g.h)}$ em torno das 9 horas de cultivo, nos ensaios DA-3b e D-3b, um pouco mais cedo do que os ensaios anteriores. A velocidade específica de produção de retamicina total atingiu um valor máximo de $0,114 \text{ g/(g.h)}$ no ensaio DA-3b, cerca de 18 % superior ao ensaio D-3b ($0,097 \text{ g/(g.h)}$).

Devido à maior concentração celular atingida no ensaio DA-3b, o valor do índice de consistência (K) foi bem maior neste ensaio ($18,7 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$) do que no ensaio descontínuo padrão ($8,3 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$), como mostram as figuras 4.60 e 4.61. O índice de comportamento (n) atingiu um valor mínimo em torno de 0,28 nos dois ensaios.

Figura 4.54 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-3b.

Figura 4.55 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-3b.

Figura 4.56 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-3b.

Figura 4.57 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-3b.

Figura 4.58 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-3b.

Figura 4.59 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-3b.

Figura 4.60 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-3b.

Figura 4.61 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-3b.

Figura 4.62 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-3b.

Figura 4.63 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-3b.

Figura 4.64 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-3b.

A figura 4.62 mostra o consumo de oxigênio no ensaio DA-3b. A velocidade global de consumo de oxigênio (QO_2X) atingiu um máximo em torno de 12,0 mmol/(L.h) e a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) atingiu um máximo em torno de 1,8 mmol/(g.h), durante o período de alimentação. Não foram determinadas as velocidades de consumo de oxigênio para o ensaio D-3b. É interessante notar que, com cerca de 35 horas de cultivo, ocorreu um aumento

significativo na respiração celular (aumento de QO_2), o que levou a uma queda na concentração de oxigênio dissolvido, como mostrado na figura 4.54. Esse fato coincidiu com uma aceleração na produção de retamicina (inflexão mostrada na figura 4.56), após 35 horas de cultivo. Este comportamento foi observado apenas neste ensaio, não sendo possível, entretanto, uma explicação lógica para esse fato.

Em relação à porcentagem de cada classe morfológica em termos de área (figuras 4.63 e 4.64), no início dos cultivos havia praticamente 50 % de *clumps* e 50 % de *pellets*, com uma porcentagem muito pequena de hifas livres. Com o decorrer do cultivo, o cisalhamento no interior dos reatores provocou o rompimento de *pellets*, com a formação de *clumps* e hifas livres. Os *pellets* estiveram presentes até cerca de 20 horas de cultivo, período correspondente à fase de crescimento. No final dos cultivos, a proporção de *clumps* era de cerca de 90 % no ensaio DA-3b e de 87 % no ensaio D-3b.

Em relação às dimensões de *pellets* e *clumps*, observou-se um comportamento semelhante aos ensaios anteriores. A dimensão média de *clumps* iniciou-se em torno de 160 μm no ensaio DA-3b, decaindo ligeiramente para 130 μm no final do ensaio. No entanto, as variações foram muito pequenas, considerando-se os intervalos de confiança adotados. No ensaio D-3b, a dimensão média de *clumps* manteve-se em torno de 150 μm , sem muitas variações significativas. Em relação à dimensão média de *pellets*, nos dois ensaios, os valores ficaram em torno de 350 μm . O comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em torno de 50 μm no ensaio DA-3b, aumentando para cerca de 145 μm na fase de crescimento (primeiras 20 horas de cultivo) e decaindo no final do cultivo para cerca de 110 μm . No ensaio D-3b, o comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em torno de 90 μm , aumentando para cerca de 120 μm na fase de crescimento (até 20 horas de cultivo) e decaindo novamente para cerca de 80 μm , no final do cultivo. Em ambos os ensaios, o número de extremidades foi de 6 e a unidade de crescimento hifal, em torno de 20 μm , de forma semelhante aos demais ensaios.

4.2.4 Comparação entre os ensaios DA-1, DA-2 e DA-3b

Conforme já destacado, é importante se fazer uma análise dos resultados em termos de produtividades, fatores de conversão e produção específica, pois a

quantidade de glicose fornecida foi maior nos ensaios descontínuos alimentados do que nos descontínuos padrão.

Assim, a tabela 4.1 mostra um resumo dos resultados obtidos neste primeiro conjunto de ensaios. Pode-se observar que, em termos de crescimento celular, os ensaios foram muito semelhantes, apresentando fatores de conversão substrato a células muito próximos (entre 0,44 g/g e 0,51 g/g). Dessa forma, a maior concentração celular atingida no ensaio DA-3b (7,8 g/L) foi devida à maior quantidade de glicose fornecida neste ensaio, fato que é refletido pelo fator de conversão substrato a células.

Por outro lado, o fator de conversão substrato a retamicina total foi de 0,59 g/g no ensaio DA-3b, cerca de 37 % superior ao ensaio D-3b (0,43 g/g). Da mesma forma, o ensaio DA-1 apresentou um fator de conversão substrato a retamicina total de 0,48 g/g (37 % superior ao ensaio D-1) e o ensaio DA-2 apresentou um fator de 0,49 g/g (apenas 11 % superior ao ensaio D-2), indicando que o controle da velocidade específica de crescimento ($\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$) influenciou positivamente na síntese de retamicina.

Em relação à produtividade em células, os ensaios apresentaram valores semelhantes (em torno de 0,15 g/(L.h)). A produtividade em retamicina total, por outro lado, apresentou valores maiores nos ensaios descontínuos alimentados do que nos ensaios descontínuos padrão. No ensaio DA-1 foi obtida uma produtividade em retamicina total de 0,134 g/(L.h), cerca de 30 % superior ao ensaio D-1; no ensaio DA-2, a produtividade foi de 0,136 g/(L.h), apenas 8 % superior ao ensaio D-2. No ensaio DA-3b, a produtividade em retamicina total foi de 0,197 g/(L.h), cerca de 54 % superior ao ensaio D-3b (0,128 g/(L.h)).

Dessa forma, pode-se perceber uma superioridade dos ensaios descontínuos alimentados em relação aos ensaios descontínuos padrão. Outro parâmetro importante é a produção específica em retamicina total, que representa a relação entre a concentração máxima de retamicina total e a concentração celular no mesmo instante, indicando quanto cada célula está produtiva em média. Analisando a produção específica em retamicina total, o ensaio DA-1 atingiu um valor de 1,10 g/g (cerca de 30 % superior ao ensaio D-1), o que pode ser percebido pelo valor de $R = 1,3$ na tabela 4.1 (fator definido como sendo a relação entre a produção específica em retamicina total no ensaio descontínuo alimentado e a produção

específica em retamicina total no ensaio descontínuo padrão realizado em paralelo). O ensaio DA-2 apresentou uma produção específica de 1,20 g/g (10 % superior ao ensaio D-2) e o ensaio DA-3b apresentou uma produção específica cerca de 50 % superior ao ensaio D-3b, confirmando uma superioridade dos ensaios descontínuos alimentados em relação aos descontínuos padrão, provavelmente como consequência do controle da velocidade específica de crescimento em baixos valores.

Tabela 4.1 Resumo dos resultados dos ensaios DA-1, DA-2, DA-3b, D-1, D-2 e D-3b.

Parâmetro	DA-1	D-1	DA-2	D-2	DA-3b	D-3b
S_{ini} (g/L)	10,3	10,5	10,5	10,2	10,6	10,6
S_t (g/L)	10,0	10,5	12,2	10,2	16,7	10,6
X_f (g/L)	4,60	4,98	5,99	5,54	7,83	5,38
Re_f (g/L)	3,90	2,97	4,98	3,70	8,20	3,57
Ri_f (g/L)	0,92	0,98	1,01	0,85	1,67	1,04
Rt_f (g/L)	4,81	3,72	5,98	4,52	9,86	4,61
$\mu_{x\ max}$ (h^{-1})	0,23	0,26	0,21	0,19	0,26	0,27
$\mu_{Re\ max}$ (g/(g.h))	0,07	0,05	0,06	0,07	0,09	0,08
$\mu_{Ri\ max}$ (g/(g.h))	0,027	0,021	0,020	0,019	0,021	0,023
$\mu_{Rt\ max}$ (g/(g.h))	0,093	0,071	0,080	0,083	0,114	0,097
$QO_2\ max$ (mmol/(g.h))	2,1	---	3,2	---	1,8	---
K_{max} (dina.s ⁿ /cm ²)	6,8	7,4	---	---	18,7	8,3
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,44	0,45	0,47	0,51	0,44	0,48
$Y_{Re/s}$ (g/g)	0,39	0,28	0,41	0,36	0,49	0,34
$Y_{Ri/s}$ (g/g)	0,092	0,094	0,083	0,084	0,100	0,098
$Y_{Rt/s}$ (g/g)	0,48	0,35	0,49	0,44	0,59	0,43
P_x (g/(L.h))	0,14	0,17	0,14	0,16	0,15	0,16
P_{Re} (g/(L.h))	0,108	0,083	0,113	0,103	0,164	0,099
P_{Ri} (g/(L.h))	0,026	0,031	0,025	0,027	0,035	0,029
P_{Rt} (g/(L.h))	0,134	0,103	0,136	0,126	0,197	0,128
PE_{Re} (g/g)	0,89	0,68	1,00	0,86	1,11	0,71
PE_{Ri} (g/g)	0,21	0,21	0,17	0,16	0,23	0,20
PE_{Rt} (g/g)	1,10	0,85	1,20	1,05	1,33	0,91
R	1,3	1,0	1,1	1,0	1,5	1,0

Em relação à influência da concentração de nutrientes na alimentação sobre a produção específica de retamicina, não se pôde observar um efeito claro neste conjunto de ensaios, pois os ensaios DA-1 e DA-3b apresentaram resultados melhores do que os ensaios padrão D-1 e D-3b, enquanto que o ensaio DA-2 apresentou um resultado muito semelhante ao ensaio padrão D-2. Entretanto, a produção total de retamicina foi maior com o aumento da concentração total de nutrientes na alimentação.

4.3 Ensaios DA-3, DA-4 e DA-5 (descontínuos alimentados) e

Ensaio D-3+ (descontínuo com maior concentração de glicose)

A fim de se verificar a influência do controle da velocidade específica de crescimento sobre a produção de retamicina, foram realizados os ensaios descontínuos alimentados DA-3, DA-4 e DA-5. Foram escolhidas três velocidades específicas de crescimento a serem controladas: $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (ensaio DA-3); $\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$ (ensaio DA-4) e $\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$ (ensaio DA-5), que correspondem respectivamente a 10 %, 30 % e 56 % do valor da velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{x \text{ max}}$, cujo valor ficou em torno de $0,30 \text{ h}^{-1}$).

Nos três ensaios foi utilizado, como meio de alimentação, 1 L de meio R5 modificado com apenas a concentração de glicose quadruplicada, conforme descrito no item 3.2.2. Para a alimentação do reator, foram utilizadas equações exponenciais (calculadas de acordo com as equações 2.1 a 2.3), que permitem o controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação, no valor desejado, conforme a tabela 3.4.

Em paralelo com cada ensaio descontínuo alimentado, foi realizado um ensaio descontínuo padrão, para a comparação dos resultados. Adicionalmente, foi realizado o ensaio descontínuo D-3+ com uma concentração inicial de glicose de 16,7 g/L, conforme descrito no item 3.3.3, em paralelo com os ensaios DA-3 e D-3.

4.3.1 Ensaios DA-3, D-3 e D-3+

As figuras 4.65, 4.66 e 4.67 mostram os perfis de concentração celular, de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido nos ensaios DA-3, D-3 e D-3+,

respectivamente. No ensaio D-3 não foi possível a determinação do perfil de oxigênio dissolvido. A alimentação no ensaio DA-3 foi realizada entre 18 e 42 horas de cultivo (instantes representados pelas linhas verticais, na figura). A concentração celular máxima atingida no ensaio DA-3 foi de cerca de 6,1 g/L, ligeiramente inferior ao ensaio D-3+ (6,6 g/L). O ensaio D-3 atingiu uma concentração celular inferior (cerca de 4,8 g/L). Em relação ao substrato, pode-se perceber pela figura 4.65 que não foi possível manter a concentração de glicose constante durante a alimentação, no ensaio DA-3. Durante a alimentação, ocorreu um acúmulo de glicose, provavelmente devido à limitação por outros nutrientes, uma vez que na alimentação, apenas a glicose foi quadruplicada e os outros nutrientes mantidos na concentração do meio R5 modificado, como explicado anteriormente. No ensaio DA-3, a glicose exauriu-se em cerca de 60 horas de cultivo, o mesmo ocorrendo com o ensaio D-3+. No ensaio D-3+, a partir das 28 horas de cultivo, o consumo de glicose tornou-se mais lento, devido provavelmente à limitação por algum outro nutriente, como mostra a figura 4.67. No ensaio D-3, a glicose terminou com cerca de 28 horas. Os perfis de oxigênio dissolvido foram semelhantes nos ensaios DA-3 e D-3+, atingindo um valor mínimo de cerca de 70 %.

Em relação à produção de retamicina, as figuras 4.68, 4.69 e 4.70 apresentam os perfis de concentração do antibiótico durante os ensaios DA-3, D-3 e D-3+, respectivamente. De forma semelhante aos demais ensaios, a produção do antibiótico mostrou-se defasada em relação ao crescimento celular. No ensaio DA-3, a concentração de retamicina total atingiu um valor de 11,2 g/L, cerca de 2,6 vezes superior ao ensaio D-3 (4,4 g/L) e 11 % superior ao ensaio D-3+ (10,1 g/L).

As figuras 4.71, 4.72 e 4.73 apresentam as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de retamicina nos ensaios DA-3, D-3 e D-3+. No ensaio DA-3, durante a alimentação, a velocidade específica de crescimento manteve valores baixos, oscilando entre $0,01 \text{ h}^{-1}$ e $0,04 \text{ h}^{-1}$, próximo ao valor de controle desejado ($0,03 \text{ h}^{-1}$). O controle da velocidade específica de crescimento, no entanto, não foi muito bom, devido provavelmente à limitação por outros nutrientes além da glicose, o que provocou um acúmulo de glicose no meio, como já destacado anteriormente. A velocidade específica de crescimento atingiu um valor máximo de cerca de $0,30 \text{ h}^{-1}$, nos três ensaios. A velocidade específica máxima de consumo de glicose foi de cerca de $0,30 \text{ g/(g.h)}$ nos ensaios DA-3 e D-3, um

pouco superior ao ensaio D-3+ (cerca de 0,20 g/(g.h)). Em relação ao antibiótico, a velocidade específica de produção de retamicina total atingiu um valor máximo de 0,098 g/(g.h) no ensaio DA-3, valor próximo ao obtido no ensaio D-3+ (0,091 g/(g.h)) e cerca de 22 % superior ao obtido no ensaio D-3 (0,080 g/(g.h)).

Nos ensaios DA-3, D-3 e D-3+ foi determinada a concentração de íons amônio no caldo de fermentação durante os cultivos, utilizando-se um eletrodo de amônia (figuras 4.74, 4.75 e 4.76). Deve-se lembrar que a metodologia utilizada mede a quantidade de nitrogênio na forma de íons amônio presentes no caldo de fermentação e não a quantidade de nitrogênio total e, por isso, fornece apenas uma estimativa da quantidade de nitrogênio presente no caldo de fermentação em determinado instante. Mesmo assim, é interessante notar que, nos três ensaios, ocorreu um aumento na concentração de amônio até 12 ou 16 horas de cultivo (provavelmente devido à hidrólise de aminoácidos) e que, por volta de 16 horas, ocorreu uma queda acentuada nessa concentração, provavelmente devido ao consumo de amônia pelo microrganismo. O início da produção do antibiótico, nos três ensaios, ocorreu quando a concentração de amônio já apresentava níveis reduzidos (cerca de 2,0 mM). No ensaio descontínuo alimentado DA-3, a concentração de amônio manteve níveis baixos durante toda a alimentação. O aumento da concentração de amônio no final dos cultivos provavelmente foi devido à lise celular, já que esse aumento foi observado, na maioria dos casos, após o término da fonte de carbono. Esse comportamento mostrou-se semelhante ao obtido por Martins (2001) em cultivos de *Streptomyces olindensis* So20.

Com relação à reologia, da mesma forma que os ensaios anteriores, os ensaios DA-3, D-3 e D-3+ apresentaram um comportamento newtoniano no início dos cultivos, com um valor de n próximo a 1,0. Com o crescimento celular, o caldo de fermentação adquiriu características pseudoplásticas, com o índice de comportamento (n) atingindo valores próximos a 0,25. O índice de consistência (K) máximo foi de cerca de 12,0 dina.sⁿ/cm² no ensaio DA-3, cerca de 22 % superior ao ensaio D-3+ (9,8 dina.sⁿ/cm²) e 64 % superior ao ensaio D-3 (7,3 dina.sⁿ/cm²), como mostram as figuras 4.77, 4.78 e 4.79.

A figura 4.80 mostra o consumo de oxigênio no ensaio DA-3. A velocidade de consumo de oxigênio (QO₂X) atingiu um máximo em torno de 15,0 mmol/(L.h) e a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂) atingiu um máximo em torno

de 4,4 mmol/(g.h), durante o período de alimentação, valores semelhantes aos obtidos por Martins (2001). Não foram determinadas as velocidades de consumo de oxigênio para os ensaios D-3 e D-3+.

As porcentagens de cada classe morfológica em termos de área (figuras 4.81, 4.82 e 4.83) mostram que a porcentagem de *clumps* aumentou durante a maior parte do cultivo, nos três ensaios, decaindo um pouco no final. Esse aumento na porcentagem de *clumps* foi acompanhado de uma diminuição na porcentagem de *pellets*, provavelmente devido ao cisalhamento no reator. Os *pellets* estiveram presentes até cerca de 30 horas nos ensaios DA-3 e D-3+ e até cerca de 24 horas no ensaio D-3. A porcentagem de hifas ramificadas aumentou durante o cultivo e a porcentagem de hifas não ramificadas manteve valores baixos (inferiores a 5 %) durante todo o cultivo, nos três ensaios. No final dos ensaios, os *clumps* representavam a morfologia predominante nos cultivos (entre 80 % e 85 %, em área).

A dimensão média de *clumps* iniciou-se em torno de 180 µm nos ensaios DA-3 e D-3, decaindo para cerca de 100 µm no ensaio DA-3 e 150 µm no ensaio D-3. No ensaio D-3+, a dimensão média de *clumps* iniciou-se em torno de 160 µm, decaindo para 110 µm no final do cultivo. As dimensões médias de *pellets* mantiveram-se entre 400 µm e 450 µm, nos três ensaios. O comprimento de hifas ramificadas iniciou-se em 50 µm no ensaio DA-3, aumentando para cerca de 140 µm durante a fase de crescimento e decaindo para cerca de 100 µm no final do ensaio. No ensaio D-3, o comportamento foi semelhante, com o comprimento total de hifas ramificadas iniciando-se em cerca de 40 µm e aumentando até cerca de 140 µm até as 16 horas de cultivo, mantendo-se praticamente constante a partir daí. No ensaio D-3+, o comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em 70 µm, aumentando para cerca de 140 µm na fase de crescimento (primeiras 24 horas de cultivo) e decaindo para 110 µm no final do ensaio. Em relação ao comprimento total de hifas não ramificadas, os valores foram de cerca de 40 µm nos três ensaios, não apresentando variações significativas. De forma semelhante aos demais ensaios, o número de extremidades manteve-se em torno de 6 e a unidade de crescimento hifal, em torno de 20 µm, nos três ensaios.

A comparação dos resultados, em termos de fatores de conversão, produtividades e produção específica de retamicina será apresentada no item 4.3.4.

Figura 4.65 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-3.

Figura 4.66 Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio D-3.

Figura 4.67 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-3+.

Figura 4.68 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-3.

Figura 4.69 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-3.

Figura 4.70 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-3+.

Figura 4.71 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-3.

Figura 4.72 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-3.

Figura 4.73 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-3+.

Figura 4.74 Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio DA-3.

Figura 4.75 Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio D-3.

Figura 4.76 Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio D-3+.

Figura 4.77 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-3.

Figura 4.78 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-3.

Figura 4.79 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-3+.

Figura 4.80 Velocidade de consumo de oxigênio (QO₂X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂), no ensaio DA-3.

Figura 4.81 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-3.

Figura 4.82 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-3.

Figura 4.83 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-3+.

4.3.2 Ensaio DA-4 e D-4

No ensaio descontínuo alimentado DA-4, foi utilizada uma vazão exponencial de alimentação a fim de se controlar a velocidade específica de crescimento em um valor intermediário ($\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$). Em paralelo com o ensaio DA-4, foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-4.

As figuras 4.84 e 4.85 mostram os perfis de concentração celular, de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido nos ensaios DA-4 e D-4, respectivamente. A alimentação no ensaio DA-4 foi realizada entre 16 e 26 horas de cultivo (instantes representados pelas linhas verticais, na figura). A concentração celular máxima atingida no ensaio DA-4 foi de cerca de 4,7 g/L, semelhante ao ensaio D-4 (4,3 g/L), apesar da maior quantidade de glicose fornecida no ensaio descontínuo alimentado. Portanto, a maior quantidade de glicose fornecida no ensaio DA-4 não foi utilizada para o crescimento celular, tendo sido provavelmente utilizada para a produção do antibiótico, conforme será discutido adiante. Em relação ao substrato, no início da alimentação do ensaio DA-4 foi possível manter a concentração de glicose praticamente constante, mas a partir das 20 horas de cultivo, começou a ocorrer um acúmulo de glicose no meio, provavelmente devido a limitações por outros nutrientes, da mesma forma que ocorreu no ensaio DA-3.

A produção de retamicina nos ensaios DA-4 e D-4 é apresentada nas figuras 4.86 e 4.87, de onde se pode observar novamente a defasagem entre a produção do antibiótico e o crescimento celular. No ensaio DA-4, a concentração de retamicina total máxima foi de cerca de 8,5 g/L (96 % superior à obtida no ensaio descontínuo padrão D-4). Esse fato reforça a hipótese de que a glicose fornecida na alimentação foi utilizada para a produção do antibiótico e não para o crescimento, uma vez que o crescimento celular adicional foi muito pequeno após o início da alimentação. Convém destacar também que o início da produção do antibiótico ocorreu com cerca de 20 horas de cultivo no ensaio DA-4 (figura 4.86), instante em que a concentração de glicose apresentava valores altos (cerca de 7,0 g/L), mostrando que a alta concentração de glicose não é um fator que prejudica a produção de retamicina.

As figuras 4.88 e 4.89 mostram as velocidades específicas, nos ensaios DA-4 e D-4. No ensaio DA-4, foi possível o controle da velocidade específica de crescimento no início da alimentação. No entanto, a partir das 20 horas de cultivo,

não foi mais possível manter a velocidade específica de crescimento no valor de controle desejado ($0,10 \text{ h}^{-1}$). A partir desse instante, ocorreu uma queda na velocidade específica de crescimento, provavelmente devido a limitações por outros nutrientes, o que também provocou um aumento da concentração de glicose no meio, como destacado anteriormente. A velocidade específica de consumo de substrato atingiu um valor máximo entre $0,25 \text{ g/(g.h)}$ e $0,30 \text{ g/(g.h)}$, em ambos os ensaios, semelhante ao obtido nos ensaios anteriores. A velocidade específica de produção de retamicina total atingiu um valor máximo de $0,08 \text{ g/(g.h)}$ no ensaio DA-4, um pouco inferior à obtida no ensaio D-4 ($0,10 \text{ g/(g.h)}$).

O comportamento reológico foi semelhante aos demais ensaios, como mostram as figuras 4.90 e 4.91. No ensaio DA-4, o índice de consistência (K) atingiu um valor máximo de cerca de $4,5 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$ e o índice de comportamento atingiu um valor mínimo em torno de 0,30. No ensaio D-4, o valor máximo de K ficou em torno de $5,3 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$. O menor valor de K obtido no ensaio DA-4 em relação ao ensaio DA-3 ($12,0 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$), provavelmente foi devido à menor concentração celular obtida neste ensaio (cerca de $4,7 \text{ g/L}$), comparada ao ensaio DA-3 (cerca de $6,1 \text{ g/L}$).

Em relação à respiração celular, a figura 4.92 apresenta os perfis de QO_2 e QO_2X , durante o ensaio DA-4. A velocidade global de consumo de oxigênio (QO_2X) atingiu um valor máximo de cerca de $8,9 \text{ mmol/(L.h)}$. A velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) atingiu um valor máximo em torno de $2,6 \text{ mmol/(g.h)}$, valores um pouco inferiores aos obtidos por Martins (2001). Com o término da fonte de carbono, a respiração celular praticamente cessou (em torno de 52 horas de cultivo).

Em relação à porcentagem de cada classe morfológica em termos de área, pode-se observar pelas figuras 4.93 e 4.94 que o rompimento de *pellets* nas primeiras 20 horas de cultivo (fase de crescimento) conduziu a um aumento na porcentagem de *clumps*, nos ensaios DA-4 e D-4. A partir das 20 horas de cultivo, período correspondente à fase de produção do antibiótico, praticamente não havia mais *pellets* no meio de fermentação e, portanto, o rompimento de *clumps* passou a ser significativo, com um considerável aumento na porcentagem de hifas livres, principalmente de hifas ramificadas. No final do cultivo, a porcentagem de *clumps* representava cerca de 60 % a 65 %, nos ensaios DA-4.

Figura 4.84 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-4.

Figura 4.85 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-4.

Figura 4.86 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-4.

Figura 4.87 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-4.

Figura 4.88 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-4.

Figura 4.89 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-4.

Figura 4.90 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-4.

Figura 4.91 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-4.

Figura 4.92 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-4.

Figura 4.93 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-4.

Figura 4.94 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-4.

De forma semelhante aos demais ensaios, as variações nas dimensões do microrganismo foram pequenas. A dimensão média de *clumps* iniciou-se em torno de 180 μm nos ensaios DA-4 e D-4, decaindo para cerca de 100 μm no final do ensaio DA-4 e para cerca de 140 μm no final do ensaio D-4. A dimensão média de *pellets* manteve-se entre 350 μm e 400 μm nos dois ensaios. O comprimento total de hifas

ramificadas iniciou-se em torno de 80 μm no ensaio DA-4, aumentando para cerca de 130 μm nas primeiras 22 horas de cultivo (fase de crescimento) e decaindo para cerca de 70 μm no final. O comprimento total de hifas ramificadas no ensaio D-4 apresentou um comportamento semelhante, iniciando-se em torno de 80 μm , aumentando para cerca de 140 μm e atingindo um valor de 90 μm no final do ensaio. O comprimento total de hifas não ramificadas manteve-se entre 30 μm e 40 μm , enquanto o número de extremidades apresentou-se em torno de 6 e a unidade de crescimento hifal, em torno de 20 μm , nos dois ensaios, de forma semelhante aos resultados anteriores.

A comparação dos resultados, em termos de fatores de conversão, produtividades e produção específica de retamicina será apresentada no item 4.3.4.

4.3.3 Ensaios DA-5 e D-5

No ensaio descontínuo alimentado DA-5, foi utilizada uma vazão exponencial de alimentação a fim de se controlar a velocidade específica de crescimento em um valor alto ($\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$). Em paralelo com o ensaio DA-5, foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-5.

As figuras 4.95 e 4.96 mostram os perfis de concentração celular, de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido nos ensaios DA-5 e D-5, respectivamente. A alimentação no ensaio DA-5 foi realizada entre 13 e 18 horas de cultivo (instantes representados pelas linhas verticais nas figuras). A concentração celular atingida no ensaio DA-5 foi de cerca de 5,7 g/L, quase 45 % superior à obtida no ensaio D-5 (3,9 g/L). Da mesma forma que o observado nos ensaios DA-3 e DA-4, ocorreu um acúmulo de glicose durante o período de alimentação, no ensaio DA-5. A concentração de glicose chegou a 12,0 g/L, o que mostra que ocorreu limitação por outros nutrientes, prejudicando o controle do ensaio descontínuo alimentado. Com o término da alimentação, no ensaio DA-5, a concentração de glicose começou a decair. A partir das 24 horas de cultivo, o consumo de glicose passou a ser bastante lento, com o término do substrato apenas com 56 horas de cultivo, acompanhado por um pequeno crescimento celular. No ensaio D-5, a glicose exauriu-se em cerca de 28 horas.

Em relação à produção do antibiótico (figuras 4.97 e 4.98), o ensaio DA-5 atingiu uma concentração de retamicina total em torno de 8,7 g/L, cerca de 92 % superior à atingida no ensaio D-5 (4,5 g/L). No ensaio DA-5, o início da produção do antibiótico ocorreu com cerca de 20 horas de cultivo (figura 4.97), instante em que a concentração de glicose apresentava valores altos (cerca de 11,0 g/L), reforçando a hipótese de que alta concentração de glicose não é um fator que prejudica a produção de retamicina. É provável que a limitação de nutrientes (possivelmente, a fonte de nitrogênio) tenha conduzido a essa alta produção de retamicina. Da mesma forma que os demais ensaios, o perfil de concentração de retamicina apresentou-se defasado em relação à concentração celular.

Conforme já destacado, o fato de ter se quadruplicado apenas a glicose na alimentação do ensaio DA-5 aparentemente provocou limitação por outros nutrientes, o que prejudicou o controle da velocidade específica de crescimento no valor desejado ($0,17 \text{ h}^{-1}$), semelhante ao que foi observado nos ensaios DA-3 e DA-4. Assim, a figura 4.99 mostra um perfil de velocidade específica de crescimento decrescente durante a alimentação, no ensaio DA-5, semelhante ao perfil obtido no ensaio D-5 (figura 4.100). A velocidade específica de produção de retamicina total atingiu cerca de 0,09 g/(g.h) no ensaio DA-5 e 0,11 g/(g.h) no ensaio D-5.

O comportamento reológico do caldo de fermentação foi semelhante aos obtidos nos demais ensaios, com o índice de consistência atingindo cerca de 11,0 dina.sⁿ/cm² no ensaio DA-5 e cerca de 3,0 dina.sⁿ/cm² no ensaio D-5, devido à menor concentração celular atingida neste ensaio, como mostram as figuras 4.101 e 4.102.

A figura 4.103 apresenta as velocidades de consumo de oxigênio, durante o ensaio DA-5. O valor máximo de QO_2X foi de cerca de 11,0 mmol/(L.h) enquanto o máximo QO_2 atingido foi de 2,8 mmol/(g.h), de forma semelhante aos demais ensaios.

Figura 4.95 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-5.

Figura 4.96 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-5.

Figura 4.97 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-5.

Figura 4.98 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-5.

Figura 4.99 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-5.

Figura 4.100 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-5.

Figura 4.101 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-5.

Figura 4.102 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-5.

Figura 4.103 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-5.

Figura 4.104 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-5.

Figura 4.105 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-5.

Em relação à morfologia (figuras 4.104 e 4.105), na fase de crescimento (até cerca de 20 horas de cultivo), ocorreu um aumento na porcentagem de *clumps* para valores entre 90 % e 95 % e uma diminuição na porcentagem de *pellets*, os quais desapareceram entre 16 h e 20 h de cultivo, de maneira semelhante aos demais ensaios. A partir das 20 horas de cultivo, na fase de produção, ocorreu uma diminuição na porcentagem de *clumps*, atingindo cerca de 77 % no final do ensaio DA-5 e 55 % no final do ensaio D-5. A porcentagem de hifas livres também aumentou durante o cultivo, nos dois ensaios.

Nos ensaios DA-5 e D-5, a dimensão média de *clumps* iniciou-se em torno de 180 μm , decaindo para cerca de 150 μm no final do ensaio DA-5 e cerca de 100 μm no final do ensaio D-5. A dimensão média de *pellets* manteve-se entre 400 μm e 450 μm , nos dois ensaios. O comprimento total de hifas ramificadas iniciou-se em torno de 60 μm no ensaio DA-5, aumentando para cerca de 170 μm nas primeiras 17 horas de cultivo (fase de crescimento) e decaindo para cerca de 110 μm no final. O comprimento total de hifas ramificadas no ensaio D-5 apresentou um comportamento semelhante, iniciando-se em torno de 60 μm , aumentando para cerca de 150 μm e atingindo um valor de 80 μm no final do ensaio. O comprimento total de hifas não ramificadas manteve-se entre 30 μm e 40 μm , enquanto o número de extremidades apresentou-se em torno de 6 e a unidade de crescimento hifal, entre 15 μm e 20 μm , nos dois ensaios, de forma semelhante aos resultados anteriores.

4.3.4 Comparação entre os ensaios DA-3, DA-4, DA-5 e D-3+

A tabela 4.2 mostra um resumo dos resultados obtidos neste conjunto de ensaios. Pode-se observar que, em termos de crescimento celular, os fatores de conversão substrato a células não foram muito diferentes entre os ensaios descontínuos alimentados e os correspondentes ensaios descontínuos padrão realizados em paralelo, mantendo valores entre 0,27 g/g e 0,41 g/g. Em relação à produtividade em células, o ensaio DA-3 atingiu cerca de 0,11 g/(L.h), bastante inferior à obtida no ensaio D-3 (0,19 g/(L.h)). No ensaio D-3+ foi obtida uma produtividade em células de 0,15 g/(L.h). Nos demais ensaios, a produtividade em células apresentou valores semelhantes.

Tabela 4.2 Resumo dos resultados dos ensaios DA-3, DA-4, DA-5, D-3+, D-3, D-4 e D-5.

Parâmetro	DA-3	D-3+	D-3	DA-4	D-4	DA-5	D-5
S_{ini} (g/L)	10,7	16,9	11,1	10,4	10,9	11,1	11,0
S_t (g/L)	16,7	16,9	11,1	16,7	10,9	16,7	11,0
X_f (g/L)	6,10	6,62	4,75	4,70	4,30	5,71	3,94
Re_f (g/L)	9,10	8,70	3,75	7,15	3,71	7,04	3,84
Ri_f (g/L)	2,10	1,40	0,85	1,45	0,78	1,64	0,80
Rt_f (g/L)	11,22	10,10	4,38	8,54	4,33	8,67	4,52
$\mu_{x\ max}$ (h^{-1})	0,30	0,31	0,30	0,24	0,24	0,25	0,29
$\mu_{Re\ max}$ (g/(g.h))	0,09	0,08	0,06	0,07	0,08	0,08	0,09
$\mu_{Ri\ max}$ (g/(g.h))	0,012	0,017	0,016	0,020	0,018	0,013	0,018
$\mu_{Rt\ max}$ (g/(g.h))	0,098	0,091	0,08	0,079	0,101	0,093	0,110
$QO_2\ max$ (mmol/(g.h))	4,4	---	---	2,6	---	2,8	---
K_{max} (dina.s ⁿ /cm ²)	12,0	9,8	7,3	4,5	5,3	11,0	3,0
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,35	0,38	0,41	0,27	0,36	0,33	0,34
$Y_{Re/s}$ (g/g)	0,54	0,51	0,34	0,43	0,34	0,42	0,35
$Y_{Ri/s}$ (g/g)	0,126	0,083	0,077	0,087	0,071	0,098	0,073
$Y_{Rt/s}$ (g/g)	0,67	0,60	0,39	0,51	0,40	0,52	0,41
P_x (g/(L.h))	0,11	0,15	0,19	0,11	0,12	0,15	0,13
P_{Re} (g/(L.h))	0,138	0,132	0,078	0,138	0,077	0,135	0,080
P_{Ri} (g/(L.h))	0,032	0,021	0,027	0,026	0,024	0,032	0,022
P_{Rt} (g/(L.h))	0,170	0,153	0,091	0,164	0,090	0,167	0,103
PE_{Re} (g/g)	1,62	1,58	0,96	1,66	1,01	1,57	1,25
PE_{Ri} (g/g)	0,37	0,25	0,20	0,39	0,20	0,37	0,24
PE_{Rt} (g/g)	2,00	1,83	1,12	1,99	1,17	1,94	1,38
R	1,8	1,6	1,0	1,7	1,0	1,4	1,0

Em relação à produção do antibiótico, o fator de conversão substrato a retamicina total obtido no ensaio DA-3 foi de 0,67 g/g , cerca de 72 % superior ao ensaio D-3 (0,39 g/g) e 12 % superior ao ensaio D-3+. Da mesma forma, a produtividade em retamicina total foi de 0,170 g/(L.h) no ensaio DA-3, cerca de 87 % superior ao ensaio D-3 (0,091 g/(L.h)) e 11 % superior ao ensaio D-3+ (0,153 g/(L.h)).

A produção específica em retamicina total (relação entre a concentração de retamicina total máxima e a concentração celular, no mesmo instante) também reflete a superioridade dos ensaios descontínuos alimentados em relação aos ensaios descontínuos padrão. A produção específica no ensaio DA-3 foi de 2,00 g/g, cerca de 80 % superior ao ensaio D-3 ($R = 1,8$) e apenas 9 % superior ao ensaio D-3+. O ensaio D-3+ apresentou uma produção específica de 1,83 g/g, cerca de 60 % superior ao ensaio D-3 ($R = 1,6$). O ensaio DA-4 apresentou uma produção específica de 1,99 g/g, cerca de 70 % superior ao ensaio D-4 ($R = 1,7$) e o ensaio DA-5 apresentou uma produção específica de 1,94 g/g, cerca de 40 % superior ao ensaio D-5 ($R = 1,4$). As produções específicas nos ensaios descontínuos alimentados (DA-3, DA-4 e DA-5) foram superiores à obtida no ensaio D-3+.

Dessa forma, tanto os ensaios descontínuos alimentados como o ensaio descontínuo D-3+ apresentaram resultados superiores aos ensaios descontínuos padrão, em termos de produção de retamicina total. Aparentemente, a principal causa para essa superioridade foi a ocorrência de limitação de determinados nutrientes, durante o período de alimentação, o que ocasionou um acúmulo de glicose no reator e não permitiu um bom controle da velocidade específica de crescimento (μ_x).

4.4 Ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b (descontínuos alimentados)

Como foi destacado no item 4.3, nos ensaios DA-3, DA-4 e DA-5 não foi possível exercer um bom controle da velocidade específica de crescimento durante a alimentação, devido ao fato de se ter utilizado um meio de alimentação com apenas a concentração de glicose quadruplicada, o que levou a limitações por outros nutrientes além da glicose.

Dessa forma, foram realizados os ensaios descontínuos alimentados DA-3b, DA-4b e DA-5b, utilizando-se como alimentação 1,0 L de meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas, a fim de que a glicose fosse o único substrato limitante e não ocorressem limitações por outros nutrientes, sendo possível, assim, o controle da velocidade específica de crescimento em diferentes valores.

De maneira semelhante aos ensaios DA-3, DA-4 e DA-5, foram escolhidas as mesmas três velocidades específicas de crescimento a serem controladas, nesse

conjunto de ensaios: $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (ensaio DA-3b); $\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$ (ensaio DA-4b) e $\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$ (ensaio DA-5b), que correspondem respectivamente a 10 %, 30 % e 56 % do valor da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x \text{ max}}$, em torno de $0,30 \text{ h}^{-1}$).

Em relação ao ensaio DA-3b, a discussão já foi apresentada no item 4.2.3, mostrando que foi possível o controle da velocidade específica de crescimento em níveis baixos (próximo ao valor desejado $\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$), obtendo-se uma boa produção do antibiótico.

4.4.1 Ensaios DA-4b e D-4b

No ensaio descontínuo alimentado DA-4b, foi utilizada uma vazão exponencial de alimentação a fim de se controlar a velocidade específica de crescimento em um valor intermediário ($\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$). Em paralelo com o ensaio DA-4b, foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-4b.

As figuras 4.106 e 4.107 mostram os perfis de concentração celular e de concentração de glicose nos ensaios DA-4b e D-4b, respectivamente. A alimentação no ensaio DA-4b foi realizada entre 14 e 24 horas de cultivo (instantes representados pelas linhas verticais, na figura). A concentração celular máxima atingida no ensaio DA-4b foi de cerca de 7,3 g/L, 62 % superior ao ensaio D-4b. A concentração de glicose decaiu um pouco no início da alimentação, no ensaio DA-4b, mas depois se manteve constante em cerca de 3,3 g/L. Ao término da alimentação, a concentração de glicose decaiu rapidamente, exaurindo-se em torno de 32 horas de cultivo, bem mais cedo se comparado ao ensaio DA-4 (término da glicose em torno de 56 horas de cultivo). No ensaio D-4b, a glicose exauriu-se em torno de 24 horas de cultivo.

Em relação à produção do antibiótico (figuras 4.108 e 4.109), o ensaio DA-4b atingiu uma concentração de retamicina total de 8,2 g/L, cerca de 88 % superior ao ensaio D-4b (4,4 g/L). Os perfis de produção de retamicina apresentaram-se defasados em relação ao crescimento celular, como já discutido anteriormente.

Figura 4.106 Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio DA-4b.

Figura 4.107 Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio D-4b.

Figura 4.108 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-4b.

Figura 4.109 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-4b.

Figura 4.110 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-4b.

Figura 4.111 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-4b.

Figura 4.112 Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$), no ensaio DA-4b.

Figura 4.113 Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$), no ensaio D-4b.

Figura 4.114 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-4b.

Figura 4.115 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-4b.

Figura 4.116 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-4b.

Figura 4.117 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-4b.

As velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de retamicina nos ensaios DA-4b e D-4b são apresentadas nas figuras 4.110 e 4.111. No ensaio DA-4b, durante praticamente toda a alimentação foi possível controlar a velocidade específica de crescimento no valor desejado ($\mu_x = 0,10 \text{ h}^{-1}$). Dessa forma, tanto o perfil de concentração de substrato como o perfil

de velocidade específica de crescimento mostram que não houve limitação por outros nutrientes, sendo a glicose o único substrato limitante. A velocidade específica de consumo de glicose atingiu um valor máximo entre 0,30 g/(g.h) e 0,35 g/(g.h) nos dois ensaios. A velocidade específica de produção de retamicina total atingiu um valor máximo de cerca de 0,11 g/(g.h) no ensaio DA-4b e de cerca de 0,09 g/(g.h) no ensaio D-4b. O perfil de velocidade específica de produção mostrou-se defasado em relação à velocidade específica de crescimento, como observado nos demais ensaios.

Nesses ensaios também foi determinada a concentração de amônio no caldo de fermentação (figuras 4.112 e 4.113). Foi observado um comportamento semelhante aos ensaios DA-3, D-3 e D-3+, com o início da produção do antibiótico coincidindo com a queda da concentração de amônio no caldo a níveis abaixo de 2 mM.

Em relação à reologia, os ensaios apresentaram o mesmo comportamento já descrito para os demais ensaios, com o índice de consistência (K) atingindo cerca de 17,0 dina.sⁿ/cm² no ensaio DA-4b, cerca de 2,8 vezes superior ao obtido no ensaio D-4b (6,0 dina.sⁿ/cm²), devido à maior concentração celular obtida no ensaio DA-4b (7,3 g/L) em comparação com o ensaio D-4b (4,5 g/L), como mostram as figuras 4.114 e 4.115.

No que se refere à morfologia (figuras 4.116 e 4.117), na fase de crescimento (até cerca de 20 horas de cultivo), ocorreu um aumento na porcentagem de *clumps* e uma diminuição na porcentagem de *pellets*, semelhante aos demais ensaios. A partir das 20 horas de cultivo, na fase de produção, a porcentagem de *clumps* permaneceu praticamente constante, representando quase 90 % do total. A porcentagem de hifas livres aumentou durante o cultivo, nos dois ensaios.

Em relação aos parâmetros morfológicos, a dimensão média de *clumps* mostrou um comportamento semelhante aos demais ensaios, iniciando-se em torno de 190 µm e decaindo para cerca de 140 µm no final dos ensaios DA-4 b e D-4b. A dimensão média de *pellets* ficou entre 400 µm e 450 µm, nos dois ensaios. O comprimento total de hifas ramificadas manteve-se em torno de 100 µm e o comprimento total de hifas não ramificadas, entre 30 µm e 40 µm, nos dois ensaios, sem grandes variações ao longo dos cultivos, o mesmo ocorrendo com o número de extremidades (em torno de 6) e a unidade de crescimento hifal (em torno de 20 µm).

A comparação dos resultados, em termos de fatores de conversão, produtividades e produção específica de retamicina será apresentada no item 4.4.3.

4.4.2 Ensaio DA-5b e D-5b

No ensaio descontínuo alimentado DA-5b, foi utilizada uma vazão exponencial de alimentação a fim de se controlar a velocidade específica de crescimento em um valor alto ($\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$). Em paralelo com o ensaio DA-5b, foi realizado o ensaio descontínuo padrão D-5b.

As figuras 4.118 e 4.119 mostram os perfis de concentração celular, de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido nos ensaios DA-5b e D-5b, respectivamente. A alimentação no ensaio DA-5b foi realizada entre 13 e 19 horas de cultivo (instantes representados pelas linhas verticais, na figura). A concentração celular máxima atingida no ensaio DA-5b foi de cerca de 7,6 g/L, 55 % superior ao ensaio D-5b. Durante a alimentação, no ensaio DA-5b, a concentração de glicose permaneceu praticamente constante, em torno de 7,5 g/L, mostrando um bom controle da concentração de substrato. Tanto no ensaio DA-5b como no ensaio D-5b, a glicose exauriu-se com cerca de 28 horas de cultivo. O oxigênio dissolvido atingiu níveis bastante baixos no ensaio DA-5b (cerca de 10 %), em comparação com o ensaio D-5b (cerca de 65 %), provavelmente devido à maior concentração celular atingida naquele ensaio.

Ao contrário dos outros ensaios descontínuos alimentados, a produção do antibiótico foi inferior ao ensaio descontínuo padrão, como mostram as figuras 4.120 e 4.121. No ensaio DA-5b, a concentração de retamicina total chegou a apenas 2,5 g/L, bastante inferior à obtida no ensaio D-5b (cerca de 5,3 g/L). Convém destacar que o ensaio DA-5b foi o único em que o oxigênio dissolvido atingiu valores bastante baixos (cerca de 10 %), o que pode ter prejudicado a síntese de retamicina (Martins, 2001).

As figuras 4.122 e 4.123 mostram que foi possível, durante a alimentação no ensaio DA-5b, o controle da velocidade específica de crescimento próximo ao valor desejado ($\mu_x = 0,17 \text{ h}^{-1}$). A velocidade específica de crescimento máxima atingiu cerca de $0,29 \text{ h}^{-1}$ no ensaio DA-5b e $0,32 \text{ h}^{-1}$ no ensaio D-5b. Em relação ao substrato, a velocidade específica de consumo de glicose apresentou um valor

máximo de cerca de 0,40 g/(g.h) no ensaio DA-5b e de cerca de 0,30 g/(g.h) no ensaio D-5b. A velocidade específica máxima de produção de retamicina total atingiu cerca de 0,04 g/(g.h) no ensaio DA-5b, bastante inferior ao ensaio D-5b (0,08 g/(g.h)). Em ambos os ensaios, o perfil de velocidade específica de produção do antibiótico mostrou-se defasado em relação à velocidade específica de crescimento celular, como já observado anteriormente.

Nesses ensaios também foi determinada a concentração de amônio no caldo de fermentação (figuras 4.124 e 4.125). Foi observado um comportamento semelhante aos ensaios anteriores, com o início da produção do antibiótico coincidindo com a queda da concentração de amônio no caldo a níveis abaixo de 2 mM.

Em relação à reologia, os ensaios apresentaram o mesmo comportamento já descrito para os demais ensaios, com o índice de consistência (K) atingindo cerca de 14,0 dina.sⁿ/cm² no ensaio DA-5b e 6,5 dina.sⁿ/cm² no ensaio D-5b, como apresentado nas figuras 4.126 e 4.127.

A figura 4.128 mostra as velocidades de consumo de oxigênio durante o ensaio DA-5b. O valor máximo de QO₂X foi de cerca de 14,0 mmol/(L.h) enquanto o máximo QO₂ atingido foi de 3,0 mmol/(g.h), valores próximos aos obtidos por Martins (2001) em cultivos descontínuos de *Streptomyces olindensis* So20. Essas velocidades de consumo de oxigênio foram um pouco maiores do que as obtidas no ensaio DA-3b (QO₂X em torno de 12,0 mmol/(L.h) e QO₂ em torno de 1,8 mmol/(g.h)), mostrando um maior consumo de oxigênio no ensaio DA-5b, fato que também é evidenciado pelo perfil de oxigênio dissolvido obtido nesse ensaio (figura 4.118), em virtude da concentração celular significativamente mais elevada.

No que se refere à morfologia (figuras 4.129 e 4.130), na fase de crescimento (até cerca de 20 horas de cultivo), ocorreu um aumento na porcentagem de *clumps* e uma diminuição na porcentagem de *pellets*, semelhante aos demais ensaios. A partir das 20 horas de cultivo, na fase de produção, a porcentagem de *clumps* decaiu um pouco, nos ensaios DA-5b e D-5b. A porcentagem de hifas livres aumentou durante o cultivo, nos dois ensaios. No final do ensaio DA-5b, a porcentagem de *clumps* representava cerca de 80 % do total, um pouco menor do que a obtida nos demais ensaios onde a produção do antibiótico foi maior.

Figura 4.118 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio DA-5b.

Figura 4.119 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio D-5b.

Figura 4.120 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio DA-5b.

Figura 4.121 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio D-5b.

Figura 4.122 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio DA-5b.

Figura 4.123 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio D-5b.

Figura 4.124 Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$), no ensaio DA-5b.

Figura 4.125 Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$), no ensaio D-5b.

Figura 4.126 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio DA-5b.

Figura 4.127 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio D-5b.

Figura 4.128 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio DA-5b.

Figura 4.129 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio DA-5b.

Figura 4.130 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio D-5b.

Em relação às dimensões do microrganismo, a dimensão média de *clumps* não apresentou variações significativas, mantendo-se em torno de 150 μm em ambos os ensaios. A dimensão média de *pellets* ficou entre 400 μm e 450 μm , nos dois ensaios. O comprimento total de hifas ramificadas manteve-se entre 100 μm e 150 μm e o comprimento total de hifas não ramificadas, entre 30 μm e 40 μm , nos dois ensaios, sem grandes variações ao longo dos cultivos, o mesmo ocorrendo com o número de extremidades (em torno de 6) e a unidade de crescimento hifal (em torno de 20 μm).

4.4.3 Comparação entre os ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b

Conforme já destacado, é importante se fazer uma análise dos resultados em termos de produtividades, fatores de conversão e produção específica, pois a quantidade de glicose fornecida foi maior nos ensaios descontínuos alimentados do que nos descontínuos padrão realizados em paralelo.

A tabela 4.3 mostra um resumo dos resultados obtidos neste conjunto de ensaios.

Em relação aos fatores de conversão substrato a células, pode-se observar valores praticamente semelhantes entre os ensaios descontínuos alimentados e descontínuos padrão (em torno de 0,45 g/g). Isso mostra que o crescimento maior obtido nos ensaios descontínuos alimentados foi proporcional à maior quantidade de glicose fornecida nesses ensaios. Um comportamento semelhante ocorreu em relação à produtividade em células, cujos valores ficaram entre 0,15 g/(L.h) e 0,23 g/(L.h).

Por outro lado, com relação à produção do antibiótico, observa-se que o fator de conversão substrato a retamicina total atingiu um valor de 0,59 g/g no ensaio DA-3b, cerca de 37 % superior ao ensaio D-3b (0,43 g/g). No ensaio DA-4b, o fator de conversão substrato a retamicina total atingiu um valor mais baixo (0,49 g/g), apenas 16 % superior ao ensaio padrão correspondente (D-4b), cujo valor foi de 0,42 g/g. Por outro lado, no ensaio DA-5b obteve-se um fator de conversão substrato a retamicina total de 0,15 g/g, muito menor do que o obtido no ensaio padrão correspondente (0,53 g/g).

As produtividades em retamicina também mostram diferenças entre os ensaios descontínuos alimentados e descontínuos padrão. A produtividade em

retamicina total no ensaio DA-3b foi de 0,197 g/(L.h), cerca de 54 % superior ao ensaio D-3b (0,128 g/(L.h)). No ensaio DA-4b, a produtividade em retamicina total foi de 0,186 g/(L.h), cerca de 88 % superior ao ensaio D-4b (0,099 g/(L.h)). Por outro lado, a produtividade em retamicina total no ensaio DA-5b (0,057 g/(L.h)) foi menor do que no ensaio padrão correspondente (D-5b).

A produção específica em retamicina total (relação entre a concentração de retamicina total e a concentração celular) atingiu um maior valor no ensaio DA-3b (1,33 g/g) cerca de 46 % superior ao ensaio padrão D-3b (0,91 g/g). No ensaio DA-4b, obteve-se uma produção específica semelhante à obtida no ensaio D-4b (cerca de 1,15 g/g). Novamente, esse parâmetro mostrou um resultado inferior para o ensaio DA-5b (0,35 g/g), que apresentou um resultado pior em termos de produção de retamicina do que o ensaio D-5b.

Outro resultado interessante é o parâmetro R (relação entre a produção específica em retamicina total do ensaio descontínuo alimentado e a produção específica em retamicina total do ensaio descontínuo padrão correspondente), que é mostrado na figura 4.131. Essa figura mostra a variação desse parâmetro em função da velocidade específica de controle imposta nos ensaios descontínuos alimentados. Deve-se lembrar que esse parâmetro tem valor igual a 1,0 para os ensaios descontínuos padrão (representados pela linha pontilhada em $R = 1$). A outra linha pontilhada no gráfico representa o ensaio descontínuo D-3+, onde foi obtido um valor de R igual a 1,6. Assim, com um valor de R igual a 1,6, significa que o ensaio D-3+ apresentou uma produção específica em retamicina total cerca de 60 % superior ao ensaio descontínuo padrão realizado em paralelo (D-3).

A figura 4.131 permite observar a influência de dois efeitos importantes no processo de produção do antibiótico: a velocidade específica de controle (μ_o) e a composição da alimentação. Em primeiro lugar, aumentando-se a velocidade específica de controle durante a alimentação, ocorreu uma tendência de diminuição da produção específica, o que é coerente com um processo de produção de um metabólito secundário. Em segundo lugar, a limitação de outros nutrientes devido a uma alimentação com apenas a concentração de glicose quadruplicada (ensaios DA-3, DA-4 e DA-5) conduziu a um aumento na produção específica de retamicina total, como mostra o deslocamento da curva obtida na figura 4.131, em relação aos ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b. Portanto, o ensaio DA-3, onde se obteve melhor

resultado ($R = 1,8$), foi o que apresentou esses dois efeitos atuando de forma positiva (alimentação provocando limitação de nutrientes e velocidade específica de crescimento baixa).

Dessa forma, exceto no ensaio DA-5b, a produção específica foi melhor nos ensaios descontínuos alimentados do que nos ensaios descontínuos padrão realizados em paralelo (pontos acima da linha $R = 1$).

Tabela 4.3 Resumo dos resultados dos ensaios DA-3b, DA-4b, DA-5b, D-3b, D-4b e D-5b.

Parâmetro	DA-3b	D-3b	DA-4b	D-4b	DA-5b	D-5b
S_{ini} (g/L)	10,6	10,6	10,1	10,3	10	10,2
S_t (g/L)	16,7	10,6	16,7	10,3	16,7	10,0
X_f (g/L)	7,83	5,38	7,30	4,50	7,60	4,90
Re_f (g/L)	8,20	3,57	6,45	3,74	2,02	3,70
Ri_f (g/L)	1,67	1,04	1,75	0,79	0,45	1,70
Rt_f (g/L)	9,86	4,61	8,18	4,36	2,50	5,30
$\mu_{x\ max}$ (h^{-1})	0,26	0,27	0,26	0,30	0,29	0,32
$\mu_{Re\ max}$ (g/(g.h))	0,09	0,08	0,09	0,08	0,03	0,05
$\mu_{Ri\ max}$ (g/(g.h))	0,021	0,023	0,025	0,021	0,004	0,030
$\mu_{Rt\ max}$ (g/(g.h))	0,114	0,097	0,114	0,096	0,04	0,080
$QO_2\ max$ (mmol/(g.h))	1,8	---	---	---	3,0	---
K_{max} (dina.s ⁿ /cm ²)	18,7	8,3	17,0	6,0	14,0	6,5
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,44	0,48	0,42	0,42	0,44	0,47
$Y_{Re/s}$ (g/g)	0,49	0,34	0,39	0,36	0,12	0,37
$Y_{Ri/s}$ (g/g)	0,100	0,098	0,105	0,077	0,027	0,170
$Y_{Rt/s}$ (g/g)	0,59	0,43	0,49	0,42	0,15	0,53
P_x (g/(L.h))	0,15	0,16	0,18	0,18	0,23	0,20
P_{Re} (g/(L.h))	0,164	0,099	0,147	0,085	0,046	0,084
P_{Ri} (g/(L.h))	0,035	0,029	0,040	0,028	0,010	0,043
P_{Rt} (g/(L.h))	0,197	0,128	0,186	0,099	0,057	0,120
PE_{Re} (g/g)	1,11	0,71	0,91	1,00	0,29	0,91
PE_{Ri} (g/g)	0,23	0,20	0,25	0,18	0,06	0,41
PE_{Rt} (g/g)	1,33	0,91	1,15	1,16	0,35	1,30
R	1,5	1,0	1,0	1,0	0,3	1,0

Mesmo assim, é importante destacar que, nos ensaios onde ocorreu limitação de nutrientes (DA-3, DA-4 e DA-5), não foi possível um controle muito bom da velocidade específica de crescimento durante a alimentação. Nos ensaios onde não ocorreu limitação de outros nutrientes, foi possível um bom controle da velocidade específica de crescimento no valor desejado, durante a alimentação.

Figura 4.131 Parâmetro R em função da velocidade específica de crescimento (controle) durante a alimentação nos ensaios descontinuos alimentados (DA-3, DA-4, DA-5, DA-3b, DA-4b e DA-5b). As linhas pontilhadas representam os ensaios descontinuos padrão e o ensaio D-3+.

Comparando-se os resultados dos ensaios descontinuos alimentados com o ensaio D-3+ (descontínuo com a mesma quantidade de glicose fornecida nos ensaios descontinuos alimentados), pode-se perceber que, em termos de produção específica, o ensaio D-3+ conduziu a melhores resultados do que os ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b. Os resultados mostraram também que apenas o fato de se aumentar a quantidade de glicose fornecida neste ensaio descontinuo (D-3+) conduziu a uma maior produção de retamicina em comparação com os ensaios descontinuos padrão (deslocamento entre as linhas pontilhadas na figura 4.131). Os ensaios DA-3 e DA-4, por outro lado, apresentaram melhores resultados do que o ensaio D-3+, em termos de produção específica de retamicina, mostrando a importância adicional da manutenção de baixas velocidades específicas de crescimento.

4.5 Correlações obtidas utilizando-se os resultados dos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos

A análise dos resultados de todos os ensaios (descontínuos alimentados e descontínuos) apresentados permite o estabelecimento de algumas correlações entre alguns parâmetros. O estabelecimento de correlações gerais é muito útil na análise de processos fermentativos, principalmente na elaboração de modelos matemáticos.

Como foi apresentado anteriormente, as características reológicas do caldo de fermentação estão relacionadas com a concentração celular, como destacado por Queiroz et al. (1997). A figura 4.132 mostra um ajuste entre o índice de consistência (K) e a concentração celular (X), com a obtenção de uma equação de potência. Nesse ajuste foram utilizados dados de todos os ensaios descontínuos alimentados e descontínuos. De uma maneira geral, constata-se que o aumento na concentração celular conduz a um aumento no índice de consistência do caldo de fermentação. Tal comportamento é usual em cultivos de microrganismos filamentosos, como *Streptomyces*, *Aspergillus* e outros (Allen; Robinson, 1990; Pedersen et al., 1993; Pamboukian et al., 1998; Badino Jr et al., 1999).

Figura 4.132 Correlação entre o índice de consistência (K) e a concentração celular (X) nos ensaios realizados.

Figura 4.133 Correlação entre o índice de comportamento (n) e a concentração celular (X) nos ensaios realizados

De maneira análoga, a figura 4.133 apresenta um ajuste entre o índice de comportamento (n) e a concentração celular, mostrando que, de uma maneira geral, o aumento da concentração celular conduz a uma diminuição no valor de n .

Figura 4.134 Correlação entre a velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}) e a velocidade específica de crescimento (μ_x) nos ensaios realizados.

A figura 4.134 apresenta um ajuste entre a velocidade específica de produção de retamicina total e a velocidade específica de crescimento. Esse ajuste foi realizado na fase de produção (fase de declínio da velocidade específica de crescimento e de aumento da velocidade específica de produção do antibiótico), utilizando-se os resultados de todos os ensaios descontínuos alimentados e descontínuos. A correlação obtida é muito boa, indicando que a velocidade específica de produção de retamicina total aumenta com a diminuição da velocidade específica de crescimento, o que é coerente com um processo de produção de um metabólito secundário (Lee, 1997; Melzoch et al., 1997).

Figura 4.135 Correlação entre a concentração de retamicina total (Rt) e a concentração de retamicina extracelular (Re) nos ensaios realizados

A figura 4.135 mostra a relação entre a concentração de retamicina total e a concentração de retamicina extracelular, com a utilização de resultados de todos os ensaios realizados (descontínuos alimentados e descontínuos). De uma maneira geral, constata-se que a concentração de retamicina extracelular representa cerca de 84 % da concentração total do antibiótico.

4.6 Ensaios contínuos C-1, C-2, C-3 e C-4

Conforme se pôde observar através dos resultados obtidos nos ensaios descontínuos alimentados (itens 4.2 a 4.4), o controle da velocidade específica de crescimento através da adoção de uma vazão exponencial de alimentação, de uma maneira geral, não foi de fácil implementação. Mesmo nos casos em que se conseguiu sucesso neste controle (ensaios DA-3b, DA-4b e DA-5b), não foi possível uma interpretação mais precisa dos fenômenos envolvidos, pelo fato de que as variáveis de estado (concentração celular, concentração de glicose e dos outros nutrientes, concentração de retamicina) variam em função do tempo de cultivo.

Neste contexto, torna-se importante a obtenção de dados em processo contínuo, em estado estacionário, no qual as variáveis de estado mencionadas permanecem constantes com o tempo, possibilitando assim um estudo mais preciso e aprofundado das correlações existentes entre essas variáveis.

Dessa forma, foram realizados os ensaios contínuos C-1, C-2, C-3 e C-4, a fim de se controlar a velocidade específica de crescimento em diferentes valores, conforme a tabela 3.6, apresentada no item 3.3.2. No ensaio C-1, a velocidade específica de crescimento foi controlada em $0,10 \text{ h}^{-1}$, com a imposição de uma vazão específica de alimentação $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$; no ensaio C-2, a velocidade específica de crescimento foi controlada em $0,20 \text{ h}^{-1}$, com a imposição de uma vazão específica de alimentação $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$. No ensaio C-3 foram estudados dois estados estacionários, com $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (C-3a) e com $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ (C-3b), controlando-se a velocidade específica de crescimento em $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,25 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, dois valores bastante distintos. No ensaio C-4 foram estudados mais dois estados estacionários, com $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$ (C-4a) e com $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ (C-4b), controlando-se a velocidade específica de crescimento em $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,30 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, dois valores bastante distintos. Dessa forma, uma ampla faixa de valores de D foi estudada, chegando-se próximo da condição de lavagem, uma vez que a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{x\text{max}}$) apresentou valores de cerca de $0,35 \text{ h}^{-1}$.

Em todos os ensaios contínuos utilizou-se, como alimentação, o meio R5 Modificado, como descrito no item 3.2.3.

4.6.1 Ensaio contínuo C-1

A figura 4.136 mostra a concentração celular, a concentração de glicose e o oxigênio dissolvido durante o ensaio C-1. A linha vertical representa o início da operação contínua do reator (16 horas de cultivo, instante que representa o final da fase exponencial de crescimento). A alimentação foi realizada entre 16 h e 96 horas de cultivo, período equivalente a 8 tempos de residência, a fim de se obter uma boa estabilização do sistema. A partir do início da alimentação, ocorreu um aumento na concentração celular e uma diminuição na concentração de glicose, até a estabilização do sistema (estabelecimento do regime estacionário). No estado estacionário, a concentração celular atingiu um valor de cerca de 5,5 g/L e a concentração de glicose atingiu um valor de cerca de 3,7 g/L. Em relação ao oxigênio dissolvido, o valor mínimo atingido foi de cerca de 60 %. Pode-se notar, no perfil de oxigênio dissolvido, algumas quedas acentuadas (pequenos vales). Pôde-se observar que os instantes dessas quedas coincidiam com a adição de gotas de antiespumante ao reator, a fim de se eliminar a espuma formada no cultivo. A adição de antiespumante altera as propriedades do caldo de fermentação, interferindo no oxigênio dissolvido e no nível de líquido no reator, o que pode prejudicar o estabelecimento e a manutenção do estado estacionário.

A figura 4.137 apresenta as concentrações do antibiótico (retamicina extracelular, intracelular e total) durante o ensaio C-1. A produção de retamicina iniciou-se em torno das 16 horas de cultivo, já no período de operação contínua do reator, com a concentração do antibiótico aumentando até as 30 horas de cultivo e estabilizando-se a partir deste instante. Após o estabelecimento do estado estacionário, a concentração de retamicina total foi de cerca de 1,35 g/L. Da mesma forma que em relação à concentração celular, obteve-se um estado estacionário bem definido para a produção do antibiótico, com uma rápida estabilização do sistema, após o início da operação contínua. Mesmo com essa rápida estabilização, o sistema operou em forma contínua por cerca de 8 tempos de residência.

A figura 4.138 apresenta as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de retamicina durante o ensaio C-1. Pode-se observar que o estabelecimento do estado estacionário (estabilização dos parâmetros) ocorreu entre 35 e 40 horas de cultivo. A velocidade específica de crescimento

manteve-se em $0,10 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_x = D$). A velocidade específica de consumo de substrato manteve-se em $0,11 \text{ g/(g.h)}$. A velocidade específica de produção de retamicina total ficou em torno de $0,025 \text{ g/(g.h)}$.

Em relação aos íons amônio, a figura 4.139 mostra que, durante toda a etapa contínua do processo, a concentração de amônio foi mantida em níveis bastante baixos (cerca de $0,04 \text{ mM}$), o que pode ter favorecido a produção de retamicina.

As propriedades reológicas do caldo de fermentação são apresentadas na figura 4.140. O índice de consistência (K) máximo obtido no ensaio C-1 foi de $5,0 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$ e o índice de comportamento (n) mínimo foi de $0,30$, mostrando um comportamento pseudoplástico do caldo, da mesma forma que nos ensaios anteriores.

Em relação à respiração celular, a figura 5.141 apresenta a velocidade de consumo de oxigênio e a velocidade específica de consumo de oxigênio, no ensaio C-1. Os perfis obtidos apresentaram algumas flutuações, da mesma forma que o perfil de oxigênio dissolvido, devido à adição de antiespumante durante o ensaio. Os valores máximos de QO_2X e de QO_2 estiveram em torno de $12,0 \text{ mmol/(L.h)}$ e $2,5 \text{ mmol/(g.h)}$, respectivamente, semelhante aos resultados obtidos por Martins (2001), em processos descontínuos de produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* So20.

A porcentagem de cada classe morfológica em termos de área, durante o ensaio C-1, é apresentada na figura 4.142. No início do ensaio, as classes morfológicas predominantes eram os *pellets* e os *clumps* (cerca de 50 % de cada classe). Durante a fase de crescimento (até o início da operação contínua do reator), ocorreu uma diminuição na porcentagem de *pellets* e um correspondente aumento na porcentagem de *clumps*, provavelmente devido ao cisalhamento no reator. Até cerca de 60 horas de cultivo, havia a presença de *pellets* no meio de cultivo. Após as 60 horas de cultivo, praticamente não havia mais *pellets* no meio de cultivo, com o crescimento quase que totalmente na forma de *clumps* (aproximadamente 100 %), com uma quantidade muitíssimo pequena de hifas livres.

Figura 4.136 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio C-1.

Figura 4.137 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-1

Figura 4.138 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-1.

Figura 4.139 Concentração de íons amônio (C_{NH4+}), no ensaio C-1.

Figura 4.140 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-1.

Figura 4.141 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-1.

Figura 4.142 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-1.

Em termos de dimensões, os *clumps* apresentaram uma dimensão média de cerca de 170 μm no início do ensaio, a qual decaiu para cerca de 130 μm no estado estacionário. Os *pellets*, por sua vez, apresentaram uma dimensão média de cerca de 400 μm até cerca de 36 horas de cultivo, diminuindo para cerca de 280 μm com 48 horas e praticamente desaparecendo a partir das 60 horas de cultivo. O comprimento total de hifas ramificadas apresentou algumas flutuações, mantendo-se entre 100 μm e 150 μm durante todo o ensaio, o mesmo ocorrendo com o comprimento total de hifas não ramificadas (entre 30 μm e 60 μm). O número de extremidades manteve-se em torno de 6 e a unidade de crescimento hifal, entre 15 μm e 20 μm , sem muitas variações.

4.6.2 Ensaio contínuo C-2

Conforme destacado anteriormente, o ensaio C-2 foi realizado com uma vazão específica de alimentação (D) de $0,20 \text{ h}^{-1}$. A alimentação iniciou-se com 16 horas de cultivo e foi mantida por 36 horas, o equivalente a 7,2 tempos de residência, a fim de obter uma boa estabilização do sistema e o estabelecimento do estado estacionário.

A figura 4.143 apresenta os perfis de concentração celular, de concentração de glicose e de oxigênio dissolvido durante o ensaio C-2. A estabilização da concentração celular e da concentração de glicose foi bastante rápida, após cerca de 8 horas do início da alimentação. A concentração celular no estado estacionário ficou

em torno de 4,0 g/L, um pouco menor do que a obtida no ensaio C-1 (5,5 g/L). A concentração de glicose, por sua vez, foi de 4,8 g/L, coerentemente superior à do ensaio C-1 (3,7 g/L). O oxigênio dissolvido atingiu um valor mínimo em torno de 60 %. No estado estacionário, o oxigênio manteve valores de cerca de 80 %. Procurou-se utilizar a menor quantidade de antiespumante possível, a fim de se evitar perturbações no perfil de oxigênio dissolvido.

Em relação à produção de retamicina, a figura 4.144 mostra que a concentração de retamicina total atingiu um valor de 0,40 g/L, significativamente menor do que a obtida no ensaio C-1 (1,35 g/L), mostrando que o aumento da vazão específica de alimentação (D) conduziu a uma diminuição na produção de retamicina.

A figura 4.145 apresenta as velocidades específicas durante o ensaio C-2. Pode-se observar uma estabilização do sistema entre 35 e 40 horas de cultivo. A velocidade específica de crescimento foi controlada em um valor $\mu_x = D = 0,20 \text{ h}^{-1}$. A velocidade de consumo de substrato atingiu um valor de 0,26 g/(g.h), no estado estacionário. A velocidade específica de produção de retamicina total foi de cerca de 0,020 g/(g.h), um pouco menor do que a obtida no ensaio C-1, mostrando que o aumento da velocidade específica de crescimento conduziu a uma diminuição na velocidade específica de produção de retamicina.

Da mesma forma que o ensaio C-1, a concentração de íons amônio (figura 4.146) atingiu um valor baixo no estado estacionário (em torno de 0,30 mM), embora ligeiramente superior ao ensaio C-1 (0,04 mM), o que pode ter contribuído para a produção de retamicina.

A figura 4.147 apresenta as características reológicas do caldo de fermentação, no ensaio C-2. O índice de consistência, no estado estacionário, foi de cerca de 3,5 dina.sⁿ/cm², inferior ao obtido no ensaio C-1 (5,0 dina.sⁿ/cm²), provavelmente devido à menor concentração celular atingida no ensaio C-2. O índice de comportamento atingiu um mínimo de 0,35.

Figura 4.143 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio C-2.

Figura 4.144 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-2.

Figura 4.145 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-2.

Figura 4.146 Concentração de íons amônio (C_{NH4^+}), no ensaio C-2.

Figura 4.147 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-2.

Figura 4.148 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-2.

Figura 4.149 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hr}), em termos de área, no ensaio C-2.

As velocidades de consumo de oxigênio (figura 4.148) apresentaram um perfil sem muitas flutuações, como ocorreu no ensaio C-1. A velocidade específica de consumo de oxigênio atingiu um valor de cerca de 4,2 mmol/(g.h), enquanto a velocidade de consumo de oxigênio atingiu um valor de 17,0 mmol/(L.h), valores maiores do que os obtidos no ensaio C-1, devido à maior velocidade específica de crescimento no ensaio C-2, que conduziu a uma maior velocidade de respiração celular neste ensaio.

Em relação à morfologia, a figura 4.149 apresenta a porcentagem de cada classe morfológica ao longo do ensaio C-2, em termos de área. No início do ensaio, a classe morfológica predominante era a de *pellets* (cerca de 80 %), com cerca de 18 % de *clumps*. Durante a fase descontínua (até as 16 horas de cultivo), ocorreu uma diminuição na porcentagem de *pellets* e um aumento na porcentagem de *clumps*, devido provavelmente ao cisalhamento no reator. Com 16 horas de cultivo, praticamente não havia mais *pellets* no reator. No entanto, com o início da operação contínua do reator, ocorreu novamente a formação de *pellets*, devido provavelmente ao baixo tempo de residência no reator (5 horas), que contribuiu para a aglomeração do microrganismo. No estado estacionário, havia o predomínio de *clumps* (43 %) e *pellets* (55 %), ao contrário do ensaio C-1, onde praticamente havia apenas *clumps* no estado estacionário. Esse resultado sinaliza para o fato de que a morfologia predominantemente na forma de *pellets* seja prejudicial à síntese de retamicina, considerando-se os baixos níveis de produção obtidos neste ensaio.

Em termos de dimensões, os *clumps* apresentaram uma dimensão média de cerca de 190 μm no início do ensaio, a qual decaiu para cerca de 150 μm no estado estacionário. Os *pellets*, por sua vez, apresentaram uma dimensão média entre 350 μm e 400 μm , no estado estacionário. O comprimento total de hifas ramificadas manteve-se entre 150 μm e 200 μm , enquanto o comprimento total de hifas não ramificadas manteve-se entre 50 μm e 70 μm , no estado estacionário. O número de extremidades manteve-se em torno de 6 e a unidade de crescimento hifal, em torno de 30 μm , no estado estacionário.

4.6.3 Ensaio contínuo C-3

No ensaio contínuo C-3, foram estudados dois estados estacionários. A primeira etapa contínua do ensaio (entre 16 e 96 horas de cultivo) foi realizada com uma vazão específica de alimentação $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, a fim de se controlar a velocidade específica de crescimento neste valor (μ_x baixo). A segunda etapa (entre 96 e 120 horas de cultivo) foi realizada com uma vazão específica $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$, com o objetivo de se verificar a influência de um alto valor de μ_x sobre a produção de retamicina.

A figura 4.150 apresenta a concentração celular, a concentração de substrato e de oxigênio dissolvido durante o ensaio C-3. Em relação à concentração celular pode-se observar que, após o início do processo contínuo ($D = 0,05 \text{ h}^{-1}$), ocorreu uma rápida estabilização, com o estabelecimento do estado estacionário. A concentração celular no estado estacionário foi de cerca de 5,30 g/L. Essa primeira etapa, compreendida entre 16 e 96 horas de cultivo, é representada pelas linhas verticais na figura. A partir das 96 horas de cultivo, a vazão específica de alimentação foi aumentada para $0,25 \text{ h}^{-1}$. Com o aumento da vazão, ocorreu uma perturbação no sistema, com uma queda na concentração celular até cerca de 4,0 g/L. Após essa queda, a concentração celular voltou a aumentar, atingindo novamente o mesmo patamar anterior (cerca de 5,40 g/L). Em relação ao substrato, na primeira etapa do ensaio, a concentração de glicose atingiu um baixo valor de cerca de 0,95 g/L, no estado estacionário. Com o aumento de D , ocorreu um aumento na concentração de glicose, no estado estacionário para cerca de 5,6 g/L. A porcentagem de oxigênio

dissolvido manteve-se em torno de 95 % no primeiro estado estacionário, caindo para cerca de 62 % no segundo estado estacionário.

A figura 4.151 apresenta os perfis de concentração do antibiótico retamicina, no ensaio C-3. Após o início da primeira fase do processo contínuo, a concentração de retamicina total estabilizou-se em torno de 3,85 g/L. Com o aumento da vazão específica de alimentação, a partir das 96 horas de cultivo, ocorreu uma diminuição na produção do antibiótico. A retamicina total, no segundo estado estacionário, ficou em torno de 0,30 g/L. Esses resultados mostram que altas vazões específicas, que conduzem a altas velocidades específicas de crescimento ($\mu_x = D$, no estado estacionário), prejudicam a síntese de retamicina, por ser esta um metabólito secundário (não associado ao crescimento). Dessa forma, a produção de retamicina é favorecida por baixas vazões específicas de alimentação (D), que conduzem a baixas velocidades específicas de crescimento (μ_x), conforme observado anteriormente nos ensaios descontínuos alimentados.

A figura 4.152 mostra as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de retamicina, durante o ensaio C-3. O valor máximo da velocidade específica de crescimento foi de cerca de $0,30 \text{ h}^{-1}$, em torno das 9 horas de cultivo. Após o estabelecimento do primeiro estado estacionário, o valor de μ_x foi controlado em torno de $0,05 \text{ h}^{-1}$, o que levou a uma velocidade específica de produção de retamicina total de cerca de $0,036 \text{ g/(g.h)}$ neste primeiro estado estacionário. Com a mudança da vazão, a velocidade específica de crescimento aumentou, estabilizando-se em $0,25 \text{ h}^{-1}$, o que provocou uma queda na velocidade específica de produção de retamicina total, que atingiu apenas $0,014 \text{ g/(g.h)}$, no segundo estado estacionário.

A figura 4.153 apresenta a concentração de íons amônio no ensaio C-3. De forma semelhante aos ensaios C-1 e C-2, pode-se observar que a produção do antibiótico iniciou-se entre 18 e 20 horas, instante em que a concentração de amônio apresentava níveis baixos (menor do que 2 mM). Durante todo o primeiro estado estacionário, a concentração de amônio foi muito baixa; na segunda condição, aumentou para cerca de 1,30 mM.

O índice de consistência (K) e o índice de comportamento (n) no ensaio C-3 são mostrados na figura 4.154. Em relação ao índice de consistência (K), o valor atingido na primeira etapa do ensaio, após o estabelecimento do estado estacionário,

foi de cerca de $4,0 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$. No segundo estado estacionário, o valor de K atingiu cerca de $7,2 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$. O índice de comportamento (n) atingiu um valor de 0,35 no primeiro estado estacionário, decaindo para cerca de 0,20 no segundo estado estacionário.

Em relação à respiração celular, a figura 4.155 apresenta a velocidade global de consumo de oxigênio (QO_2X) e a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), durante o ensaio C-3. No primeiro estado estacionário, o valor de QO_2X foi de cerca de $13,0 \text{ mmol}/(\text{L.h})$ e o valor de QO_2 foi de $2,5 \text{ mmol}/(\text{g.h})$. Com o aumento da vazão (D), no segundo estado estacionário ocorreu um aumento no consumo de oxigênio, com QO_2X atingindo cerca de $21,5 \text{ mmol}/(\text{L.h})$ e QO_2 atingindo cerca de $4,0 \text{ mmol}/(\text{g.h})$. Esse maior consumo de oxigênio no segundo estado estacionário também é refletido pela menor concentração de oxigênio dissolvido, como mostrado na figura 4.150.

A figura 4.156 apresenta a porcentagem de cada classe morfológica, em termos de área. Pode-se observar um predomínio de *clumps* durante a primeira fase do ensaio contínuo, com cerca de 90 % do total. Na segunda etapa, com o surgimento de *pellets*, estes passaram a representar a classe morfológica predominante, com cerca de 80 % do total, contra cerca de 16 % de *clumps*. O aumento da porcentagem de *pellets* e diminuição da porcentagem de *clumps* na segunda etapa do processo contínuo provavelmente é devido ao menor tempo de residência nessa segunda etapa, o que leva os *pellets* a serem submetidos a um menor tempo de cisalhamento, diminuindo o rompimento dos mesmos.

Em relação às dimensões dos objetos, os *clumps* apresentaram uma dimensão média em torno de $100 \mu\text{m}$ no primeiro estado estacionário e cerca de $130 \mu\text{m}$ no segundo estado estacionário, diferenças pouco significativas, considerando-se os intervalos de confiança adotados. Os *pellets* apresentaram uma dimensão média em torno de $450 \mu\text{m}$, no segundo estado estacionário, não estando presentes no primeiro estado estacionário. As hifas ramificadas apresentaram um comprimento total de cerca de $130 \mu\text{m}$ na primeira condição, atingindo um valor ligeiramente inferior (de cerca de $80 \mu\text{m}$) na segunda condição. Em relação ao comprimento das hifas não ramificadas, as diferenças obtidas entre os dois estados estacionários foi muito pequena, o mesmo ocorrendo com o número de extremidades e com a unidade de crescimento hifal das hifas ramificadas.

Figura 4.150 Concentração celular (X), concentração de glicose (S) e oxigênio dissolvido (OD), no ensaio C-3.

Figura 4.151 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-3.

Figura 4.152 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-3.

Figura 4.153 Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$), no ensaio C-3.

Figura 4.154 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-3.

Figura 4.155 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-3.

Figura 4.156 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-3.

A comparação entre todos os ensaios contínuos será apresentada no item 4.6.5.

4.6.4 Ensaio contínuo C-4

A fim de ampliar a faixa de vazões específicas de alimentação estudadas, foi realizado o ensaio C-4. Na primeira etapa contínua deste ensaio foi estudada uma vazão bastante baixa ($D = 0,03 \text{ h}^{-1}$) e na segunda etapa, foi utilizada uma vazão $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$, bem próxima da condição de lavagem do reator. A condição de lavagem é aquela na qual $D \geq \mu_{x\max}$. Nessa condição, o único estado estacionário possível é obtido quando a concentração celular no reator decai até zero (estado estacionário de lavagem). Assim, quando D se aproxima do valor de $\mu_{x\max}$, a concentração celular no estado estacionário decai.

A figura 4.157 apresenta a concentração celular (X) e a concentração de substrato (S) durante o ensaio C-4. Em relação à concentração celular pode-se observar que, de forma semelhante aos demais ensaios contínuos, ocorreu uma rápida estabilização, após o início do processo contínuo. Na primeira fase, compreendida entre 16 e 168 horas de cultivo (instantes representados pelas linhas verticais na figura), a concentração celular atingiu um valor de cerca de 4,6 g/L no estado estacionário, ligeiramente inferior à obtida no ensaio C-3. Com a mudança da vazão específica de alimentação (a partir das 168 horas de cultivo) para $0,30 \text{ h}^{-1}$, ocorreu uma queda considerável na concentração celular em estado estacionário (cerca de 2,4 g/L), indicando a proximidade da condição de lavagem do reator. Em relação ao

substrato, a concentração de glicose manteve níveis muito baixos durante o primeiro estado estacionário (cerca de 0,1 g/L), aumentando no segundo estado estacionário para cerca de 6,9 g/L, indicando que para altas vazões específicas de alimentação ocorre uma sobra de substrato não consumido, devido ao baixo tempo de residência no reator, de forma semelhante ao que foi observado no ensaio C-3.

Em relação à produção do antibiótico, a figura 4.158 apresenta os perfis de concentração de retamicina extracelular, intracelular e total durante o ensaio C-4. Após o estabelecimento do primeiro estado estacionário, a concentração de retamicina total foi de cerca de 3,10 g/L, inferior à obtida no ensaio C-3 (primeira etapa). Com o aumento da vazão, no segundo estado estacionário, a produção do antibiótico foi nula, mostrando que altas vazões específicas de alimentação e, conseqüentemente, altas velocidades específicas de crescimento, prejudicam a síntese de retamicina.

As figuras 4.159 a 4.162 apresentam o biorreator, no ensaio C-4, no término da primeira etapa (figura 4.159), quando a produção do antibiótico era alta, e no início da segunda etapa (figuras 4.160 a 4.162). Pode-se observar a gradual perda na produção de retamicina, quando a vazão de alimentação foi aumentada.

A figura 4.163 mostra as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de retamicina, durante o ensaio C-4. O valor máximo da velocidade específica de crescimento foi de cerca de 0,35 h⁻¹, em torno das 8 horas de cultivo. Durante a primeira etapa do processo contínuo, a velocidade específica de crescimento foi controlada em 0,03 h⁻¹. Na segunda etapa, a velocidade específica de crescimento foi controlada em 0,30 h⁻¹. Como o valor máximo de μ_x foi de cerca de 0,35 h⁻¹, maior do que D, não ocorreu lavagem no reator. Em relação à velocidade específica de produção de retamicina total, no primeiro estado estacionário o valor ficou em 0,020 g/(g.h). No segundo estado estacionário, como já destacado anteriormente, não foi detectada a produção do antibiótico.

A figura 4.164 apresenta a concentração de íons amônio no ensaio C-3. Da mesma forma que o ensaio C-3, pode-se observar que a produção do antibiótico iniciou-se entre 18 e 20 horas, instante em que a concentração de amônio apresentava níveis baixos (menor do que 2 mM). Durante todo o primeiro estado estacionário, a concentração de amônio foi muito baixa; na segunda condição, manteve-se em torno de 8,0 mM, concentração mais alta do que a obtida na segunda etapa do ensaio C-3,

reforçando a hipótese de que a limitação pela fonte de nitrogênio desempenha um papel importante na síntese de metabólitos secundários, conforme destacado por Demain; Fang (1995).

O índice de consistência (K) e o índice de comportamento (n) no ensaio C-4 são mostrados na figura 4.165. No primeiro estado estacionário, o valor de K manteve-se em torno de $3,0 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$. No segundo estado estacionário, devido à diminuição na concentração celular, o valor de K decaiu para cerca de $1,0 \text{ dina.s}^n/\text{cm}^2$. Já o valor de n não variou muito de um estado estacionário para outro (0,36 no primeiro e 0,42 no segundo estado estacionário).

Em relação à respiração celular, a figura 4.166 mostra a velocidade global de consumo de oxigênio (QO_2X) e a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), durante o ensaio C-4. No primeiro estado estacionário, o valor de QO_2X foi de cerca de $3,9 \text{ mmol}/(\text{L.h})$ e o valor de QO_2 foi de $0,9 \text{ mmol}/(\text{g.h})$. Com o aumento da vazão (D), no segundo estado estacionário ocorreu um aumento no consumo de oxigênio, com QO_2X atingindo cerca de $16,7 \text{ mmol}/(\text{L.h})$ e QO_2 atingindo cerca de $7,0 \text{ mmol}/(\text{g.h})$.

A figura 4.167 apresenta a porcentagem de cada classe morfológica, em termos de área. Pode-se observar que, no primeiro estado estacionário, houve um crescimento predominantemente na forma de *clumps* (entre 85 % e 90 %), com a presença também de hifas ramificadas (cerca de 12 %). Com o aumento da vazão específica de alimentação e, conseqüentemente com a diminuição do tempo de residência no reator, ocorreu a formação de *pellets*, semelhantemente ao observado no ensaio C-3. No segundo estado estacionário havia cerca de 90 % de *pellets* e 9 % de *clumps*.

Figura 4.157 Concentração celular (X) e concentração de glicose (S), no ensaio C-4.

Figura 4.158 Concentração de retamicina extracelular (Re), concentração de retamicina intracelular (Ri) e concentração de retamicina total (Rt), no ensaio C-4.

Figura 4.159 Biorreator, no ensaio C-4, com 168 horas de cultivo (término da primeira etapa contínua).

Figura 4.160 Biorreator, no ensaio C-4, com 172 horas de cultivo (segunda etapa contínua).

Figura 4.161 Biorreator, no ensaio C-4, com 176 horas de cultivo (segunda etapa contínua).

Figura 4.162 Biorreator, no ensaio C-4, com 180 horas de cultivo (segunda etapa contínua).

Figura 4.163 Velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), velocidade específica de produção de retamicina extracelular (μ_{Re}), velocidade específica de produção de retamicina intracelular (μ_{Ri}), velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), no ensaio C-4.

Figura 4.164 Concentração de íons amônio ($C_{NH_4^+}$), no ensaio C-4.

Figura 4.165 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n), no ensaio C-4.

Figura 4.166 Velocidade de consumo de oxigênio (QO_2X) e velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), no ensaio C-4.

Figura 4.167 Porcentagem de *chumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, no ensaio C-4.

Em relação às dimensões dos objetos, os *clumps* apresentaram uma dimensão média em torno de 100 μm nos dois estados estacionários, sem diferenças significativas, considerando-se os intervalos de confiança adotados. Os *pellets* apresentaram uma dimensão média em torno de 500 μm , no segundo estado estacionário, não estando presentes no primeiro estado estacionário, de forma semelhante ao ocorrido no ensaio C-3. As hifas ramificadas apresentaram um comprimento total entre 80 μm e 100 μm , sem diferenças significativas entre os dois estados estacionários. Em relação ao comprimento das hifas não ramificadas, as diferenças obtidas entre os dois estados estacionários também foi muito pequena, o mesmo ocorrendo com o número de extremidades e com a unidade de crescimento hifal das hifas ramificadas.

4.6.5 Comparação entre os ensaios contínuos

Em relação aos ensaios contínuos, é interessante se fazer uma análise dos resultados em função da vazão específica de alimentação e, conseqüentemente, em função da velocidade específica de crescimento. A tabela 4.4 apresenta um resumo dos resultados obtidos, em estado estacionário, nos ensaios contínuos C-1, C-2, C-3 e C-4, bem como a média de todos os ensaios descontínuos padrão realizados.

A figura 4.168 mostra a variação da concentração celular em estado estacionário em função de D , nos ensaios contínuos. Pode-se observar que, para D entre 0,05 h^{-1} e 0,25 h^{-1} , a concentração celular obtida praticamente não variou, mantendo-se em torno de 5,4 g/L, exceto no ensaio C-2, onde manteve-se em torno de 4,0 g/L. Para $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$, a concentração celular decaiu um pouco (4,6 g/L) e, para $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$, ponto próximo à condição de lavagem do reator, a concentração celular foi bem mais baixa (cerca de 2,4 g/L).

A figura 4.169 apresenta a variação da concentração de glicose, em estado estacionário, em função de D , nos ensaios contínuos. Em relação à glicose, ocorreu um aumento da concentração residual à medida que se aumentou a vazão específica de alimentação. Entretanto, o perfil apresentado mostra um comportamento diferente do previsto por Monod (Bonomi; Schmidell, 2001), com um ponto de inflexão em torno de $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$. Esse comportamento, provavelmente, é devido à presença de outro substrato além da glicose, no caso o extrato de levedura, que está presente no

meio de cultura alimentado ao reator em concentração relativamente alta (5,0 g/L). O perfil de concentração de glicose mostra coerentemente que, quando D tende a $0,35 \text{ h}^{-1}$ (ponto correspondente à condição de lavagem, considerando $\mu_{\text{max}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$), a concentração de substrato tende à concentração de glicose na alimentação (10 g/L).

Tabela 4.4 Resumo dos resultados dos ensaios contínuos C-1, C-2, C-3 e C-4 e média dos ensaios descontínuos padrão.

Parâmetro	C-4a	C-3a	C-1	C-2	C-3b	C-4b	Média dos ensaios descontínuos
$D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	---
$X_f \text{ (g/L)}$	4,60	5,30	5,50	4,00	5,40	2,40	4,79
$S_f \text{ (g/L)}$	0,10	0,95	3,70	4,80	5,60	6,90	---
$Re_f \text{ (g/L)}$	2,50	3,10	1,00	0,30	0,22	0	3,62
$Ri_f \text{ (g/L)}$	0,60	0,75	0,35	0,10	0,08	0	0,97
$Rt_f \text{ (g/L)}$	3,10	3,85	1,35	0,40	0,30	0	4,47
$\mu_x \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,05	0,10	0,20	0,25	0,30	---
$\mu_s \text{ (g/(g.h))}$	0,06	0,09	0,11	0,26	0,20	0,39	---
$\mu_{Re} \text{ (g/(g.h))}$	0,016	0,029	0,018	0,015	0,010	0	---
$\mu_{Ri} \text{ (g/(g.h))}$	0,004	0,007	0,006	0,005	0,004	0	---
$\mu_{Rt} \text{ (g/(g.h))}$	0,020	0,036	0,025	0,020	0,014	0	---
$QO_{2f} \text{ (mmol/(g.h))}$	0,9	2,5	2,5	4,2	4,0	7,0	---
$K_f \text{ (dina.s}^n\text{/cm}^2\text{)}$	3,0	4,0	5,0	3,5	7,2	1,0	6,5
$Y_{x/s} \text{ (g/g)}$	0,46	0,59	0,87	0,77	1,23	0,77	0,43
$Y_{Re/s} \text{ (g/g)}$	0,25	0,34	0,16	0,06	0,05	0	0,34
$Y_{Ri/s} \text{ (g/g)}$	0,06	0,08	0,06	0,02	0,02	0	0,09
$Y_{Rt/s} \text{ (g/g)}$	0,31	0,43	0,21	0,08	0,07	0	0,42
$P_x \text{ (g/(L.h))}$	0,14	0,27	0,55	0,80	1,35	0,72	0,16
$P_{Re} \text{ (g/(L.h))}$	0,08	0,16	0,10	0,06	0,06	0	0,09
$P_{Ri} \text{ (g/(L.h))}$	0,02	0,04	0,04	0,02	0,02	0	0,03
$P_{Rt} \text{ (g/(L.h))}$	0,09	0,19	0,14	0,08	0,08	0	0,11
$PE_{Re} \text{ (g/g)}$	0,54	0,58	0,18	0,075	0,040	0	0,90
$PE_{Ri} \text{ (g/g)}$	0,13	0,14	0,14	0,025	0,015	0	0,22
$PE_{Rt} \text{ (g/g)}$	0,67	0,72	0,24	0,100	0,055	0	1,09

A figura 4.170 apresenta a concentração de íons amônio, obtida em estado estacionário, nos ensaios contínuos, em função de D . De forma semelhante à

concentração de glicose, para baixos valores de D , a concentração de íons amônio manteve valores baixos. Com o aumento de D , a concentração de íons amônio aumentou consideravelmente. Para uma vazão específica de alimentação de $0,30 \text{ h}^{-1}$, correspondente à condição onde não houve produção do antibiótico, a concentração de íons amônio foi relativamente alta (cerca de $8,3 \text{ mM}$), reforçando o fato de que altas concentrações de fonte de nitrogênio prejudicam a síntese de retamicina.

A concentração de retamicina total em função de D , nos ensaios contínuos é apresentada na figura 4.171. A máxima produção de retamicina total ocorreu em $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, ficando em torno de $3,85 \text{ g/L}$. No entanto, esse valor foi menor que o obtido nos ensaios descontínuos padrão (cerca de $4,5 \text{ g/L}$). Para um alto valor de D ($0,30 \text{ h}^{-1}$), próximo à condição de lavagem, praticamente não ocorreu a produção de retamicina. Para uma vazão específica de alimentação baixa ($0,03 \text{ h}^{-1}$), a produção atingiu um valor menor, quando comparado ao valor atingido para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

A figura 4.172 mostra um aumento da velocidade específica de consumo de substrato à medida que ocorreu um aumento da vazão específica de alimentação (D), nos ensaios contínuos. A figura mostra um ajuste linear entre a velocidade específica de consumo de substrato e a vazão específica de alimentação, desconsiderando-se o ponto de $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$. O coeficiente angular ($1,23 = 1/Y_{X/S}$) sugere um fator de conversão substrato a células da ordem de $0,81 \text{ g/g}$, o qual é muito alto. Esse alto valor é explicado pela existência de um outro substrato no meio de cultura (extrato de levedura), o qual também é utilizado para o crescimento. O coeficiente linear ($0,015 \text{ g/(g.h)}$) representa o consumo de glicose para a manutenção celular (m_s).

A figura 4.173 mostra a velocidade específica de produção de retamicina total, em função da vazão específica de alimentação, nos ensaios contínuos. A máxima velocidade específica de produção de retamicina foi obtida para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$. O aumento e a diminuição de D levaram a uma diminuição na velocidade específica de produção do antibiótico, a qual cessou para $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$, por se tratar de um metabólito secundário, conforme discutido anteriormente.

Figura 4.168 Concentração celular no estado estacionário (X_f), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.169 Concentração de substrato no estado estacionário (S_f), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.170 Concentração de íons amônio no estado estacionário (C_{NH4+}), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.171 Concentração de retamicina total no estado estacionário (R_{t_f}), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.172 Velocidade específica de consumo de substrato (μ_s), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.173 Velocidade específica de produção de retamicina total (μ_{Rt}), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.174 Velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.175 Fator de conversão substrato a células ($Y_{x/s}$), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.176 Fator de conversão substrato a retamicina total ($Y_{Rt/s}$), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.177 Produtividade em células (P_x) e Produtividade em retamicina total (PR_t), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.178 Produção específica em retamicina total (PE_{Rt}), em função da vazão específica de alimentação (D).

Figura 4.179 Porcentagem de *clumps* (FA_{cl}), de *pellets* (FA_p), de hifas ramificadas (FA_{hr}) e de hifas não ramificadas (FA_{hnr}), em termos de área, em função da vazão específica de alimentação (D).

Na figura 4.174 é apresentada a velocidade específica de consumo de oxigênio, em função da vazão específica de alimentação. De uma forma geral, o valor de QO_2 aumentou com o aumento da vazão específica de alimentação e, conseqüentemente, com o aumento da velocidade específica de crescimento. Na figura, também é apresentado um ajuste linear entre QO_2 e D (μ_x), de onde se pode tirar uma estimativa do fator de conversão oxigênio a células (Y_O , da ordem de 0,058 g/mmol) e o consumo de oxigênio para manutenção celular (m_O , da ordem de 0,83 mmol/(g.h)). Esses valores estão de acordo com os obtidos por Martins (2001), para cultivos de *Streptomyces olindensis* So20 ($Y_O = 0,066$ g/mmol e $m_O = 0,63$ mmol/(g.h)).

A figura 4.175 mostra o fator de conversão substrato a células, em função da vazão específica de alimentação, nos ensaios contínuos. O fator de conversão máximo foi obtido para $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$, ficando em torno de 1,23 g/g. Esse alto valor do fator de conversão substrato a células mostra que existe uma outra fonte de carbono sendo consumida (extrato de levedura), juntamente com a glicose. Convém destacar que o cálculo deste fator de conversão leva em conta apenas o consumo de glicose, não considerando o extrato de levedura, cuja concentração não foi medida durante os cultivos. Pode-se notar que, em todos os ensaios contínuos, o fator de conversão substrato a células apresentou valores maiores do que os ensaios descontínuos padrão. Para valores de D entre $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,25 \text{ h}^{-1}$, como destacado anteriormente, a concentração celular em estado estacionário ficou praticamente constante, no entanto, a concentração de glicose variou significativamente, o que é refletido pelo fator de conversão substrato a celular, reforçando o fato de que o extrato de levedura é utilizado para o crescimento celular.

A figura 4.176 mostra o fator de conversão substrato a retamicina total, em função da vazão específica de alimentação (D), nos ensaios contínuos. De forma semelhante ao observado na produção de retamicina, o fator de conversão máximo foi obtido para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, decaindo para maiores valores de D e anulando-se para $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$. Em todos os ensaios, o fator de conversão substrato a retamicina total ficou abaixo da média obtida nos ensaios descontínuos padrão (linha tracejada), exceto para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, onde o valor obtido foi semelhante à média dos descontínuos.

Embora a produção de retamicina tenha sido menor nos ensaios contínuos do que nos descontínuos padrão, em termos de produtividade em retamicina total, a figura 4.177 mostra que para valores de $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ e $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$, a produtividade em retamicina total atingiu valores maiores do que os obtidos nos ensaios descontínuos padrão (cerca de 73 % e 27 % maiores do que os ensaios descontínuos, respectivamente). De forma semelhante ao observado na produção de retamicina, a máxima produtividade em retamicina foi obtida para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, decaindo tanto para maiores como para menores valores de D e anulando-se para $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$. A figura 4.177 também mostra a produtividade em células, nos ensaios contínuos, em função de D . Essa figura apresenta o comportamento típico de um processo de produção de um metabólito secundário, como é o caso da retamicina (Facciotti, 2001). Para altos valores de D , o crescimento celular é favorecido, o que conduz a uma alta produtividade em células. Por outro lado, para baixos valores de D , a produção do antibiótico é favorecida, o que leva a altas produtividades em retamicina total.

A figura 4.178 apresenta a produção específica em retamicina total, nos ensaios contínuos, em função de D . A máxima produção específica foi obtida com uma vazão específica de alimentação de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Os valores obtidos nos ensaios contínuos foram inferiores à média dos ensaios descontínuos padrão.

A figura 4.179 apresenta a porcentagem de cada classe morfológica, em termos de área, em função da vazão específica de alimentação, nos ensaios contínuos. Pode-se observar que, para $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$, a classe morfológica predominante foi a de *clumps*. Para maiores valores de D e, conseqüentemente, menores tempos de residência, ocorreu uma diminuição na porcentagem de *clumps* e um correspondente aumento na porcentagem de *pellets*. Para valores de D menores do que $0,10 \text{ h}^{-1}$ (altos tempos de residência no reator), ocorreu uma diminuição na porcentagem de *clumps* e um correspondente aumento na porcentagem de hifas ramificadas. Esses resultados sugerem que o cisalhamento é importante no processo de rompimento de *pellets* e *clumps*, sendo responsável pela morfologia obtida no cultivo e que a produção de retamicina pode ser favorecida com o crescimento na forma de *clumps*.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos permitiram as seguintes conclusões:

a) Os ensaios descontínuos alimentados DA-1, DA-2 e DA-3b, onde a velocidade específica de crescimento foi fixada em um valor baixo ($0,03 \text{ h}^{-1}$) apresentaram resultados superiores em termos produção de retamicina total, em relação aos ensaios descontínuos padrão realizados em paralelo;

b) Nos ensaios descontínuos alimentados onde a alimentação foi realizada com apenas a concentração de glicose quadruplicada (DA-3, DA-4 e DA-5) não foi possível o controle da velocidade específica de crescimento no valor desejado, devido à limitação do crescimento por outros nutrientes, o que elevou a uma alta produção do antibiótico retamicina, mostrando que limitações nutricionais favorecem a produção deste metabólito;

c) Nos ensaios descontínuos alimentados onde a alimentação foi realizada com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas (DA-3b, DA-4b e DA-5b) foi possível o controle da velocidade específica de crescimento no valor desejado, devido à presença de apenas um substrato limitante (glicose). Nestes ensaios, a produção de retamicina foi favorecida pela manutenção de uma baixa velocidade específica de crescimento (ensaio DA-3b), enquanto a manutenção de uma alta velocidade específica de crescimento (ensaio DA-5b) prejudicou a síntese do antibiótico;

d) A existência de limitações nutricionais é um fator importante no processo de produção de retamicina. O início da produção de retamicina está ligado à limitação por nutrientes, provavelmente a fonte de nitrogênio, o que é evidenciado pelos perfis de concentração de íons amônio no caldo durante os cultivos. Estas limitações prejudicam o controle da velocidade específica de crescimento nos processos descontínuos alimentados, provocando um acúmulo de glicose no meio de cultivo durante a alimentação;

e) Alta concentração de glicose não é um fator que prejudica a produção de retamicina, uma vez que se observou o início da produção de antibiótico com altas concentrações de glicose;

- f) A concentração de retamicina extracelular representa cerca de 84 % da concentração de retamicina total;
- g) As propriedades reológicas do caldo de fermentação (K e n) podem ser relacionadas com a concentração celular, por meio de equações de potência;
- h) A velocidade específica de produção de retamicina total pode ser relacionada com a velocidade específica de crescimento, por meio de uma equação exponencial inversa, durante a fase de produção, nos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos padrão. Dessa forma, a velocidade específica de produção de retamicina total aumenta com a diminuição da velocidade específica de crescimento, comportamento típico de um metabólito secundário;
- i) O critério de classificação morfológica desenvolvido mostrou-se adequado para a análise da morfologia durante os cultivos;
- j) No início dos ensaios descontínuos alimentados e descontínuos, houve um predomínio de *pellets* e *clumps*. Com o decorrer dos cultivos, o rompimento de *pellets* devido ao cisalhamento levou a um crescimento predominantemente na forma de *clumps*;
- k) As variações nas dimensões do microrganismo não foram muito grandes, levando-se em conta os intervalos de confiança adotados. Em geral, a dimensão média de *clumps* diminuiu ligeiramente ao longo dos cultivos, provavelmente devido ao cisalhamento no reator. O comprimento total de hifas ramificadas, em geral, aumentou durante a fase de crescimento, diminuindo no final do cultivo. Os outros parâmetros morfológicos (dimensão média de *pellets*, comprimento total de hifas não ramificadas, número de extremidades e unidade de crescimento hifal de hifas ramificadas) não apresentaram variações significativas durante os ensaios;
- l) A condução do processo na forma descontínua alimentada pode ser interessante no processo de produção de retamicina, conduzindo a maiores concentrações desse antibiótico, desde que a alimentação seja adequada (manutenção de baixos valores de velocidade específica de crescimento e limitação por nutrientes).

Os resultados obtidos nos ensaios contínuos permitiram as seguintes conclusões:

m) A implementação do sistema contínuo não apresentou problemas operacionais sérios, sendo possível a obtenção de estados estacionários bem definidos em todos os ensaios contínuos;

n) A concentração celular obtida em estado estacionário praticamente não foi afetada pelo aumento da vazão específica de alimentação e, conseqüentemente da velocidade específica de crescimento, entre $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,25 \text{ h}^{-1}$; o aumento de D para $0,30 \text{ h}^{-1}$ conduziu a uma diminuição da concentração celular, devido à proximidade da condição de lavagem;

o) A concentração de glicose aumentou com o aumento da vazão específica de alimentação, o que levou à superestimação dos fatores de conversão substrato a células, mostrando que outra fonte de carbono (extrato de levedura) é também consumida para o crescimento;

p) O perfil de concentração de glicose em função de D não segue o modelo previsto por Monod, uma vez que existe outro substrato (extrato de levedura) sendo consumido para o crescimento;

q) A máxima produção de retamicina foi obtida para um valor de D de $0,05 \text{ h}^{-1}$, tanto em termos de concentração como em termos de produtividade e produção específica em retamicina total; o aumento de D provocou a diminuição na produção, a qual cessou completamente para $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$;

r) Em termos de produção de retamicina, os ensaios contínuos apresentaram resultados inferiores aos ensaios descontínuos padrão. Por outro lado, em termos de produtividades, os ensaios contínuos com valores de D de $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,10 \text{ h}^{-1}$ apresentaram resultados superiores aos ensaios descontínuos padrão;

s) O controle da velocidade específica de crescimento é fundamental no processo de produção do antibiótico retamicina. O aumento da velocidade específica de crescimento mostrou-se prejudicial à síntese de retamicina, por tratar-se de um metabólito secundário. Portanto, é desejável um controle da velocidade específica de crescimento em valores baixos (entre $0,03 \text{ h}^{-1}$ e $0,05 \text{ h}^{-1}$), tanto em processos descontínuos alimentados como em processos contínuos;

t) A concentração de íons amônio também aumentou com o aumento da vazão específica de alimentação; em todos os ensaios onde houve produção de retamicina, a concentração de íons amônio esteve abaixo de 2,0 mM;

u) A velocidade específica de consumo de oxigênio aumentou com o aumento da vazão específica de alimentação e, conseqüentemente com o aumento da velocidade específica de crescimento;

v) A morfologia é influenciada pela vazão específica de alimentação: altos valores de D, que correspondem a baixos tempos de residência, conduzem a uma morfologia na forma de *pellets*; baixos valores de D (altos tempos de residência) conduzem a uma morfologia na forma de *clumps* e hifas livres, devido ao rompimento de *pellets*;

w) O cisalhamento no interior do reator leva ao rompimento de *pellets* e à formação de *clumps* e hifas livres. Nos ensaios onde ocorreu maior produção do antibiótico, o crescimento foi predominantemente na forma de *clumps*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, H.L.; THOMAS, C.R. The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, n.5, p.707-712, 1988.
- AGUERO, J.M.Z. **Estudo da inativação da glicoamilase e da influência de fosfatos na produção de enzimas em cultivos de *Aspergillus awamori***. 1998. 142p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1998.
- AIKAWA, M. Rearranjos no genoma de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, produtor do antibiótico antitumoral retamicina, analisado por PFGE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., Salvador, 1999. **Resumo**. Salvador: SBM, 1999. p. 221.
- ALLEN, D.G.; ROBINSON, C.W. Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. **Chemical Engineering Science**, v.45, n. 1, p.37-48, 1990.
- AMANULLAH, A.; BLAIR, R.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.62, n.4, p.434-446, 1999.
- AMANULLAH, A.; JÜSTEN, P.; DAVIES, A.; PAUL, G.C.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, n.2, p.109-114, 2000.
- ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, EMBRAPA; CNPMA, 1998. p. 351-367.
- ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FANTIN, G.; GREIN, A.; OREZZI, P.; POL, C.; SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.11, n.6, p.1101-1110, 1969.
- ASFORA, J.J.; SANTANA, C.F.; LIMA, O.G. Primeiras observações com o uso da retamicina em pacientes portadores de leucemias agudas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.12, n.1/2, p.89-99, 1972.
- ATES, S.; ELIBOL, M.; MAVITUNA, F. Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* in batch and fed-batch cultures. **Process Biochemistry**, v.32, n.4, p.273-278, 1997.
- BADINO JR, A.C.; FACCIOITI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. **Biotechnology Techniques**, v.13, n.10, p.723-726, 1999.

- BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, v.97, p.142-145, 1972.
- 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**, v.37, n.5, p.456-462, 1991.
- BETINA, V. Differentiation and secondary metabolism in some prokaryotes and fungi. **Folia Microbiologica**, v.40, n.1, p.51-67, 1995.
- BHATNAGAR, R.K.; DOULL, J.L.; VINING, L.C. Role of the carbon source in regulating chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in batch and continuous cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, v.34, n.11, p.1217-1223, 1988.
- BIBB, M. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology**, v.142, pt.6, p.1335-1344, 1996.
- BIEBER, L.W.; SILVA FILHO, A.A.; SILVA, E.C.; MÉLLO, J.F.; LYRA, F.D.A.; NASCIMENTO, M.S.; BOTTA, B.; ANGELIS, F. The anthracyclenic complex retamycin, 1. Structure, determination of the major constituents. **Journal of Natural Products**, v.52, n.2, p.385-388, 1989.
- BIRNBAUM, S.; BAILEY, J.E. Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, n.8, p.736-745, 1991.
- BITTNER, C.; WEHNERT, G.; SCHEPER, T. In situ microscopy for on-line determination of biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v.60, n.1, p.24-35, 1998.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.(coord.) **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**, São Paulo ,Edgard Blücher, 2001. v.2 p.,123-178.
- BRAUN, S.; VECHT-LIFSHITZ, S.E. Mycelial morphology and metabolite production. **Trends in Biotechnology**, v.9, p.37-48, 1990.
- BU'LOCK, J.D. **Essays in biosynthesis and microbial development**. New York: Willey, 1967.
- BU'LOCK, J.D. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v.3, p.293-342, 1961.
- CARLSEN, M.; SPOHR, A.B.; NIELSEN, J. Morphology and physiology of an alpha-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, n.3, p.266-276, 1996.
- CASTILLO, I.D.S. **Cultivo de Escherichia coli recombinante: desenvolvimento de estratégia para o crescimento e indução à síntese de Troponina C**. 1997. 1v. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.
- CHATER, K.F. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. **Trends in Genetic**, v.5, p.144-156, 1989.

- COTIAS, C.T.; SANTANA, C.F.; PINTO, K.V. Prevenção das arritmias produzidas pela intoxicação crônica com a retamicina (complexo) pela utilização dos bloqueadores adrenérgicos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.11, n.1, p.3-13, 1971.
- COX, P.W.; THOMAS, C.R. Assessment of the activity of filamentous fungi using Mag Fura. **Mycological Research**, v.103, pt.6, p.757-763, 1999.
- CUI, Y.Q.; LANS, R.G.J.M.; LUYBEN, K.A.M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.57, n.4, p.409-419, 1998.
- DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTÒLO, G.B.; ALBUQUERQUE, I.L.; LYRA, F.D.A.; LIMA, O.G. Sulle composizioni della retamicina, un complesso antibiotico ed attività antitumorale prodotto da *Streptomyces olindensis*, nov. sp. (DAUFPE 5622). **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.6, n.6, p.357-364, 1970.
- DEMAIN, A.L. Function of secondary metabolites. In: HERSHBERGER, C.L.; QUENEER, S.W.; HEGEMAN, G. **Genetic and molecular biology of industrial microorganisms**. Washington, American Society for Microbiology, 1989. p.1-11
- DEMAIN, A.L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. **Actinomycetologica**, v.9, n.2, p.98-117, 1995.
- EL KHADEM, H.S.; MATSUURA, D.; SWARTZ, D.L.; CERMAK, R. Anthracyclines analogs modified in the sugar moiety. In: _____. **Anthracycline antibiotics**. New York; London: Academic Press, 1982. 285p
- ENDO, H.; SUZUKI, M.; SODE, K.; TAMIYA, E.; KARUBE, I. Rapid determination of plasmid-carrying yeast cells by using an imaging sensor system. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, n.11, p.1331-1336, 1991.
- ESMANHOTO, E. **Purificação de retamicina através de extração em sistemas de duas fases aquosas**. 2002. 80p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.
- FACCIOTTI, M.C.R. **Análise do desempenho de biorreatores**. 1997. 1v. Tese (Livro-Docência) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.
- FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.) **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. Edgard Blücher, São Paulo, 2001. v.2 p.,223-246
- FURLAN, R.L. **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.; BENAVENTE, A.C.N.M.B.; LATORRE, L.B.; KATO, M.J.; MALDONADO, G.P. Purificação química e testes de atividade biológica do complexo antitumoral retamicina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, Salvador, 1999. **Resumo**. Salvador, SBM,1999. p. 184.

- GARRIDO, L.M. **Construção de uma biblioteca genômica de *Streptomyces olindensis* e triagem de clones envolvidos na biossíntese do antitumoral retamicina.** 2000. 63p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.
- GIL, J.; WU, H.; WANG, B.Y. Image analysis and morphometry in the diagnosis of breast cancer. **Microscopy Research and Technique**, v.59, n.2, p.109-118, 2002.
- GIRIDHAR, R.; SRIVASTAVA, A.K. Computer coupled substrate feeding strategies for efficient conversion of D-sorbitol to L-sorbose in fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v.36, n.8/9, p.829-834, 2001.
- GOMES, N.C. **Caracterização da instabilidade genética de *Streptomyces olindensis* produtor do antitumoral retamicina.** 1999. 83p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.
- GÓMEZ, R.; SCHNABEL, I.; GARRIDO, J. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.10, n.3, p.188-191, 1988.
- GORDILLO, M.A.; SANZ, A.; SÁNCHEZ, A.; VALERO, F.; MONTESINOS, J.L.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. **Biotechnology and Bioengineering**, v.60, n.2, p.156-168, 1998.
- GRAFE, U.; DORNBERGER, K.; SALUZ, H.P. Biotechnical drugs as antitumor agents. In: REHM, H.-J. ; REED, G. ; KLEIKAUF, H. ; DÖHREN, H. (ed.). **Products of secondary metabolism.** Weinheim: VCH, 1997. p.641-706. (Biotechnology, vol 7)
- GRAY, P.P.; BHUWAPATHANAPUN, S. Production of the macrolide antibiotic tylosin in batch and chemostat cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, n.9, p.1785-1804, 1980.
- GREIN, A. Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peuceitius*. **Advances in Applied Microbiology**, v.32, p.203-214, 1987.
- 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.
- GULIK, W.M.; LAAT, W.T.A.M.; VINKE, J.L.; HEIJNEN, J.J. Application of metabolic flux analysis for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of Penicillin-G. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, n.6, p.602-618, 2000.
- 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**, v.80, n.6, p.677-684, 2002.

- HEYDARIAN, S.M.; ISON, A.P.; LILLY, M.D.; SHAMLOU, A. Turbulent breakage of filamentous bacteria in mechanically agitated batch culture. **Chemical Engineering Science**, v.55, n.10, p.1775-1784, 2000.
- HULS, P.G.; NANNINGA, N.; SPRONSEN, E.A.; VALKENBURG, J.A.C.; VISCHER, N.O.E.; WOLDRINGH, C.L. A computer-aided measuring system for the characterization of yeast populations combining 2D-image analysis, electronic particle counter, and flow cytometry. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n.3, p.343-350, 1992.
- JAMES, P.D.A.; EDWARDS, C.; DAWSON, M. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. **Journal of General Microbiology**, v.137, pt.7, p.1715-1720, 1991.
- JOHANSEN, C.L.; COOLEN, L.; HUNIK, J.H. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. **Biotechnology Progress**, v.14, n.2, p.233-240, 1998.
- JOHDO, O.; TONE, H.; OKAMOTO, R.; YOSHIMOTO, A.; TAKEUCHI, T. Production of new anthracycline antibiotics by microbial 4-O-methylation using a specific daunorubicin-negative mutant. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n.12, p.1837-1847, 1992.
- JONSBUR, E.; MCINTYRE, M.; NIELSEN, J. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. **Journal of Biotechnology**, v.95, n.2, p.133-144, 2002.
- KOJIRI, K.; ARAKAWA, H.; SATOH, F.; KAWAMURA, K.; OKURA, A.; SUDA, H.; OKANISHI, M. New antitumor substances, BE-12406A and BE-12406B, produced by a streptomycete. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical, and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, n.10, p.1054-1060, 1991.
- LAACK, J.A.W.M.; WESTPHAL, J.R.; SCHALKWIJK, L.J.M.; PAHLPLATZ, M.M.; RUITER, D.J.; WAAL, R.M.W.; WILDE, P.C.M. An improved procedure to quantify tumour vascularity using true colour image analysis. Comparison with the manual hot-spot procedure in a human melanoma xenograft model. **Journal of Pathology**, v.184, n.2, p.136-143, 1998.
- LATORRE, L.R. **Purificação e caracterização de antraciclinas antibióticas de uma linhagem mutante de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622**. 2001. 71p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
- LEBRIHI, A.; LAMSAIF, D.; LEFEBVRE G.; GERMAIN, P. Effect of ammonium ion on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, n.3, p.382-387, 1992.
- LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the order *Actinomycetales*. In: STARR, M.P.; STALP, H.; TRYPER, H.G.; BALAWI, A.; SCHLEGEL, H.G. **The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. New York, Springer-Verlag, 1981.

- LEE, S.H. Ammonium ion affecting tylosin production by *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 in continuous culture. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.5, p.349-352, 1997.
- LEICA IMAGE SYSTEMS. **LEICA QWin User Guide**. 1996.
- LI, Z.J.; SHUKLA, V.; FORDYCE, A.; PEDERSEN, A.G.; WENGER, K.S.; MARTEN, M.R. Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale. **Biotechnology and Bioengineering**, v.70, n.3, p.300-312, 2000.
- 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**, v.9, n.1-2, p.27-37, 1969.
- LIMA, R.M.O.C.; NASCIMENTO, S.C.; BIEBER, L.W.; SOUZA, I.A. Ação citotóxica e antitumoral do complexo antraciclínico retamicina. **Revista Portuguesa de Farmacia**, v.17, n.3, p.23-25, 1992.
- LYRA, F.D.A.; ARAÚJO, J.M.; LIMA, O.G.; ANDRADE, A.L.; SCHUMACHER, I.E. Estudo taxonômico de três cepas de *Streptomyces*, produtoras de antibióticos do grupo das antraciclínas, portadores de ação antitumoral. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.8, n.1-2, p.61-71, 1968.
- MARTIN, J.F. Control of antibiotic synthesis by phosphate. **Advances in Biochemical Engineering**, v.6, p.105-127, 1977.
- 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.D.; TONSO, A.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Efeito do controle da concentração de oxigênio dissolvido sobre o crescimento e a produção do antibiótico retamicina em cultivos de *Streptomyces olindensis* So20. Trabalho apresentado ao: 14º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, 2002. Não publicado.
- McINTYRE, J.J.; BUNCH, A.W.; BULL, A.T. Vancomycin production is enhanced in chemostat culture with biomass-recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, v.62, n.5, p.576-582, 1999.
- McNEIL, B.; BERRY, D.R.; HARVEY, L.M.; GRANT, A.; WHITE, S. Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysigenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.57, n.3, p.297-305, 1998.
- MELZUCH, K.; MATTOS, M.J.T.; NEIJSSSEL, O.M. Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) grown in chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, n.6, p.577-582, 1997.
- METZ, B.; BRUIJN, E.W.; SUIJDAM, J.C. Method for quantitative representation of the morphology of molds. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, n.1, p.149-162, 1981.

- MOHSENI, M.; ALLEN, D.G. The effect of particle morphology and concentration on the directly measured yield stress in filamentous suspensions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.48, n.3, p.257-265, 1995.
- MONNERET, C. Recent developments in the field of antitumour anthracyclines. **European Journal of Medical Chemistry**, v.36, n.6, p.483-493, 2001.
- NIEMI, J.; YLIHONKO, K.; HAKALA, J.; PÄRSSINEN, R.; KOPIO, A.; MÄNTSÄLÄ, P. Hybrid anthracycline antibiotics: production of new anthracyclines by cloned genes from *Streptomyces purpurascens* in *Streptomyces galilaeus*. **Microbiology**, v.140, pt.6, p.1351-1358, 1994.
- NIGAR, E.; DERVAN, P.A. Quantitative assessment os basement membranes in soft tissue tumors. Computerized image analysis of laminin and type IV collagen. **Journal of Pathology**, v.185, n.2, p.184-187, 1998.
- OLSVIK, E.; TUCKER, K.G.; THOMAS, C.R.; KRISTIANSEN, B. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, n.9, p.1046-1052, 1993.
- PACKER, H.L.; KESHAVARZ-MOORE, E.; LILLY, M.D.; THOMAS, C.R. Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, n.4, p.384-391, 1992.
- PACKER, H.L.; THOMAS, C.R. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automated image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, n.9, p.870-881, 1990.
- PADILLA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.(ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, EMBRAPA; CNPMA, 1998. p. 327-347
- 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. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.
- PAMBOUKIAN, C.R.D.; FACCIOTTI, M.C.R. Correlation between pellet size and glucoamylase production in submerged cultures of *Aspergillus awamori* . **Revista de Microbiologia**, v.29, n.1, p.23-26, 1998.
- PAMBOUKIAN, C.R.D.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.15, n.3, p.265-272, 1998.
- 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**, v.33, n.1, p.17-21, 2002.

- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. **Process Biochemistry**, v.35, n.3/4, p.359-366, 1999.
- PAUL, G.C.; KENT, C.A.; THOMAS, C.R. Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.44, n.5, p.655-650, 1994.
- PAUL, G.C.; KENT, C.A.; THOMAS, C.R. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, n.1, p.11-23, 1993.
- PAUL, G.C.; PRIEDE, M.A.; THOMAS, C.R. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v.3, n.2, p.121-129, 1999.
- PAUL, G.C.; SYDDALL, M.T.; KENT, C.A.; THOMAS, C.R. A structured model for penicillin production on mixed substrates. **Biochemical Engineering Journal**, v.2, n.1, p.11-21, 1998.
- PAUL, G.C.; THOMAS, C.R. Characterization of mycelial morphology using image analysis. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.60, p.1-59, 1998.
- PEDERSEN, A.G.; BUNDGAARD-NIELSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, n.1, p.162-164, 1993.
- PERRY, R.H; CHILTON, C.H.(ed.) **Chemical engineer's handbook**. 5 ed. London, McGraw-Hill, 1973.
- 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**, v.70, p.12-21, 2001. Disponível em: <http://dequim.ist.utl.pt/bbio/70/pdf/Analise_Digital_de_Imagem.pdf>. Acesso em: 24/12/2002.
- PIRT, S.J. **Principles of microbes and cell cultivation**. New York, Wiley, 1975.
- PODCZECK, F.; RAHMAN, S.R.; NEWTON, J.M. Evaluation of a standardized procedure to assess the shape of pellets using image analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.192, n.2, p.123-138, 1999.
- PONS, M.N.; DROUIN, J.F.; LOUVEL, L.; VANHOUTTE, B.; VIVIER, H.; GERMAIN, P. Physiological investigations by image analysis. **Journal of Biotechnology**, v.65, n.1, p.3-14, 1998.
- QUEIROZ, M.C.R.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Rheological changes of *Aspergillus awamori* broth during amyloglucosidase production. **Biotechnology Letters**, v.19, n.2, p.167-170, 1997.
- RATLEDGE, C. Secondary products and fungal biochemistry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.56, n.2, p.203-222, 1993.

- REICHL, U.; KING, R.; GILLES, E.D. Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, n.2, p.164-170, 1992.
- RUOHANG, W.; WEBB, C. Effect of cell concentration on the rheology of glucoamylase fermentation broth. **Biotechnology Techniques**, v.9, n.1, p.55-58, 1995.
- SARRÀ, M.; CASAS, C.; GÒDIA, F. Continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* TK21 pellets in a three-phase fluidized-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.53, n.6, p.601-609, 1997.
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.) **Biociologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo, Edgard Blücher, 2001. v.2, p.277-331
- SCHMIDELL, W.; FACHINI, E.R.; FACCIOTTI, M.C.R.; KILIKIAN, B.V. Rheological behavior studies on *Aspergillus* sp submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v.25, n.2, p.126-128, 1994.
- SEBASTINE, I.M.; STOCKS, S.M.; COX, P.W.; THOMAS, C.R. Characterization of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis. **Biotechnology Techniques**, v.13, n.6, p.419-423, 1999.
- SEIDEL, G.; TOLLNICK, C.; BEYER, M.; FAHIMI, Y.; SCHÜGERL, K. Process engineering aspects of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. Part I. Application of complex media. **Process Biochemistry**, v.38, n.2, p.229-239, 2002a.
- SEIDEL, G.; TOLLNICK, C.; BEYER, M.; SCHÜGERL, K. Process engineering aspects of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. Part II. Cultivation in diluted and enriched complex media. **Process Biochemistry**, v.38, n.2, p.241-248, 2002b.
- SILVA, P.M.; GUIMARÃES, L.M.; MARTINS, R.A. FACCIOTTI, M.C.R. Estudo comparativo de diferentes metodologias para a extração e purificação do antibiótico retamicina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 8., São Carlos, 2000. **8º SIICUSP: resumos**. São Paulo: EPUSP, 2000. CD-ROM.
- SIMÕES, D.A.; ARROYO, G.; URIBELARREA, J.L. **Logiciel de Lissage**. [S.l.], [S.n.], 1994. Software.
- SOLÓRZANO, C.O.; COSTES, S.; CALLAHAN, D.E.; PARVIN, B.; BARCELLOS-HOFF, M.H. Applications of quantitative digital image analysis to breast cancer research. **Microscopy Research and Technique**, v.59, n.2, p.119-127, 2002.
- SPOHR, A.; DAM-MIKKELSEN, C.; CARLSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. On-line study of fungal morphology during submerged growth in a small flow-through cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, n.5, p.541-553, 1998.

- STROHL, W.R.; BARTEL, P.L.; CONNORS, N.C. Biosynthesis of anthracyclines: analysis of mutants of *Streptomyces* sp. Strain C5 blocked in daunomycin biosynthesis. **Journal of General Microbiology**, v.136, pt.9, p.1877-1886, 1990.
- 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**, v.83, n.6, 523-528, 1997.
- THOMAS, C.R. Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. **Trends in Biotechnology**, v.10, n.10, p.343-348, 1992.
- THOMAS, C.R.; PAUL, G.C. Applications of image analysis in cell technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.7, n.1, p.35-45, 1996.
- TRESKATIS, S.K.; ORGELDINGER, V.; WOLF, H.; GILLES, E.D. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. **Biotechnology and Bioengineering**, v.53, n.2, p.191-201, 1997.
- TUCKER, K.G.; KELLY, T.; DELGRAZIA, P.; THOMAS, C.R. Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. **Biotechnology Progress**, v.8, n.4, p.353-359, 1992.
- 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**, v.48, n.1, p.1-11, 1995.
- VINING, L.C. Secondary metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G.(ed.) **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1986. v.4, p.21-29,.
- WANG, W. Image analysis of aggregates. **Computers and Geosciences**, v.25, p. 71-81, 1999.
- WARREN, S.J.; KESHAVARZ-MOORE, E.; SHAMLOU, P.A.; LILLY, M.D.; THOMAS, C.R.; DIXON, K. Rheologies and morphologies of three Actinomycetes in submerged culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.45, n.1, p.80-85, 1995.
- WHITAKER, A. Fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v.15 , n.4, p.10-15, 1980.
- YAMANÉ, T.; SHIMIZU, S. Fed-Batch techniques in microbial processes. **Advances in Biochemical Engineering**, v.30, p.148-194, 1984.
- YANG, Y.K.; MORIKAWA, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA, K.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y. Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*.. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.81, n.1, p.7-12, 1996.
- YOSHIMOTO, A.; FUJII, S.; JOHDO, O.; KUBO, K.; ISHIKURA, K.; NAGANAWA, H.; SAWA, T.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. Intensely potent anthracycline antibiotic oxaunomycin produced by a blocked mutant of the daunorubicin-producing microorganism. **The Journal of Antibiotics**, v. 39, n.7, p.902-909, 1986.

- YOSHIMOTO, A.; JOHDO, O.; NISHIDA, H.; OKAMOTO, R.; TAKEUCHI, T. Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. III. New anthracycline metabolites produced by blocked mutants 4L-660 and YDK-18. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, n.11, p.1758-1761, 1993.
- ZALEWSKI, K.; BUCHHOLZ, R. Morphological analysis of yeast cells using an automated image processing system. **Journal of Biotechnology**, v.48, n.1/2, p.43-49, 1996.

Apêndice A

Equacionamento dos reatores descontínuos alimentados

Este apêndice apresenta o equacionamento detalhado relativo aos reatores descontínuos alimentados, com vazão exponencial de alimentação, como apresentado por Facciotti, 1997.

O balanço material de células e de substrato no reator descontínuo alimentado pode ser escrito da seguinte forma, em termos de massas totais de células e de substrato limitante, uma vez que o volume do reator é variável:

$$\frac{d X_m}{dt} = \mu_X \cdot X_m \quad (\text{A.1})$$

$$\frac{d S_m}{dt} = \phi \cdot S_i - \frac{\mu_X \cdot X_m}{Y_{X/S}} \quad (\text{A.2})$$

Onde:

S_i = concentração de substrato limitante na alimentação (g/L);

S_m = massa total de substrato limitante no reator no instante t (g);

X_m = massa total de células no reator no instante t (g);

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato a células (g/g);

Φ = vazão volumétrica de alimentação (L/h);

μ_X = velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

Nesse equacionamento não está sendo considerado o consumo de substrato para a manutenção celular, bem como a perda de viabilidade celular.

As equações A.1 e A.2 podem também ser escritas em termos de concentrações, conduzindo a:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_X - D) \cdot X \quad (\text{A.3})$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_i - S) - \frac{\mu_X \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (\text{A.4})$$

Onde:

$$D = \frac{\phi}{V} \cong \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} = \text{vazão específica de alimentação (h}^{-1}\text{)};$$

$$X = X_m/V = \text{concentração celular no reator no instante } t \text{ (g/L)};$$

$$S = S_m/V = \text{concentração de substrato limitante no reator no instante } t \text{ (g/L)}.$$

A partir dessas equações pode-se estabelecer as condições necessárias para o controle da concentração de substrato limitante no reator. Com isso, também é possível o controle da velocidade específica de crescimento em um determinado valor desejado, que seja interessante para o acúmulo do metabólito de interesse. O controle da velocidade específica de crescimento implica na manutenção de uma concentração constante de substrato limitante no reator, desde que não haja limitação por outros nutrientes, por meio do emprego de uma vazão de alimentação exponencial, da seguinte forma:

$$\phi = A \cdot e^{B \cdot (t-t_0)} \quad (\text{A.5})$$

Se for imposta uma concentração de substrato constante $S = S_0$, correspondente à concentração de substrato limitante no instante de início da alimentação (instante t_0), obtém-se:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\phi}{V} \cdot (S_i - S_0) - \frac{\mu_X \cdot X}{Y_{X/S}} = 0 \quad (\text{A.6})$$

Portanto, chega-se à seguinte equação:

$$\phi = \frac{V \cdot X \cdot \mu_X}{Y_{X/S} \cdot (S_i - S_0)} \quad (\text{A.7})$$

Considerando-se um crescimento exponencial com $\mu_X = \mu_{X0}$, constante, obtém-se:

$$X \cdot V = X_0 \cdot V_0 \cdot e^{\mu_{X0}(t-t_0)} \quad (\text{A.8})$$

A partir das equações A.7 e A.8, obtém-se a seguinte equação para a vazão de alimentação:

$$\phi = \frac{\mu_{X0} \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot e^{\mu_{X0}(t-t_0)}}{Y_{X/S} \cdot (S_i - S_0)} = A \cdot e^{B \cdot (t-t_0)} \quad (\text{A.9})$$

Esse equacionamento conduz às seguintes expressões para os parâmetros A e B da vazão:

$$A = \frac{\mu_{X0} \cdot X_0 \cdot V_0}{Y_{X/S} \cdot (S_i - S_0)} \quad (\text{A.10})$$

$$B = \mu_{X0} \quad (\text{A.11})$$

Dessa forma, impondo-se uma vazão de alimentação exponencial de acordo com as equações A.10 e A.11, pode-se controlar a oferta de substrato às células, de forma a se ter uma concentração de substrato constante no reator, o que conduz a uma velocidade específica de crescimento constante, que pode ser controlada no valor desejado para a produção do metabólito de interesse.

Conforme destacado anteriormente, a alimentação deve se iniciar quando a velocidade específica de crescimento for igual ou estiver muito próxima ao valor desejado μ_0 , a fim de se obter sucesso no controle da velocidade específica de crescimento. Dessa forma, o instante de início da alimentação deve ser determinado a partir de resultados preliminares, dependendo da velocidade específica de crescimento desejada no ensaio.

Exemplo de cálculo:

No ensaio DA-5, foram utilizados os seguintes dados para o cálculo da vazão específica de alimentação (estimados a partir de ensaios anteriores):

$\mu_{X0} = 0,17 \text{ h}^{-1}$ (velocidade específica de crescimento desejada)

$t_0 = 13$ horas (instante onde a velocidade específica de crescimento encontrava-se próxima de $0,17 \text{ h}^{-1}$)

$X_0 = 2,91 \text{ g/L}$ (concentração celular no instante t_0)

$V_0 = 3,3$ L (volume de cultivo no instante t_0)

$Y_{X/S} = 0,43$ g/g (fator de conversão substrato a células, estimado a partir de ensaios descontínuos padrão)

$S_i = 40$ g/L (concentração de glicose na alimentação)

$S_0 = 8,5$ g/L (concentração de glicose no meio de cultivo no instante t_0)

Utilizando-se as equações A.10 e A.11, temos:

$$A = \frac{0,17 \cdot 2,91 \cdot 3,3}{0,43 \cdot (40,0 - 8,5)} = 0,1205 \text{ L/h}$$

$$B = 0,17 \text{ h}^{-1}$$

Assim, a equação de alimentação nesse ensaio foi a seguinte:

$$\Phi = 0,1205 \cdot e^{0,17 \cdot (t-13)} \text{ L/h}$$

No entanto, essa equação que foi utilizada no ensaio foi obtida a partir de resultados de ensaios anteriores. Se os resultados do ensaio DA-5 (Apêndice F) fossem utilizados, a equação seria um pouco diferente, como mostrado abaixo:

$$\mu_{X0} = 0,17 \text{ h}^{-1}$$

$$t_0 = 13 \text{ horas}$$

$$X_0 = 2,55 \text{ g/L}$$

$$V_0 = 3,3 \text{ L}$$

$$Y_{X/S} = 0,43 \text{ g/g}$$

$$S_i = 40 \text{ g/L}$$

$$S_0 = 8,8 \text{ g/L}$$

Utilizando-se as equações A.10 e A.11, temos:

$$A = \frac{0,17 \cdot 2,55 \cdot 3,3}{0,43 \cdot (40,0 - 8,8)} = 0,1066 \text{ L/h}$$

$$B = 0,17 \text{ h}^{-1}$$

E a equação de alimentação deveria ser:

$$\Phi = 0,1066 \cdot e^{0,17 \cdot (t-13)} \text{ L/h}$$

A tabela A1 mostra as estimativas utilizadas para calcular as equações de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados e a tabela A2 mostra os valores reais obtidos no Apêndice F.

Tabela A1 Estimativas utilizadas nos cálculos das vazões de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados

Parâmetro	DA-1	DA-2	DA-3	DA-4	DA-5	DA-3b	DA-4b	DA-5b
$\mu_{x0} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,03	0,03	0,10	0,17	0,03	0,10	0,17
$t_0 \text{ (h)}$	21	21	18	16	13	21	14	13
$S_0 \text{ (g/L)}$	3,34	4,05	3,66	7,00	8,50	3,80	5,00	7,70
$X_0 \text{ (g/L)}$	5,31	4,18	4,39	2,68	2,91	4,16	2,79	2,27
$V_0 \text{ (L)}$	3,45	3,20	3,20	3,30	3,30	3,20	3,21	3,25
$S_i \text{ (g/L)}$	10,0	20,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
$Y_{x/s} \text{ (g/g)}$	0,53	0,43	0,43	0,45	0,43	0,43	0,45	0,43
$A \text{ (L/h)}$	0,1560	0,0585	0,0269	0,0596	0,1205	0,0256	0,0569	0,0903
$B \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,03	0,03	0,10	0,17	0,03	0,10	0,17

Tabela A2 Valores reais para os cálculos das vazões de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados (baseado no Apêndice F), considerando-se $Y_{x/s} = 0,43 \text{ g/g}$.

Parâmetro	DA-1	DA-2	DA-3	DA-4	DA-5	DA-3b	DA-4b	DA-5b
$\mu_{x0} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,03	0,03	0,10	0,17	0,03	0,10	0,17
$t_0 \text{ (h)}$	21	21	18	16	13	17	15	15
$S_0 \text{ (g/L)}$	4,20	3,80	3,90	7,20	8,80	5,40	6,50	7,70
$X_0 \text{ (g/L)}$	4,39	4,16	4,39	2,94	2,55	4,00	3,00	3,45
$V_0 \text{ (L)}$	3,45	3,20	3,20	3,30	3,30	3,20	3,21	3,25
$S_i \text{ (g/L)}$	10,0	20,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
$Y_{x/s} \text{ (g/g)}$	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
$A \text{ (L/h)}$	0,1820	0,0573	0,0271	0,0688	0,1066	0,0258	0,0669	0,1372
$B \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,03	0,03	0,10	0,17	0,03	0,10	0,17

Apêndice B

Equacionamento dos reatores contínuos

Este apêndice apresenta o equacionamento detalhado relativo aos reatores contínuos como apresentado por Facciotti, 2001.

O processo contínuo mais simples é baseado em um único reator, com uma alimentação e uma retirada de caldo, sem reciclo de células e pode ser representado por meio das equações de balanço material de células, de substrato limitante e de produto, em termos de massas totais, da seguinte forma:

$$\frac{d(V.X)}{dt} = \phi.X_i - \phi.X + \left(\frac{d(V.X)}{dt} \right)_{\text{Crescimento}} \quad (\text{B.1})$$

$$\frac{d(V.S)}{dt} = \phi.S_i - \phi.S + \left(\frac{d(V.S)}{dt} \right)_{\text{Consumo}} \quad (\text{B.2})$$

$$\frac{d(V.P)}{dt} = \phi.P_i - \phi.P + \left(\frac{d(V.P)}{dt} \right)_{\text{Produção}} \quad (\text{B.3})$$

Onde:

P_i = concentração de produto na alimentação (g/L);

S = concentração de substrato limitante no reator no instante t (g/L);

S_i = concentração de substrato limitante na alimentação (g/L);

V = volume de meio no reator (L);

X = concentração celular no reator no instante t (g/L);

X_i = concentração celular na alimentação (g/L);

Φ = vazão volumétrica de alimentação (L/h).

Pode-se, ainda, escrever as seguintes equações:

$$\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{Crescimento}} = \mu_X \cdot X \quad (\text{B.4})$$

$$\left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{Consumo}} = -\mu_S \cdot X = -\frac{\mu_X}{Y_{X/S}} \cdot X \quad (\text{B.5})$$

$$\left(\frac{dP}{dt} \right)_{\text{Produção}} = \mu_P \cdot X \quad (\text{B.6})$$

$$D = \frac{\phi}{V} \quad (\text{B.7})$$

Onde:

D = vazão específica de alimentação (h^{-1});

$Y_{X/S}$ = fator de conversão substrato a células (g/g);

μ_P = velocidade específica de produção (g/(g.h));

μ_S = velocidade específica de consumo de substrato (g/(g.h));

μ_X = velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

Substituindo-se as equações B.4 a B.7 nas equações B.1, B.2 e B.3 e levando-se em conta que o volume de meio no reator é constante, obtemos as seguintes equações:

$$\frac{dX}{dt} = D \cdot (X_i - X) + \mu_X \cdot X \quad (\text{B.8})$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_i - S) - \frac{\mu_X}{Y_{X/S}} \cdot X \quad (\text{B.9})$$

$$\frac{dP}{dt} = D \cdot (P_i - P) + \mu_P \cdot X \quad (\text{B.10})$$

Considerando que, no estado estacionário, todas as condições no reator são constantes e que, no sistema sem reciclo, na alimentação não existe nem células (meio esterilizado) e nem produto ($X_i = 0$ e $P_i = 0$), podemos simplificar as equações acima da seguinte forma, fazendo-se $dX/dt = 0$, $dS/dt = 0$ e $dP/dt = 0$:

$$\mu_X = D \quad (\text{B.11})$$

$$X_f = Y_{X/S} \cdot (S_i - S_f) \quad (\text{B.12})$$

$$P_f = \frac{\mu_P \cdot X_f}{D} \quad (\text{B.13})$$

Onde:

P_f = concentração de produto no reator no estado estacionário (g/L);

S_f = concentração de substrato no reator no estado estacionário (g/L);

X_f = concentração celular no reator no estado estacionário (g/L).

Observa-se, a partir da equação B.11, que é possível controlar a velocidade específica de crescimento do microrganismo por meio da imposição de uma certa vazão específica de alimentação, o que permite exercer um bom controle sobre o processo contínuo.

Apêndice C

Fundamentos de Análise de Imagens

Na etapa inicial do trabalho, foi de muita importância o estudo dos aspectos fundamentais no processamento de imagens via computador, desde o processo de aquisição das imagens até o tratamento dessas imagens, com as ferramentas disponíveis no *software QWin*. Após a aquisição da imagem via microscópio, é necessário fazer um tratamento dessa imagem antes de realizar as medições, a fim de eliminar objetos indesejados, separar objetos interconectados e melhorar o contraste dessa imagem. A maioria dos *softwares* de análise de imagens possui várias ferramentas para essa finalidade, cada uma delas com um efeito específico sobre a imagem.

As informações apresentadas neste apêndice foram obtidas principalmente no Manual do Usuário do *software QWin* (Leica, 1996).

C.1 Equipamento Básico para a Análise de Imagens

O equipamento básico para a realização da análise de imagens é composto por um microscópio (óptico comum, de contraste de fase, de fluorescência, etc) acoplado a uma câmera de vídeo (monocromática ou colorida). A câmera de vídeo, por sua vez, é acoplada a um microcomputador com um *software* de análise de imagens instalado (Thomas, 1992; Thomas; Paul, 1996). Esse *software* possui as ferramentas para o tratamento das imagens e os recursos para a execução das medições e armazenamento dos dados obtidos. Em equipamentos mais avançados, o *software* pode controlar também o microscópio (autofoco, luminosidade, posição e movimentação automática da plataforma).

C.2 Preparo da amostra (lâmina)

A primeira etapa do processo de análise de imagens é o preparo da amostra. A lâmina deve ser preparada de forma que as imagens obtidas sejam de boa qualidade, facilitando o seu processamento. Inicialmente, é necessário fazer uma diluição da amostra, a fim de que as hifas estejam bem dispersas e espalhadas sobre a

lâmina, evitando que ocorra superposição de hifas. Geralmente, essa diluição é feita para que a concentração celular caia para valores inferiores a 1,0 g/L (Paul; Thomas, 1998). Após a diluição, é necessária a aplicação de um corante, a fim de que o contraste da imagem seja realçado. Esse corante depende do microrganismo a ser analisado. Em alguns casos, o corante tem uma função específica, sendo utilizado para diferenciar estados fisiológicos das células ou para determinar a viabilidade celular.

Essa etapa é muito importante e deve ser bem padronizada, principalmente na análise de microrganismos filamentosos. A preparação inadequada da lâmina pode levar a medições imprecisas ou até inviabilizar o processo de análise de imagens.

C.3 Etapas do processamento de imagens

As etapas do processamento de imagens são as seguintes:

- a. Aquisição da imagem via microscópio (obtenção de uma imagem cinza ou *Grey Image*).
- b. Processamento da imagem cinza.
- c. Detecção da imagem cinza, com a produção de uma imagem binária (*Binary Image*).
- d. Processamento da imagem binária.
- e. Seleção dos parâmetros a serem medidos e dos filtros a serem utilizados nas medições.
- f. Execução das medições e armazenamento dos resultados.
- g. Análise dos resultados.

a. Aquisição da imagem (obtenção da imagem cinza)

Após a fixação de um determinado campo de visão no microscópio, escolhido aleatoriamente ou fixado automaticamente pelo computador, é necessário o ajuste dos parâmetros do microscópio (aumento a ser utilizado, luminosidade e foco). Com esses ajustes, pode-se então proceder à aquisição da imagem. O *software*, no processo de aquisição, armazena a imagem obtida pela câmera de vídeo na memória

do computador, para que ela seja processada ou para que ela seja gravada em disco e processada posteriormente.

No processo de aquisição da imagem, a câmera de vídeo faz uma varredura do campo de visão do microscópio (da esquerda para a direita e de cima para baixo), amostrando vários pontos e produzindo uma imagem digital. Esse processo é chamado de digitalização. A imagem digital produzida é uma imagem discreta (formada por pontos ou *pixels*). Quanto mais pontos a imagem possuir, maior será a sua nitidez. Uma imagem típica possui 512 x 512 pontos, mas pode chegar até a 1024 x 1024 pontos.

Essa imagem é chamada de imagem cinza (*grey image*). Para imagens monocromáticas, a cada ponto da imagem cinza é associado um número entre 0 e 255, proporcional à coloração deste ponto. Esse número associado é chamado de nível de cinza do ponto (*grey level*). Se o nível de cinza for igual a zero, o ponto possui uma coloração preta. Se o nível de cinza for igual a 255, o ponto possui uma coloração branca. Os pontos de coloração intermediária possuem nível de cinza entre 0 e 255. Quanto menor for o valor do nível de cinza, mais escuro é o ponto. A figura C.1 apresenta um esquema de uma imagem cinza.

Figura C.1 Esquema dos níveis de cinza em uma imagem.

Cada ponto da imagem cinza ocupa 1 Byte de memória computacional. Dessa forma, uma imagem monocromática de tamanho 512 pontos x 512 pontos ocupa uma memória de $512 \times 512 = 262.144$ Bytes = 256 Kb (1 Kb = 1024 bytes).

No caso de imagens coloridas, cada ponto possui três números associados, que correspondem à combinação de três cores (vermelho, verde e azul). Dessa forma, uma imagem colorida ocupa um espaço de memória três vezes maior.

b. Processamento da imagem cinza

Uma vez feita a aquisição da imagem, a imagem cinza obtida pode ser processada, com a utilização de várias ferramentas disponíveis no *software*. Essas ferramentas têm a função de melhorar a qualidade da imagem, realçar partes escuras ou claras da imagem, isolar objetos de interesse a serem medidos, separar objetos interconectados e eliminar ruídos da imagem (*debris*).

Cada ferramenta provoca uma transformação no nível de cinza de cada ponto da imagem, seguindo fórmulas matemáticas e produzindo um efeito específico sobre a imagem. Esses efeitos devem ser analisados a fim de se escolher qual o conjunto de ferramentas mais adequado para a análise de um determinado tipo de imagens. As transformações no nível de cinza dos pontos da imagem pode ser de dois tipos:

- Transformações de vizinhança, onde o novo nível de cinza do ponto depende do seu nível de cinza original e dos níveis de cinza de seus vizinhos.
- Transformações de ponto, onde o novo nível de cinza do ponto depende apenas do seu nível de cinza original.

b.1 Transformações de vizinhança

Cada ponto da imagem cinza pode possuir até oito vizinhos, como esquematizado na figura C.2. O conjunto formado pelo ponto central e pelos seus vizinhos é chamado operador ou elemento estrutural.

Na figura C.2, **P** é o ponto a ser transformado e seus vizinhos estão numerados de 1 a 8. As transformações de vizinhança alteram o nível de cinza do ponto **P** para um valor que depende do seu nível de cinza original e dos níveis de cinza dos seus vizinhos.

1	2	3
4	P	5
6	7	8

Figura C.2 Elemento estrutural ou operador

Existem três tipos de ferramentas que executam as transformações de vizinhança:

- Ferramentas básicas de correção da imagem cinza (*amendment*).
- Ferramentas secundárias de correção da imagem cinza.
- Ferramentas de convolução (*convolution*).

- **Ferramentas básicas de correção da imagem cinza (*Amendment*)**

Essas ferramentas são a erosão (*erosion*), a dilatação (*dilation*), a abertura (*opening*) e o fechamento (*closing*) da imagem cinza.

Erosão: nessa transformação, o nível de cinza do ponto a ser transformado é substituído pelo menor nível de cinza de seus vizinhos. Essa transformação provoca o encolhimento das regiões claras da imagem e a expansão das regiões escuras. É útil na remoção de pequenos objetos claros e na junção de áreas escuras próximas, devido à expansão dessas áreas escuras.

Dilatação: de maneira inversa à erosão, o nível de cinza do ponto a ser transformado é substituído pelo maior nível de cinza de seus vizinhos. A dilatação provoca expansão de regiões claras e encolhimento de regiões escuras da imagem. É útil na remoção de pequenos objetos escuros da imagem e na junção de áreas claras da imagem, devido à expansão dessas áreas claras.

Abertura: São feitas duas transformações na imagem cinza, uma erosão seguida de uma dilatação. É útil na remoção de pequenos objetos claros da imagem.

Fechamento: São feitas duas transformações na imagem cinza, uma dilatação seguida de uma erosão. É útil na remoção de pequenos objetos escuros da imagem.

Cada uma dessas transformações pode ser aplicada mais de uma vez à imagem. O número de vezes que uma transformação é aplicada à imagem é chamado de número de ciclos.

- **Ferramentas secundárias de correção da imagem cinza**

Essas ferramentas são combinações das ferramentas básicas (erosão, dilatação, abertura e fechamento), associadas a combinações lógicas entre a imagem transformada e a imagem original (soma e subtração de imagens).

Existem várias ferramentas secundárias de correção da imagem cinza : *White Top Hat*, *Black Top Hat*, *White Smooth*, *Black Smooth*, *White Sharpen*, *Black Sharpen*, *Fill White*, *Fill Black*, *White Flood*, *Black Flood*, *Enhance*, *Delineate*, *Gradient*, *Median*, *Maxima*, *Minima*, *Fill Maxima* e *Fill Minima*.

White Top Hat: essa transformação consiste na abertura da imagem em um certo número de ciclos e a sua subtração da imagem original. A abertura da imagem provoca o desaparecimento de detalhes claros, ficando apenas os detalhes escuros. Com a subtração da imagem original, apenas as partes claras da imagem permanecem. Por isso, essa ferramenta, facilita a detecção de detalhes claros da imagem.

$$\text{White Top Hat} = \text{Imagem original} - \text{Imagem após abertura.}$$

Black Top Hat: essa transformação consiste no fechamento da imagem em um certo número de ciclos e a subtração da imagem original. O fechamento da imagem provoca o desaparecimento de detalhes escuros, ficando apenas os detalhes claros. Com a subtração da imagem original, apenas as partes escuras da imagem permanecem. Por isso, essa ferramenta, facilita a detecção de detalhes escuros da imagem.

$$\text{Black Top Hat} = \text{Imagem após fechamento} - \text{Imagem original}$$

Os *Top Hats* são algumas das mais importantes ferramentas para tratamento de imagens e são chamados de “resíduos” pois produzem uma imagem que é uma parte remanescente da imagem original.

White Smooth: essa transformação suaviza a imagem, por meio de uma série de aberturas e fechamentos. A abertura da imagem tem a tendência de destacar as partes escuras da imagem e o fechamento tem a tendência de destacar as partes claras da imagem. A utilização de *White Smooth* suaviza a imagem mas evita o favorecimento das partes escuras ou claras pois emprega tanto a abertura como o fechamento.

White Smooth de n ciclos = Fechamento de 1 ciclo + Abertura de 1 ciclo + Fechamento de 2 ciclos + Abertura de 2 ciclos +...+ Fechamento de n ciclos + Abertura de n ciclos.

Black Smooth: essa transformação suaviza a imagem, por meio de uma série de aberturas e fechamentos. Da mesma forma que o *White Smooth*, essa ferramenta suaviza a imagem mas evita o favorecimento das partes escuras ou claras pois emprega tanto a abertura como o fechamento.

BSmooth de n ciclos = Abertura de 1 ciclo + Fechamento de 1 ciclo + Abertura de 2 ciclos + Fechamento de 2 ciclos + ... + Abertura de n ciclos + Fechamento de n ciclos.

White Sharpen: Destaca detalhes claros da imagem adicionando o *White Top Hat* à imagem original.

$$\text{White Sharpen} = \text{White Top Hat} + \text{Imagem original.}$$

Black Sharpen: Destaca detalhes escuros da imagem subtraindo o *Black Top Hat* da imagem original.

$$\text{Black Sharpen} = \text{Imagem original} - \text{Black Top Hat.}$$

Fill White: essa transformação preenche orifícios claros da imagem com o nível de cinza das regiões vizinhas, sem afetar as fronteiras dos objetos, por meio de uma abertura da imagem (em um certo número de ciclos) e uma reconstrução da imagem (reconstituição da imagem ao seu tamanho original).

Fill Black: essa transformação preenche orifícios escuros da imagem com o nível de cinza das regiões vizinhas, sem afetar as fronteiras dos objetos, por meio de

um fechamento da imagem (em um certo número de ciclos) e uma reconstrução da imagem (reconstituição da imagem ao seu tamanho original).

White Flood: preenche orifícios escuros da imagem. Produz um efeito semelhante ao *Fill Black*.

Black Flood: preenche orifícios claros da imagem. Produz um efeito semelhante ao *Fill White*.

Enhance: promove um melhor delineamento das fronteiras dos objetos, melhorando o contraste entre as fronteiras e o fundo da imagem.

Delineate: melhora a definição das fronteiras dos objetos. Geralmente, devido a uma limitada resolução das câmeras de vídeo, as fronteiras dos objetos (transição entre os objetos a serem medidos e o fundo (*background*) da imagem) não são muito nítidas. Por exemplo, seja um objeto preto a ser medido. Supondo-se que esse objeto seja exatamente preto, todos os seus pontos terão um nível de cinza igual a zero. Vamos supor também que o fundo da imagem seja exatamente branco e, portanto, tenha um nível de cinza igual a 255. Essa imagem teria apenas pontos pretos (nível de cinza igual a zero) e brancos (nível de cinza igual a 255), não tendo pontos com nível de cinza intermediário. Na prática, mesmo em uma imagem desse tipo, ocorre uma transição na fronteira do objeto, onde aparecem pontos com nível de cinza intermediário (esse fenômeno é chamado erro de auréola ou *halo error*). Os pontos não passam diretamente do preto para o branco (mudança tipo degrau). Esse fenômeno provoca o aparecimento de uma região difusa e com pouca nitidez, que é a fronteira do objeto. Essa ferramenta de delineamento (*Delineate*) provoca uma transição mais aguda na fronteira do objeto (do preto para o branco) e, portanto, melhora a nitidez da fronteira.

Gradient: permite a detecção das fronteiras dos objetos pois é a diferença entre a imagem dilatada e a imagem erodida. A diferença entre essas imagens representa a fronteira dos objetos.

$$\text{Gradient} = \text{Imagem Dilatada} - \text{Imagem erodida}$$

Median: substitui o nível de cinza do ponto a ser transformado pelo nível de cinza médio dos seus vizinhos. É útil na remoção de pequenos objetos (pontos isolados), tanto escuros como claros.

Maxima: essa transformação é feita subtraindo-se um determinado valor do nível de cinza de todos os pontos da imagem, fazendo-se uma reconstrução dessa imagem (para que os pontos tenham nível de cinza entre 0 e 255) e subtraindo-se a imagem resultante da imagem original. O valor a ser subtraído é uma constante. Se esse valor a ser subtraído for baixo (próximo de 0), a imagem resultante será bastante escura. Se esse valor for muito alto (próximo de 255), a imagem resultante será muito próxima da imagem original.

Minima: essa transformação é feita somando-se um determinado valor ao nível de cinza de todos os pontos da imagem, fazendo-se uma reconstrução dessa imagem (para que os pontos tenham nível de cinza entre 0 e 255) e subtraindo-se a imagem original desta imagem. O valor a ser subtraído é uma constante. Se esse valor a ser subtraído for baixo (próximo de 0), a imagem resultante será bastante escura. Se esse valor for muito alto (próximo de 255), a imagem resultante será o inverso (negativo) da imagem original.

Fill Maxima: essa transformação é feita subtraindo-se um determinado valor do nível de cinza de todos os pontos da imagem, fazendo-se uma reconstrução dessa imagem (para que os pontos tenham nível de cinza entre 0 e 255). A diferença entre essa transformação e a *Maxima* é que, neste caso, não é feita a subtração da imagem original.

Fill Minima: essa transformação é feita somando-se um determinado valor ao nível de cinza de todos os pontos da imagem, fazendo-se uma reconstrução dessa imagem (para que os pontos tenham nível de cinza entre 0 e 255). A diferença entre essa transformação e a *Minima* é que, neste caso, não é feita a subtração da imagem original.

- **Ferramentas de convolução (*convolution*)**

A convolução é um tipo de transformação onde os níveis de cinza dos pontos da imagem são multiplicados por uma matriz de convolução. Geralmente, essa matriz de convolução possui dimensão $n \times n$, onde n é um número ímpar, que determina a quantidade de vizinhos a ser utilizada. Se, por exemplo $n = 3$, teremos:

1 C1	2 C2	3 C3
4 C4	P C9	5 C5
6 C6	7 C7	8 C8

Esse é um elemento estrutural com o ponto central (P), circundado por 8 vizinhos. A matriz de convolução será uma matriz quadrada 3×3 (com 9 elementos). Na imagem original, cada ponto tem um nível de cinza C_i .

Se a matriz de convolução for:

$$\begin{bmatrix} A1 & A2 & A3 \\ A4 & A9 & A5 \\ A6 & A7 & A8 \end{bmatrix}$$

O nível de cinza do ponto P após a convolução será: $C_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^9 A_i.C_i$

Nesse caso, N é uma constante de normalização, utilizada para garantir que o nível de cinza resultante esteja entre 0 e 255. Geralmente N é a soma dos coeficientes A_i , desde que essa soma seja diferente de zero.

As ferramentas de convolução mais utilizadas são: *Sharpen*, *Laplace*, *Horizontal Edge*, *Vertical Edge*, *Prewitt*, *Sobel*, *Average*, *Gaussian*. Cada uma dessas ferramentas tem uma matriz de convolução e uma constante de normalização específicos.

Por exemplo, a matriz de convolução para uma transformação tipo *Average*

é: $\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$ e a constante de normalização é 9. Nessa caso, o nível de cinza

resultante é uma média dos níveis de cinza dos nove pontos (do ponto que está sendo transformado e dos seus 8 vizinhos).

b.2 Transformações de ponto (*Lookup Tables*)

Essas transformações alteram o nível de cinza de cada ponto a partir de equações matemáticas, sendo chamadas de *Lookup Tables*. O novo nível de cinza de cada ponto depende apenas do seu nível de cinza original, sendo independente dos seus vizinhos.

As ferramentas de transformação da imagem cinza são: *Inversa*, *Quadrática*, *Raiz Quadrada*, *Exponencial*, *Logarítmica* e *Exponencial inversa*, conforme detalhado a seguir:

Inversa: o nível de cinza de cada ponto é alterado de acordo com a seguinte tabela:

Nível de cinza original	Nível de cinza resultante
0	255
1	254
...	...
255	0

Essa ferramenta provoca a inversão da imagem: os pontos pretos tornam-se brancos e vice-versa (negativo da imagem original).

Quadrática: o nível de cinza de cada ponto torna-se proporcional ao quadrado de seu nível de cinza original, mantendo um valor entre 0 e 255. Aumenta o contraste das regiões claras da imagem.

Raiz Quadrada: o nível de cinza de cada ponto torna-se proporcional à raiz quadrada de seu nível de cinza original, mantendo um valor entre 0 e 255. Aumenta o contraste das regiões escuras da imagem.

Logarítmica: o nível de cinza de cada ponto torna-se proporcional ao logaritmo de seu nível de cinza original, mantendo um valor entre 0 e 255. Provoca um efeito similar à transformação raiz quadrada, só que mais profundo.

Exponencial: o nível de cinza de cada ponto torna-se proporcional à exponencial de seu nível de cinza original, mantendo um valor entre 0 e 255. Provoca um efeito similar à transformação quadrática, só que mais profundo.

Exponencial Inversa: o nível de cinza de cada ponto torna-se proporcional ao inverso da exponencial de seu nível de cinza original, mantendo um valor entre 0 e 255. Produz um negativo da imagem original e altera o contraste.

Todas essas ferramentas de processamento da imagem cinza podem ser utilizadas a fim de melhorar a qualidade da imagem e facilitar as medições. É necessário escolher o conjunto de ferramentas mais adequado para o tipo de imagem a ser analisado.

c. Detecção da imagem cinza e produção de uma imagem binária

Após o processamento da imagem cinza, pode-se passar para a próxima etapa do processo de análise da imagem. Essa etapa é chamada de detecção. Na execução das medições, o computador não consegue trabalhar com a imagem cinza e portanto é necessário produzir uma imagem binária (*Binary Image*), a partir da imagem cinza. Todas as medições são realizadas sobre a imagem binária.

Como já foi destacado, na imagem cinza cada ponto possui um valor entre 0 e 255. Na imagem binária, por sua vez, cada ponto possui um valor 0 ou 1. Essa é a chamada lógica binária. Se o ponto está selecionado, ele possui o valor 1. Se o ponto não está selecionado, ele possui o valor 0. A figura C.3 mostra a representação de uma imagem binária.

A imagem binária também é chamada de máscara binária (*Binary Mask*) e ocupa uma memória computacional bem menor do que a imagem cinza.

Figura C.3 Imagem binária

A produção de uma imagem binária a partir da imagem cinza é chamada de detecção da imagem cinza.

Para realizar a detecção é necessário ajustar um par de limites para os níveis de cinza: o limite inferior e o limite superior. Todos os pontos da imagem cinza que tiverem um nível de cinza entre esses dois limites serão detectados, ou seja, possuirão o valor 1, na imagem binária resultante. Os pontos que tiverem um nível de cinza fora desses limites não serão detectados e possuirão o valor 0 na imagem binária resultante. O computador realiza as medições em cima dos pontos detectados (região de interesse). O ajuste desses limites é chamado de *thresholding*, sendo muito importante para a realização de medições precisas. A escolha dos limites deve ser feita de tal modo que a imagem binária represente bem o objeto a ser medido.

Figura C.4 (A) Imagem binária sobreposta à imagem cinza
(B) Imagem binária isolada

A figura C.4 (A) mostra a imagem binária sobreposta à sua imagem cinza correspondente. Pode-se perceber que uma parte da imagem cinza (fronteira do *pellet*) não foi detectada, devido à escolha incorreta dos limites de detecção. Para

realizar uma medição precisa é necessário que a imagem binária coincida exatamente com a imagem cinza. Para isso, seria necessário aumentar os limites de detecção na imagem anterior.

A figura C.4 (B) mostra a imagem binária isolada. É sobre essa imagem binária que o computador vai realizar as medições. Por exemplo, para medir a área do *pellet*, o computador vai determinar o número de pontos que compõem o *pellet* na imagem binária e multiplicá-lo por um fator de conversão. Esse fator de conversão é necessário para produzir um resultado em unidades reais (μm^2 , por exemplo) e deve ser ajustado, dependendo da objetiva utilizada no microscópio.

d. Processamento da imagem binária

Após a detecção e produção da imagem binária, a imagem cinza não é mais necessária. Pode-se então utilizar ferramentas que modificam a imagem binária, antes de proceder às medições.

Essas ferramentas são: Erosão (*Erosion*), Dilatação (*Dilation*), Abertura (*Opening*), Fechamento (*Closing*), Esqueletização (*Skeletonization*) e Encurtamento (*Prune*) da imagem binária.

Erosão: Na erosão de uma imagem binária, ocorre a remoção de uma camada de pontos da fronteira dos objetos. A aplicação de erosões sucessivas faz com que os objetos encolham devido à remoção de camadas de pontos de suas fronteiras. O processo de erosão é mostrado na figura C.5 (Leica, 1996). A figura C.6 mostra a aplicação da erosão na separação de objetos interconectados.

Dilatação: De maneira inversa à erosão, a dilatação acrescenta uma camada de pontos à fronteira dos objetos. A aplicação de sucessivas dilatações faz com que os objetos aumentem de tamanho. A dilatação é mostrada na figura C.7 (Leica, 1996).

Figura C.5 (A) Imagem original
(B) Processo de erosão
(C) Imagem erodida

Figura C.6 Separação de objetos (erosão)

(A) Imagem original
(B) Imagem erodida

Figura C.7 (A) Imagem original (B) Processo de dilatação (C) Imagem dilatada

Abertura: São feitas duas transformações na imagem binária, uma erosão seguida de uma dilatação. É útil na remoção de pequenos pontos da imagem. Por exemplo, pontos isolados da imagem desaparecem quando é feita a erosão e não reaparecem quando a imagem é reconstruída pela dilatação. Uma imagem que sofreu uma abertura sempre tem um número de pontos igual ou menor do que a imagem original.

Fechamento: São feitas duas transformações na imagem binária, uma dilatação seguida de uma erosão. É útil no preenchimento de pequenos orifícios da imagem. Por exemplo, para um orifício pequeno, a dilatação preenche o orifício que não é reaberto quando a imagem é reconstruída pela erosão. Uma imagem que sofreu um fechamento sempre tem um número de pontos igual ou maior do que a imagem original.

Esqueletização (*Skeletonization*): é uma transformação onde ocorrem sucessivos afinamentos dos objetos da imagem, a partir das fronteiras, em direção ao centro, produzindo eixos centrais nos objetos da imagem. Se a esqueletização for feita até sua última etapa (*Exhaustive Skeletonization*), produz-se eixos com largura de apenas um ponto. A esqueletização exaustiva é a esqueletização feita até que não haja mais mudança na imagem. É útil na análise de ramificações em microrganismos filamentosos, onde a esqueletização de hifas isoladas faz com que os eixos gerados coincidam com as ramificações das hifas.

Encurtamento (*Prune*): após a esqueletização, é comum executar o encurtamento dos eixos gerados. Cada encurtamento faz com que seja removido um ponto de cada extremidade dos eixos gerados. Essa ferramenta é útil na remoção de falsas ramificações, quando se analisa microrganismos filamentosos. Existe também o encurtamento exaustivo (*Exhaustive Prune*), onde os eixos são encurtados até que não haja mais alterações na imagem.

A figura C.8 apresenta o esquema da esqueletização de um objeto e, posteriormente, de um encurtamento desse mesmo objeto.

Figura C.8: (A) Imagem original (B) Imagem após esqueletização exaustiva
(C) Imagem após encurtamento

Com a utilização dessas ferramentas, a imagem binária pode ser modificada, a fim de que os objetos sejam medidos com maior precisão.

e. Seleção dos parâmetros a serem medidos

Após o tratamento da imagem binária, pode-se selecionar quais parâmetros serão medidos. A seleção desses parâmetros depende da morfologia de crescimento do microrganismo.

Para o crescimento na forma de *pellets* ou aglomerados de hifas (*clumps*), os parâmetros que geralmente são medidos são os seguintes (Paul; Thomas, 1998):

- Perímetro.
- Perímetro convexo (perímetro do objeto, após o preenchimento de todas as suas concavidades).
- Área.
- Área convexa (área do objeto, após o preenchimento de todas as suas concavidades, ou seja, a área delimitada pelo perímetro convexo).

- Diâmetro equivalente (diâmetro do círculo que tem a mesma área do objeto medido).
- Circularidade ou rugosidade, que é definida como: $R = \frac{(\text{Perímetro})^2}{4\pi \text{ Area}}$.
- Dimensões do objeto em oito direções diferentes (*ferets*).
- Dimensão média do objeto (média das dimensões em até 64 direções).
- Comprimento (maior dimensão do objeto).
- Largura (menor dimensão do objeto).

No caso do crescimento na forma de hifas isoladas, os parâmetros que geralmente são medidos são os seguintes:

- Perímetro.
- Perímetro convexo.
- Área.
- Área convexa.
- Circularidade.
- Comprimento (maior dimensão do objeto).
- Largura (menor dimensão do objeto).
- Comprimento total das hifas (hifa principal + ramificações).
- Número de extremidades (*Tips*).
- Unidade de crescimento de hifa (*Hiphal Growth Unit* ou *HGU*), que é a relação entre o comprimento total das hifas e o número de extremidades.

Após a seleção dos parâmetro a serem medidos, é comum a imposição de algumas restrições, a fim de eliminar objetos indesejados. Assim, o *software* só considera objetos que tenham as dimensões em certo intervalo. Por exemplo, impondo-se o filtro: $60 \mu\text{m} < \text{Comprimento total das hifas} < 150 \mu\text{m}$, o *software* não vai medir os objetos que tiverem um comprimento menor do que $60 \mu\text{m}$ ou maior do que $150 \mu\text{m}$.

f. Execução das medições e armazenamento dos resultados

Após a seleção dos parâmetros a serem medidos, pode-se proceder à medição a partir da imagem binária final. Para a obtenção de bons resultados, vários autores destacam a necessidade de realizar as medições para vários objetos (vários campos de medida; várias lâminas preparadas), pois a variabilidade é grande, principalmente para microrganismos filamentosos (Packer; Thomas, 1990; Belmar-Beiny; Thomas, 1991; Vanhoutte et al., 1995; Tamura et al., 1997). O procedimento deve, então, ser repetido para outras imagens a fim de se ter uma boa quantidade de dados (cerca de 100 objetos medidos).

Alguns *softwares* de análise de imagens possuem um ambiente de programação, permitindo a automatização do procedimento de análise de imagens, diminuindo a intervenção do operador e a subjetividade dos resultados. No caso do *software* utilizado (*LEICA QWin*), esse ambiente de programação chama-se *QUIPS* (*Quantitative Interactive Programming System*).

g. Análise dos resultados

Finalmente, após a obtenção dos dados referentes a todas as imagens processadas, pode-se reunir esses dados e partir para a análise e levantamento de correlações entre os parâmetros morfológicos medidos e outras propriedades do cultivo, como características reológicas, crescimento celular ou produção do produto de interesse.

No caso do *software QWin*, para cada campo medido, é gerada uma tabela contendo as dimensões dos objetos presentes naquele campo. Esses dados podem, então, ser transferidos para uma planilha (*Excel*, *Lotus*, etc.), onde poderão ser reunidos os resultados de todos os campos medidos. Com esses resultados pode-se construir histogramas de frequência e curvas de distribuição percentual acumulada para a análise das dimensões características do microrganismo.

Apêndice D

Rotinas desenvolvidas para a análise de imagens de *Streptomyces olindensis*

Na etapa inicial do trabalho, foram desenvolvidas as rotinas para a caracterização do microrganismo por análise de imagens, utilizando o ambiente de programação *QUIPS* (*Quantitative Interactive Programming System*), parte integrante do *software* QWin.

Foram desenvolvidas duas rotinas: uma para a aquisição de imagens e uma para o tratamento das imagens e medição dos objetos.

D.1 Rotina para aquisição de imagens, em *QUIPS*

```
***** Rotina para a aquisição de imagens de Streptomyces  
***** CELSO PAMBOUKIAN - DOUTORADO - EPUSP  
***** 11 de abril de 2001
```

Routine Reader

Number of fields: 1

Standard frames

```
***** Configuração da câmera, microscópio e da origem do fator de calibração (microscópio)
```

Colour Transform (Mono Mode)

Select Lens (Transmitted, 20 x, mag changer 1.0 x)

Calibration (System)

Configure (Image Store 764 x 574, Grey Images 15, Binaries 16)

Shading Correction (Set)

```
***** Entrada do nome do ensaio e do instante de cultivo
```

```
***** Deve ser criada uma pasta em C:\usuarios\celso\Análise de imagens,
```

```
***** Dentro desta pasta deve ser criada uma pasta com o instante de cultivo (apenas os  
números)
```

PauseText ("Digite o nome do ensaio")

Input (ENSAIO\$)

PauseText ("Digite o tempo de cultivo em horas (apenas os numeros)")

Input (TEMPO\$)

```
NEWFILE$ = "C:\usuarios\celso\Análise de imagens\"+ENSAIO$+"\"+TEMPO$+"\"+ENSAIO$+  
TEMPO$+"c"
```

```
***** Início do "Loop" para aquisição de 50 campos
```

For (I = 1 to 50, step 1)

Display (I, 0 digits after '.', no tab follows)

PauseText ("Selecione a objetiva")

***** Rotina para a aquisição da imagem e armazenamento em disco

```

AQUISICAO:
Acquire [PAUSE] ( into Image0 )
Select Lens [PAUSE] ( Transmitted, 20 x, mag changer 1.0 x )
Annotation On
Copy Display ( Image0 (on), frames (off,off), planes (off,off,off,off,off,off), lut 5, x 0, y 0, z 1,
                Reduction off )
Grey Util ( Paste Clipboard to Image0 )
Define Flag ( #1, "Sim" )
Define Flag ( #2, "Não" )
Pause ( Flags, "Salvar ?" )
ACQOUTPUT = 0
If ( FLAG2 )
    Goto AQUISICAO
Endif
If ( FLAG1 )
    ACQFILE$ = NEWFILE$ + STR$(I) + ".tif"
    Write image ( from ACQOUTPUT into file ACQFILE$, export calibration )
Endif
Next ( I )

END

```

D.2 Rotina para tratamento das imagens e medição dos objetos, em *QUIPS*

***** Rotina para a medição de Streptomyces em cultivo submerso, com classificação em
 ***** quatro classes morfológicas distintas: aglomerados (clumps), pellets, hifas isoladas
 ***** ramificadas e hifas isoladas não ramificadas.
 ***** CELSO PAMBOUKIAN - DOUTORADO - EPUSP
 ***** 11 de abril de 2001

Routine Reader
 Number of fields: 1
 Standard frames

***** Configuração da Câmera (tamanho da imagem)

```

Configure ( Image Store 764 x 574, Grey Images 15, Binaries 16 )
Measure frame ( x 31, y 61, Width 702, Height 512 )
Image frame ( x 0, y 0, Width 764, Height 574 )

```

***** Entrada do nome do ensaio e do instante de cultivo
 ***** Deve ser criada uma pasta em C:\usuarios\celso\Análise de imagens,
 ***** Dentro desta pasta deve ser criada uma pasta com o instante de cultivo (apenas os
 números)

```

PauseText ( "Digite o nome do ensaio" )
Input ( ENSAIO$ )
PauseText ( "Digite o tempo de cultivo em horas (apenas os números)" )
Input ( TEMPO$ )

```

```

NEWFILE$ = "C:\usuarios\celso\Análise de imagens\" + ENSAIO$ + "\" + TEMPO$ + "\" + ENSAIO$ +
TEMPO$ + "c"

```

***** Início do “Loop” para medição de 50 campos

For (I = 1 to 50, step 1)

***** Leitura da imagem (HD)

Display (I, 0 digits after '.', no tab follows)

Calibration (Local)

ACQOUTPUT = 0

ACQFILE\$ = NEWFILE\$ + STR\$(I)+".tif"

Read image (from file ACQFILE\$ into ACQOUTPUT, import calibration)

***** Seleção das classes morfológicas a serem medidas, pelo usuário

Define Flag (#1, "Clumps")

Define Flag (#2, "Pellets")

Define Flag (#3, "Hifas")

Pause (Flags, "Classe Morfológica")

***** Rotina para a medição de clumps

If (FLAG1)

>>>>> Tratamento da imagem cinza, para a medição de clumps

Grey Util (Copy Image0 to Image2)

Grey Transform (BSharpen from Image2 to Image3, cycles 7, operator Disc)

Grey Transform (FillBlack from Image3 to Image4, cycles 1, operator Disc)

Grey Transform (Enhance from Image4 to Image5, cycles 1, operator Disc)

>>>>> Detecção, para a medição de clumps

PauseText ("Medição de Clumps Ajuste os Limites")

Detect [PAUSE] (blacker than 180, from Image5 into Binary0)

>>>>> Tratamento da imagem binária, para a medição de clumps

Binary Logical (copy Binary0 to Binary2)

Binary Identify (Spots from Binary2 to Binary3)

Binary Identify (EdgeFeat from Binary3 to Binary4)

>>>>> Imposição de filtros para separação de clumps

Feature Accept :

Perimeter from 599.2639771 to 11999.9043

ConvxPerim from 175.6800079 to 950.6240234

>>>>> Medição de clumps

Measure feature (plane Binary4, 64 ferets, minimum area: 20, grey image: Image5)

Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP, Feret0, Feret90, Length,

Breadth, OrthoFeret, Perimeter, ConvxPerim, Roundness, Feret22.5,

Feret45, Feret67.5, Feret112.5, Feret135, Feret157.5, AspectRatio,

EquivDiam, CurveLength, CurveWidth, ConvexArea, FullRatio

Copy Accepted Features (from Binary4 into Binary5)

Label Feature (Number)

>>>>>> Armazenamento dos resultados da medição de clumps

```

Display Feature Results ( x -1, y 620, w 794, h 211 )
Open File ( C:\Usuarios\Celso\Análise de imagens\Trabalho\Clumps.txt, channel #1 )
Go to File End ( channel #1 )
File Feature Results ( channel #1 )
Close File ( channel #1 )
PauseText ( "Dados de clumps Pressione Continue" )
Pause ( No dialog )
Endif

```

***** Rotina para a medição de Pellets

```

If ( FLAG2 )

```

>>>>>> Tratamento da imagem cinza, para a medição de Pellets

```

Grey Util ( Copy Image0 to Image2 )
Grey Transform ( BSharpen from Image2 to Image3, cycles 7, operator Disc )
Grey Transform ( FillBlack from Image3 to Image4, cycles 1, operator Disc )
Grey Transform ( Enhance from Image4 to Image5, cycles 1, operator Disc )

```

>>>>>> Detecção, para a medição de Pellets

```

PauseText ( "Medição de Pellets Ajuste os limites" )
Detect [PAUSE] ( blacker than 180, from Image5 into Binary0 )

```

>>>>>> Tratamento da imagem binária, para a medição de Pellets

```

Binary Logical ( copy Binary0 to Binary2 )
Binary Identify ( Spots from Binary2 to Binary3 )
Binary Identify ( EdgeFeat from Binary3 to Binary4 )

```

>>>>>> Imposição de filtros para separação de Pellets

```

Feature Accept :
    ConvxPerim from 950.6240234 to 7200.928223

```

>>>>>> Medição de Pellets

```

Measure feature ( plane Binary4, 64 ferets, minimum area: 20, grey image: Image5 )
    Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP, Feret0, Feret90, Length,
    Breadth, OrthoFeret, Perimeter, ConvxPerim, Roundness, Feret22.5,
    Feret45, Feret67.5, Feret112.5, Feret135, Feret157.5, AspectRatio,
    EquivDiam, CurveLength, CurveWidth, ConvexArea, FullRatio
Copy Accepted Features ( from Binary4 into Binary5 )
Label Feature ( Number )

```

>>>>>> Armazenamento dos resultados da medição de Pellets

```

Display Feature Results ( x -4, y 622, w 813, h 211 )
Open File ( C:\Usuarios\Celso\Análise de imagens\Trabalho\Pellets.txt, channel #1 )
Go to File End ( channel #1 )
File Feature Results ( channel #1 )
Close File ( channel #1 )
PauseText ( "Dados de pellets Pressione Continue" )
Pause ( No dialog )
Endif

```

***** Rotina para a medição de Hifas isoladas

If (FLAG3)

>>>>> Tratamento da imagem cinza, para a medição de Hifas

Grey Util (Copy Image0 to Image2)

Grey Transform (BSharpen from Image2 to Image3, cycles 5, operator Disc)

>>>>> Detecção, para a medição de Hifas

PauseText ("Medição de hifas isoladas Ajuste os limites")

Detect [PAUSE] (blacker than 180, from Image3 into Binary0)

>>>>> Tratamento da imagem binária, para a medição de Hifas

Binary Logical (copy Binary0 to Binary2)

Binary Identify (Spots from Binary2 to Binary3)

>>>>> Imposição de filtros para separação de Hifas

Feature Accept :

Perimeter from 39.99700165 to 599.9550171

Roundness from 5. to 100.

>>>>> Medição de Hifas

Measure feature (plane Binary3, 64 ferets, minimum area: 4, grey image: Image5)

Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP, Perimeter, ConvxPerim,
Roundness, EquivDiam, ConvexArea

Label Feature (Number)

PauseText ("Dados de hifas isoladas Execute a confirmação")

Display Feature Results [PAUSE] (x 0, y 620, w 779, h 201)

Copy Accepted Features (from Binary3 into Binary4)

Binary Edit [PAUSE] (Keep from Binary4 to Binary5, nib Rect, width 2)

Measure feature (plane Binary5, 64 ferets, minimum area: 4, grey image: Image5)

Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP, Feret0, Feret90, Length,
Breadth, OrthoFeret, Perimeter, ConvxPerim, Roundness, Feret22.5,
Feret45, Feret67.5, Feret112.5, Feret135, Feret157.5, AspectRatio,
EquivDiam, CurveLength, CurveWidth, ConvexArea, FullRatio

Label Feature (Number)

>>>>> Armazenamento dos resultados da medição de Hifas

Display Feature Results (x 51, y 537, w 665, h 211)

Open File (C:\Usuarios\Celso\Análise de imagens\Trabalho\hifas.txt, channel #1)

Go to File End (channel #1)

File Feature Results (channel #1)

Close File (channel #1)

>>>>> Esqueletização e Encurtamento para a medição de ramificações

PauseText ("Dados de hifas Pressione continue para medição de ramificações")

Pause (No dialog)

Display Feature Results (x 51, y 537, w 665, h 211)

Binary Amend (White Exh. Skeleton from Binary5 to Binary6, cycles 1, operator Disc, edge
erode off, alg. 'M' Type)

Binary Amend (Prune from Binary6 to Binary7, cycles 5, operator Disc, edge erode off)

Clear Accepts

>>>>> Medição de ramificações

Measure feature (plane Binary7, 64 ferets, minimum area: 4, grey image: Image5)

Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP, Length, Breadth, CurveLength,

CurveWidth, Tops, Ends

Label Feature (Number)

>>>>> Armazenamento dos resultados da medição de ramificações

Display Feature Results (x -5, y 621, w 832, h 211)**Open File** (C:\Usuarios\Celso\Análise de imagens\Trabalho\ramif.txt, channel #1)**Go to File End** (channel #1)**File Feature Results** (channel #1)**Close File** (channel #1)**Endif**

>>>>> Passagem para o próximo campo de medida

Next (I)**END**

APPLICATIONS OF IMAGE ANALYSIS IN THE CHARACTERIZATION OF *STREPTOMYCES OLINDENSIS* IN SUBMERGED CULTURE

Celso R. Denser Pamboukian; Luciana M. Guimarães; Maria Cândida R. Facciotti*

Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Química, São Paulo, SP, Brasil

Submitted: December 15, 2000; Returned to authors for corrections: May 02, 2001; Approved: February 25, 2002

ABSTRACT

The morphology of *Streptomyces olindensis* (producer of retamycin, an antitumor antibiotic) grown in submerged culture was assessed by image analysis. The morphology was differentiated into four classes: pellets, clumps (or entangled filaments), branched and unbranched free filaments. Four morphological parameters were initially considered (area, convex area, perimeter, and convex perimeter) but only two parameters (perimeter and convex perimeter) were chosen to automatically classify the cells into the four morphological classes, using histogram analysis. Each morphological class was evaluated during growth carried out in liquid media in fermenter or shaker. It was found that pellets and clumps dominated in early growth stages in fermenter (due to the inoculum coming from a shaker cultivation) and that during cultivation, the breakage of pellets and clumps caused an increase in the percentage of free filaments. The criteria of morphological classification by image analysis proposed were useful to quantify the percentage of each morphological class during fermentations and may help to establish correlations between antibiotic production and microorganism morphology.

Key words: *Streptomyces olindensis*, image analysis, morphology

INTRODUCTION

Filamentous microorganisms such as *Actinomycetales* and filamentous fungi are used in several industrial fermentations. In particular, *Streptomyces* spp. are very important in antibiotic production. In these processes, microorganism morphology is strongly related to the production of metabolites (7,10,11), influencing the rheological properties of the fermentation broth (5), which can cause problems in mixing and mass transfer.

Despite of this importance, little quantitative work to evaluate the morphology of filamentous microorganisms in a systematic way has been published until recent years. With the development of automated image analysis techniques, in the 1990's, a considerable quantity of information about microorganism morphology has been obtained, with faster and more accurate results than the ones obtained with the earlier time-consuming manual methods, consisting in measurements from photographs

(1,3,10). Nowadays, image analysis is a very useful technique to assess morphology during cultivations.

Image analysis is the obtention of information (measurements) from an image by a computer in a reproducible and semi-automated or automated manner. The main advantages of image analysis are that repetitive measurements can be automated and measurements can be made accurately, reproducibly, and more quickly than manual methods based on human observations (6,8).

Hence, in the present work, image analysis techniques were applied to characterize the morphology of *Streptomyces olindensis* in submerged culture, which is a good producer of the antibiotic retamycin, an anthracyclin complex with high antitumour activity (2). The morphology was classified into four classes: pellets, clumps (or entangled filaments), branched, and unbranched free filaments (9), through a criterion developed to classify the microorganism into these classes, based on its dimensions (perimeter and convex perimeter).

* Corresponding author. Mailing address: Escola Politécnica da USP, Departamento de Engenharia Química, Caixa Postal 61548, 05424-970, São Paulo, SP, Brasil. Fax: (+5511) 3031-3020. E-mail: mcrfacci@usp.br

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

The strain of *Streptomyces olindensis* was obtained from Laboratório de Genética de Microrganismos/Instituto de Ciências Biomédicas/Universidade de São Paulo. The cells were stored in tubes containing glycerol 20% v/v, at -20°C (4).

Culture medium

The medium for the cultivations contained the following nutrients (4): glucose (10.0 g/L), yeast extract (5.0 g/L), tris(hydroxymethyl)-aminometan (3.09 g/L), casein hydrolysate (0.10 g/L), K_2SO_4 (0.25 g/L), and $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10.12 g/L). The pH was adjusted in 7.0. After medium sterilization, the following sterile solutions were added (for 250 mL of culture medium): KH_2PO_4 0.5 % w/v (2.5 mL), CaCl_2 5M (1.0 mL), and 0.5 mL of a trace elements solution (40 mg ZnCl_2 , 200 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 1000 mL of distilled water).

Culture conditions

One batch run was performed in a 15-L Biolafitte fermenter (run R-1) under the following conditions: working volume = 10 L; agitation rate = 500 rev/min; air flow rate = 10 L/min; internal pressure = 1.2 atm; pH = 7.0 and temperature = 30°C . The fermenter was provided with three flat blade turbine disk impellers, with four blades each. Another run (R-2) was performed in a New Brunswick rotary shaker at 200 rev/min and 30°C .

Inoculum preparation

The inoculum for the fermenter run (R-1) was prepared in a New Brunswick rotary shaker at 200 rev/min and 30°C for 24 hours. In run R-2, shaker flasks were inoculated with the stock cell suspension (4).

Methodology

Samples collected periodically from the fermenter were evaluated for dry mass (X) after vacuum filtration and drying (4), glucose concentration (S) by glucose-oxidase method (4) and morphology by image analysis.

Image analysis

A LEICA Q500MC Image Analyser, attached to an Olympus BX60 optical microscope, was used. The images were acquired with a JVC TK1280U CCD camera. The microscope images were recorded with a resolution of 640 x 512 pixels and 256 grey values. The grey image was corrected using erosion and dilation, before binarization. The image was then segmented by two thresholds to obtain a binary image. In the segmentation process, pixels which have a grey scale between the two thresholds are picked out and the others are eliminated, to form

the binary image (12). After binarization, the binary image was corrected using erosion, dilation, skeletonization and pruning. Skeletonization and pruning were useful to obtain the number of tips of the hyphal elements.

Sample preparation

Samples from the culture broth were diluted 5- to 20-fold with distilled water. A 20- μm aliquot of the diluted sample was pipetted onto a slide glass, dried and fixed over a Bunsen flame, and stained with methylene blue (0.3 g methylene blue, 30 mL 95% ethyl alcohol, in 100 mL distilled water) (1,12). For each sample, 5 slides were prepared.

For each sample, more than 100 features were characterized by area, convex area, perimeter, and convex perimeter measurements. Convex area is that area bounded by the convex perimeter, in which concavities in the feature boundary have been infilled.

RESULTS AND DISCUSSION

A series of experimental runs (data not shown) were utilized for the proposition of a criterion to classify the features into the four morphological classes in an automated way, based on microorganism dimensions. The set of results was composed by 2110 features (940 free filaments (branched and unbranched), 641 clumps, and 529 pellets). The data were analyzed by means of frequency histograms (Figs. 1 and 2).

Fig. 1 shows the histograms of perimeter. From Fig. 1A, it can be calculated that 95% of free filaments had perimeter between 40 and 600 μm , while from Fig. 1B and 1C, that only 3% of clumps and 1% of pellets presented perimeter in this range. Thus, perimeter is a good criterion to identify free filaments. The criterion to distinguish branched from unbranched filaments is the number of tips. However, also from Figs. 1B and 1C, it can be calculated that 95% of clumps and 80% of pellets presented perimeter between 600 and 10,000 μm . So, perimeter is not a good criterion to distinguish pellets from clumps.

Similarly, Fig. 2 shows the histograms of convex perimeter. From Figs. 2A and 2B, it can be calculated that 93% of free filaments and 10% of clumps presented convex perimeter between 20 and 300 μm . So, convex perimeter is not a good criterion to distinguish free filaments from clumps, as the perimeter criterion. However, from Figs. 2B and 2C, 90% of clumps presented convex perimeter between 100 and 950 μm and 90% of pellets presented convex perimeter between 950 and 7,200 μm . Thus, convex perimeter is a good criterion to distinguish clumps from pellets.

Then, both perimeter and convex perimeter can be used to classify the features into the four morphological classes proposed, as shown in Fig. 3. For clumps, two criteria must be used. The first one to distinguish clumps from free filaments and the second one to distinguish clumps from pellets. Other morphological measurements, such as area and convex area,

Figure 1. Histograms of perimeter for each morphological class of *Streptomyces olindensis* grown in submerged cultures. (A) Free filaments; (B) Clumps; (C) Pellets.

did not allow the establishment of any classification criterion for the microorganism morphology.

To illustrate the applicability of these criteria, the morphology during two fermentation runs (in fermenter and in shaker) was assessed, in order to compare the evolution of morphology and pellet disruption in two very different shear conditions.

Fig. 4A shows the time course of morphology in run R-1, carried out in fermenter, with the percentage of each morphological class, assigned by image analysis. From this figure, it can be observed that pellets dominated in the beginning of fermentation (about 70%), because the inoculum contained a high quantity of pellets, provenient from a shaker culture. During growth phase (0 to 20 hours), pellet percentage decreased while

Figure 2. Histograms of convex perimeter for each morphological class of *Streptomyces olindensis* grown in submerged cultures. (A) Free filaments; (B) Clumps; (C) Pellets.

free filaments (branched and unbranched) percentage increased, as a consequence of severe shear conditions in fermenter, which cause pellet and clump disruption, forming free filaments. Clumps percentage did not vary significantly during fermentation. Fig. 4B shows biomass and glucose profiles during fermentation, in run R-1. Biomass reached a maximum of about 5.5 g/L after 20 hours of cultivation and carbon source exhausted after about 24 hours of cultivation.

In run R-2, carried out in shaker, there was mainly pellets and clumps in the beginning of cultivation, with a significant smaller percentage of free filaments. Only after about 24 hours of cultivation, the percentage of free filaments started increasing. Pellet and clump disruption was indeed faster in fermenter

Figure 3. Morphological classes of *Streptomyces olindensis* grown in submerged cultures and the main characteristics of each class.

Figure 4. (A) Percentage of each morphological class of *Streptomyces olindensis* during run R-1, in fermenter; (B) Biomass and glucose profiles during *Streptomyces olindensis* cultivation in run R-1, in fermenter.

cultivation than in shaker cultivation, because of the very different shear conditions; in fermenter, there are higher shear stress conditions due to the mechanical stirrer, that causes pellet and clump breakage. At the end of the shaker cultivation, there was about 60% of free filaments, as shown in Fig. 5A. Fig. 5B shows biomass and glucose profiles during fermentation, in run R-2. The maximum biomass concentration was about 4.3 g/L,

Figure 5. (A) Percentage of each morphological class of *Streptomyces olindensis* during run R-2, in rotary shaker; (B) Biomass and glucose profiles during *Streptomyces olindensis* cultivation in run R-2, in rotary shaker.

after 24 hours of cultivation. From 24 hours of cultivation up to the end of run R-2, biomass did not vary significantly but the morphology changed markedly, with pellet disruption and significant formation of free filaments. Carbon source exhausted after 44 hours of cultivation.

It should be emphasized that the results of these two runs are only examples of how the morphology can vary along the fermentation course, and that it is strictly related to the shear conditions during cultivation. Hence, very distinct morphological behaviors should be expected when different culture conditions are established.

From the results presented in this work, it can be concluded that the criteria of morphological classification by image analysis proposed here are suitable to quantify the percentage of each morphological class during fermentations. Image analysis showed to be a powerful tool to quantify morphology during filamentous microorganism cultivations and the criteria established will be very useful in future studies, with the main objective of correlating both antibiotic production and microorganism morphology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank FAPESP and PADCT/ CNPq for the financial support.

REFERENCES

1. Adams, H.L.; Thomas, C.R. The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, 32: 707-712, 1988.
2. Bieber, L.W.; Silva Filho, A.A.; Silva, E.C.; Mello, J.F.; Lyra, F.D.A. The anthracyclinic complex retamycin, 1. Structure determination of the major constituents. *J. Nat. Prod.*, 52: 385-388, 1989.
3. Cox, P.W.; Paul, G.C.; Thomas, C.R. Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiol.*, 144: 817-827, 1998.
4. Guimarães, L.M. *Influência do preparo do inóculo e do pH na produção do antibiótico retamicina por Streptomyces olindensis So20*. São Paulo, 2000, 122p. (Master Thesis. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo).
5. Olsvik, E.; Tucker, K.G.; Thomas, C.R.; Kristiansen, B. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 1046-1052, 1993.
6. Pamboukian, C.R.D.; Facciotti, M.C.R. Correlation between pellet size and glucoamylase production in submerged cultures of *Aspergillus awamori*. *Rev. Microbiol.*, 29: 23-26, 1998.
7. Paul, G.C.; Priede, M.A.; Thomas, C.R. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. *Biochem. Eng. J.*, 3: 121-129, 1999.
8. Paul, G.C.; Thomas, C.R. Characterization of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 60: 1-59, 1998.
9. 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. *J. Ferment. Bioeng.*, 83: 523-528, 1997.
10. Treskatis, S.K.; Orgeldinger, V.; Wolf, H.; Gilles, E.D. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.*, 53: 191-201, 1997.
11. Warren, S.J.; Keshavarz-Moore, E.; Shamlou, P.A.; Lilly, M.D.; Thomas, C.R.; Dixon, K. Rheologies and morphologies of three *Actinomyces* in submerged culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 45: 80-85, 1995.
12. Yang, Y.K.; Morikawa, M.; Shimizu, H.; Shioya, S.; Suga, K.; Nihira, T.; Yamada, Y. Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 81: 7-12, 1996.

Apêndice F

Resultados experimentais obtidos nos ensaios

As tabelas seguintes apresentam os resultados experimentais dos ensaios realizados: t (h), X (g/L), S (g/L), Re (g/L), Ri (g/L), Rt (g/L), OD (%), K (dina.sⁿ/cm²), n (adimensional), μ_x (h⁻¹), μ_s (g/(g.h)), μ_{Re} (g/(g.h)), μ_{Ri} (g/(g.h)), μ_{Rt} (g/(g.h)) e QO_2 (mmol/(g.h)). Nos ensaios descontínuos alimentados, os valores em negrito representam o período de alimentação. Os dados de $C_{NH_4^+}$ (mM) são apresentados na tabela F22.

Tabela F1 Resultados experimentais do ensaio DA-1

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO_2
0	0,23	10,6	100,0				0,01	1,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	
1			98,8						0,01	0,00	0,00	0,000	0,000	
2			98,9						0,05	0,03	0,00	0,000	0,000	
3			100,0						0,08	0,07	0,00	0,000	0,000	
4	0,21	10,4	100,0						0,11	0,10	0,00	0,000	0,000	
5			99,8						0,14	0,13	0,00	0,000	0,000	
6			99,3				0,06	0,72	0,17	0,16	0,00	0,000	0,000	
7			98,5						0,19	0,19	0,00	0,000	0,000	
8	0,55	10,6	97,9	0,00	0,00	0,00			0,21	0,21	0,00	0,000	0,000	
9			96,9						0,22	0,22	0,00	0,000	0,000	
10			95,7				0,66	0,66	0,23	0,24	0,00	0,000	0,001	0,00
11			94,1						0,23	0,24	0,00	0,000	0,003	0,13
12	1,37	10	92,7	0,00	0,00	0,00			0,22	0,24	0,01	0,000	0,005	0,70
13			89,5						0,20	0,24	0,01	0,001	0,007	0,63
14			81,8				0,71	0,47	0,17	0,24	0,01	0,003	0,009	1,28
15			77,1						0,14	0,24	0,01	0,004	0,011	1,65
16	3,05	8,3	76,6	0,00	0,00	0,00			0,12	0,25	0,01	0,006	0,016	1,41
17			75,8						0,09	0,25	0,01	0,010	0,024	1,17
18			75,0				2,43	0,40	0,07	0,25	0,02	0,014	0,036	1,06
19			75,3						0,05	0,24	0,03	0,020	0,050	1,00
20	3,97	5,1	73,7	0,37	0,21	0,58			0,04	0,21	0,04	0,024	0,065	0,98
21	4,39	4,2	76,1	0,72					0,03	0,20	0,05	0,027	0,081	0,97
22	4,23	3,8	76,1	0,89			4,48	0,34	0,03	0,19	0,07	0,026	0,092	0,97
23	4,34	3,5	75,2	1,06					0,03	0,15	0,07	0,024	0,093	1,03
24	4,12	3,1	72,6	1,28	0,67	1,95			0,04	0,14	0,07	0,019	0,089	1,16
25	4,15	2,9	74,1	1,45					0,04	0,15	0,07	0,015	0,083	1,31
26	4,16	2,7	74,3	1,70			5,58	0,29	0,03	0,17	0,07	0,012	0,078	1,45
27	4,13	2,5	78,0	1,81					0,04	0,12	0,06	0,010	0,072	1,74
28	4,46	2,1	82,0	2,24	0,70	2,94			0,03	0,07	0,06	0,008	0,065	1,68
29			84,1						0,02	0,07	0,05	0,006	0,059	1,53
30			84,8				6,81	0,31	0,00	0,08	0,05	0,005	0,052	1,79
31			84,9							0,08	0,04	0,004	0,047	2,01
32	4,6	0,7	85,6	3,13	0,90	4,03				0,08	0,04	0,003	0,041	2,01
33			87,0							0,06	0,03	0,002	0,036	1,98
34			87,8				6,76	0,31		0,04	0,03	0,000	0,031	2,03
35			89,3							0,01	0,03		0,029	2,06
36	4,63	0,1	89,3	3,90	0,90	4,80				0,00	0,03		0,030	2,11

Tabela F2 Resultados experimentais do ensaio D-1

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,23	11,1	100,0				0,01	1,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1			100,0						0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
2			100,0						0,05	0,00	0,00	0,000	0,000
3			100,0						0,07	0,00	0,00	0,000	0,000
4	0,28	10,6	100,0						0,09	0,00	0,00	0,000	0,000
5			100,0						0,12	0,00	0,00	0,000	0,000
6			100,0				0,02	0,91	0,15	0,00	0,00	0,000	0,000
7			100,0						0,19	0,00	0,00	0,000	0,000
8	0,5	10,8	99,3						0,21	0,01	0,00	0,000	0,000
9			97,7						0,24	0,08	0,00	0,000	0,000
10			95,9				0,13	0,58	0,26	0,16	0,00	0,000	0,000
11			94,3						0,26	0,22	0,00	0,000	0,000
12	1,3	10,6	91,9	0,00					0,25	0,26	0,00	0,000	0,000
13			89,0						0,22	0,26	0,00	0,000	0,000
14			83,5				0,72	0,47	0,19	0,26	0,00	0,000	0,000
15			79,0						0,15	0,24	0,01	0,002	0,015
16	3,12	8,0	71,8	0,00	0,00	0,00			0,12	0,23	0,02	0,003	0,025
17			70,3						0,09	0,22	0,03	0,006	0,034
18			69,6				2,68	0,37	0,07	0,21	0,04	0,008	0,044
19			69,1						0,06	0,20	0,04	0,011	0,053
20	3,9	5,3	67,7	0,56	0,12	0,68			0,05	0,19	0,05	0,014	0,061
21			66,4						0,04	0,18	0,05	0,017	0,067
22			72,7				5,45	0,32	0,03	0,17	0,05	0,019	0,070
23			77,2						0,03	0,15	0,05	0,020	0,071
24	4,57	1,1	78,1	1,43	0,46	1,89			0,03	0,13	0,05	0,021	0,070
25			77,0						0,03	0,11	0,05	0,021	0,066
26			80,8				6,62	0,31	0,02	0,09	0,04	0,020	0,061
27			83,8						0,01	0,07	0,04	0,018	0,054
28	5,05	0,4	85,8	2,20	0,82	3,02			0,01	0,05	0,03	0,015	0,047
29			93,0						0,00	0,03	0,03	0,012	0,039
30			93,1				7,40	0,31		0,01	0,02	0,009	0,031
31			93,5							0,00	0,02	0,004	0,023
32	4,89	0,1	94,2	2,47	0,98	3,45					0,02	0,000	0,016
33			95,3								0,01		0,015
34			96,0				7,36	0,29			0,00		0,000
35			97,5										0,000
36	4,62	0,1	97,5	3,04	0,75	3,79							0,000

Tabela F3 Resultados experimentais do ensaio DA-2

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,27	10,5	100,0				0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	
1			99,8				0,04	0,00	0,00	0,000	0,00	
2			99,3				0,12	0,00	0,00	0,000	0,00	
3			98,8				0,17	0,02	0,00	0,000	0,00	
4			98,5				0,19	0,05	0,00	0,000	0,00	
5			97,6				0,20	0,07	0,00	0,000	0,00	
6	0,39	10,5	96,9				0,20	0,09	0,00	0,000	0,00	0,00
7			95,3				0,21	0,11	0,00	0,000	0,00	0,00
8			95,0				0,21	0,14	0,00	0,000	0,00	0,17
9			93,7				0,21	0,17	0,00	0,000	0,00	0,66
10			93,0				0,20	0,19	0,00	0,000	0,00	0,67
11			90,9				0,19	0,20	0,00	0,001	0,00	1,24
12	1,66	9,9	88,6				0,18	0,21	0,00	0,002	0,01	2,35
13			94,6				0,16	0,22	0,01	0,003	0,01	3,11
14			82,3				0,14	0,23	0,01	0,004	0,02	3,25
15			79,1				0,12	0,23	0,02	0,005	0,02	2,97
16	3,28	7,6	75,9	0,00	0,00	0,00	0,10	0,24	0,02	0,006	0,03	2,67
17			73,0				0,08	0,23	0,03	0,007	0,04	2,45
18			73,5				0,06	0,21	0,04	0,008	0,05	2,33
19			72,1				0,04	0,19	0,05	0,009	0,06	2,30
20	4,02	4,5	71,9	0,76	0,17	0,93	0,03	0,16	0,05	0,010	0,06	2,36
21	4,16	3,8	74,1	1,01			0,03	0,16	0,05	0,011	0,07	2,39
22			73,2				0,03	0,16	0,05	0,013	0,07	2,32
23			73,5				0,03	0,12	0,05	0,015	0,07	2,22
24	4,96	3,6	66,8	1,59	0,36	1,95	0,03	0,09	0,05	0,018	0,07	2,18
25			66,4				0,03	0,09	0,05	0,019	0,07	2,24
26	4,45	3,4	67,0	2			0,03	0,09	0,06	0,020	0,08	2,53
27			69,0				0,03	0,10	0,06	0,019	0,08	2,67
28	4,4	3,3	69,0	2,65			0,03	0,10	0,05	0,018	0,07	2,66
29			67,4				0,04	0,10	0,05	0,016	0,06	2,73
30	5,05	3,2	66,6	2,84	0,89	3,73	0,05	0,10	0,05	0,014	0,06	2,89
31			67,1				0,06	0,11	0,05	0,012	0,07	2,79
32	5,45	3	67,6	3,38			0,05	0,09	0,06	0,010	0,07	2,56
33			73,6				0,04	0,07	0,06	0,008	0,07	2,28
34			76,1				0,03	0,08	0,05	0,006	0,06	1,86
35			75,5				0,02	0,09	0,04	0,005	0,05	1,61
36	5,74	0,6	75,5	4,62	1,00	5,62	0,02	0,08	0,03	0,003	0,03	1,70
37			76,1				0,01	0,07	0,02	0,002	0,02	1,79
38			83,2				0,00	0,05	0,01	0,001	0,01	1,54
39			83,2				0,00	0,03	0,01	0,000	0,01	1,22
40	6,1	0	83,6	4,40				0,01	0,01	0,000	0,01	0,79
41			82,4					0,00	0,01	0,000	0,01	0,35
42			82,9					0,00	0,00		0,00	0,00
43			83,8					0,00	0,00		0,00	
44	5,17	0	84,6	5,02	1,01	6,03		0,00			0,00	
45			84,7								0,00	
46			85,0								0,00	
47			85,2								0,00	
48	4,86	0	85,4	4,26	0,89	5,15					0,00	

Tabela F4 Resultados experimentais do ensaio D-2

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,38	10,15	100,0				0,00	0,01	0,00	0,000	0,000
1			100,0				0,01	0,02	0,00	0,000	0,000
2			100,0				0,05	0,02	0,00	0,000	0,000
3			100,0				0,08	0,02	0,00	0,000	0,000
4			100,0				0,11	0,02	0,00	0,000	0,000
5			100,0				0,12	0,01	0,00	0,000	0,000
6	0,4	10,1	100,0				0,14	0,02	0,00	0,000	0,000
7			99,2				0,15	0,02	0,00	0,000	0,000
8			98,9				0,17	0,03	0,00	0,000	0,000
9			97,8				0,18	0,04	0,00	0,000	0,000
10			96,6				0,19	0,05	0,00	0,000	0,000
11			95,3				0,19	0,07	0,00	0,000	0,001
12	1,21	9,55	92,7				0,18	0,09	0,00	0,000	0,004
13			90,6				0,17	0,12	0,01	0,001	0,009
14			85,9				0,15	0,16	0,01	0,003	0,015
15			83,1				0,13	0,20	0,02	0,005	0,023
16	2,69	8,92	77,2	0,00	0,00	0,00	0,11	0,24	0,02	0,008	0,031
17			75,8				0,10	0,25	0,03	0,010	0,039
18			75,0				0,09	0,26	0,04	0,013	0,049
19			78,1				0,08	0,25	0,04	0,016	0,059
20	3,32	5,58	77,6	0,50	0,17	0,67	0,07	0,23	0,05	0,018	0,068
21			78,3				0,07	0,21	0,06	0,019	0,075
22			77,8				0,06	0,18	0,06	0,019	0,080
23			80,3				0,06	0,15	0,06	0,019	0,083
24	4,37	3,08	82,5	1,45	0,49	1,94	0,06	0,13	0,07	0,017	0,083
25			81,6				0,05	0,10	0,06	0,016	0,079
26			85,7				0,05	0,09	0,06	0,014	0,072
27			85,7				0,04	0,07	0,05	0,012	0,062
28	5,33	1,46	87,2	2,63			0,03	0,06	0,04	0,010	0,052
29			88,8				0,02	0,05	0,04	0,007	0,043
30			89,0				0,01	0,04	0,03	0,005	0,038
31			89,4				0,00	0,04	0,03	0,004	0,034
32	5,63	0,28	88,4	3,16	0,84	4,00	0,00	0,03	0,03	0,002	0,032
33			91,9				0,00	0,02	0,03	0,000	0,027
34			92,4					0,02	0,02		0,022
35			92,4					0,01	0,01		0,013
36	4,66	0	92,5	3,86				0,01	0,00		0,003
37			92,9					0,00	0,00		0,000
38								0,00	0,00		0,000
39			93,4					0,00			0,000
40	4,33	0	93,3	3,41				0,00			
41			93,7					0,00			
42			94,2					0,00			
43			94,2					0,00			
44	4,51	0	94,8	3,56	0,64	4,20		0,00			
45			94,9					0,00			
46			94,4					0,00			
47			95,2					0,00			
48	3,86	0	95,2	3,59	0,59	4,18		0,00			

Tabela F5 Resultados experimentais do ensaio DA-3

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,23	10,4	100,0				0,02	0,98	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	
1			100,0						0,02	0,00	0,00	0,000	0,000	
2			100,0						0,06	0,01	0,00	0,000	0,000	
3			100,0						0,10	0,03	0,00	0,000	0,000	
4	0,3	10,7	100,0						0,13	0,05	0,00	0,000	0,000	
5			100,0						0,19	0,06	0,00	0,000	0,000	
6			99,6						0,25	0,07	0,00	0,000	0,000	0,00
7			98,6						0,29	0,08	0,00	0,000	0,000	1,46
8	0,73	10,6	97,6						0,30	0,10	0,00	0,000	0,000	0,70
9			98,2						0,28	0,14	0,00	0,000	0,000	2,75
10			93,3						0,25	0,20	0,00	0,000	0,000	3,81
11			87,0						0,21	0,25	0,00	0,000	0,000	3,69
12	2,36	9,9	87,0				0,91	0,45	0,18	0,28	0,01	0,001	0,008	3,48
13			82,6						0,15	0,31	0,01	0,003	0,012	4,35
14			78,7						0,13	0,32	0,01	0,005	0,018	4,19
15			75,0						0,10	0,31	0,02	0,007	0,024	4,03
16	3,83	5,8	74,5	0,19					0,08	0,29	0,02	0,009	0,033	3,39
17			73,8						0,06	0,25	0,03	0,010	0,043	3,66
18	4,39	3,9	78,5	0,45					0,03	0,26	0,05	0,011	0,056	2,91
19			83,2						0,02	0,20	0,06	0,012	0,069	2,21
20	4,5	2,9	85,9	0,99	0,28	1,27	6,49	0,29	0,01	0,16	0,07	0,012	0,080	1,81
21			88,8						0,01	0,12	0,08	0,012	0,089	1,48
22			84,7						0,01	0,10	0,08	0,011	0,094	1,52
23			86,9						0,01	0,08	0,09	0,010	0,098	1,49
24	4,79	2,4	87,4	2,46					0,01	0,07	0,09	0,009	0,099	1,49
25			88,4						0,01	0,07	0,09	0,009	0,097	1,46
26			89,0						0,01	0,06	0,09	0,008	0,093	1,51
27			89,4						0,01	0,06	0,08	0,007	0,086	1,49
28	4,38	2,7	89,0	3,96	1,17	5,13			0,01	0,06	0,07	0,006	0,078	1,49
29			89,1						0,02	0,06	0,06	0,006	0,070	1,79
30			89,3						0,02	0,06	0,05	0,005	0,060	1,77
31			89,2						0,03	0,05	0,05	0,005	0,051	1,74
32	4,8	3,4	90,7	4,82					0,03	0,05	0,04	0,005	0,041	1,71
33			90,3						0,04	0,05	0,03	0,004	0,033	1,68
34			90,6						0,04	0,05	0,02	0,004	0,025	1,59
35			90,9						0,03	0,05	0,02	0,004	0,019	1,53
36	5,61	4,2	90,5	4,25	0,83	5,08			0,03	0,05	0,01	0,004	0,014	1,53
37			88,9						0,03	0,05	0,01	0,004	0,010	1,46
38			86,6						0,02	0,06	0,00	0,004	0,008	1,41
39			89,7						0,02	0,06	0,00	0,005	0,006	1,63
40			89,6						0,01	0,07	0,00	0,005	0,005	1,59
41			89,6						0,01		0,00	0,005	0,006	1,51
42	5,71	5,2	89,2	4,81	0,80	5,61	11,20	0,27	0,01		0,00	0,006	0,007	1,50
43			92,2						0,01		0,00	0,006	0,010	1,50
44			92,8						0,00		0,01	0,007	0,015	1,49
45			93,1						0,00		0,01	0,007	0,022	1,49
46			93,3						0,00		0,02	0,008	0,030	0,71
47			93,2						0,00	0,05	0,03	0,009	0,037	0,45

continua

Continuação da tabela F5 Resultados experimentais do ensaio DA-3														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ _x	μ _s	μ _{Re}	μ _{Ri}	μ _{Rt}	QO ₂
48	5,29	3,9	93,6	5,01	1,11	6,12	11,90	0,25	0,00	0,05	0,04	0,010	0,045	0,20
49			93,5						0,00	0,06	0,04	0,010	0,050	0,00
50			93,0						0,00	0,06	0,04	0,011	0,053	
51			93,3						0,00	0,06	0,04	0,011	0,054	
52	6,08	2,7	93,4	6,75	0,95	7,70			0,00	0,05	0,04	0,011	0,053	
53			93,1						0,00	0,05	0,04	0,011	0,051	
54			92,9						0,00	0,05	0,04	0,011	0,049	
55			93,4						0,00	0,06	0,04	0,011	0,046	
56	6,15	1,6	94,6	7,62			10,40	0,20	0,00	0,06	0,03	0,010	0,043	
57			93,9						0,00	0,06	0,03	0,010	0,039	
58			93,7						0,00	0,05	0,03	0,009	0,036	
59			94,5						0,00	0,04	0,02	0,008	0,032	
60	6,29	0	95,7	8,02	2,01	10,03			0,00	0,03	0,02	0,007	0,028	
61			100,0							0,02	0,02	0,006	0,023	
62			100,0							0,00	0,01	0,004	0,018	
63			100,0							0,00	0,01	0,002	0,012	
64			100,0								0,01	0,000	0,007	
65			100,0								0,00	0,000	0,002	
66	5,84	0	100,0	9,11	2,03	11,14	11,73	0,28			0,00		0,000	
67			100,0											
68			100,0											
69			100,0											
70			100,0											
71			100,0											
72	5,6	0	100,0	8,71	1,58	10,29								

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,22	10,6				0,02	0,98	0,22	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1									0,05	0,02	0,00	0,000	0,000
2									0,09	0,08	0,00	0,000	0,000
3									0,12	0,12	0,00	0,000	0,000
4	0,28	11,3						0,28	0,14	0,16	0,00	0,000	0,000
5									0,20	0,19	0,00	0,000	0,000
6									0,26	0,23	0,00	0,000	0,000
7									0,30	0,25	0,00	0,000	0,000
8	0,76	10,6						0,76	0,30	0,25	0,00	0,000	0,000
9									0,28	0,26	0,00	0,000	0,000
10									0,24	0,27	0,00	0,000	0,000
11									0,20	0,27	0,00	0,000	0,000
12	2,43	9				1,13	0,40	2,43	0,17	0,28	0,00	0,000	0,000
13									0,15	0,27	0,01	0,002	0,009
14									0,12	0,24	0,01	0,004	0,017
15									0,10	0,22	0,02	0,007	0,026
16	3,76	5,7	0,15					3,76	0,09	0,19	0,03	0,009	0,035

continua

Continuação da tabela F6 Resultados experimentais do ensaio D-3													
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
17									0,07	0,17	0,03	0,012	0,045
18									0,05	0,16	0,04	0,013	0,055
19									0,04	0,15	0,05	0,014	0,065
20	4,79	3,8	0,88	0,31	1,19	5,52	0,31	4,79	0,02	0,14	0,06	0,015	0,074
21									0,01	0,13	0,06	0,016	0,080
22									0,00	0,12	0,06	0,015	0,080
23									0,00	0,11	0,06	0,015	0,075
24	4,65	0,4	2,23					4,65	0,00	0,09	0,05	0,014	0,068
25									0,00	0,07	0,05	0,013	0,059
26										0,05	0,04	0,011	0,051
27										0,03	0,03	0,009	0,043
28	4,57	0,1	2,76	0,83	3,59			4,57		0,02	0,03	0,007	0,036
29										0,01	0,02	0,005	0,029
30										0,00	0,02	0,004	0,024
31										0,00	0,02	0,002	0,020
32	4,42	0	3,24					4,42		0,00	0,02	0,001	0,017
33										0,00	0,01	0,000	0,014
34											0,01	0,000	0,013
35											0,01	0,000	0,012
36	5,25	0	3,45	0,76	4,21			5,25			0,01	0,000	0,012
37											0,01	0,000	0,012
38											0,01		0,011
39											0,01		0,010
40											0,01		0,009
41											0,01		0,007
42	4,28	0	3,74	0,82	4,56	7,27	0,27	4,28			0,01		0,006
43											0,00		0,004
44											0,00		0,003
45											0,00		0,000
46											0,00		
47											0,00		
48	4,12	0	3,43	0,61	4,04	6,31	0,25	4,12			0,00		
49													
50													
51													
52	4,54	0	4,11	0,59	4,70			4,54					

Tabela F7 Resultados experimentais do ensaio D-3+

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,24	16,3	100,0				0,02	0,98	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1			99,9						0,02	0,00	0,00	0,000	0,000
2			99,8						0,04	0,01	0,00	0,000	0,000
3			100,0						0,06	0,02	0,00	0,000	0,000
4	0,23	16,7	99,9						0,08	0,02	0,00	0,000	0,000
5			99,9						0,15	0,03	0,00	0,000	0,000
6			98,3						0,23	0,04	0,00	0,000	0,000
7			97,1						0,29	0,05	0,00	0,000	0,000
8	0,53	17,2	95,3						0,31	0,06	0,00	0,000	0,000
9			93,8						0,30	0,08	0,00	0,000	0,000
10			91,4						0,27	0,11	0,00	0,000	0,000
11			97,0						0,24	0,13	0,00	0,001	0,001
12	1,97	16,7	82,0				0,65	0,43	0,21	0,15	0,00	0,003	0,003
13			81,4						0,18	0,17	0,00	0,004	0,004
14			77,9						0,15	0,18	0,01	0,006	0,012
15			76,8						0,12	0,19	0,01	0,008	0,018
16	3,48	14,3	69,4						0,10	0,20	0,01	0,010	0,024
17			68,6						0,08	0,20	0,02	0,012	0,032
18			75,0						0,06	0,18	0,03	0,014	0,043
19			66,9						0,05	0,17	0,04	0,015	0,054
20	4,45	10,3	70,0	0,50	0,30	0,80	4,59	0,33	0,04	0,15	0,05	0,016	0,066
21			76,1						0,03	0,13	0,06	0,017	0,076
22			76,2						0,02	0,12	0,07	0,017	0,083
23			78,9						0,01	0,12	0,07	0,017	0,088
24	4,88	9,9	81,5	1,86					0,01	0,12	0,07	0,016	0,090
25			82,1						0,01	0,12	0,08	0,016	0,091
26			83,6						0,00	0,11	0,08	0,014	0,091
27			85,0						0,00	0,10	0,08	0,013	0,088
28	4,89	6,7	85,9	3,24	0,98	4,22			0,00	0,08	0,07	0,012	0,084
29			85,9						0,00	0,07	0,07	0,010	0,075
30			87,1						0,01	0,06	0,05	0,009	0,063
31			87,2						0,02	0,05	0,04	0,008	0,048
32	5,03	5,8	87,4	4,43					0,03	0,04	0,02	0,007	0,031
33			87,7						0,04	0,03	0,01	0,006	0,019
34			88,0						0,04	0,03	0,01	0,006	0,012
35			88,1						0,04	0,03	0,01	0,005	0,011
36	6,35	5	89,3	4,04	1,09	5,13			0,03	0,03	0,01	0,005	0,012
37			89,2						0,02	0,03	0,01	0,005	0,015
38			88,6						0,02	0,03	0,01	0,005	0,018
39			89,7						0,01	0,04	0,02	0,005	0,021
40			89,2						0,01	0,04	0,02	0,005	0,024
41			89,1						0,00	0,04	0,02	0,005	0,027
42	6,31	3,5	88,4	5,43	0,97	6,40	8,23	0,30	0,00	0,04	0,03	0,005	0,030
43			88,6						0,00	0,04	0,03	0,005	0,034
44			88,2						0,00	0,05	0,03	0,005	0,037
45			88,2						0,00	0,05	0,03	0,005	0,040
46			88,1						0,00	0,05	0,04	0,005	0,042
47			88,2						0,00	0,05	0,04	0,004	0,044

continua

Continuação da tabela F7 Resultados experimentais do ensaio D-3+													
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
48	6,31	1,8	88,0	6,43	1,60	8,03	9,75	0,26	0,00	0,05	0,04	0,004	0,044
49			88,6						0,00	0,05	0,04	0,004	0,043
50			88,4						0,00	0,04	0,04	0,003	0,039
51			85,5						0,00	0,04	0,03	0,001	0,034
52	6,74	0,6	87,1	7,58	1,64	9,22			0,00	0,03	0,03	0,000	0,027
53			87,4						0,00	0,03	0,02	0,000	0,022
54			87,8						0,00	0,02	0,02	0,000	0,019
55			91,6						0,00	0,02	0,02	0,000	0,016
56	6,67	0,1	91,8	7,89			7,79	0,27	0,00	0,01	0,01	0,000	0,014
57			93,3							0,01	0,01		0,013
58			94,0							0,00	0,01		0,012
59			94,7							0,00	0,01		0,012
60	5,97	0	95,2	7,83	1,32	9,15				0,00	0,01		0,012
61			95,9							0,00	0,01		0,012
62			96,0								0,01		0,012
63			96,5								0,01		0,011
64			96,5								0,01		0,010
65			96,7								0,01		0,008
66	5,77	0	96,7	8,69	1,45	10,14	6,62	0,32			0,00		0,005
67			96,7								0,00		
68			97,1								0,00		
69			97,2								0,00		
70			97,5										
71			98,2										
72	5,51	0	98,4	8,22	1,25	9,47							

Tabela F8 Resultados experimentais do ensaio DA-4

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO₂
0	0,24	10,4	100,0				0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	
1			100,0						0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	
2			100,0						0,02	0,04	0,00	0,000	0,000	
3			100,0						0,06	0,10	0,00	0,000	0,000	
4	0,26	10,4	99,7						0,11	0,16	0,00	0,000	0,000	
5			98,9						0,19	0,20	0,00	0,000	0,000	
6			97,7						0,23	0,23	0,00	0,000	0,000	
7			96,3						0,24	0,24	0,00	0,000	0,000	
8	0,57	10,2	93,5						0,24	0,25	0,00	0,000	0,000	
9			91,2						0,23	0,27	0,00	0,000	0,000	
10			85,9						0,22	0,30	0,00	0,000	0,005	0,00
11			84,3						0,20	0,31	0,01	0,000	0,006	0,16
12	1,55	9,4	79,0				0,22	0,59	0,18	0,30	0,01	0,000	0,008	0,91
13			79,9						0,18	0,26	0,01	0,000	0,010	1,54
14			71,8						0,15	0,20	0,01	0,002	0,015	2,00
15	2,6	7,8	64,0						0,13		0,02	0,005	0,021	2,31
16	2,94	7,2	60,4						0,09		0,02	0,010	0,031	2,55

continua

Continuação da tabela F8 Resultados experimentais do ensaio DA-4														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO₂
17			61,4						0,10	0,26	0,03	0,016	0,042	2,60
18	3,04	7,8	64,4	0,00	0,15	0,15	1,82	0,37	0,09	0,27	0,03	0,019	0,052	2,56
19			62,1						0,09	0,29	0,04	0,020	0,060	2,38
20	3,91	6,9	68,2						0,08	0,30	0,05	0,020	0,066	2,20
21			71,4						0,06	0,26	0,05	0,019	0,070	2,00
22	4,34	7,3	73,9	1,02	0,44	1,46			0,04	0,18	0,06	0,017	0,074	1,87
23			76,1						0,03	0,17	0,06	0,015	0,076	1,75
24	3,66	8,5	77,0	1,40			3,63	0,32	0,02	0,24	0,06	0,013	0,078	1,70
25			75,8						0,01		0,07	0,012	0,079	1,66
26	3,99	8	75,6	2,09					0,01		0,07	0,011	0,079	1,92
27			76,7						0,01	0,10	0,07	0,010	0,077	1,99
28	4,06	7,3	80,3	2,51	0,61	3,12			0,01	0,10	0,06	0,009	0,071	2,07
29			78,6						0,01	0,08	0,06	0,008	0,064	2,10
30			77,1						0,01	0,07	0,05	0,007	0,058	2,11
31			77,3						0,01	0,05	0,05	0,007	0,053	2,09
32	3,67	7,1	78,0	3,23			3,23	0,36	0,01	0,04	0,04	0,006	0,049	2,06
33			79,2						0,01	0,03	0,04	0,006	0,047	1,97
34			78,5						0,01	0,03	0,04	0,006	0,045	1,83
35			81,0						0,01	0,04	0,04	0,006	0,043	1,64
36	4,57	5,9	80,3	3,96	0,93	4,89			0,00	0,05	0,04	0,006	0,042	1,44
37			82,3						0,00	0,06	0,04	0,006	0,041	1,23
38			84,0						0,00	0,07	0,03	0,005	0,040	1,06
39			83,7						0,00	0,07	0,03	0,005	0,040	0,94
40	4,74	4,6	83,7	4,93			4,45	0,29		0,07	0,03	0,005	0,039	0,89
41			83,6							0,07	0,03	0,005	0,039	0,88
42			84,6							0,07	0,03	0,005	0,039	0,90
43			84,6							0,06	0,03	0,005	0,040	0,92
44	4,57	3,6	85,0	5,63	1,18	6,81				0,05	0,04	0,005	0,041	0,95
45			85,3							0,05	0,04	0,005	0,043	0,91
46			85,3							0,04	0,04	0,005	0,043	0,83
47			85,4							0,04	0,04	0,005	0,043	0,69
48	4,68	2,9	84,8	5,89			2,39	0,40		0,05	0,04	0,005	0,042	0,51
49			85,3							0,05	0,03	0,005	0,039	0,32
50			85,3							0,06	0,03	0,004	0,033	0,11
51			84,6							0,07	0,02	0,004	0,026	0,00
52	4,53	1,8	85,0	7,28	1,35	8,63				0,08	0,01	0,003	0,018	0,00
53			85,0							0,09	0,01	0,003	0,010	
54			85,0							0,10	0,00	0,002	0,003	
55			85,0							0,11	0,00	0,001	0,000	
56	4,00	0,1	85,0	7,16	1,48	8,64				0,13	0,00	0,001	0,000	

Tabela F9 Resultados experimentais do ensaio D-4

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,36	11	100,0				0,01	1,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1			100,0						0,00	0,01	0,00	0,000	0,000
2			100,0						0,00	0,04	0,00	0,000	0,000
3			100,0						0,00	0,07	0,00	0,000	0,000
4	0,3	11	99,9						0,01	0,10	0,00	0,000	0,000
5			99,8						0,05	0,13	0,00	0,000	0,000
6			99,1						0,10	0,17	0,00	0,000	0,000
7			98,4						0,17	0,20	0,00	0,000	0,000
8	0,5	10,6	97,1						0,21	0,22	0,00	0,000	0,000
9			95,3						0,24	0,23	0,00	0,000	0,000
10			92,1						0,24	0,24	0,00	0,000	0,000
11			89,3						0,24	0,25	0,00	0,000	0,000
12	1,41	9,8	89,3				0,13	0,65	0,22	0,25	0,00	0,000	0,000
13			87,6						0,20	0,24	0,00	0,001	0,001
14			82,4						0,17	0,23	0,00	0,004	0,004
15			80,3						0,15	0,22	0,00	0,007	0,007
16	2,85	7,8	74,0	0,00					0,12	0,22	0,00	0,010	0,010
17			72,4						0,10	0,21	0,02	0,012	0,030
18			70,8						0,08	0,20	0,03	0,014	0,046
19			70,4						0,06	0,19	0,04	0,015	0,060
20	3,97	5,4	69,4	0,34	0,24	0,58			0,04	0,19	0,06	0,017	0,072
21			64,9						0,02	0,18	0,07	0,018	0,083
22			72,3						0,01	0,17	0,07	0,018	0,091
23			74,2						0,01	0,16	0,08	0,017	0,098
24	3,76	2,6	76,0	1,61			5,02	0,31	0,01	0,15	0,08	0,016	0,101
25			80,6						0,01	0,13	0,08	0,015	0,099
26			79,3						0,01	0,11	0,08	0,013	0,091
27			80,9						0,01	0,09	0,07	0,011	0,079
28	4,96	0	82,0	2,91	0,81	3,72			0,01	0,07	0,06	0,008	0,064
29			83,4						0,01	0,05	0,04	0,006	0,048
30			87,0						0,01	0,04	0,03	0,004	0,035
31			87,8						0,00	0,02	0,02	0,002	0,023
32	4,14	0	89,3	3,30			5,29	0,32	0,00	0,01	0,01	0,001	0,013
33			90,9						0,00	0,00	0,01	0,000	0,005
34			91,6						0,00	0,00	0,00	0,000	0,003
35			92,1						0,00	0,00	0,00	0,000	0,002
36	4,5	0	92,8	3,41	0,65	4,06							0,000
37			93,8										0,000
38			94,4										0,000
39			94,7										
40	4,1	0	94,9	3,47			5,27	0,30					
41			95,0										
42			95,5										
43			95,7										
44	4,06	0	96,0	3,49	0,69	4,18							
45			96,0										
46			96,0										
47			96,7										

continua

Continuação da tabela F9 Resultados experimentais do ensaio D-4													
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
48	3,32	0	96,6	3,71			2,22	0,39					
49			96,8										
50			96,9										
51			96,9										
52	3,94	0	96,9	3,82	0,55	4,37							

Tabela F10 Resultados experimentais do ensaio DA-5

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,27	11,1	100,0				0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	
1			100,0						0,03	0,02	0,00	0,000	0,00	
2			100,0						0,08	0,08	0,00	0,000	0,00	
3			100,0						0,12	0,11	0,00	0,000	0,00	
4	0,35	11,1	99,7						0,15	0,15	0,00	0,000	0,00	
5			98,9						0,18	0,21	0,00	0,000	0,00	
6			97,7						0,22	0,29	0,00	0,000	0,00	
7			96,3						0,24	0,34	0,00	0,000	0,00	
8	0,79	10,7	93,5						0,25	0,35	0,00	0,000	0,00	
9			91,2						0,24	0,37	0,00	0,000	0,00	
10			85,9						0,23	0,35	0,00	0,000	0,00	
11			84,3						0,21	0,28	0,00	0,000	0,00	0,00
12	2,23	9,2	79,0	0,00			0,44	0,52	0,19	0,15	0,00	0,002	0,00	0,24
13	2,55	8,8	79,9						0,17		0,00	0,004	0,01	1,26
14	3,16	9,3	71,8						0,17		0,01	0,005	0,01	2,00
15	3,51	9,9	64,0				1,57	0,40	0,14	0,08	0,01	0,006	0,02	2,23
16	3,38	11,4	60,4	0,00	0,00	0,00			0,11	0,18	0,02	0,007	0,03	2,40
17	3,61	11,7	61,4	0,24					0,09		0,03	0,008	0,04	2,43
18	3,92	12,4	64,4	0,33	0,15	0,48	2,81	0,36	0,07		0,04	0,009	0,04	2,35
19			62,1						0,06	0,11	0,04	0,010	0,05	2,75
20	4,15	10,7	68,2	0,56	0,20	0,76			0,04	0,20	0,05	0,012	0,06	2,72
21			71,4						0,03	0,24	0,06	0,013	0,07	2,28
22			73,9						0,02	0,23	0,07	0,014	0,08	1,55
23			76,1						0,01	0,20	0,07	0,014	0,09	0,90
24	4,78	8,1	77,0	1,85			5,08	0,32	0,01	0,15	0,08	0,014	0,09	0,55
25			75,8						0,00	0,10	0,08	0,013	0,09	0,48
26			75,6						0,00	0,07	0,08	0,013	0,09	0,55
27			76,7						0,00	0,04	0,07	0,012	0,08	0,65
28	4,42	7,1	80,3	3,58	0,87	4,45			0,01	0,02	0,06	0,011	0,07	0,78
29			78,6						0,01	0,01	0,05	0,010	0,06	0,88
30			77,1						0,01	0,01	0,04	0,009	0,05	0,95
31			77,3						0,01	0,02	0,03	0,008	0,04	1,00
32	5,07	6,1	78,0	4,25			8,98	0,26	0,02	0,03	0,02	0,008	0,03	1,09
33			79,2						0,02	0,04	0,02	0,007	0,02	1,18
34			78,5						0,01	0,05	0,01	0,006	0,02	1,27
35			81,0						0,01	0,05	0,01	0,006	0,02	1,35
36	6,17	5,1	80,3	4,12	0,99	5,11			0,00	0,05	0,01	0,006	0,01	1,45

continua

Continuação da tabela F10 Resultados experimentais do ensaio DA-5														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ _x	μ _s	μ _{Re}	μ _{Ri}	μ _{Rt}	QO ₂
37			82,3						0,00	0,05	0,01	0,006	0,02	1,52
38			84,0							0,05	0,01	0,005	0,02	1,58
39			83,7							0,05	0,01	0,005	0,02	1,62
40	5,65	4,2	83,7	4,85			10,32	0,24		0,05	0,02	0,005	0,02	1,63
41			83,6							0,05	0,02	0,005	0,03	1,64
42			84,6							0,05	0,03	0,005	0,03	1,66
43			84,6							0,05	0,03	0,005	0,04	1,68
44	5,62	3,1	85,0	5,91	1,39	7,30				0,05	0,03	0,005	0,04	1,71
45			85,3							0,05	0,04	0,005	0,04	1,69
46			85,3							0,05	0,03	0,005	0,04	1,48
47			85,4							0,06	0,03	0,004	0,03	1,32
48	5,7	2,1	84,8	6,80			11,27	0,24		0,06	0,02	0,004	0,03	1,33
49			85,3							0,06	0,02	0,004	0,02	1,44
50			85,3							0,07	0,01	0,004	0,01	1,43
51			84,6							0,07	0,00	0,003	0,00	1,28
52	4,53	0,7	85,0	7,06	1,64	8,70				0,07	0,00	0,002	0,00	1,13
53			85,0							0,06		0,002	0,00	1,05
54			85,0							0,04		0,001		1,07
55			85,0							0,02				1,12
56	4,53	0	85,0	7,02	1,65	8,67	10,32	0,24		0,00				1,09

[illegible]

Continuação da tabela F11 Resultados experimentais do ensaio D-5													
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
22			84,2						0,03	0,16	0,05	0,018	0,068
23			85,9						0,01	0,15	0,06	0,018	0,082
24	4,2	2,4	86,3	1,16			2,96	0,34	0,00	0,14	0,08	0,018	0,097
25			88,0						0,00	0,13	0,09	0,017	0,107
26			88,6						0,00	0,12	0,09	0,016	0,110
27			89,8							0,10	0,09	0,014	0,106
28	3,8	0,1	91,7	2,95	0,75	3,70				0,08	0,09	0,011	0,097
29			91,4							0,05	0,07	0,009	0,082
30			94,6							0,03	0,06	0,006	0,062
31			94,0							0,02	0,04	0,003	0,041
32	3,69	0,1	97,7	3,64			1,20	0,45		0,00	0,02	0,001	0,020
33			99,5							0,00	0,00	0,000	0,005
34			100,0							0,00	0,00	0,000	0,000
35			100,0							0,00	0,00	0,000	0,000
36	3,89	0	100,0	3,63	0,80	4,43					0,00		0,000
37			100,0								0,00		0,000
38			100,0								0,00		0,000
39			100,0										0,000
40	3,71	0	100,0	3,65			0,73	0,54					0,000
41			100,0										
42			100,0										
43			100,0										
44	3,4	0	100,0	3,75	0,72	4,47							
45			100,0										
46			100,0										
47			100,0										
48	3,31	0	100,0	3,82			0,56	0,56					
49			100,0										
50			100,0										
51			100,0										
52	2,64	0	100,0	3,97	0,62	4,59							

Tabela F12 Resultados experimentais do ensaio DA-3b

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,3	10,6	100,0				0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	
1			99,7						0,03	0,02	0,00	0,000	0,000	
2			99,7						0,06	0,07	0,00	0,000	0,000	
3			99,0						0,10	0,12	0,00	0,000	0,000	
4			98,5						0,15	0,18	0,00	0,000	0,000	
5			97,9						0,21	0,23	0,00	0,000	0,000	
6	0,65	10,5	96,9						0,25	0,26	0,00	0,000	0,000	
7			95,6						0,26	0,27	0,00	0,000	0,000	0,00
8			94,1						0,25	0,28	0,00	0,000	0,004	0,03
9			92,1						0,23	0,28	0,00	0,000	0,004	0,92
10			87,0						0,21	0,27	0,00	0,000	0,004	1,18

continua

Continuação da tabela F12 Resultados experimentais do ensaio DA-3b														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO₂
11			84,5						0,18	0,27	0,01	0,000	0,006	1,45
12	2,63	8,6	80,3				0,92	0,45	0,16	0,26	0,01	0,001	0,010	1,55
13			77,8						0,13	0,24	0,02	0,004	0,019	1,50
14			77,2						0,10	0,23	0,02	0,007	0,030	1,57
15			76,3						0,07	0,22	0,03	0,010	0,043	1,67
16	3,99	5,5	76,3	0,27					0,05	0,21	0,04	0,013	0,057	1,72
17			79,0						0,03	0,20	0,06	0,016	0,072	1,71
18			76,3						0,02	0,19	0,07	0,018	0,086	1,67
19			76,8						0,01	0,18	0,08	0,020	0,099	1,65
20	4,08	2,5	74,8	1,75	0,51	2,26	3,92	0,31	0,01	0,16	0,09	0,021	0,109	1,71
21	4,29	1,9	77,1	1,92					0,01	0,16	0,09	0,021	0,114	1,77
22			75,5						0,01	0,16	0,09	0,020	0,111	1,81
23			79,5						0,02	0,13	0,08	0,019	0,102	1,80
24	4,72	1,3	79,5	3,24			6,18	0,25	0,02	0,11	0,07	0,018	0,089	1,78
25			79,2						0,01	0,09	0,06	0,017	0,075	1,79
26			79,9						0,02	0,09	0,05	0,015	0,061	1,82
27			78,4						0,02	0,08	0,03	0,014	0,048	1,80
28	4,76	1,1	78,2	3,70	1,05	4,75			0,02	0,08	0,03	0,012	0,038	1,79
29			78,1						0,02	0,08	0,02	0,010	0,031	1,76
30			78,0						0,03	0,08	0,02	0,009	0,029	1,65
31			77,6						0,04	0,08	0,02	0,008	0,031	1,58
32	5,26	0,9	77,2	4,12			11,85	0,29	0,05	0,08	0,03	0,008	0,034	1,54
33			76,7						0,05	0,08	0,03	0,007	0,036	1,46
34			75,9						0,05	0,08	0,03	0,007	0,037	1,40
35			74,9						0,04	0,08	0,03	0,007	0,037	1,37
36	6,68	0,8	77,0	4,83	1,22	6,05			0,03	0,08	0,03	0,007	0,036	1,48
37			64,3						0,02	0,08	0,03	0,007	0,036	1,59
38			57,8						0,02	0,08	0,03	0,007	0,038	1,70
39			57,8						0,02	0,09	0,03	0,007	0,040	1,76
40	6,2	0,7	58,3	5,27			16,76	0,27	0,02	0,09	0,04	0,007	0,042	1,78
41			58,3						0,02	0,09	0,04	0,007	0,045	1,75
42			58,8						0,03	0,09	0,04	0,006	0,048	1,69
43			58,3						0,03	0,08	0,04	0,006	0,050	1,54
44	7,11	0,5	59,0	6,46	1,63	8,09			0,04	0,08	0,05	0,005	0,052	1,43
45			58,5						0,04	0,08	0,05	0,004	0,051	1,33
46			59,4						0,03	0,09	0,05	0,004	0,049	1,24
47	7,73	0,6	60,0	7,31			18,72	0,29	0,02	0,09	0,04	0,002	0,045	1,15
48			63,6						0,01	0,06	0,04	0,001	0,038	1,07
49			69,3						0,01	0,02	0,03	0,000	0,029	1,12
50	7,71	0,1	81,8	8,30	1,66	9,96			0,01	0,02	0,02	0,000	0,019	1,13
51			83,2						0,01	0,02	0,01		0,008	1,10
52			84,4						0,01	0,01	0,00		0,000	1,11
53			85,7						0,01	0,00	0,00		0,000	1,04
54	7,83	0	86,7	8,26	1,60	9,86	17,06	0,29	0,01	0,00	0,00			0,70

Tabela F13 Resultados experimentais do ensaio D-3b

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,28	10,9	100,0				0,01	0,98	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1			100,0						0,02	0,01	0,00	0,000	0,000
2			100,0						0,05	0,04	0,00	0,000	0,000
3			100,0						0,08	0,07	0,00	0,000	0,000
4			100,0						0,13	0,11	0,00	0,000	0,000
5			100,0						0,20	0,14	0,00	0,000	0,000
6	0,47	10,3	100,0						0,26	0,17	0,00	0,000	0,000
7			100,0						0,27	0,18	0,00	0,000	0,000
8			100,0						0,27	0,20	0,00	0,000	0,000
9			100,0						0,25	0,20	0,00	0,000	0,000
10			98,3						0,22	0,21	0,00	0,000	0,000
11			96,9						0,20	0,21	0,00	0,000	0,000
12	2,25	9,1	91,5				0,69	0,46	0,17	0,21	0,01	0,000	0,005
13			87,4						0,15	0,21	0,01	0,003	0,016
14			83,8						0,12	0,21	0,02	0,008	0,030
15			82,1						0,10	0,21	0,03	0,013	0,046
16	3,56	6,6	80,5	0,11					0,07	0,21	0,04	0,018	0,062
17			81,7						0,06	0,21	0,05	0,021	0,075
18			80,1						0,05	0,20	0,06	0,023	0,086
19			77,7						0,04	0,19	0,07	0,023	0,093
20	4,17	3,4	80,1	1,27	0,49	1,76	4,26	0,30	0,03	0,17	0,08	0,021	0,097
21			85,7						0,03	0,15	0,08	0,019	0,095
22			85,7						0,03	0,13	0,07	0,017	0,088
23			85,7						0,02	0,11	0,06	0,014	0,076
24	4,81	1,2	89,3	2,66			4,49	0,30	0,02	0,08	0,05	0,011	0,062
25			90,5						0,02	0,06	0,04	0,009	0,050
26			91,5						0,02	0,05	0,03	0,008	0,039
27			91,5						0,02	0,03	0,02	0,007	0,030
28	4,76	0,1	95,4	2,97	0,92	3,89			0,02	0,02	0,02	0,006	0,023
29			98,5						0,01	0,02	0,01	0,005	0,018
30			98,9						0,01	0,01	0,01	0,004	0,015
31			100,0						0,01	0,01	0,01	0,003	0,014
32	5,39	0	100,0	3,25			8,35	0,32	0,01	0,00	0,01	0,003	0,013
33			100,0						0,00	0,00	0,01	0,003	0,013
34			100,0							0,00	0,01	0,002	0,012
35			100,0							0,00	0,01	0,002	0,011
36	5,36	0	100,0	3,62	1,06	4,68				0,00	0,01	0,002	0,009
37			100,0							0,00	0,01	0,001	0,007
38			100,0							0,00	0,00	0,001	0,004
39			100,0							0,00		0,001	0,001
40	4,93	0	100,0	3,08			6,96	0,28		0,00		0,000	0,000
41			100,0							0,00		0,000	0,000
42			100,0							0,00			
43			100,0							0,00			
44	3,99	0	100,0	3,48	1,03	4,51				0,00			
45			100,0							0,00			
46			100,0							0,00			
47	4,53	0	100,0	3,23			7,40	0,31		0,00			
48			100,0							0,00			
49			100,0							0,00			
50	4,48	0	100,0	3,22	0,80	4,02				0,00			

Tabela F14 Resultados experimentais do ensaio DA-4b

t	X	S	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,25	10,4				0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1								0,05	0,00	0,00	0,000	0,000
2								0,11	0,13	0,00	0,000	0,000
3								0,15	0,22	0,00	0,000	0,000
4	0,29	9,8						0,17	0,28	0,00	0,000	0,000
5								0,21	0,32	0,00	0,000	0,000
6								0,24	0,35	0,00	0,000	0,000
7								0,26	0,36	0,00	0,000	0,000
8	0,88	9,4						0,25	0,35	0,00	0,000	0,000
9								0,24	0,32	0,00	0,000	0,000
10								0,21	0,30	0,00	0,000	0,000
11								0,18	0,27	0,00	0,000	0,000
12	2,53	7,7				0,43	0,50	0,16	0,25	0,00	0,000	0,000
13								0,14		0,00	0,001	0,001
14	2,96	6,6						0,12		0,00	0,003	0,003
15								0,10		0,00	0,006	0,006
16	4,13	5,4	0,00	0,00	0,00			0,09		0,02	0,010	0,026
17								0,09	0,36	0,03	0,014	0,043
18	4,09	4,2	0,42	0,15	0,57	2,77	0,36	0,09	0,33	0,04	0,018	0,060
19								0,09	0,30	0,06	0,021	0,077
20	4,77	3,4	0,83					0,09	0,27	0,07	0,023	0,094
21								0,09	0,24	0,08	0,025	0,107
22	5,3	3,1	1,52	0,56	2,08			0,10	0,22	0,09	0,025	0,114
23								0,09	0,21	0,09	0,024	0,114
24	6,35	3,3	2,47			7,64	0,31	0,08		0,09	0,023	0,109
25								0,06		0,08	0,020	0,100
26	6,77	3,0	3,68					0,04		0,07	0,018	0,089
27								0,02	0,06	0,06	0,015	0,076
28	6,62	2,1	3,88	1,40	5,28			0,01	0,07	0,05	0,012	0,062
29								0,00	0,07	0,04	0,010	0,048
30								0,00	0,07	0,03	0,008	0,034
31								0,00	0,06	0,01	0,006	0,020
32	7,17	0,3	5,13			17,01	0,26	0,00	0,04	0,00	0,005	0,009
33								0,00	0,03	0,00	0,004	0,003
34								0,00	0,02	0,00	0,003	0,003
35								0,00	0,01	0,01	0,002	0,009
36	7,21	0	5,07	1,27	6,34			0,00	0,00	0,02	0,002	0,017
37								0,00	0,00	0,02	0,001	0,024
38								0,00	0,00	0,03	0,001	0,026
39								0,00	0,00	0,02	0,001	0,026
40	8,66	0	6,31			14,66	0,27	0,00	0,00	0,02	0,001	0,022
41								0,00	0,00	0,02	0,001	0,017
42								0,00	0,00	0,01	0,001	0,011
43								0,00	0,00	0,00	0,001	0,001
44	7,37	0	6,38	1,82	8,20			0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
45								0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
46								0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
47								0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
48	7,09	0	6,47	1,57	8,04	12,66	0,28	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000

Tabela F15 Resultados experimentais do ensaio D-4b

t	X	S	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,26	10,3				0,01	1,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1								0,01	0,05	0,00	0,000	0,000
2								0,10	0,13	0,00	0,000	0,000
3								0,16	0,18	0,00	0,000	0,000
4	0,26	10,2						0,20	0,21	0,00	0,000	0,000
5								0,24	0,24	0,00	0,000	0,000
6								0,28	0,28	0,00	0,000	0,000
7								0,30	0,30	0,00	0,000	0,000
8	0,81	9,7						0,29	0,29	0,00	0,000	0,000
9								0,27	0,29	0,00	0,000	0,000
10								0,24	0,27	0,00	0,000	0,000
11								0,21	0,26	0,00	0,000	0,000
12	2,43	7,8				0,33	0,55	0,18	0,25	0,00	0,000	0,000
13								0,15	0,23	0,00	0,002	0,002
14								0,12	0,22	0,01	0,006	0,017
15								0,09	0,22	0,02	0,010	0,030
16	3,96	5,1						0,06	0,21	0,03	0,015	0,043
17								0,04	0,20	0,04	0,018	0,057
18								0,03	0,19	0,05	0,021	0,071
19								0,02	0,17	0,06	0,021	0,083
20	4,09	1,9	0,95	0,47	1,42			0,02	0,14	0,07	0,021	0,093
21								0,01	0,12	0,08	0,020	0,096
22								0,01	0,10	0,07	0,017	0,091
23								0,01	0,07	0,07	0,014	0,080
24	4,63	0,1	2,37			4,74	0,33	0,01	0,05	0,05	0,010	0,065
25								0,01	0,03	0,04	0,007	0,051
26								0,00	0,02	0,03	0,004	0,039
27								0,00	0,01	0,03	0,002	0,029
28	4,52	0	2,70	0,78	3,48			0,00	0,00	0,02	0,000	0,022
29								0,00	0,00	0,02	0,000	0,018
30										0,02	0,000	0,015
31										0,01	0,000	0,014
32	4,05	0	2,44			6,08	0,28			0,01	0,000	0,014
33										0,01	0,000	0,014
34										0,02		0,015
35										0,02		0,016
36	4,15	0	3,40	0,66	4,06					0,02		0,017
37										0,02		0,017
38										0,02		0,016
39										0,01		0,014
40	4,07	0	3,70			5,69	0,30			0,01		0,011
41										0,01		0,007
42										0,00		0,000
43										0,00		0,000
44	4,61	0	3,73	0,61	4,34					0,00		0,000
45										0,00		0,000
46										0,00		
47										0,00		
48	3,5	0	3,70	0,64	4,34	4,21	0,27			0,00		

Tabela F16 Resultados experimentais do ensaio DA-5b

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,24	10	100,0				0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	
1			100,0						0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	
2			100,0						0,00	0,02	0,00	0,000	0,00	
3			100,0						0,06	0,12	0,00	0,000	0,00	
4	0,21	10	100,0						0,13	0,21	0,00	0,000	0,00	
5			100,0						0,19	0,28	0,00	0,000	0,00	
6			100,0						0,23	0,33	0,00	0,000	0,00	
7			100,0						0,26	0,36	0,00	0,000	0,00	
8	0,48	9,7	98,8						0,28	0,36	0,00	0,000	0,00	
9			96,3						0,29	0,36	0,00	0,000	0,00	
10			92,7						0,29	0,35	0,00	0,000	0,00	
11			89,0						0,29	0,30	0,00	0,000	0,00	
12	1,97	8,7	84,3				0,47	0,49	0,27	0,20	0,00	0,000	0,00	0,00
13	2,3	8,1	82,0						0,25		0,00	0,000	0,00	0,33
14	2,87	8,1	69,6						0,20	0,40	0,00	0,000	0,00	1,03
15	3,45	7,7	57,7				1,69	0,40	0,16	0,39	0,00	0,000	0,00	1,93
16	3,96	8,2	47,9						0,15	0,38	0,00	0,000	0,00	2,52
17	4,52	7,5	44,0	0,00	0,00	0,00			0,15	0,39	0,00	0,001	0,00	3,04
18	4,48	7,3	33,7	0,00	0,00	0,00	4,03	0,34	0,15	0,40	0,02	0,002	0,02	2,54
19	4,96	7,3	23,0	0,00	0,00	0,00			0,14	0,41	0,03	0,003	0,04	2,33
20	6,6	7,5	8,9	0,35	0,07	0,42			0,12		0,03	0,003	0,04	2,09
21			9,1						0,09	0,06	0,03	0,003	0,03	2,39
22			11,0						0,05	0,11	0,02	0,003	0,02	1,96
23			12,0						0,02	0,16	0,01	0,004	0,02	1,90
24	6,67	3	12,5	0,45			7,33	0,29	0,01	0,19	0,01	0,004	0,01	1,88
25			24,2						0,00	0,19	0,01	0,004	0,01	2,11
26			31,7						0,00	0,16	0,01	0,004	0,01	1,96
27			43,4						0,00	0,11	0,01	0,004	0,01	1,24
28	7,61	0	41,8	1,07	0,25	1,32			0,00	0,06	0,01	0,003	0,01	1,29
29			48,6						0,00	0,00	0,01	0,003	0,01	1,27
30			56,6						0,00	0,00	0,01	0,003	0,01	0,87
31			58,5							0,00	0,01	0,003	0,01	0,87
32	7,59	0	58,0	1,49			8,11	0,31		0,00	0,01	0,002	0,01	0,72
33			62,8							0,00	0,01	0,002	0,01	0,60
34			62,1							0,00	0,01	0,002	0,01	0,60
35			63,3							0,01	0,01	0,002	0,01	0,44
36		0	63,0	1,61	0,38	1,99				0,02	0,01	0,001	0,01	0,45
37			62,4							0,02	0,01	0,001	0,01	0,45
38			60,4							0,02	0,01	0,001	0,01	0,45
39			60,4							0,01	0,00	0,001	0,01	0,29
40	7,39	0	60,4	1,85			14,39	0,25		0,01	0,00	0,001	0,01	0,29
41			59,0							0,00	0,00	0,000	0,01	0,50
42			59,0							0,00	0,00	0,000	0,00	0,51
43			58,0							0,00				0,30
44	7,4	0	58,0	2,03	0,45	2,48				0,00				0,30
45			54,9							0,00				0,13
46			54,9							0,00				0,14
47			54,5							0,01				0,14
48	6,37	0	53,7	1,94	0,47	2,41	11,76	0,23		0,03				0,15

Tabela F17 Resultados experimentais do ensaio D-5b

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}
0	0,18	10,2	100,0				0,01	1,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
1			100,0						0,00	0,00	0,00	0,000	0,000
2			100,0						0,02	0,08	0,00	0,000	0,000
3			100,0						0,06	0,14	0,00	0,000	0,000
4	0,19	9,6	100,0						0,11	0,18	0,00	0,000	0,000
5			100,0						0,19	0,23	0,00	0,000	0,000
6			100,0						0,27	0,27	0,00	0,000	0,000
7			100,0						0,32	0,28	0,00	0,000	0,000
8	0,44	9,6	99,8						0,32	0,28	0,00	0,000	0,000
9			97,3						0,31	0,26	0,00	0,000	0,000
10			94,4						0,28	0,24	0,00	0,000	0,000
11			90,8						0,25	0,23	0,00	0,000	0,000
12	1,79	8,5	87,9				0,31	0,54	0,22	0,21	0,00	0,000	0,000
13			80,7						0,19	0,21	0,01	0,001	0,008
14			79,8						0,17	0,21	0,01	0,005	0,016
15			72,6						0,15	0,22	0,02	0,009	0,025
16	3,4	6,7	69,1	0,0	0,00	0,00			0,13	0,22	0,02	0,012	0,033
17			63,7						0,10	0,21	0,02	0,016	0,040
18			64,1						0,08	0,20	0,03	0,020	0,046
19			63,2						0,06	0,18	0,03	0,023	0,051
20	4,85	1,8	68,6	0,6	0,41	1,00			0,04	0,15	0,03	0,026	0,057
21			76						0,03	0,13	0,03	0,028	0,062
22			82,4						0,01	0,11	0,04	0,030	0,067
23			84,7						0,00	0,09	0,04	0,030	0,073
24	4,96	1	87,7	1,3			5,29	0,34	0,00	0,07	0,05	0,030	0,077
25			89,2						0,00	0,06	0,05	0,029	0,080
26			91,7							0,04	0,05	0,027	0,079
27			95,2							0,03	0,05	0,024	0,075
28	4,61	0	96,6	2,4	1,76	4,14				0,01	0,05	0,021	0,068
29			97,5							0,01	0,04	0,018	0,058
30			98,5							0,00	0,03	0,014	0,048
31			98,8							0,00	0,03	0,011	0,038
32	4,47	0	98,6	2,9			4,50	0,35		0,00	0,02	0,008	0,027
33			99,9							0,00	0,01	0,005	0,018
34			100							0,00	0,01	0,002	0,000
35			100							0,00	0,01	0,000	0,006
36		0	100	3,1	1,62	4,67					0,00	0,000	0,000
37			100								0,00	0,000	0,000
38			100										0,000
39			100										0,000
40	4,29	0	100	3,1			6,55	0,28					0,000
41			100										
42			100										
43			100										
44	4,83	0	100	3,6	1,67	5,31							
45			100										
46			100										
47			100										
48	4,09	0	100	3,4	1,57	4,96	4,46	0,27					

Tabela F18 Resultados experimentais do ensaio C-1

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,09	10,7	100,0	0	0	0	0,02	0,97	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	
1			100,0						0,06	0,00	0,00	0,000	0,000	
2			100,0						0,11	0,00	0,00	0,000	0,000	
3			100,0						0,15	0,00	0,00	0,000	0,000	
4	0,19	10,4	100,0	0	0	0			0,18	0,00	0,00	0,000	0,000	
5			100,0						0,23	0,04	0,00	0,000	0,000	
6			100,0						0,29	0,10	0,00	0,000	0,000	
7			100,0						0,33	0,16	0,00	0,000	0,000	
8	0,48	10,3	98,5	0,00	0	0			0,33	0,19	0,00	0,000	0,000	
9			97,4						0,31	0,23	0,00	0,001	0,000	
10			95,9						0,28	0,25	0,00	0,004	0,003	
11			93,8						0,25	0,27	0,00	0,006	0,007	
12	1,69	9,3	91,4	0,00	0,000	0	0,22	0,58	0,22	0,27	0,00	0,008	0,009	
13			86,8						0,19	0,26	0,00	0,009	0,013	2,00
14			84,6						0,16	0,24	0,01	0,009	0,016	1,49
15			78,5						0,13	0,22	0,01	0,009	0,020	2,14
16	3,25	6,7	78,4	0,02	0,112	0,132					0,02	0,012	0,029	2,48
17			70,8								0,02	0,012	0,034	2,51
18			69,9						0,18	0,26	0,02	0,012	0,037	1,94
19			69,0						0,16	0,25	0,03	0,013	0,040	1,79
20			60,4						0,15	0,24	0,03	0,013	0,042	1,64
21			61,8						0,14	0,22	0,03	0,012	0,043	1,59
22			63,8						0,13	0,21	0,03	0,012	0,045	1,19
23			65,1						0,13	0,19	0,03	0,012	0,046	1,24
24	4,51	3,8	66,2	0,87	0,333	1,203	5,72	0,33	0,12	0,18	0,03	0,012	0,046	1,23
25			68,3						0,12	0,16	0,03	0,011	0,045	0,87
26			69,3						0,12	0,15	0,03	0,011	0,044	1,20
27			70,5						0,12	0,15	0,03	0,011	0,042	0,92
28			72,0						0,12	0,14	0,03	0,010	0,040	0,85
29			72,9						0,12	0,14	0,03	0,010	0,037	1,30
30			73,8						0,11	0,14	0,02	0,010	0,035	1,23
31			75,4						0,11	0,13	0,02	0,010	0,033	1,23
32			77,1						0,11	0,13	0,02	0,009	0,032	0,90
33			77,2						0,11	0,13	0,02	0,009	0,030	0,96
34			78,7						0,11	0,12	0,02	0,009	0,030	0,97
35			79,9						0,11	0,12	0,02	0,009	0,029	0,91
36	4,35	4,2	81,2	1,11	0,373	1,483			0,11	0,12	0,02	0,009	0,029	0,91
37			82,8						0,11	0,13	0,02	0,009	0,029	0,64
38			83,7						0,11	0,13	0,02	0,009	0,028	0,64
39			84,4						0,11	0,14	0,02	0,009	0,028	0,64
40			85,8						0,11	0,14	0,02	0,008	0,028	0,64
41			74,9						0,11	0,15	0,02	0,008	0,028	0,64
42			80,0						0,11	0,15	0,02	0,008	0,028	0,97
43			77,6						0,11	0,15	0,02	0,008	0,028	1,30
44			82,9						0,11	0,15	0,02	0,008	0,028	0,97
45			85,2						0,11	0,15	0,02	0,008	0,028	0,64
46			84,4						0,12	0,15	0,02	0,008	0,028	0,96
47			84,5						0,12	0,14	0,02	0,008	0,028	0,95

continua

Continuação da tabela F18 Resultados experimentais do ensaio C-1														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
48	4,61	4,4	84,8	0,88	0,396	1,276	5,90	0,34	0,12	0,14	0,02	0,008	0,029	0,95
49			85,1						0,12	0,14	0,02	0,008	0,029	1,26
50			85,8						0,12	0,14	0,02	0,008	0,029	1,25
51			86,1						0,12	0,14	0,02	0,008	0,029	1,55
52			86,5						0,12	0,14	0,02	0,008	0,029	1,85
53			86,2						0,12	0,14	0,02	0,008	0,029	1,83
54			76,2						0,12	0,13	0,02	0,008	0,029	1,82
55			74,1						0,12	0,13	0,02	0,008	0,028	2,41
56			82,8						0,12	0,13	0,02	0,008	0,028	2,27
57			82,2						0,12	0,13	0,02	0,008	0,028	2,26
58			81,9						0,12	0,13	0,02	0,007	0,028	1,35
59			81,3						0,12	0,13	0,02	0,007	0,028	1,35
60	5,37	3,8	80,1	1,11	0,443	1,553	5,19	0,35	0,11	0,13	0,02	0,007	0,028	1,34
61			78,8						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,33
62			78,8						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,27
63			79,1						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,32
64			79,6						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,32
65			80,0						0,11	0,12	0,02	0,007	0,027	1,32
66			80,8						0,11	0,12	0,02	0,007	0,027	1,31
67			81,6						0,11	0,12	0,02	0,007	0,027	1,60
68			82,1						0,11	0,12	0,02	0,007	0,027	1,31
69			82,1						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,31
70			83,1						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,31
71			82,7						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,31
72	5,33	3,7	83,0	0,93	0,333	1,263	4,98	0,33	0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,31
73			74,8						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,59
74			71,4						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,88
75			77,5						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	2,34
76			76,0						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	2,34
77			74,9						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	2,63
78			74,9						0,11	0,13	0,02	0,007	0,026	2,34
79			75,2						0,11	0,13	0,02	0,007	0,026	2,40
80			75,4						0,11	0,13	0,02	0,007	0,026	2,40
81			76,2						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	2,40
82			76,2						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,82
83			76,6						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,59
84	5,73	3,7	76,2	0,91	0,371	1,281			0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,31
85			71,9						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,59
86			65,8						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	1,77
87			69,6						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	2,06
88			67,0						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	2,06
89			66,8						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	2,06
90			66,9						0,11	0,13	0,02	0,007	0,027	2,06
91			67,2						0,11	0,13	0,02	0,007	0,026	1,77
92			67,2						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,77
93			68,1						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,54
94			68,3						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,54
95			68,3						0,11	0,12	0,02	0,007	0,026	1,54
96	5,12	3,7	68,3	0,98	0,330	1,31	5,02	0,33	0,11	0,12	0,02	0,007	0,025	1,54

Tabela F19 Resultados experimentais do ensaio C-2

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,2	10,5	100,0				0,02	1,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	
1			100,0						0,06	0,00	0,000	0,000	0,000	
2			100,0						0,11	0,06	0,000	0,000	0,000	
3			100,0						0,14	0,12	0,000	0,000	0,000	
4	0,3	10,1	100,0						0,16	0,17	0,000	0,000	0,000	
5			100,0						0,20	0,21	0,000	0,000	0,000	
6			100,0						0,24	0,25	0,000	0,000	0,000	
7			100,0						0,27	0,26	0,000	0,000	0,000	
8	0,69	9,8	97,2						0,28	0,26	0,000	0,000	0,000	
9			93,9						0,27	0,26	0,000	0,000	0,000	
10			91,8						0,25	0,26	0,000	0,000	0,000	
11			88,3						0,23	0,25	0,000	0,000	0,000	0,00
12	2,02	8,5	87,2				0,35	0,52	0,20	0,23	0,000	0,000	0,000	0,00
13			84,0						0,17	0,21	0,000	0,000	0,000	0,46
14			80,9						0,13	0,18	0,001	0,000	0,002	0,39
15			77,6						0,09	0,16	0,003	0,000	0,003	0,61
16	3,61	6,3	72,9	0,00	0,00	0,00	1,33	0,40	0,25	0,34	0,006	0,001	0,006	0,90
17			66,9						0,23	0,33	0,008	0,001	0,009	1,95
18			67,0						0,21	0,33	0,011	0,001	0,012	1,89
19			66,0						0,20	0,32	0,013	0,002	0,015	2,23
20	3,34	5,3	65,7	0,13	0,03	0,16	5,90	0,34	0,20	0,31	0,015	0,002	0,017	2,59
21			66,8						0,20	0,31	0,017	0,002	0,019	4,26
22			69,5						0,20	0,30	0,019	0,002	0,021	4,35
23			66,7						0,20	0,29	0,020	0,003	0,023	4,31
24	3,73	5	65,7	0,24	0,03	0,27	2,33	0,36	0,20	0,29	0,021	0,003	0,023	4,34
25			69,7						0,20	0,28	0,021	0,003	0,024	3,91
26			67,3						0,21	0,28	0,021	0,003	0,024	4,30
27			61,8						0,21	0,28	0,021	0,004	0,024	4,19
28			61,9						0,21	0,27	0,021	0,004	0,024	4,15
29			61,9						0,21	0,27	0,020	0,004	0,024	4,52
30	3,66	4,9	60,7	0,34	0,06	0,40	2,76	0,36	0,21	0,27	0,019	0,004	0,023	4,88
31			62,5						0,21	0,27	0,019	0,004	0,023	4,84
32			64,3						0,21	0,27	0,018	0,005	0,022	4,80
33			64,2						0,21	0,27	0,017	0,005	0,022	4,77
34			65,8						0,21	0,27	0,017	0,005	0,021	4,74
35			65,6						0,21	0,27	0,016	0,005	0,021	4,71
36	4,5	4,8	69,0	0,34	0,08	0,42	4,07	0,34	0,21	0,27	0,016	0,005	0,021	4,30
37			72,5						0,20	0,27	0,015	0,005	0,020	4,28
38			70,9						0,20	0,27	0,015	0,005	0,020	4,27
39			70,9						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,25
40			72,1						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,24
41			75,9						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,23
42	4,16	4,8	74,3	0,33	0,08	0,41	3,72	0,34	0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,60
43			75,9						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,60
44			77,2						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,22
45			77,2						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,22
46			75,1						0,20	0,26	0,015	0,005	0,021	4,22
47			74,1						0,20	0,26	0,015	0,005	0,021	4,22

continua

Continuação da tabela F19 Resultados experimentais do ensaio C-2														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
48	3,81	4,8	77,9	0,27	0,12	0,39	3,03	0,34	0,20	0,26	0,015	0,005	0,021	4,22
49			80,7						0,20	0,26	0,015	0,005	0,021	4,22
50			76,4						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,30
51			78,0						0,20	0,26	0,015	0,005	0,020	4,29
52	3,62	4,8	82,1	0,28	0,11	0,39			0,20	0,26	0,014	0,005	0,019	4,66

Tabela F20 Resultados experimentais do ensaio C-3

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,17	10,9	100,0	0	0,00	0,00	0,02	1,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	
1			100,0						0,07	0,00	0,000	0,000	0,000	
2			100,0						0,17	0,17	0,000	0,000	0,000	
3			100,0						0,23	0,43	0,000	0,000	0,000	
4	0,23	10,9	100,0	0	0,00	0,00			0,25	0,54	0,000	0,000	0,000	
5			100,0						0,28	0,54	0,000	0,000	0,000	
6			100,0						0,30	0,46	0,002	0,000	0,002	1,69
7			98,8						0,30	0,37	0,004	0,000	0,004	2,77
8	0,86	9,7	99,4	0,00	0,00	0,00			0,29	0,29	0,006	0,000	0,006	1,88
9			95,6						0,25	0,24	0,006	0,000	0,006	3,38
10			93,8						0,21	0,23	0,006	0,000	0,006	3,25
11			86,0						0,17	0,22	0,006	0,000	0,006	3,80
12	2,42	8,5	81,6	0,00	0,00	0,00	0,80	0,46	0,14	0,22	0,007	0,001	0,007	3,24
13			71,4						0,12	0,22	0,009	0,008	0,016	3,77
14			69,7						0,10	0,21	0,012	0,012	0,024	3,89
15			72,8						0,08	0,19	0,017	0,015	0,032	3,53
16	3,26	5,7	72,8	0,16	0,04	0,20			0,12	0,23	0,025	0,019	0,044	3,33
17			72,8						0,11	0,22	0,030	0,019	0,049	2,85
18			71,4						0,10	0,20	0,034	0,019	0,053	2,70
19			76,9						0,09	0,19	0,037	0,019	0,056	2,33
20			79,4						0,09	0,17	0,040	0,019	0,058	1,87
21			81,1						0,08	0,15	0,042	0,018	0,060	1,56
22			85,2						0,08	0,14	0,043	0,018	0,061	1,99
23			86,8						0,07	0,12	0,044	0,017	0,061	1,61
24	4,67	3	88,6	1,54	0,70	2,24	6,86	0,29	0,07	0,11	0,044	0,017	0,061	1,26
25			90,2						0,07	0,10	0,045	0,015	0,059	1,23
26			91,3						0,06	0,09	0,045	0,013	0,058	2,45
27			91,0						0,06	0,08	0,045	0,011	0,056	1,57
28			90,8						0,06	0,07	0,045	0,010	0,055	1,61
29			91,3						0,06	0,07	0,044	0,009	0,053	1,84
30			92,1						0,06	0,07	0,044	0,008	0,052	1,82
31			92,7						0,06	0,06	0,044	0,008	0,051	2,11
32			94,8						0,05	0,06	0,043	0,007	0,051	2,10
33			94,3						0,05	0,06	0,042	0,007	0,050	2,38
34			96,1						0,05	0,06	0,042	0,007	0,049	2,09
35			95,7						0,05	0,06	0,041	0,007	0,048	1,50
36	5,05	3	95,4	2,42	0,68	3,10			0,05	0,07	0,040	0,007	0,047	1,50

continua

Continuação da tabela F20 Resultados experimentais do ensaio C-3

t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ _x	μ _s	μ _{Re}	μ _{Ri}	μ _{Rt}	QO ₂
37			92,3						0,05	0,07	0,039	0,007	0,046	1,49
38			95,0						0,05	0,07	0,038	0,007	0,045	1,43
39			95,1						0,05	0,07	0,037	0,007	0,045	1,43
40			95,0						0,05	0,07	0,037	0,007	0,044	1,66
41			95,8						0,05	0,07	0,036	0,007	0,043	1,66
42			97,2						0,05	0,08	0,035	0,007	0,042	1,66
43			94,4						0,05	0,08	0,034	0,007	0,042	1,95
44			95,9						0,05	0,08	0,034	0,007	0,041	1,95
45			96,6						0,05	0,08	0,033	0,007	0,041	1,95
46			96,2						0,05	0,08	0,033	0,007	0,040	1,65
47			94,8						0,05	0,09	0,032	0,007	0,039	1,65
48	4,58	2,3	95,5	3,01	0,65	3,66	5,04	0,36	0,05	0,09	0,031	0,007	0,039	1,93
49			96,1						0,05	0,09	0,031	0,007	0,038	1,64
50			95,4						0,05	0,09	0,030	0,007	0,038	1,93
51			95,4						0,05	0,09	0,030	0,007	0,038	1,92
52			95,5						0,05	0,09	0,030	0,007	0,037	2,48
53			95,6						0,05	0,09	0,029	0,007	0,037	2,48
54			95,5						0,05	0,09	0,029	0,007	0,037	2,47
55			95,6						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,75
56			95,0						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,46
57			94,9						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,45
58			95,1						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,17
59			95,2						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,16
60	5,3	1,4	95,0	3,06	0,89	3,95			0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,16
61			95,6						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,16
62			94,8						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,16
63			90,9						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,15
64			94,7						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,43
65			95,4						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,43
66			95,7						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,37
67			95,2						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,31
68			94,8						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,34
69			95,0						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,31
70			95,4						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,09
71			96,4						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,09
72	4,83	0,9	96,9	2,94	0,91	3,85	4,33	0,35	0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,09
73			98,6						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,0

Continuação da tabela F20 Resultados experimentais do ensaio C-3														
t	X	S	OD	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
85			95,2						0,05	0,09	0,029	0,007	0,035	2,44
86			95,5						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,44
87			95,8						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,44
88			96,0						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,45
89			96,2						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,45
90			97,6						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,45
91			97,6						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,45
92			98,3						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,45
93			100,2						0,05	0,08	0,029	0,007	0,036	2,43
94			99,9						0,05	0,09	0,029	0,007	0,036	2,44
95			87,6						0,03	0,08	0,029	0,007	0,036	2,46
96	5,26	1	94,7	3,41	0,60	4,01	4,02	0,37	0,01	0,08	0,028	0,007	0,035	2,24
97			95,3						0,20	0,26	0,030	0,028	0,028	2,04
98			90,4						0,19	0,21	0,030	0,025	0,025	2,92
99			93,1						0,20	0,18	0,030	0,021	0,050	3,08
100	3,86	5,1	90,4	1,36	0,68	2,04	1,16	0,45	0,21	0,15	0,030	0,016	0,025	3,85
101			87,4						0,23	0,14		0,012	0,012	4,48
102			85,5						0,24	0,14		0,007	0,007	4,54
103			84,5						0,26	0,15		0,003	0,003	4,89
104	4,28	6,3	82,3	0,45	0,19	0,64	1,2	0,42	0,28	0,18				5,12
105			79,1						0,29	0,20				4,92
106			75,5						0,29	0,22				5,26
107			71,3						0,29	0,23		0,001		4,98
108	4,84	5,9	67,1	0,08	0,10	0,18	2,01	0,35	0,29	0,24		0,001		4,49
109			65,6						0,28	0,24	0,008	0,002	0,010	4,01
110			64,6						0,28	0,23	0,012	0,003	0,015	4,47
111			64,4						0,27	0,23	0,011	0,004	0,014	4,36
112	5,38	5,5	64,8	0,15	0,08	0,23	7,15	0,20	0,26	0,22	0,011	0,004	0,015	4,00
113			63,1						0,26	0,21	0,011	0,004	0,015	3,96
114			61,8						0,25	0,21	0,011	0,004	0,015	3,94
115			63,8						0,25	0,20	0,011	0,005	0,015	3,95
116	5,34	5,6	63,6	0,22	0,18	0,40	8,73	0,19	0,25	0,20	0,011	0,005	0,016	3,97
117			63,6						0,25	0,20	0,010	0,005	0,015	3,99
118			63,6						0,25	0,20	0,010	0,005	0,015	4,01
119			63,6						0,25	0,20	0,010	0,005	0,015	4,01
120	5,38	5,6	63,6	0,22	0,08	0,30	7,15	0,20	0,25	0,20	0,011	0,004	0,015	3,96

Tabela F21 Resultados experimentais do ensaio C-4

t	X	S	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO ₂
0	0,24	10,5	0	0,00	0,00	0,01	0,98	0,00	0,03	0,000	0,000	0,000	
1								0,00	0,08	0,000	0,000	0,000	
2								0,02	0,11	0,000	0,000	0,000	
3								0,14	0,12	0,000	0,000	0,000	
4	0,17	10	0	0,00	0,00			0,23	0,13	0,000	0,000	0,000	
5								0,30	0,19	0,000	0,000	0,000	0,00
6								0,35	0,26	0,000	0,000	0,000	4,59
7								0,35	0,29	0,000	0,000	0,000	5,11
8	0,6	10	0,00	0,00	0,00			0,33	0,30	0,000	0,000	0,000	5,51
9								0,30	0,27	0,000	0,000	0,000	3,46
10								0,26	0,23	0,000	0,000	0,000	3,53
11								0,23	0,19	0,000	0,000	0,000	4,25
12	1,99	8,7	0,00	0,00	0,00	0,44	0,50	0,19	0,16	0,000	0,000	0,000	4,27
13								0,17	0,14	0,000	0,000	0,000	2,82
14								0,14	0,13	0,004	0,000	0,004	3,37
15								0,12	0,12	0,010	0,000	0,010	3,27
16	3,45	7,6	0,00	0,00	0,00			0,13	0,15	0,017	0,000	0,017	2,98
17								0,11	0,15	0,023	0,006	0,029	2,51
18								0,10	0,15	0,028	0,007	0,035	1,88
19								0,09	0,14	0,031	0,008	0,039	1,63
20								0,08	0,14	0,034	0,009	0,043	0,89
21								0,07	0,14	0,036	0,009	0,046	0,53
22								0,07	0,13	0,038	0,010	0,048	0,58
23								0,06	0,13	0,039	0,010	0,049	0,56
24	4,53	2,6	1,68	0,48	2,16	4,64	0,32	0,06	0,12	0,040	0,010	0,050	0,60
25								0,05	0,12	0,041	0,010	0,051	0,59
26								0,05	0,11	0,042	0,010	0,051	0,58
27								0,04	0,10	0,042	0,010	0,052	0,57
28								0,04	0,10	0,042	0,009	0,052	0,56
29								0,04	0,09	0,042	0,009	0,051	0,56
30								0,04	0,08	0,043	0,009	0,051	0,55
31								0,03	0,08	0,042	0,008	0,051	0,61
32								0,03	0,07	0,042	0,008	0,050	0,60
33								0,03	0,06	0,042	0,007	0,049	0,60
34								0,03	0,06	0,042	0,007	0,049	0,60
35								0,03	0,05	0,041	0,007	0,048	0,68
36								0,03	0,05	0,041	0,006	0,047	0,68
37								0,02	0,05	0,040	0,006	0,046	0,69
38								0,02	0,05	0,039	0,006	0,045	0,69
39								0,02	0,06	0,038	0,007	0,045	0,70
40								0,02	0,06	0,037	0,007	0,044	0,70
41								0,02	0,07	0,036	0,007	0,043	0,71
42								0,02	0,07	0,035	0,007	0,042	0,71
43								0,02	0,07	0,033	0,008	0,041	0,72
44								0,02	0,07	0,032	0,008	0,040	0,72
45								0,02	0,07	0,031	0,008	0,039	0,73
46								0,02	0,07	0,029	0,008	0,038	0,74
47								0,02	0,07	0,028	0,008	0,036	0,74

continua

Continuação da tabela F21 Resultados experimentais do ensaio C-4													
t	X	S	Re	Ri	Rt	K	n	μ _x	μ _s	μ _{Re}	μ _{Ri}	μ _{Rt}	QO ₂
48	5,12		3,41	0,87	4,28	5,68	0,34	0,02	0,06	0,026	0,009	0,035	0,75
49								0,02	0,06	0,025	0,009	0,034	0,76
50								0,02	0,06	0,024	0,009	0,033	0,76
51								0,02	0,05	0,024	0,009	0,033	0,77
52								0,02	0,05	0,024	0,009	0,033	0,78
53								0,02	0,05	0,024	0,009	0,033	0,78
54								0,02	0,05	0,025	0,009	0,033	0,79
55								0,02	0,05	0,025	0,008	0,033	0,80
56								0,02	0,05	0,025	0,008	0,033	0,80
57								0,02	0,06	0,025	0,008	0,033	0,81
58								0,02	0,06	0,025	0,008	0,033	0,81
59								0,02	0,06	0,025	0,008	0,033	0,82
60	4,85	0	4,17					0,02	0,06	0,025	0,008	0,033	0,82
61								0,03	0,06	0,025	0,008	0,032	0,83
62								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,83
63								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,83
64								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,84
65								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,84
66								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,84
67								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,84
68								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,85
69								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,85
70								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,85
71								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,85
72	4,31	0	3,93	1,03	4,96	5,47	0,33	0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,85
73								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,85
74								0,03	0,06	0,025	0,007	0,032	0,86
75								0,03	0,06	0,025	0,007	0,031	0,86
76								0,03	0,07	0,025	0,006	0,031	0,86
77								0,03	0,07	0,025	0,006	0,031	0,86
78								0,03	0,07	0,024	0,006	0,031	0,86
79								0,03	0,07	0,024	0,006	0,030	0,86
80								0,03	0,07	0,024	0,006	0,030	0,86
81								0,03	0,07	0,024	0,006	0,030	0,86
82								0,03	0,07	0,024	0,006	0,030	0,86
83								0,03	0,07	0,023	0,006	0,029	0,86
84	4,89	0,1	3,49					0,03	0,07	0,023	0,006	0,029	0,86
85								0,03	0,07	0,023	0,006	0,029	0,86
86								0,03	0,07	0,023	0,006	0,028	0,86
87								0,03	0,07	0,022	0,006	0,028	0,86
88								0,03	0,07	0,022	0,005	0,028	0,86
89								0,03	0,07	0,022	0,005	0,027	0,85
90								0,03	0,06	0,022	0,005	0,027	0,85
91								0,03	0,06	0,021	0,005	0,026	0,85
92								0,03	0,06	0,021	0,005	0,026	0,85
93								0,03	0,06	0,021	0,005	0,026	0,85
94								0,03	0,06	0,021	0,005	0,026	0,85
95								0,03	0,06	0,020	0,005	0,025	0,85
continua													

Continuação da tabela F21 Resultados experimentais do ensaio C-4

t	X	S	Re	Ri	Rt	K	n	μ _x	μ _s	μ _{Re}	μ _{Ri}	μ _{Rt}	QO ₂
96	4,49	0,2	3,04	0,53	3,57	3,01	0,40	0,03	0,06	0,020	0,005	0,025	0,85
97								0,03	0,06	0,020	0,005	0,025	0,85
98								0,03	0,06	0,020	0,005	0,025	0,85
99								0,03	0,06	0,020	0,005	0,024	0,85
100								0,03	0,06	0,020	0,005	0,024	0,85
101								0,03	0,06	0,019	0,005	0,024	0,85
102								0,03	0,06	0,019	0,005	0,024	0,85
103								0,03	0,06	0,019	0,004	0,024	0,85
104								0,03	0,06	0,019	0,004	0,024	0,85
105								0,03	0,06	0,019	0,004	0,024	0,85
106								0,03	0,06	0,019	0,004	0,024	0,85
107								0,03	0,06	0,019	0,004	0,024	0,85
108	4,66	0,2	2,90					0,03	0,06	0,018	0,004	0,024	0,85
109								0,03	0,06	0,018	0,004	0,022	0,85
110								0,03	0,06	0,018	0,004	0,022	0,85
111								0,03	0,06	0,018	0,004	0,022	0,85
112								0,03	0,06	0,018	0,004	0,022	0,85
113								0,03	0,06	0,018	0,004	0,022	0,85
114								0,03	0,06	0,017	0,004	0,022	0,85
115								0,03	0,06	0,017	0,004	0,021	0,85
116								0,03	0,06	0,017	0,004	0,021	0,85
117								0,03	0,06	0,017	0,004	0,021	0,85
118								0,03	0,06	0,017	0,004	0,021	0,85
119								0,03	0,06	0,017	0,004	0,021	0,85
120	4,35	0	2,24	0,68	2,92	3,77	0,36	0,03	0,06	0,016	0,004	0,021	0,85
121								0,03	0,06	0,016	0,004	0,021	0,85
122								0,03	0,06	0,016	0,004	0,021	0,85
123								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
124								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
125								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
126								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
127								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
128								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
129								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
130								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
131								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
132	4,83	0,1	2,68					0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
133								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
134								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
135								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
136								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
137								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
138								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
139								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
140								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
141								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,85
142								0,03	0,06	0,016	0,004	0,020	0,86
143								0,03	0,07	0,016	0,004	0,021	0,86
continuu													

Continuação da tabela F21 Resultados experimentais do ensaio C-4

[illegible]

continua

Continuação da tabela F21 Resultados experimentais do ensaio C-4													
t	X	S	Re	Ri	Rt	K	n	μ_x	μ_s	μ_{Re}	μ_{Ri}	μ_{Rt}	QO₂
192	2,36	7,2	0,00	0,00	0,00	0,94	0,42	0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,76
193								0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,74
194								0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,80
195								0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,89
196	2,46	6,9	0,00	0,00	0,00			0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,91
197								0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,89
198								0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,96
199								0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,91
200	2,46	6,9	0,00	0,00	0,00	0,94	0,42	0,30	0,30	0,000	0,000	0,000	6,80

Tabela F22 Concentração de íons amônio ($C_{\text{NH}_4^+}$, em mM) nos ensaios

[illegible]

Apêndice G

Parâmetros morfológicos obtidos nos ensaios

As tabelas seguintes apresentam os parâmetros morfológicos obtidos nos ensaios realizados: F_{cl} , F_p , F_{hnr} , F_{hr} , FA_{cl} , FA_p , FA_{hnr} , FA_{hr} (%), D_{cl} , D_p , L_{hnr} , L_{hr} , HGU_{hr} (μm) e N_{hr} (adimensional).

Tabela G1A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-1

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	73,3	6,9	6,9	12,9	53,53	45,81	0,21	0,45
10	65,0	2,5	6,3	26,2	88,30	9,11	0,27	2,32
14	52,7	3,2	9,7	34,4	56,87	39,82	0,29	3,02
20	54,4	2,2	12,2	31,2	77,22	18,45	0,83	3,50
21	50,4	1,8	16,8	31,0	63,93	32,35	0,56	3,16
24	58,2	6,0	13,4	22,4	50,40	47,93	0,44	1,23
26	58,9	2,7	4,1	34,3	71,41	24,10	0,17	4,32
30	66,7	5,6	8,9	18,8	49,23	49,61	0,12	1,04
34	47,3	4,3	6,5	41,9	55,32	40,10	0,12	4,46

Tabela G1B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-1

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	140 ± 12	375 ± 44	58 ± 19	86 ± 31	6 ± 2	15 ± 3
10	161 ± 11	306 ± 40	47 ± 5	109 ± 23	6 ± 1	18 ± 3
14	138 ± 15	362 ± 20	31 ± 19	86 ± 18	6 ± 1	16 ± 3
20	161 ± 14	322 ± 57	64 ± 32	113 ± 24	6 ± 1	20 ± 3
21	163 ± 15	502 ± 32	45 ± 10	131 ± 26	5 ± 1	26 ± 6
24	169 ± 17	403 ± 78	71 ± 33	151 ± 45	8 ± 2	19 ± 4
26	168 ± 16	322 ± 59	40 ± 29	150 ± 24	7 ± 1	23 ± 3
30	169 ± 14	427 ± 15	39 ± 18	155 ± 28	7 ± 1	22 ± 4
34	150 ± 15	342 ± 50	27 ± 8	139 ± 21	7 ± 1	19 ± 2

Tabela G2A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-2

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	66,2	14,9	2,7	16,2	43,37	56,19	0,05	0,39
6	65,1	0,9	10,4	23,6	85,49	10,34	0,38	3,79
16	65,7	3,7	8,2	22,4	70,60	27,2	0,37	1,83
21	78,9	1,8	3,5	15,8	80,96	17,48	0,06	1,5
28	61,7	1,2	11,2	25,9	86,74	10,58	0,29	2,39
36	58	1,1	12,5	28,4	75,74	20,61	0,47	3,18
40	38,2	0,0	13,8	48,0	89,55	0,00	0,71	9,74
48	28,7	0,0	23,8	47,5	91,89	0,00	1,18	6,93

Tabela G2B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-2

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	157 ± 19	386 ± 44	37 ± 2	64 ± 28	4 ± 1	14 ± 3
6	127 ± 12	312 ± 50	32 ± 5	141 ± 32	8 ± 2	17 ± 3
16	173 ± 12	354 ± 37	63 ± 18	141 ± 30	6 ± 1	25 ± 5
21	174 ± 18	377 ± 40	24 ± 11	131 ± 51	6 ± 1	22 ± 7
28	151 ± 15	419 ± 37	35 ± 12	117 ± 30	6 ± 1	19 ± 4
36	150 ± 12	387 ± 40	38 ± 12	126 ± 20	7 ± 1	19 ± 3
40	137 ± 12	0	30 ± 7	121 ± 18	7 ± 1	18 ± 2
48	147 ± 16	0	31 ± 6	90 ± 18	5 ± 1	17 ± 2

Tabela G3A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-2

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	65,5	6,0	10,7	17,8	56,32	42,78	0,16	0,75
6	68,8	3,1	6,3	21,8	70,74	27,14	0,3	1,82
16	69,5	0,7	8,6	21,2	88,87	7,52	0,34	3,27
28	61,8	1,1	12,4	24,7	94,42	2,84	0,43	2,31
36	44,1	1,0	17,6	37,3	81,03	12,91	1,09	4,97
40	35,4	0,0	28	36,6	92,58	0,0	1,74	5,68
48	36,4	0,0	30,8	32,7	92,41	0,0	1,93	5,66

Tabela G3B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-2

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	150 ± 11	382 ± 51	33 ± 17	90 ± 43	7 ± 2	11 ± 2
6	125 ± 15	346 ± 31	58 ± 39	104 ± 48	6 ± 2	14 ± 4
16	151 ± 11	582 ± 40	37 ± 9	127 ± 28	5 ± 1	24 ± 4
28	183 ± 14	303 ± 40	47 ± 14	132 ± 25	6 ± 1	24 ± 4
36	143 ± 12	330 ± 40	43 ± 10	96 ± 19	5 ± 1	18 ± 2
40	124 ± 8	0	32 ± 5	80 ± 11	5 ± 1	17 ± 2
48	141 ± 12	0	32 ± 3	81 ± 18	5 ± 1	17 ± 3

Tabela G4A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-3

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	48,9	31,1	2,2	17,8	17,0	82,9	0,0	0,1
8	71,4	6,3	1,6	20,7	44,6	54,8	0,0	0,6
16	55,8	2,6	9,1	32,5	59,9	37,2	0,3	2,6
24	47,0	1,2	15,7	36,1	64,4	29,9	0,9	4,7
32	46,7	0,0	14,0	39,3	89,3	0,0	1,0	9,7
42	47,9	0,0	12,8	39,3	92,4	0,0	0,6	6,9
48	42,2	0,0	11,0	46,8	88,4	0,0	1,0	10,7
56	23,6	0,0	15,9	60,5	80,6	0,0	1,6	17,9
66	24,6	0,0	20,0	55,4	67,9	0,0	3,2	28,9

Tabela G4B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-3

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	180 ± 31	430 ± 51	32 ± 13	50 ± 12	4 ± 1	13 ± 3
8	190 ± 31	480 ± 51	32 ± 13	92 ± 27	6 ± 1	15 ± 3
16	180 ± 16	455 ± 108	53 ± 13	112 ± 26	4 ± 1	28 ± 5
24	172 ± 17	487 ± 70	56 ± 18	120 ± 23	6 ± 1	21 ± 4
32	152 ± 17	0	37 ± 6	138 ± 23	6 ± 1	23 ± 2
42	146 ± 15	0	30 ± 5	101 ± 18	5 ± 1	19 ± 2
48	160 ± 15	0	48 ± 16	125 ± 20	5 ± 1	24 ± 3
56	138 ± 18	0	35 ± 6	104 ± 12	5 ± 1	19 ± 2
66	98 ± 9	0	30 ± 8	105 ± 18	6 ± 1	17 ± 2

Tabela G5A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	55,7	29,5	3,3	11,5	23,2	76,8	0,0	0,0
8	69,6	5,8	4,3	20,3	46,8	51,9	0,1	1,3
16	58,2	4,4	8,8	28,6	60,1	36,1	0,3	3,5
24	44,8	0,0	17,2	38,0	91,2	0,0	1,4	7,3
32	39,7	0,0	22,6	37,7	86,6	0,0	2,0	11,5
42	36,4	0,0	25,2	38,4	86,3	0,0	2,5	11,2
48	33,3	0,0	28,3	38,4	85,8	0,0	3,0	11,2

Tabela G5B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	189 ± 24	430 ± 45	47 ± 1	41 ± 13	5 ± 2	10 ± 3
8	143 ± 16	376 ± 36	37 ± 24	112 ± 43	6 ± 2	19 ± 5
16	174 ± 16	362 ± 56	35 ± 7	142 ± 27	5 ± 1	29 ± 4
24	180 ± 16	0	56 ± 23	138 ± 24	5 ± 1	29 ± 5
32	156 ± 11	0	45 ± 7	148 ± 19	6 ± 1	27 ± 3
42	147 ± 11	0	52 ± 10	143 ± 19	5 ± 1	28 ± 4
48	156 ± 15	0	54 ± 16	136 ± 20	6 ± 1	24 ± 4

Tabela G6A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3+

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	51,8	28,6	1,8	17,8	13,12	86,71	0,01	0,16
8	65,8	6,6	5,3	22,3	38,62	60,28	0,11	0,99
16	48,1	2,8	12,3	36,8	45,06	49,75	0,54	4,65
24	45,0	0,8	15,3	38,9	69,16	21,17	0,92	8,75
32	40,3	0,0	18,5	41,2	87,89	0,00	1,22	10,89
42	26,6	0,0	24,1	49,3	82,82	0,00	3,07	14,11
48	32,1	0,0	24,1	43,8	91,42	0,00	1,86	6,72
56	27,3	0,0	24,0	48,7	87,16	0,00	2,01	10,83
66	22,0	0,0	25,8	52,2	79,44	0,00	3,66	16,90

Tabela G6B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3+

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	166 ± 21	436 ± 53	45 ± 34	71 ± 24	5 ± 1	15 ± 5
8	152 ± 15	448 ± 73	47 ± 34	91 ± 22	6 ± 1	15 ± 2
16	151 ± 13	444 ± 18	37 ± 14	129 ± 24	5 ± 1	24 ± 3
24	150 ± 15	398 ± 50	37 ± 8	141 ± 24	7 ± 1	20 ± 2
32	155 ± 13	0	34 ± 5	132 ± 19	5 ± 1	28 ± 4
42	125 ± 9	0	37 ± 5	78 ± 11	4 ± 1	19 ± 2
48	145 ± 13	0	40 ± 5	78 ± 10	4 ± 1	18 ± 2
56	131 ± 14	0	35 ± 4	89 ± 12	5 ± 1	18 ± 2
66	111 ± 14	0	38 ± 6	84 ± 13	5 ± 1	17 ± 2

Tabela G7A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-4

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	65,4	13,5	7,7	13,4	45,95	53,82	0,03	0,2
8	74,7	3,8	7,6	13,9	54,58	44,79	0,08	0,55
12	52,8	0,9	13,0	33,3	77,33	19,62	0,43	2,62
16	50,8	0,8	13,6	34,8	76,86	18,10	0,87	4,17
20	42,9	0,0	20,3	36,8	89,40	0,00	1,60	9,00
22	41,6	0,0	20,4	38,0	89,03	0,00	1,68	9,29
28	30,5	0,0	23,4	46,1	84,19	0,00	2,11	13,7
36	12,8	0,0	32,2	55,0	61,71	0,00	7,66	30,63
44	12,7	0,0	31,1	56,2	65,44	0,00	5,15	29,41
52	10,9	0,0	33,7	55,4	62,36	0,00	8,12	29,52

Tabela G7B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-4

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	180 ± 23	374 ± 29	24 ± 7	82 ± 26	6 ± 1	12 ± 3
8	146 ± 13	420 ± 68	26 ± 8	87 ± 30	6 ± 3	18 ± 6
12	151 ± 15	396 ± 50	37 ± 7	77 ± 20	6 ± 1	13 ± 2
16	155 ± 14	354 ± 50	48 ± 16	88 ± 19	5 ± 1	17 ± 3
20	160 ± 12	0	40 ± 7	121 ± 17	6 ± 1	22 ± 2
22	158 ± 15	0	44 ± 8	127 ± 20	6 ± 1	22 ± 3
28	140 ± 10	0	36 ± 5	113 ± 16	6 ± 1	19 ± 2
36	119 ± 13	0	42 ± 5	92 ± 11	5 ± 1	19 ± 1
44	111 ± 11	0	32 ± 3	92 ± 12	6 ± 1	15 ± 1
52	102 ± 8	0	32 ± 2	69 ± 7	5 ± 1	14 ± 1

Tabela G8A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-4

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	51,0	11,8	9,8	27,4	46,82	52,49	0,09	0,60
8	62,7	2,9	7,8	26,6	60,14	37,43	0,21	2,22
12	62,1	2,3	8,0	27,6	69,86	27,64	0,20	2,30
16	61,6	0,9	8,9	28,6	89,23	5,68	0,41	4,68
20	46,8	0,0	15,1	38,1	88,75	0,00	1,18	10,07
28	34,4	0,0	22,1	43,5	85,64	0,00	1,93	12,43
36	17,0	0,0	28,0	55,0	72,38	0,00	4,62	23,00
44	14,9	0,0	33,0	52,1	70,29	0,00	5,59	24,12
52	10,5	0,0	45,0	44,5	65,22	0,00	10,14	24,64

Tabela G8B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-4

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	189 ± 24	355 ± 25	33 ± 13	80 ± 32	6 ± 2	13 ± 4
8	149 ± 12	397 ± 92	40 ± 7	129 ± 28	7 ± 2	19 ± 4
12	155 ± 14	350 ± 39	33 ± 12	99 ± 23	6 ± 1	19 ± 5
16	137 ± 12	307 ± 50	34 ± 9	110 ± 25	6 ± 1	18 ± 3
20	157 ± 15	0	36 ± 10	123 ± 19	5 ± 1	23 ± 3
28	167 ± 18	0	45 ± 8	141 ± 18	6 ± 1	26 ± 2
36	149 ± 15	0	46 ± 6	110 ± 12	5 ± 1	22 ± 2
44	139 ± 18	0	35 ± 3	103 ± 13	5 ± 1	20 ± 2
52	146 ± 22	0	35 ± 3	92 ± 11	5 ± 1	20 ± 2

Tabela G9A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-5

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	60,0	7,1	10,0	22,9	54,40	44,88	0,11	0,61
8	55,9	4,9	7,8	31,4	50,67	46,83	0,24	2,26
12	69,2	3,8	9,0	18,0	44,89	54,23	0,09	0,79
15	54,8	1,0	10,6	33,6	62,10	34,05	0,27	3,58
17	54,6	0,0	12,4	33,0	94,18	0,00	0,63	5,19
20	59,8	0,0	11,0	29,2	95,18	0,00	0,43	4,39
24	44,5	0,0	15,5	40,0	89,26	0,00	1,11	9,63
28	24,7	0,0	26,7	48,6	83,25	0,00	3,22	13,53
36	20,0	0,0	27,1	52,9	79,51	0,00	3,83	16,66
44	21,3	0,0	22,8	55,9	78,69	0,00	2,85	18,46
52	22,2	0,0	24,8	53,0	77,95	0,00	3,73	18,32

Tabela G9B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-5

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	187 ± 18	392 ± 46	33 ± 12	63 ± 17	4 ± 1	15 ± 3
8	167 ± 13	481 ± 27	42 ± 13	111 ± 26	7 ± 1	14 ± 2
12	167 ± 16	481 ± 153	26 ± 10	116 ± 36	6 ± 2	21 ± 7
15	142 ± 14	480 ± 50	25 ± 6	111 ± 26	8 ± 2	14 ± 3
17	181 ± 15	0	42 ± 14	140 ± 26	6 ± 1	22 ± 3
20	164 ± 14	0	31 ± 9	117 ± 27	5 ± 1	24 ± 5
24	160 ± 14	0	39 ± 10	138 ± 25	6 ± 1	23 ± 3
28	162 ± 18	0	49 ± 9	112 ± 17	6 ± 1	18 ± 2
36	164 ± 14	0	47 ± 8	101 ± 13	5 ± 1	21 ± 2
44	153 ± 12	0	39 ± 5	102 ± 12	5 ± 1	21 ± 2
52	153 ± 12	0	41 ± 6	109 ± 12	5 ± 1	22 ± 4

Tabela G10A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-5

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	61,7	8,3	13,3	16,7	52,64	46,81	0,16	0,39
8	50,0	1,5	8,1	40,4	52,17	42,74	0,44	4,65
12	46,6	1,0	21,4	31,0	76,09	19,16	0,99	3,76
20	50,5	0,0	11,1	38,4	90,86	0,00	0,47	8,67
24	27,6	0,0	24,9	47,5	83,71	0,00	3,41	12,88
28	17,1	0,0	31,9	51,0	74,95	0,00	5,83	19,22
36	13,7	0,0	26,4	59,9	63,86	0,00	5,45	30,69
44	8,8	0,0	36,5	54,7	57,05	0,00	10,26	32,69
52	10,4	0,0	32,5	57,1	54,48	0,00	7,60	37,92

Tabela G10B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-5

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	183 ± 21	416 ± 93	32 ± 7	63 ± 24	5 ± 1	14 ± 4
8	130 ± 11	465 ± 240	42 ± 19	111 ± 19	7 ± 1	17 ± 2
12	153 ± 15	342 ± 93	37 ± 9	89 ± 24	6 ± 1	13 ± 2
20	144 ± 14	0	28 ± 5	151 ± 24	8 ± 1	19 ± 2
24	148 ± 15	0	54 ± 7	110 ± 11	5 ± 1	22 ± 2
28	129 ± 11	0	42 ± 3	89 ± 9	5 ± 1	18 ± 1
36	120 ± 10	0	35 ± 3	89 ± 7	6 ± 1	15 ± 1
44	97 ± 15	0	30 ± 2	70 ± 7	5 ± 1	15 ± 1
52	95 ± 14	0	25 ± 2	83 ± 15	6 ± 1	13 ± 1

Tabela G11A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-3b

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	51,1	5,7	10,2	33,0	49,87	49,07	0,15	0,91
6	63,6	3,9	11,7	20,8	48,72	49,96	0,18	1,14
12	69,9	1,0	11,8	17,3	90,09	7,49	0,31	2,11
20	38,9	0,0	10,5	50,6	80,90	0,00	0,93	18,17
24	48,7	0,0	15,4	35,9	92,10	0,00	0,71	7,19
32	45,4	0,0	13,9	40,7	89,67	0,00	0,62	9,71
40	50,4	0,0	10,4	39,2	90,78	0,00	0,55	8,67
54	48,6	0,0	8,3	43,1	91,16	0,00	0,26	8,58

Tabela G11B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-3b

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	160 ± 14	355 ± 52	28 ± 6	49 ± 8	5 ± 1	11 ± 2
6	155 ± 13	429 ± 114	28 ± 6	87 ± 32	6 ± 1	15 ± 2
12	136 ± 10	307 ± 50	26 ± 5	100 ± 29	6 ± 1	17 ± 3
20	157 ± 17	0	35 ± 8	145 ± 16	6 ± 1	28 ± 4
24	167 ± 15	0	34 ± 10	129 ± 31	6 ± 1	22 ± 4
32	145 ± 12	0	27 ± 5	126 ± 22	7 ± 1	17 ± 2
40	128 ± 10	0	30 ± 7	111 ± 20	7 ± 1	16 ± 2
54	128 ± 12	0	22 ± 4	117 ± 9	8 ± 1	15 ± 1

Tabela G12A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3b

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	49,0	7,8	11,8	31,4	47,94	50,23	0,19	1,64
6	55,1	2,0	8,2	34,7	57,05	40,04	0,21	2,70
12	57,7	1,0	10,6	30,7	70,39	25,61	0,29	3,71
20	32,6	0,0	19,6	47,8	84,22	0,00	1,91	13,87
24	36,8	0,0	12,3	50,9	86,03	0,00	1,00	12,97
32	29,0	0,0	34,9	36,1	86,24	0,00	3,55	10,21
40	24,7	0,0	31,1	44,2	87,22	0,00	2,83	9,95
47	20,6	0,0	43,1	36,3	83,24	0,00	6,26	10,50

Tabela G12B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-3b

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	154 ± 20	330 ± 21	29 ± 13	87 ± 28	6 ± 2	15 ± 4
6	140 ± 12	355 ± 50	33 ± 10	89 ± 21	6 ± 1	16 ± 3
12	142 ± 12	344 ± 50	26 ± 6	113 ± 25	7 ± 1	15 ± 2
20	153 ± 15	0	40 ± 6	113 ± 16	5 ± 1	21 ± 2
24	150 ± 15	0	37 ± 9	122 ± 17	5 ± 1	23 ± 3
32	146 ± 14	0	38 ± 4	108 ± 17	5 ± 1	23 ± 3
40	153 ± 12	0	38 ± 4	85 ± 10	5 ± 1	19 ± 2
47	134 ± 12	0	42 ± 3	84 ± 9	5 ± 1	18 ± 2

Tabela G13A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-4b

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	50,9	28,3	3,8	17,0	26,82	72,89	0,02	0,27
8	48,0	8,2	7,1	36,7	43,25	55,27	0,13	1,35
12	69,9	2,4	3,6	24,1	47,92	50,70	0,07	1,31
18	70,0	1,4	4,3	24,3	51,30	46,70	0,11	1,89
22	53,8	0,0	4,4	41,8	91,35	0,00	0,35	8,30
28	43,9	0,0	8,4	47,7	90,76	0,00	0,47	8,77
36	34,6	0,0	13,2	52,2	85,90	0,00	1,03	13,07
44	35,1	0,0	14,2	50,7	89,88	0,00	0,83	9,29

Tabela G13B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-4b

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	193 ± 25	361 ± 24	28 ± 12	103 ± 39	9 ± 3	12 ± 1
8	170 ± 17	406 ± 59	52 ± 14	95 ± 20	6 ± 1	16 ± 3
12	164 ± 14	530 ± 35	31 ± 15	102 ± 34	7 ± 2	14 ± 3
18	169 ± 16	487 ± 50	36 ± 15	121 ± 38	7 ± 2	17 ± 3
22	156 ± 16	0	48 ± 20	117 ± 17	6 ± 1	22 ± 2
28	166 ± 15	0	35 ± 11	119 ± 17	6 ± 1	20 ± 1
36	152 ± 14	0	40 ± 8	121 ± 15	7 ± 1	18 ± 2
44	147 ± 16	0	34 ± 6	104 ± 14	6 ± 1	18 ± 8

Tabela G14 Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-4b

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	48,1	37,0	5,6	9,3	23,92	75,75	0,02	0,31
8	41,4	2,3	9,8	46,5	39,28	57,44	0,29	2,99
12	64,3	4,8	13,1	17,8	47,24	51,68	0,27	0,81
20	47,5	0,0	13,1	39,4	92,41	0,00	0,69	6,90
28	37,1	0,0	16,4	46,5	89,24	0,00	1,10	9,66
36	37,1	0,0	18,6	44,3	91,51	0,00	1,37	7,12
44	24,7	0,0	20,2	55,1	85,14	0,00	1,66	13,20

Tabela G14B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-4b

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	187 ± 26	395 ± 37	30 ± 2	161 ± 40	10 ± 4	18 ± 8
8	140 ± 15	516 ± 129	40 ± 8	95 ± 17	6 ± 1	16 ± 2
12	169 ± 13	429 ± 98	44 ± 14	90 ± 40	6 ± 2	15 ± 5
20	156 ± 17	0	41 ± 10	122 ± 25	6 ± 1	20 ± 3
28	158 ± 18	0	45 ± 10	122 ± 18	7 ± 1	19 ± 2
36	171 ± 18	0	55 ± 9	116 ± 14	6 ± 1	23 ± 3
44	143 ± 14	0	34 ± 7	94 ± 11	5 ± 1	18 ± 1

Tabela G15A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-5b

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	29,5	11,4	4,5	54,6	23,36	75,29	0,06	1,29
8	67,1	8,1	2,0	22,8	46,03	52,69	0,03	1,25
12	64,3	6,3	4,5	24,9	45,37	53,43	0,13	1,07
15	38,3	0,8	17,5	43,4	56,00	32,60	1,26	10,14
20	53,4	0,0	13,6	33,0	93,45	0,00	0,65	5,90
28	48,7	0,0	11,5	39,8	92,64	0,00	0,74	6,62
36	19,0	0,0	27,7	53,3	63,98	0,00	6,08	29,94
44	18,7	0,0	36,3	45,0	76,21	0,00	6,04	17,75

Tabela G15B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio DA-5b

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	153 ± 40	444 ± 99	55 ± 29	100 ± 22	7 ± 1	14 ± 2
8	159 ± 11	397 ± 44	44 ± 21	114 ± 20	6 ± 1	20 ± 3
12	186 ± 14	472 ± 95	58 ± 25	82 ± 7	4 ± 1	20 ± 2
15	124 ± 13	411 ± 50	42 ± 10	125 ± 18	7 ± 1	20 ± 2
20	159 ± 17	0	34 ± 11	113 ± 24	6 ± 2	19 ± 3
28	178 ± 15	0	50 ± 21	127 ± 27	5 ± 1	24 ± 4
36	141 ± 15	0	50 ± 6	124 ± 13	6 ± 1	24 ± 3
44	158 ± 22	0	53 ± 8	119 ± 14	5 ± 1	24 ± 3

Tabela G16A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-5b

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	54,9	23,5	3,9	17,7	18,47	81,19	0,02	0,32
8	78,4	3,4	6,8	11,4	51,43	47,88	0,12	0,57
12	71,0	3,2	4,8	21,0	59,64	38,61	0,09	1,66
20	45,1	0,0	11,0	43,9	91,53	0,00	0,81	7,66
28	44,9	0,0	14,5	40,6	88,80	0,00	1,42	9,78
36	22,9	0,0	37,3	39,8	76,68	0,00	6,96	16,36
44	21,3	0,0	34,0	44,7	82,43	0,00	4,74	12,83

Tabela G16B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio D-5b

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	169 ± 25	469 ± 71	42 ± 25	100 ± 23	6 ± 2	21 ± 8
8	114 ± 11	439 ± 145	34 ± 10	94 ± 29	7 ± 2	15 ± 3
12	149 ± 16	387 ± 138	26 ± 12	128 ± 35	8 ± 2	17 ± 3
20	183 ± 19	0	59 ± 26	132 ± 26	5 ± 11	25 ± 5
28	138 ± 10	0	55 ± 11	123 ± 21	6 ± 1	20 ± 3
36	144 ± 15	0	57 ± 7	128 ± 14	5 ± 1	26 ± 3
44	153 ± 16	0	46 ± 5	96 ± 11	4 ± 1	22 ± 2

Tabela G17A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-1

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	54,5	9,1	20,8	15,6	43,83	55,32	0,44	0,41
4	56,7	4,8	3,8	34,7	50,94	46,85	0,08	2,13
8	49,6	4,3	10,3	35,8	56,40	40,76	0,29	2,55
12	55,7	1,5	6,9	35,9	56,60	37,93	0,37	5,10
16	54,4	0,8	8,8	36,0	66,51	25,14	0,42	7,93
24	63,6	3,9	14,3	18,2	57,59	41,15	0,19	1,07
36	74,4	4,7	5,8	15,1	60,54	38,85	0,03	0,58
60	81,5	0,0	6,2	12,3	99,37	0,00	0,09	0,54
72	81,9	0,0	3,6	14,5	99,04	0,00	0,02	0,94
96	77,9	0,0	6,7	15,4	98,54	0,00	0,19	1,27

Tabela G17B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-1

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	171 ± 19	402 ± 77	77 ± 30	93 ± 36	7 ± 2	12 ± 3
4	145 ± 14	389 ± 75	37 ± 21	98 ± 24	8 ± 2	12 ± 2
8	161 ± 16	404 ± 45	40 ± 5	110 ± 20	6 ± 1	18 ± 1
12	134 ± 13	469 ± 50	63 ± 1	152 ± 26	9 ± 2	18 ± 2
16	149 ± 11	409 ± 50	39 ± 10	176 ± 26	9 ± 1	20 ± 2
24	190 ± 15	422 ± 152	31 ± 9	125 ± 34	6 ± 2	21 ± 4
36	162 ± 16	507 ± 96	23 ± 7	145 ± 45	9 ± 2	16 ± 3
48	168 ± 12	289 ± 50	25 ± 15	49 ± 32	4 ± 1	11 ± 5
60	166 ± 12	0	36 ± 11	114 ± 20	6 ± 2	20 ± 4
72	153 ± 12	0	16 ± 1	150 ± 39	8 ± 2	20 ± 4
84	133 ± 12	0	29 ± 22	41 ± 14	3 ± 1	14 ± 5
96	113 ± 11	0	34 ± 11	89 ± 20	5 ± 1	18 ± 3

Tabela G18A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-2

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	51,7	38,3	1,7	8,3	14,42	85,48	0,01	0,09
4	65,0	6,3	2,5	26,2	56,71	41,30	0,06	1,93
8	67,0	3,0	10,0	20,0	74,98	23,29	0,24	1,49
12	69,6	2,9	8,7	18,8	81,20	17,64	0,19	0,97
16	76,1	1,5	1,5	20,9	92,14	4,80	0,07	2,99
20	68,4	8,9	7,6	15,1	33,88	65,32	0,09	0,71
24	69,8	14,3	3,2	12,7	32,07	67,30	0,16	0,47
30	72,0	12,0	5,6	10,4	38,22	60,99	0,13	0,66
36	68,9	10,8	5,4	14,9	38,70	59,70	0,19	1,41
42	68,2	10,6	7,1	14,1	37,75	60,57	0,20	1,48
48	75,0	10,2	2,8	12,0	43,33	55,27	0,17	1,23

Tabela G18B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-2

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	193 ± 25	475 ± 74	49 ± 2	99 ± 37	6 ± 1	16 ± 6
4	154 ± 14	352 ± 44	38 ± 2	111 ± 29	7 ± 2	17 ± 3
8	165 ± 12	353 ± 72	41 ± 16	122 ± 34	7 ± 2	16 ± 2
12	171 ± 15	335 ± 46	28 ± 2	77 ± 36	6 ± 2	13 ± 3
16	170 ± 16	314 ± 50	37 ± 2	160 ± 34	7 ± 2	26 ± 8
20	175 ± 15	533 ± 148	40 ± 6	169 ± 40	7 ± 2	25 ± 3
24	178 ± 17	425 ± 64	114 ± 37	144 ± 49	7 ± 2	20 ± 5
30	162 ± 13	406 ± 52	50 ± 17	133 ± 21	4 ± 1	33 ± 6
36	157 ± 16	401 ± 53	68 ± 30	194 ± 41	7 ± 1	28 ± 3
42	150 ± 14	415 ± 38	50 ± 10	182 ± 29	7 ± 1	28 ± 6
48	145 ± 10	378 ± 22	87 ± 79	149 ± 34	6 ± 1	25 ± 4

Tabela G19A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-3

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	61,4	19,3	3,5	15,8	21,76	78,13	0,01	0,10
4	65,4	11,5	5,1	18,0	31,53	67,92	0,10	0,45
8	65,8	3,9	9,2	21,1	60,98	38,13	0,16	0,73
12	53,7	2,1	11,6	32,6	63,06	33,83	0,39	2,72
16	38,0	1,0	16,0	45,0	65,19	23,02	0,83	10,96
24	48,8	0,0	13,4	37,8	93,66	0,00	0,46	5,88
36	49,6	0,0	10,4	40,0	89,25	0,00	0,83	9,92
48	52,1	0,0	5,6	42,3	89,58	0,00	0,30	10,12
60	47,4	0,0	10,4	42,2	85,39	0,00	0,77	13,84
72	48,8	0,0	11,6	39,6	89,93	0,00	0,33	9,74
84	52,4	0,0	8,9	38,7	88,48	0,00	0,57	10,95
96	49,6	0,0	10,5	39,9	88,76	0,00	0,50	10,74
100	50,3	0,0	7,4	42,3	90,70	0,00	0,31	8,99
104	63,1	0,6	9,4	26,9	82,80	12,49	0,43	4,28
108	56,2	5,5	9,6	28,7	19,99	79,41	0,12	0,48
112	54,7	7,5	8,5	29,3	16,71	82,58	0,10	0,61
120	54,7	7,5	8,5	29,3	16,71	82,58	0,10	0,61

Tabela G19B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-3

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	154 ± 21	415 ± 54	25 ± 9	54 ± 21	4 ± 1	14 ± 4
4	142 ± 16	369 ± 41	52 ± 12	80 ± 34	5 ± 1	16 ± 5
8	171 ± 18	445 ± 36	46 ± 20	89 ± 36	6 ± 1	12 ± 3
12	153 ± 15	366 ± 103	39 ± 12	96 ± 26	6 ± 1	16 ± 3
16	152 ± 15	314 ± 50	30 ± 6	124 ± 22	6 ± 1	22 ± 3
24	156 ± 16	0	32 ± 11	134 ± 22	7 ± 1	22 ± 3
36	125 ± 11	0	39 ± 8	130 ± 19	7 ± 1	19 ± 2
48	111 ± 9	0	30 ± 6	130 ± 18	7 ± 1	17 ± 1
60	109 ± 6	0	31 ± 5	128 ± 15	7 ± 1	18 ± 1
72	122 ± 10	0	19 ± 4	157 ± 22	9 ± 1	17 ± 2
84	102 ± 6	0	28 ± 8	108 ± 15	6 ± 1	16 ± 2
96	105 ± 7	0	24 ± 6	120 ± 18	6 ± 1	18 ± 2
100	117 ± 9	0	28 ± 6	130 ± 17	8 ± 1	16 ± 1
104	120 ± 7	306 ± 50	36 ± 8	126 ± 24	6 ± 1	19 ± 2
108	159 ± 16	458 ± 67	48 ± 21	64 ± 16	4 ± 1	19 ± 5
112	128 ± 11	451 ± 49	46 ± 21	83 ± 17	4 ± 1	20 ± 3
120	130 ± 21	445 ± 32	44 ± 21	82 ± 17	5 ± 1	21 ± 3

Tabela G20A Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-4

t	F_{cl}	F_p	F_{hnr}	F_{hr}	FA_{cl}	FA_p	FA_{hnr}	FA_{hr}
0	61,3	24,2	3,2	11,3	38,75	61,00	0,05	0,20
4	55,8	1,9	8,7	33,6	64,90	32,75	0,14	2,21
8	61,3	0,8	9,2	28,7	64,24	32,45	0,31	3,00
16	43,6	1,3	16,7	38,4	69,84	23,86	0,89	5,42
48	45,7	0,0	13,6	40,7	92,14	0,00	0,60	7,26
72	37,9	0,0	7,4	54,7	86,85	0,00	0,26	12,89
96	30,9	0,0	12,1	57,0	86,99	0,00	0,69	12,32
120	21,9	0,0	14,6	63,5	85,89	0,00	1,55	12,55
144	23,8	0,0	28,6	47,6	83,39	0,00	2,85	13,76
168	27,1	0,0	16,5	56,4	86,40	0,00	1,38	12,22
172	36,4	0,0	18,2	45,4	89,99	0,00	0,95	9,06
176	63,3	0,0	5,1	31,6	93,71	0,00	0,22	6,07
192	43,6	1,7	9,4	45,3	28,29	67,93	0,28	3,51
196	41,5	6,5	8,9	43,1	9,55	89,17	0,09	1,18
200	41,5	6,5	8,9	43,1	9,55	89,17	0,09	1,18

Tabela G20B Parâmetros morfológicos obtidos no ensaio C-4

t	D_{cl}	D_p	L_{hnr}	L_{hr}	N_{hr}	HGU_{hr}
0	198 ± 21	401 ± 32	85 ± 58	91 ± 49	5 ± 1	17 ± 5
4	139 ± 14	134 ± 75	24 ± 4	84 ± 22	6 ± 1	15 ± 2
8	133 ± 11	463 ± 50	31 ± 10	91 ± 24	5 ± 1	16 ± 3
16	173 ± 18	346 ± 50	38 ± 11	121 ± 26	6 ± 1	20 ± 3
48	129 ± 10	0	28 ± 5	107 ± 17	7 ± 1	15 ± 1
72	108 ± 9	0	19 ± 3	118 ± 15	8 ± 1	15 ± 1
96	103 ± 8	0	23 ± 5	88 ± 14	6 ± 1	14 ± 1
120	108 ± 11	0	25 ± 5	50 ± 7	4 ± 1	13 ± 1
144	92 ± 11	0	26 ± 3	71 ± 18	5 ± 1	13 ± 1
168	93 ± 11	0	25 ± 4	67 ± 9	6 ± 1	12 ± 1
172	97 ± 9	0	24 ± 4	83 ± 26	7 ± 1	11 ± 1
176	108 ± 12	0	44 ± 30	116 ± 33	6 ± 1	18 ± 2
192	116 ± 11	504 ± 45	34 ± 10	101 ± 18	7 ± 1	14 ± 1
196	116 ± 11	490 ± 50	34 ± 10	101 ± 10	7 ± 1	14 ± 1
200	118 ± 10	495 ± 55	33 ± 10	104 ± 10	6 ± 1	13 ± 1