

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Otimização da produção fermentativa do ácido láctico

A influência das variáveis temperatura, pH, concentração de lactose e de extrato de levedura sobre a fermentação homoláctica do soro de queijo foi estudada segundo um planejamento fatorial composto central com três réplicas no centro, perfazendo um total de 27 experimentos (Tabela 3.1). Os resultados experimentais são apresentados na Tabela 4.1. Com estes resultados foram estimados os parâmetros da superfície de resposta ajustada (Equação 3.2).

Tabela 4.1 – Resultados do planejamento experimental.

<i>Experimento</i>	X_1	X_2	X_3	X_4	<i>ácido láctico (g/L)</i>
1	-1	-1	-1	-1	1,67
2	1	-1	-1	-1	7,2
3	-1	1	-1	-1	1,28
4	1	1	-1	-1	13,5
5	-1	-1	1	-1	1,12
6	1	-1	1	-1	12,87
7	-1	1	1	-1	5,67
8	1	1	1	-1	8,46
9	-1	-1	-1	1	9,9
10	1	-1	-1	1	16,38
11	-1	1	-1	1	37,08
12	1	1	-1	1	56,88
13	-1	-1	1	1	7,2
14	1	-1	1	1	19,58
15	-1	1	1	1	37,8
16	1	1	1	1	43,65
17	0	0	0	0	37,22
18	0	0	0	0	36,94
19	0	0	0	0	37,15
20	-1,55	0	0	0	12,87
21	1,55	0	0	0	42,13
22	0	-1,55	0	0	23,94
23	0	1,55	0	0	27,81
24	0	0	-1,55	0	26,19
25	0	0	1,55	0	9,18
26	0	0	0	-1,55	0,45
27	0	0	0	1,55	48,15

A precisão dos resultados experimentais pode ser constatada através da avaliação dos resultados obtidos no nível central do planejamento, onde as diferenças entre as respostas foi inferior a 1%.

A identificação dos parâmetros significativos foi realizada através de testes de hipóteses utilizando a estatística *t* de *Student*. Foi estabelecida uma probabilidade máxima de erro no teste de 10%, sendo assim os parâmetros com nível de significância maior do que 10% foram negligenciados.

O modelo ajustado ($R^2=0,92$) é representado por:

$$Y = 36,36 + 5,57X_1 + 6,56X_2 + 12,35X_4 + 6,88X_2X_4 - 3,41X_1^2 - 2,99X_2^2 - 7,51X_3^2 - 4,75X_4^2 \quad (4.1)$$

Uma análise de resíduos mostrou que estes seguem uma distribuição normal, são independentemente distribuídos e com variância constante.

Os efeitos das variáveis independentes e das suas interações na formação do produto podem ser visualizados através da análise das superfícies de resposta (Figura 4.1), construídas a partir da Equação 4.1.

A produção de ácido láctico foi máxima quando a temperatura situou-se em torno de 40 °C, como pode ser visto nas Figuras 4.1(a) e 4.1(c). Este resultado está de acordo com vários trabalhos publicados sobre a produção de ácido láctico através da fermentação do soro de queijo, utilizando o *Lactobacillus helveticus*. Tango e Ghaly (1999a), estudando o efeito da temperatura sobre a formação do produto, realizaram experimentos à 23 °C, 37 °C e 42 °C. A maior concentração do ácido láctico foi obtida à 42°C. Kulozik e Wilde (1999) realizaram experimentos em cinco níveis de temperatura: 35 °C, 38 °C, 42 °C, 45 °C e 49 °C. A formação do produto foi ligeiramente maior à 45 °C do que em 42 °C. Entretanto, nesses dois trabalhos os autores analisaram individualmente o efeito de cada temperatura, não estudando o efeito das interações entre as variáveis do processo. Norton *et al.* (1994), Amrane (2001) e Schepers *et al.* (2002) utilizaram a temperatura de 42 °C em seus trabalhos, porém nenhum deles justificou esta escolha.

Analisando a Figura 4.1(b), pode-se observar que a formação do produto foi máxima quando a concentração de lactose situou-se na faixa entre 80-90 g/L. Para maiores concentrações ocorreu uma diminuição da resposta, provavelmente devido à inibição pelo substrato. Vários estudos mostraram que o crescimento celular e a produção de ácido láctico por bactérias do gênero *Lactobacillus* são inibidos pelo substrato (GONÇALVES *et al.*, 1991; BURGOS-RUBIO *et al.*, 2000; MI-YOUNG, 2003).

A forte influência do pH sobre o processo pode ser observada nas Figuras 4.1(b) e 4.1(c). A quantidade de produto formado em pH menor do que 6 foi muito pequena. Para valores de pH iguais ou maiores do que 6, houve uma grande formação de ácido, exceto nos casos em que a concentração de extrato de levedura foi menor do que 12 g/L.

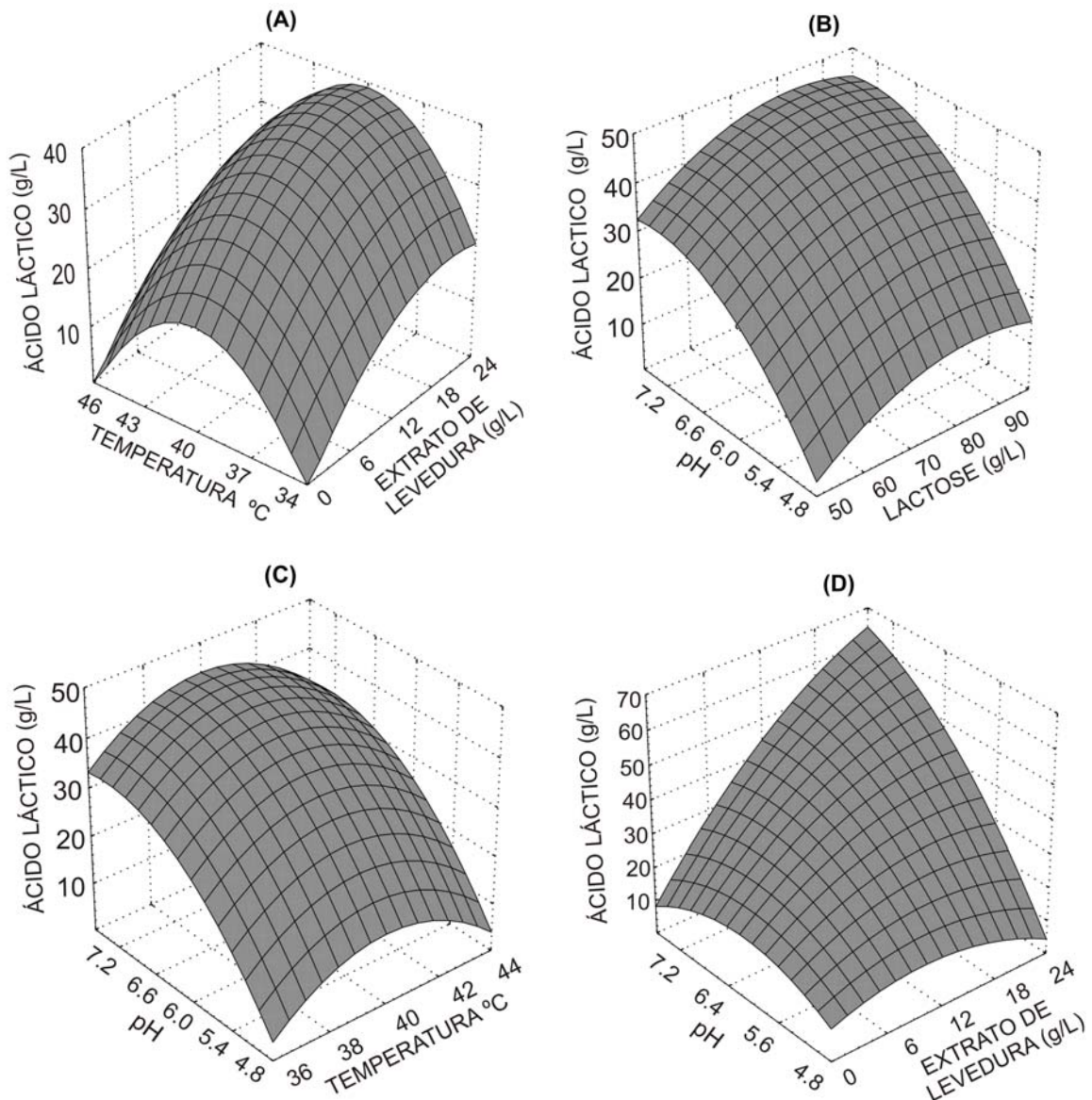


Figura 4.1 - Superfícies de resposta para a produção de ácido láctico como uma função das variáveis: (a) temperatura e concentração de extrato de levedura; (b) concentração de lactose e pH; (c) temperatura e pH; (d) concentração de extrato de levedura e pH. Em cada superfície, as demais variáveis encontram-se no nível central.

A interação entre pH e concentração de extrato de levedura é exibida pela Figura 4.1(d). Mesmo em condições favoráveis de pH, baixas concentrações de extrato de levedura levaram a baixas concentrações de produto. Isto ocorreu devido às complexas exigências nutricionais do gênero *Lactobacillus* (WOOD, 1995). A fonte de nitrogênio é o principal fator de influência sobre o crescimento desses microrganismos. Como a síntese do ácido láctico por processo fermentativo é associada ao crescimento celular, não há formação de produto se o meio não possuir uma concentração adequada de nitrogênio para promover este crescimento (PRITCHARD, 1993). Por outro lado, altas concentrações de nitrogênio podem levar à morte celular.

De acordo com a Figura 4.1(a), a concentração ótima de extrato de levedura parece estar situada na faixa entre 18 e 24 g/L. À primeira vista, estes valores podem parecer elevados, já que neste tipo de fermentação normalmente são utilizados 5 ou 10 g/L. Entretanto, alguns trabalhos mostram que eles são factíveis. Amrane e Prigent (1994), desenvolvendo um modelo para descrever a fermentação do ácido láctico, utilizaram um meio composto por soro de queijo suplementado com 20 g/L de extrato de levedura. Mais tarde, para estudar o efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção do ácido láctico, Amrane e Prigent (1998) realizaram fermentações utilizando diferentes concentrações deste composto, na faixa entre 2-30 g/L. Em todos experimentos obteve-se a mesma concentração final de ácido láctico, porém o tempo para atingi-la decresceu significativamente quando foram utilizadas maiores concentrações de extrato de levedura. Kulozik e Wilde (1999), utilizando extrato de levedura na faixa entre 0-25 g/L, relataram que nas concentrações acima de 10 g/L houve um aumento no crescimento celular, porém a produção do ácido láctico permaneceu inalterada. Para o tempo de fermentação escolhido para este estudo, 32 horas, a formação do produto foi muito pequena em concentrações de extrato de levedura menores do que 12 g/L. Talvez maiores concentrações de ácido láctico pudessem ser obtidas nessas condições, se o tempo de fermentação fosse maior.

O ponto de máxima produção de ácido láctico foi determinado através de uma análise canônica do modelo ajustado. De acordo com a metodologia descrita no Item 3.2.2, o ponto estacionário é dado por:

$$\mathbf{x}_0 = -B^{-1} \frac{\mathbf{b}}{2} \quad (4.2)$$

Foi realizado um estudo para identificar a natureza do ponto estacionário, para saber se tratava-se de um ponto de máxima ou mínima resposta, ou ainda de um ponto de sela. Isto foi

feito calculando-se as raízes características da matriz B , que é a matriz dos coeficientes dos termos quadráticos e dos termos de interação do modelo ajustado (Equação 4.1). Portanto:

$$B = \begin{bmatrix} -3,41 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -2,99 & 0 & 3,44 \\ 0 & 0 & -7,51 & 0 \\ 0 & 3,44 & 0 & -4,75 \end{bmatrix} \quad (4.3)$$

Cujas raízes características são iguais a:

$$\lambda_1 = -7,51 \quad \lambda_2 = -7,42 \quad \lambda_3 = -3,41 \quad \lambda_4 = -0,32 \quad (4.4)$$

Observa-se que todas as raízes características da matriz B possuem sinal negativo. Isto quer dizer que um deslocamento a partir do ponto estacionário em qualquer direção implicará em um decréscimo na resposta. Portanto, conclui-se que o ponto estacionário $\mathbf{x}_0$ é um ponto de máximo.

O vetor dos coeficientes dos termos de 1ª ordem da Equação 4.1 é dado por:

$$\mathbf{b} = \begin{bmatrix} 5,57 \\ 6,56 \\ 0 \\ 12,35 \end{bmatrix} \quad (4.5)$$

Com o vetor $\mathbf{b}$ e com a matriz B calculou-se o ponto estacionário $\mathbf{x}_0$ através da Equação 4.2:

$$\mathbf{x}_0 = \begin{bmatrix} 0,82 \\ 15,54 \\ 0 \\ 12,56 \end{bmatrix} \quad (4.6)$$

No qual 0,82, 15,54, 0 e 12,56 correspondem respectivamente aos valores das variáveis independentes X_1 , X_2 , X_3 e X_4 no ponto estacionário. Os níveis dessas variáveis nas suas escalas originais foram calculados com o auxílio das Equações 3.2-3.4. O valor correspondente para a temperatura foi de 40 °C, confirmando o resultado apontado pela análise das superfícies de resposta (Figuras 4.1 a e 4.1 c). A concentração ótima de lactose foi de 82 g/L. Em maiores concentrações, ocorreu uma diminuição da resposta. Este resultado está de acordo com o trabalho publicado por Tango e Ghaly (1999b), no qual relataram que o crescimento do *Lactobacillus helveticus* e a produção do ácido láctico foram inibidos em concentrações de lactose maiores do que 80 g/L. Entretanto, Aeschlimann e Von Stockar

(1989) publicaram um estudo semelhante onde o *Lactobacillus helveticus* não sofreu inibição pelo substrato em concentrações iniciais de lactose inferiores a 132 g/L.

Não há relatos sobre a concentração ideal da lactose na produção do ácido láctico por fermentação com o *Lactobacillus helveticus*. Nos trabalhos publicados sobre o assunto foram utilizadas concentrações iniciais na faixa de 50-150 g/L. Incrementos nas concentrações iniciais de lactose até valores maiores do que 100 g/L, utilizadas em alguns estudos (AESCHLIMANN; VON STOCKAR, 1989; TANGO; GHALY, 1999b), implicaram em maiores concentrações de produto, porém provocaram uma diminuição da conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ e consequentemente um aumento na concentração de lactose residual. Portanto, o valor ótimo da concentração de substrato encontrado neste estudo foi considerado plausível.

De acordo com o valor escolhido para o nível extremo do planejamento experimental, as variáveis independentes codificadas estão compreendidas no intervalo entre -1,55 e +1,55. Porém, a Equação 4.6 mostra que os valores ótimos tanto da concentração do extrato de levedura, quanto do pH extrapolaram esses limites. Portanto, um novo planejamento fatorial do tipo composto central, com duas réplicas no centro, foi construído para essas variáveis. O valor escolhido para o nível extremo do planejamento foi igual a 1,41. Este valor foi selecionado de modo a se obter um planejamento ortogonal, onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si. A temperatura e a concentração de lactose foram mantidas nos seus níveis ótimos obtidos pelo planejamento anterior, ou seja, 40 °C e 82 g/L, respectivamente.

As variáveis independentes foram codificadas segundo as relações:

$$X_2 = \frac{YE - 24}{4} \quad (4.7)$$

$$X_4 = pH - 7 \quad (4.8)$$

X_2 = concentração do extrato de levedura, codificada.

YE = concentração de extrato de levedura, g/L.

X_4 = pH, codificado.

pH = corresponde ao próprio valor do pH do meio de fermentação.

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 4.2. Os níveis extremos deste novo planejamento foram escolhidos com base nas superfícies de respostas exibidas na Figura 4.1 e desse modo espera-se que o ponto de máxima produção

de ácido láctico esteja localizado dentro da região experimental. Os resultados são exibidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.2– Valores reais das variáveis independentes codificadas X_i .

	X_i				
	-1,41	-1	0	1	1,41
YE(g/L)	18,36	20	24	28	29,64
pH	5,6	6	7	8	8,4

Tabela 4.3 – Resultados do planejamento composto central, construído para a otimização das variáveis concentração de extrato de levedura (X_2) e pH (X_4).

X_2	X_4	<i>Ácido Láctico (g/L)</i>
-1	-1	42,15
1	-1	26,32
-1	1	6,8
1	1	39,82
0	0	58,23
0	0	59,14
-1,41	0	48,73
1,41	0	38,04
0	-1,41	28,02
0	1,41	5,2

Com os novos resultados experimentais, realizou-se uma regressão múltipla no modelo descrito pela Equação 3.2. A identificação dos parâmetros significativos foi feita através de testes de hipóteses utilizando a estatística t de *Student*. Os parâmetros com nível de significância maior do que 10% foram negligenciados. O modelo ajustado ($R^2=0,95$) é dado por:

$$Y = 58,69 - 6,77X_4 + 12,21X_2X_4 - 7,96X_2^2 - 21,43X_4^2 \quad (4.9)$$

Uma análise de resíduos mostrou que estes seguem uma distribuição normal, são independentemente distribuídos e com variância constante.

Os efeitos das variáveis independentes e das suas interações na formação do produto podem ser observados através da análise da superfície de resposta (Figura 4.2), construída a partir da Equação 4.9. Pode-se observar que a formação do produto foi muito pequena tanto em pH maior do que 7,8, quanto em concentrações de extrato de levedura maiores do que 26,4 g/L. Por outro lado, a concentração do produto foi máxima em concentrações de extrato de levedura na faixa entre 20-24 g/L e pH em torno de 7.

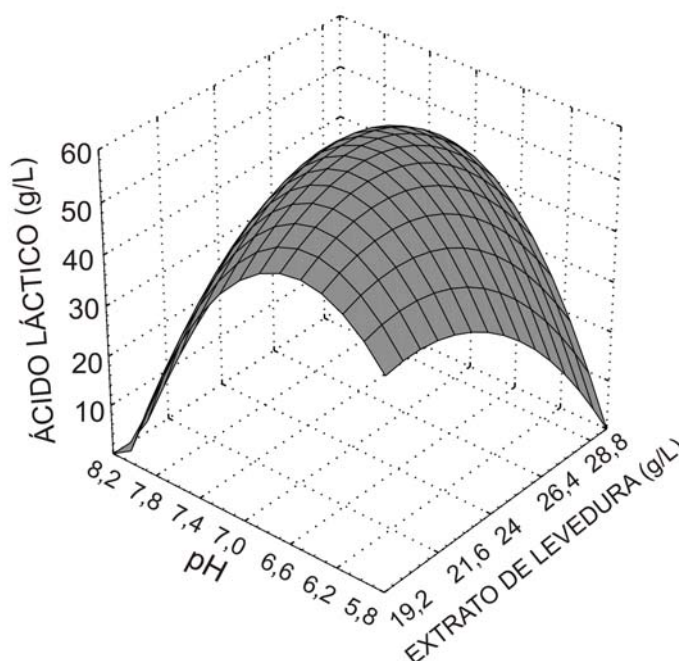


Figura 4.2 - Superfície de resposta para a produção de ácido láctico como uma função do pH e da concentração de extrato de levedura.

Para se determinar o ponto de máxima produção de ácido láctico, foi realizada uma análise canônica no modelo descrito pela Equação 4.9. Assim como foi feito no modelo anterior, inicialmente calculou-se as raízes características da matriz B , que é a matriz dos coeficientes dos termos quadráticos e dos termos de interação do modelo ajustado:

$$B = \begin{bmatrix} -7,96 & 6,11 \\ 6,11 & -21,43 \end{bmatrix} \quad (4.10)$$

Cujas raízes características são iguais a:

$$\lambda_2 = -23,79 \quad \lambda_4 = -5,61 \quad (4.11)$$

Observa-se que ambas as raízes características da matriz B possuem sinal negativo. Isto quer dizer que um deslocamento a partir do ponto estacionário em qualquer direção implicará em

um decréscimo na resposta. Portanto, conclui-se que o ponto estacionário $\mathbf{x}_0$ é um ponto de máximo.

O vetor $\mathbf{b}$, que contém os coeficientes dos termos lineares da Equação 4.9, é dado por:

$$\mathbf{b} = \begin{bmatrix} 0 \\ -6,77 \end{bmatrix} \quad (4.12)$$

Com o vetor $\mathbf{b}$ e a matriz B calculou-se o ponto de máxima resposta:

$$\mathbf{x}_0 = \begin{bmatrix} -0,16 \\ -0,20 \end{bmatrix} \quad (4.13)$$

Onde -0,16 e -0,20 correspondem respectivamente às variáveis independentes X_2 e X_4 no ponto estacionário. Os níveis reais dessas variáveis foram calculados decodificando os resultados obtidos na Equação 4.13, com o auxílio das Equações 4.7 e 4.8. Desse modo, obteve-se os valores ótimos do pH e da concentração do extrato de levedura, que foram iguais a 6,8 e 23,36 g/L respectivamente. Substituindo esses valores na Equação 4.9, obteve-se a máxima concentração de ácido láctico prevista pela análise canônica, 59,38 g/L. Com este resultado e com as raízes características da matriz B (Equação 4.11), chegou-se à forma canônica da Equação 4.9:

$$y = 59,38 - 23,79w_2^2 - 5,61w_4^2 \quad (4.14)$$

Uma nova fermentação foi realizada utilizando-se as condições operacionais ótimas encontradas neste estudo: 40 °C, pH 6,8, concentrações de lactose e de extrato de levedura iguais a 82 g/L e 23,36 g/L, respectivamente. O resultado é exibido pela Figura 4.3. A concentração do ácido láctico atingiu 59,15 g/L, valor praticamente idêntico ao predito pelo análise canônica, com um desvio de apenas 0,4%. A baixa concentração residual da lactose, 5,75 g/L, mostra que o substrato foi quase totalmente consumido após 32 horas de fermentação. A concentração celular atingiu o valor máximo de 6,14 g/L. Os coeficientes de conversão de substrato em célula, $Y_{X/S}$, e de substrato em produto, $Y_{P/S}$, foram iguais a 0,067 g cel/g lactose e 0,78 g ác. láctico/g lactose, respectivamente.

Estes resultados foram comparados com alguns trabalhos disponíveis na literatura. Amrane e Prigent (1999) empregaram uma cepa do *Lactobacillus helveticus* sp *milano* na fermentação de um meio composto por permeado de soro reconstituído, com concentrações de lactose e de extrato de levedura iguais a 48 g/L e 2 g/L, respectivamente. A concentração máxima de ácido láctico, 36 g/L, foi atingida após 30 horas de fermentação à 42 °C e pH 5,9. A concentração celular atingiu o máximo de 1 g/L após 5 horas, e manteve-se neste valor até o fim do experimento. Trabalhando nas mesmas condições, porém com uma concentração de

extrato de levedura igual a 20 g/L, os autores conseguiram a mesma concentração de produto e uma concentração celular igual a 6 g/L, ambos em apenas 7 horas de fermentação. Tango e Ghaly (1999c) empregaram uma cepa do *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009 na fermentação de um meio formado por soro de queijo, com quatro diferentes concentrações iniciais de lactose: 50, 75, 100 e 150 g/L. As respectivas concentrações finais de ácido láctico foram iguais a 21,5, 28,5, 38,5 e 38,2 g/L, para tempos de fermentação de 27, 30, 40 e 50 horas. Schepers *et al.* (2002), utilizando uma cepa do *Lactobacillus helveticus*, conduziram a fermentação de um meio composto por 110 g/L de permeado de soro suplementado com 10 g/L de extrato de levedura. O experimento foi conduzido à 42 °C e pH 5,5. O resultado foi 60 g/L de ácido láctico e 2,5 g/L de biomassa, após 30 horas de fermentação.

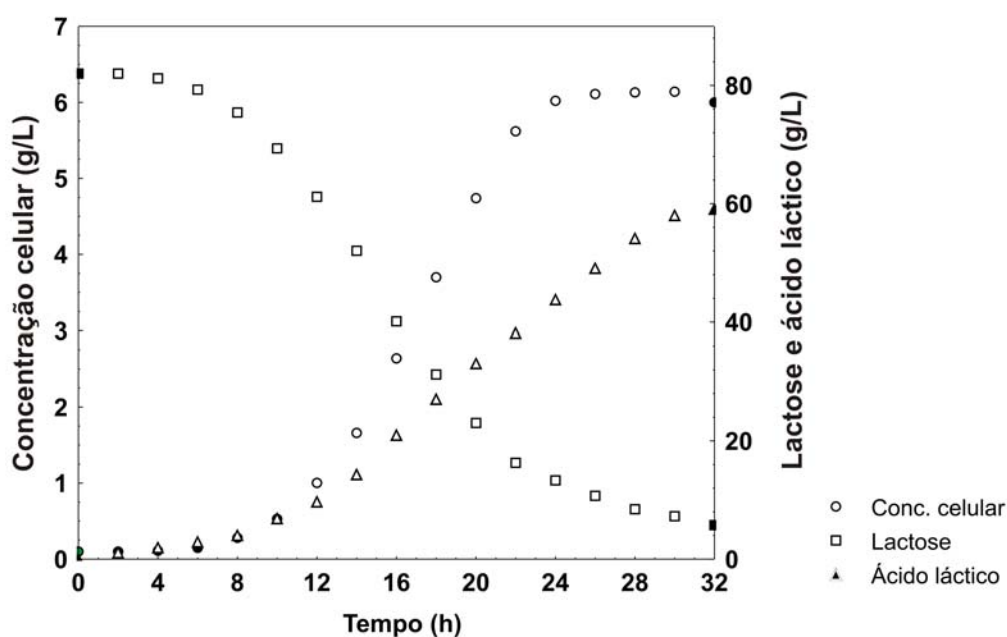


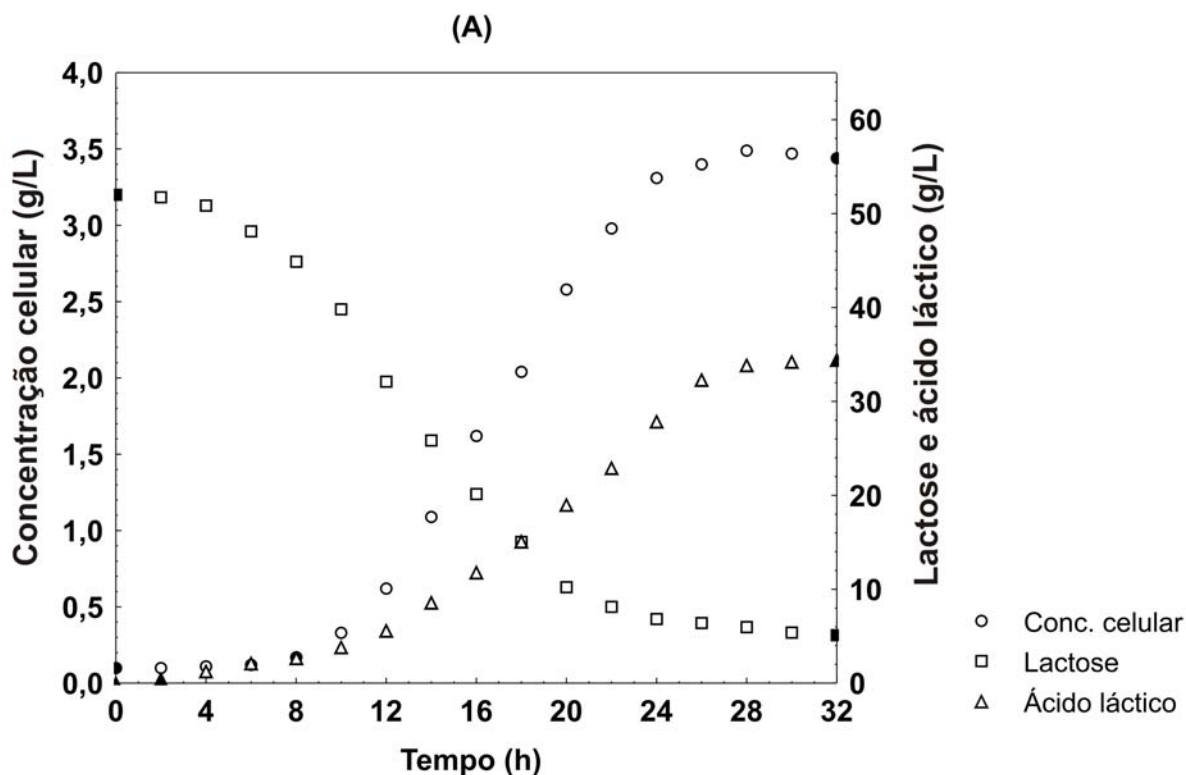
Figura 4.3 – Concentrações de produto, substrato e biomassa em função do tempo nas condições ótimas (lactose 82 g/L; extrato de levedura 23,36 g/L; temperatura 40 °C; pH 6.8).

4.2 – Estudo cinético e modelagem

Com o objetivo de realizar um estudo cinético e testar os modelos propostos para o crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto, foram realizadas novas fermentações nas concentrações iniciais de 52 g/L e 112 g/L de lactose. A escolha do primeiro

valor baseou-se no fato de que, na maioria dos trabalhos publicados sobre a fermentação homoláctica do soro de queijo, foram utilizadas concentrações de lactose entre 50-60 g/L (HOFVENDAHL, HAHN-HAGERDAL, 2000). O segundo valor foi escolhido de modo a se obter pontos igualmente espaçados em relação ao ponto ótimo. Pelos resultados obtidos neste trabalho (Figura 4.1 b), concluiu-se que em 112 g/L a inibição pelo substrato ficaria evidente e não haveria a necessidade de conduzir fermentações em maiores concentrações de lactose. Para as demais variáveis, temperatura, pH e concentração de extrato de levedura, foram mantidos os valores calculados para o ponto ótimo. Deste modo o estudo cinético se baseou em três fermentações, nas concentrações iniciais de lactose de 52, 82 e 112 g/L.

Os resultados das fermentações nas concentrações iniciais de lactose de 52 g/L e 112 g/L são exibidos respectivamente pelas Figuras 4.4(a) e (b). Na concentração inicial de 52 g/L de lactose, obteve-se 34,45 g/L de ácido láctico, 3,49 g/L de biomassa e uma concentração residual de 5,12 g/L de lactose. Para a concentração inicial de 112 g/L de lactose, obteve-se 49,92 g/L de ácido láctico, 5,21 g/L de biomassa e 22,78 g/L de lactose residual.



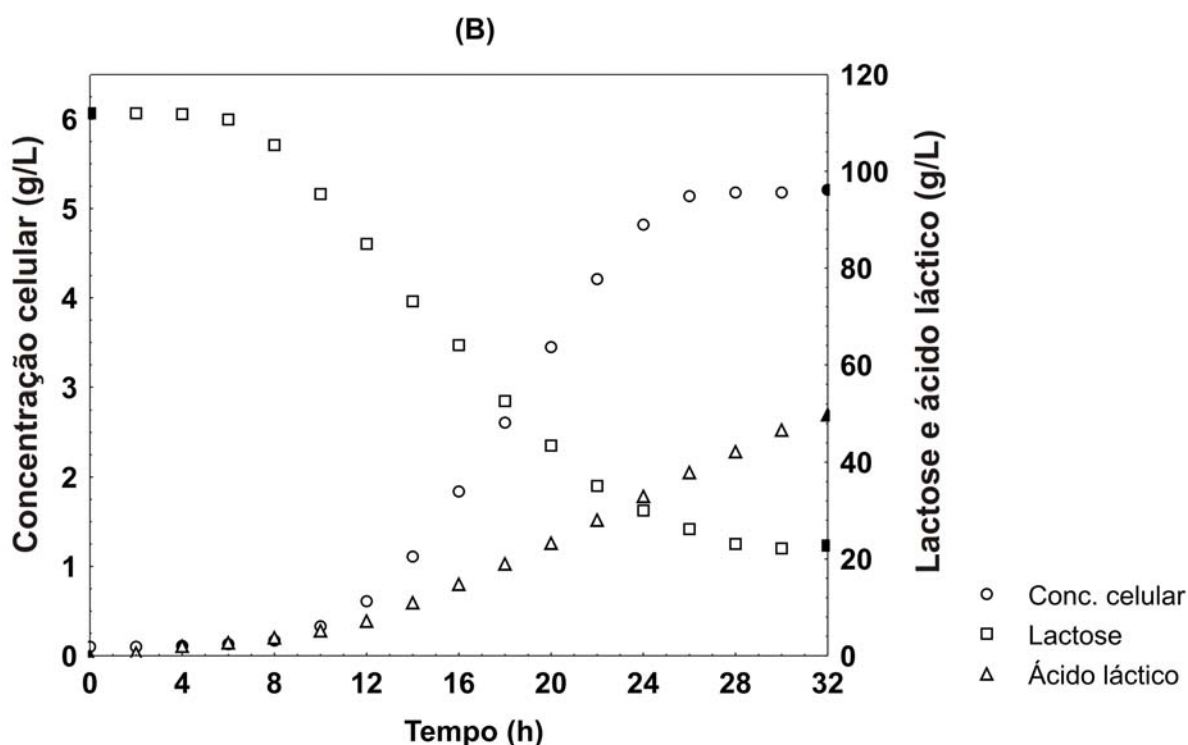


Figura 4.4 – Concentrações de produto, substrato e biomassa em função do tempo para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 112 g/L.

4.2.1 - Análise das curvas de crescimento

Os resultados experimentais das concentrações celulares em função do tempo de fermentação (Figuras 4.3 e 4.4) foram utilizados para a construção da Figura 4.5, onde foram identificadas as sete fases do crescimento microbiano segundo Hiss (2001): *lag*, transição, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio .

Fase linear

A fase linear de crescimento foi determinada pelo intervalo de tempo no qual conseguiu-se o melhor ajuste para uma reta, nas curvas da concentração celular em função do tempo de fermentação (Figura 4.5). Esse processo foi feito comparando-se os coeficientes de correlação das retas obtidas para X versus t , em diferentes intervalos de tempo. Deste modo, concluiu-se que a fase linear está compreendida no intervalo entre 14-22 horas, para as três concentrações iniciais de lactose em estudo.

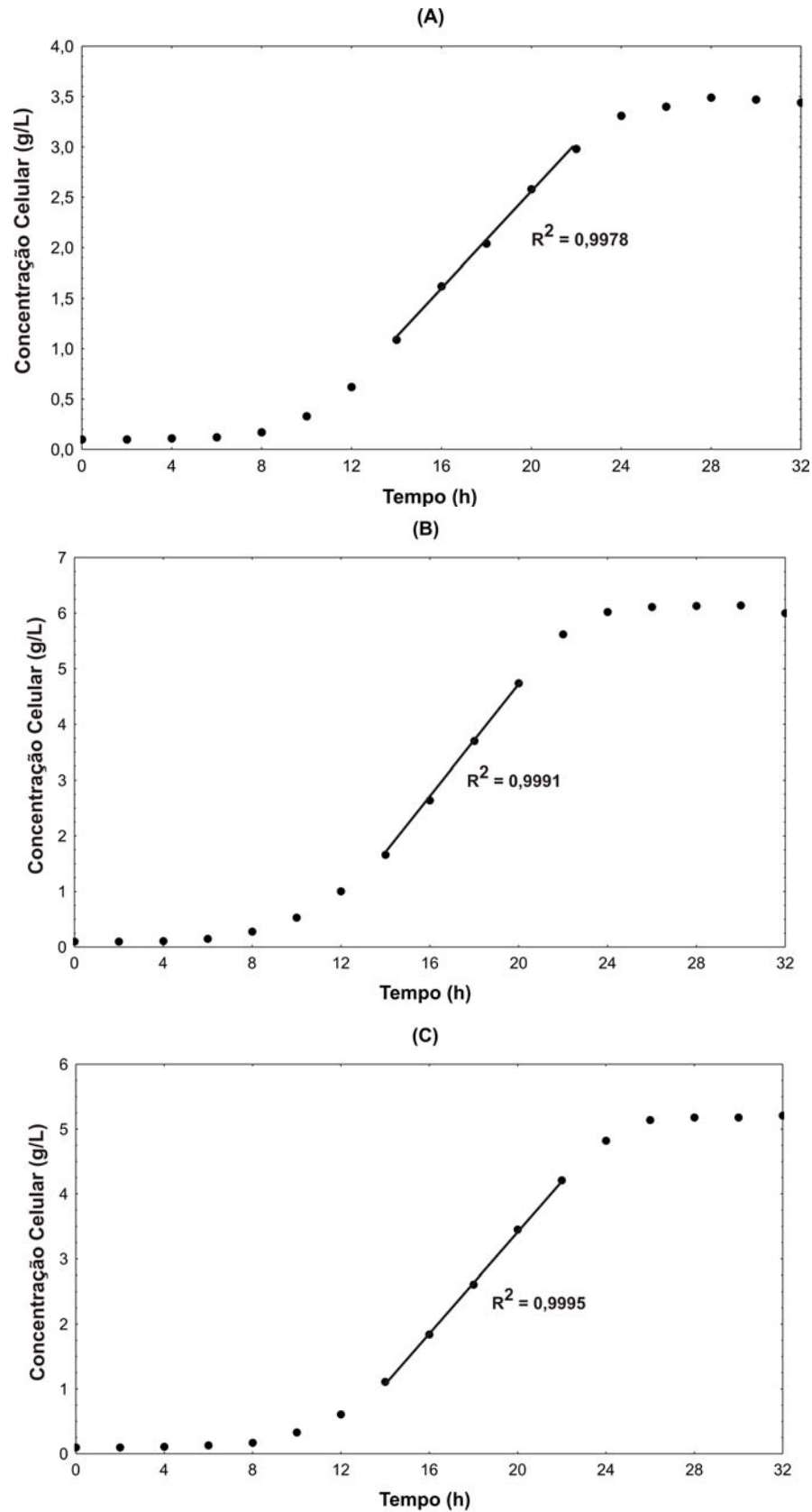


Figura 4.5 – Concentrações celulares em função do tempo para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L. As retas representam a fase linear de crescimento.

Fase exponencial

Para a identificação da fase exponencial, foram plotados gráficos semilogarítmicos da concentração celular em função do tempo, apresentados na Figura 4.6. A fase exponencial foi determinada pelo intervalo de tempo no qual conseguiu-se o melhor ajuste para uma reta. Para as concentrações iniciais de 52 g/L e 112 g/L de lactose, a fase exponencial ocorreu no intervalo entre 8-14 horas. Para a concentração de 82 g/L de lactose, a fase exponencial teve o seu início antecipado, ocorrendo no intervalo entre 6-14 horas.

As velocidades específicas máximas foram calculadas através das inclinações das retas ajustadas. Para as concentrações iniciais de 52, 82 e 112 g/L de lactose, o valor encontrado foi $0,31 \text{ h}^{-1}$. Portanto, este método leva à conclusão de que não houve inibição do crescimento causada pelo substrato. O tempo de geração foi de aproximadamente 2 horas e quinze minutos, calculado utilizando-se a Equação 4.15:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (4.15)$$

As velocidades específicas máximas foram novamente calculadas, porém utilizando o método geométrico (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Este método calcula a circunferência que passa por três pontos: o valor de X do qual se quer calcular a derivada, o anterior e o posterior. A derivada é calculada pela tangente à circunferência no ponto. Os resultados foram $0,34 \text{ h}^{-1}$ para as concentrações de 52 g/L e 82 g/L e $0,33 \text{ h}^{-1}$ para a concentração de lactose de 112 g/L. O cálculo pelo método geométrico confirmou, ainda que de maneira discreta, a esperada inibição pelo substrato, ao contrário do método anterior. Estes novos valores de $\mu_{\max}$ levam a tempos de geração iguais a 2 horas e 2 minutos, para 52 g/L e 82 g/L de lactose, e 2 horas e 6 minutos, para 112 g/L de lactose.

Tango e Ghaly (1999a) conduziram a fermentação do soro de queijo utilizando uma cepa do *Lactobacillus helveticus*. O experimento foi conduzido à temperatura constante de 42°C e pH inicial igual a 4,4, sem controle. A concentração inicial de lactose foi de 48 g/L. Nessas condições, a fase exponencial teve a duração de 5,9 horas, e a velocidade específica máxima de crescimento foi igual a $0,25 \text{ h}^{-1}$.

Amrane (2005) realizou um estudo cinético da fermentação do soro de queijo utilizando uma cepa do *Lactobacillus helveticus* sp. *milano*. A fase exponencial de crescimento teve a duração de 4 horas, e a velocidade específica máxima de crescimento atingiu $0,477 \text{ h}^{-1}$.

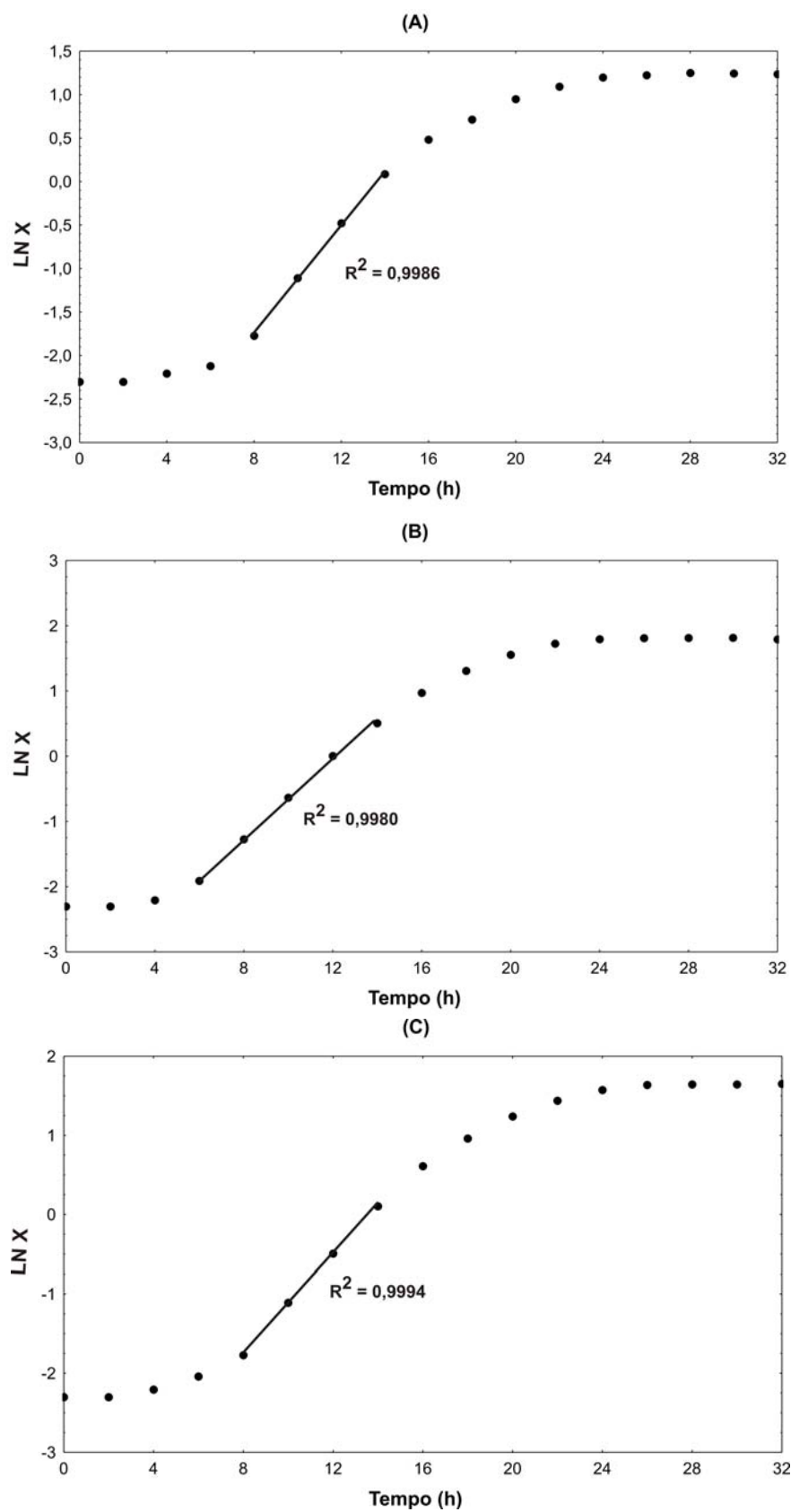


Figura 4.6 – Gráficos semilogarítmicos das concentrações celulares em função do tempo para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L. As retas representam a fase exponencial de crescimento.

Fases lag e de transição

Durante a fase *lag*, não há reprodução celular e portanto $X = X_0 = \text{constante}$. Através de uma análise da Figura 4.5, concluiu-se que a fase *lag* está compreendida no intervalo entre 0-6 horas, para as concentrações iniciais de lactose de 52 g/L e 112 g/L, e entre 0-4 horas para a concentração inicial de 82 g/L. As fases de transição situam-se nos intervalos entre 4-6 horas, para 82 g/L de lactose, e entre 6-8 horas, para 52 g/L e 112 g/L de lactose. Com base nestes resultados, conclui-se que a concentração ótima de lactose, 82 g/L, teve um efeito importante na redução das fases lag e de transição, fazendo com que as células atingissem a fase exponencial mais rapidamente. A redução das fases lag e de transição é um fator primordial na diminuição do tempo de fermentação.

Nos estudos realizados por Amrane (2005) e Tango e Ghaly (1999a) descritos no item anterior, a fase *lag* estendeu-se por 1 e 1,9 horas, respectivamente.

Tango e Ghaly (1999c) estudaram a fermentação do soro de queijo com uma cepa do *Lactobacillus helveticus*, em diferentes concentrações iniciais de lactose. Os experimentos foram conduzidos à 42 °C e pH 5,5. Nas concentrações de lactose iguais a 50, 75, 100 e 150 g/L, a fase *lag* teve a duração de 4,2, 4,8, 6,3 e 6,6 horas, respectivamente.

Fases de desaceleração, estacionária e de declínio

A identificação destas fases foi feita através de uma análise das curvas de crescimento exibidas pela Figura 4.5. A fase de desaceleração parece estar compreendida no intervalo entre 22-26 horas (Figuras 4.5 b e c) e entre 22-28 horas (Figura 4.5 a). A fase estacionária inicia-se no término da fase de desaceleração e transcorre até o final dos experimentos. Neste trabalho, não houve fase de declínio no intervalo de tempo selecionado para as fermentações.

Nos estudos realizados por Amrane (2005) e Tango e Ghaly (1999a) descritos no item anterior, a fase estacionária estendeu-se por 7 e 5 horas, respectivamente.

4.2.2 - Estimação dos parâmetros

Os resultados das fermentações conduzidas nas concentrações iniciais de 52, 82 e 112 g/L de lactose foram utilizados para a determinação dos parâmetros dos modelos de crescimento, consumo de substrato e formação do produto. Esses resultados são exibidos pelas Figuras 4.3 e 4.4 e encontram-se descritos no Apêndice D.

4.2.2.1 - Modelo logístico de crescimento

Cálculo de $\mu_{\max}$ e K

Com os resultados experimentais da concentração celular em função do tempo, $\mu_{\max}$ e K foram obtidos através de estimação não linear utilizando a Equação 3.17. Os resultados são exibidos na Tabela 4.4.

$$X = \frac{X_0 K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_0 (e^{\mu_{\max} t} - 1)} \quad (3.17)$$

Observa-se que as velocidades específicas máximas de crescimento $\mu_{\max}$ possuem valores menores do que quando calculadas pelo método geométrico (0,33 e 0,34 h⁻¹) ou por regressão linear dos resultados de $\ln(X)$ versus t (0,33 h⁻¹). Essas diferenças ocorrem em função dos diferentes ajustes que são realizados por cada método de cálculo. Vale ressaltar que através da regressão linear ou do método geométrico obtém-se estimativas preliminares dos parâmetros, que são utilizados posteriormente como ponto de partida para a estimação desses parâmetros nos modelos matemáticos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Os valores de $\mu_{\max}$ apresentados na Tabela 4.4 evidenciam a inibição do crescimento celular causada pelo substrato. Quando aumentou-se a concentração de lactose de 82 g/L para 112 g/L, $\mu_{\max}$ diminuiu de 0,244 para 0,215. Este resultado está de acordo com o estudo publicado por Tango e Ghaly (1999b), no qual relataram o surgimento da inibição pelo substrato em concentrações de lactose maiores do que 80 g/L. Por outro lado, contraria-se o resultado obtido no trabalho de Aeschlimann e Von Stockar (1989), onde concluiu-se que não ocorre inibição pelo substrato em concentrações de lactose menores do que 132 g/L. Burgos-Rubio (2000) estudou a utilização de vários substratos na fermentação do ácido láctico, utilizando uma cepa do *Lactobacillus bulgaricus*. Os resultados mostraram a ocorrência da inibição pelo substrato, quando utilizou-se lactose em concentrações maiores do que 20 g/L.

Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos do modelo logístico de crescimento.

	S_0 (g/L)		
	52	82	112
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0,209	0,244	0,215
K (g cel seca/L)	3,83	6,64	5,89
R ²	0,9881	0,9878	0,9872

S_0 = concentração inicial de lactose.

As concentrações celulares máximas teóricas, representadas por K na Equação 3.17, ficaram bem próximas de seus respectivos valores máximos experimentais $X_{\max}$, como pode ser visto na Tabela 4.5. Isto confirma a boa adequabilidade do modelo aos resultados experimentais.

Tabela 4.5 – Comparação entre as concentrações celulares máximas obtidas experimentalmente ($X_{\max}$) e as preditas pelo modelo logístico de crescimento (K).

	S_0 (g/L)		
	52	82	112
$X_{\max}$ (g cel seca/L)	3,49	6,14	5,21
K (g cel seca/L)	3,83	6,64	5,89
Desvio (%)	9,74	8,14	13,05

S_0 = concentração inicial de lactose.

Os resultados das medidas de não linearidade dos parâmetros K e $\mu_{\max}$ encontram-se na Tabela 4.6. As porcentagens do vício de Box foram menores do que 1% em todas as concentrações iniciais de lactose, indicando que os parâmetros estimados são não-viciados.

As curvaturas máximas intrínseca (IN) e devida ao efeito de parâmetros (PE) foram comparadas com o raio de curvatura da região de confiança de 95%, determinado pela estatística F com p=2 graus e n-p=15 graus de liberdade. Obteve-se como resultado F=3,68 e portanto $1/2\sqrt{F}=0,26$. Para a concentração inicial de lactose de 82 g/L, tanto a curvatura intrínseca (IN) quanto a curvatura devida ao efeito de parâmetros (PE) são menores do que 0,26 e portanto pode-se dizer que temos uma aproximação linear satisfatória sobre uma região de confiança de 95%. Nas concentrações iniciais de lactose iguais a 52 g/L e 112 g/L, as curvaturas intrínsecas são menores do que 0,26. Porém, os valores obtidos para as curvaturas

devidas ao efeito de parâmetros foram coincidentemente iguais (0,34) e maiores do 0,26. Entretanto, além deste desvio ser considerado pequeno, as respectivas medidas de vício de Box são inferiores a 1%, o que torna válida as inferências estatísticas sobre as estimações dos parâmetros por meio da regressão não linear do modelo estudado.

Tabela 4.6 – Medidas de não linearidade dos parâmetros $\mu_{\max}$ e K do modelo logístico de crescimento.

Concentração inicial de lactose (g/L)	Vício (%)		Curvaturas Máximas	
	$\mu_{\max}$	K	Intrínseca (IN)	Parâmetros (PE)
52	0,09	0,24	0,094	0,34
82	0,07	0,14	0,090	0,24
112	0,07	0,25	0,092	0,34

4.2.2.2 - Modelo de crescimento de Amrane

Cálculo dos parâmetros $\mu_{\max}$, c e d

Os resultados experimentais da concentração celular em função do tempo foram utilizados para estimar os parâmetros e avaliar a adequabilidade do modelo de crescimento proposto por Amrane (Equação 2.12), e compará-lo com o modelo logístico.

$$X = X_0 \exp \left[\mu_{\max} t - \frac{\mu_{\max}}{d} \left(\ln \frac{\mu_{\max} - c + c \cdot \exp(d \cdot t)}{\mu_{\max}} \right) \right] \quad (2.5.12)$$

Os resultados são exibidos na Tabela 4.7. Os valores de $\mu_{\max}$ se apresentam um pouco menores em relação ao modelo logístico, e novamente percebe-se a ocorrência da inibição pelo substrato na concentração de 112 g/L. Os valores de R^2 mostram um ajuste aos resultados experimentais ligeiramente melhor em relação ao modelo logístico, porém essa melhora é muito pequena comparada com o aumento da complexidade do modelo.

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos do modelo de crescimento de Amrane (1999).

	<i>S₀ (g/L)</i>		
	52	82	112
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0,189	0,230	0,201
c	0,000963	0,001251	0,000828
d	0,277	0,286	0,275
R ²	0,9885	0,9885	0,9975

S_0 = concentração inicial de lactose.

Os resultados das medidas de não linearidade dos parâmetros K e $\mu_{\max}$ encontram-se na Tabela 4.8. As medidas de vício de Box indicam que todos os parâmetros estimados são viciados. Os altos valores dessas medidas indicam que o modelo de Amrane possui um comportamento muito distante do linear. As curvaturas máximas intrínseca (IN) e devida ao efeito de parâmetros (PE) foram comparadas com o raio de curvatura da região de confiança de 95%, determinado pela estatística F com p=3 graus e n-p=14 graus de liberdade. Obteve-se como resultado $F=3,74$ e portanto $1/2\sqrt{F}=0,26$. Para todas as concentrações iniciais de lactose, tanto a curvatura intrínseca (IN) quanto a curvatura devida ao efeito de parâmetros (PE) são muito maiores do que 0,26. Logo, pode-se afirmar que as inferências estatísticas sobre as estimações dos parâmetros deste modelo não são válidas. Desse modo, conclui-se que o uso do modelo de Amrane, na forma em que ele se apresenta, não é adequado, pois não existe confiabilidade estatística dos valores dos parâmetros. Sendo assim, este modelo não será utilizado na obtenção dos modelos de formação de produto (Equação 3.19) e de consumo de substrato (Equação 3.25).

Tabela 4.8 – Medidas de não linearidade dos parâmetros $\mu_{\max}$, c e d do modelo de Amrane (1999).

So (g/L)	Vício (%)			Curvaturas Máximas	
	$\mu_{\max}$	c	d	Intrínseca (IN)	Parâmetros (PE)
52	-117.45	488.10	-24.49	5.85	353.78
82	-335.88	1041.79	-71.26	13.25	939.52
112	-232.25	870.32	-62.60	10.17	597.09

4.2.2.3 - Modelo de formação do produto – Equação de Luedeking e Piret

Cálculo de A e B

Como descrito no Item 3.8.2, inicialmente estimou-se os parâmetros r e K_p da Equação 3.21 por regressão não linear. Os resultados encontram-se na Tabela 4.9.

$$P = \frac{K_p}{K_p e^{-r \cdot t} + 1} \quad (3.21)$$

Os coeficientes de correlação quadráticos R^2 mostram que entre 99,4 e 99,9% da variabilidade dos resultados experimentais são explicados por esta equação. Os valores estimados de K_p ficaram próximos das concentrações máximas do produto obtidas experimentalmente, apresentando um desvio médio de 15%. A Figura 4.7 exibe a boa concordância entre os resultados obtidos por esta equação e os resultados experimentais, principalmente nas concentrações iniciais de lactose iguais a 82 e 112 g/L.

Tabela 4.9 –Parâmetros r e K_p da Equação 3.21 e concentração experimental máxima de produto, $P_{\max}$.

	S_0 (g/L)		
	52	82	112
r (h^{-1})	0,180	0,210	0,183
K_p (g ác. láctico/L)	41,38	63,71	57,62
$P_{\max}$ (g ác. láctico/L)	34,45	59,15	48,96
R^2	0,9942	0,9988	0,9991

S_0 = concentração inicial de lactose.

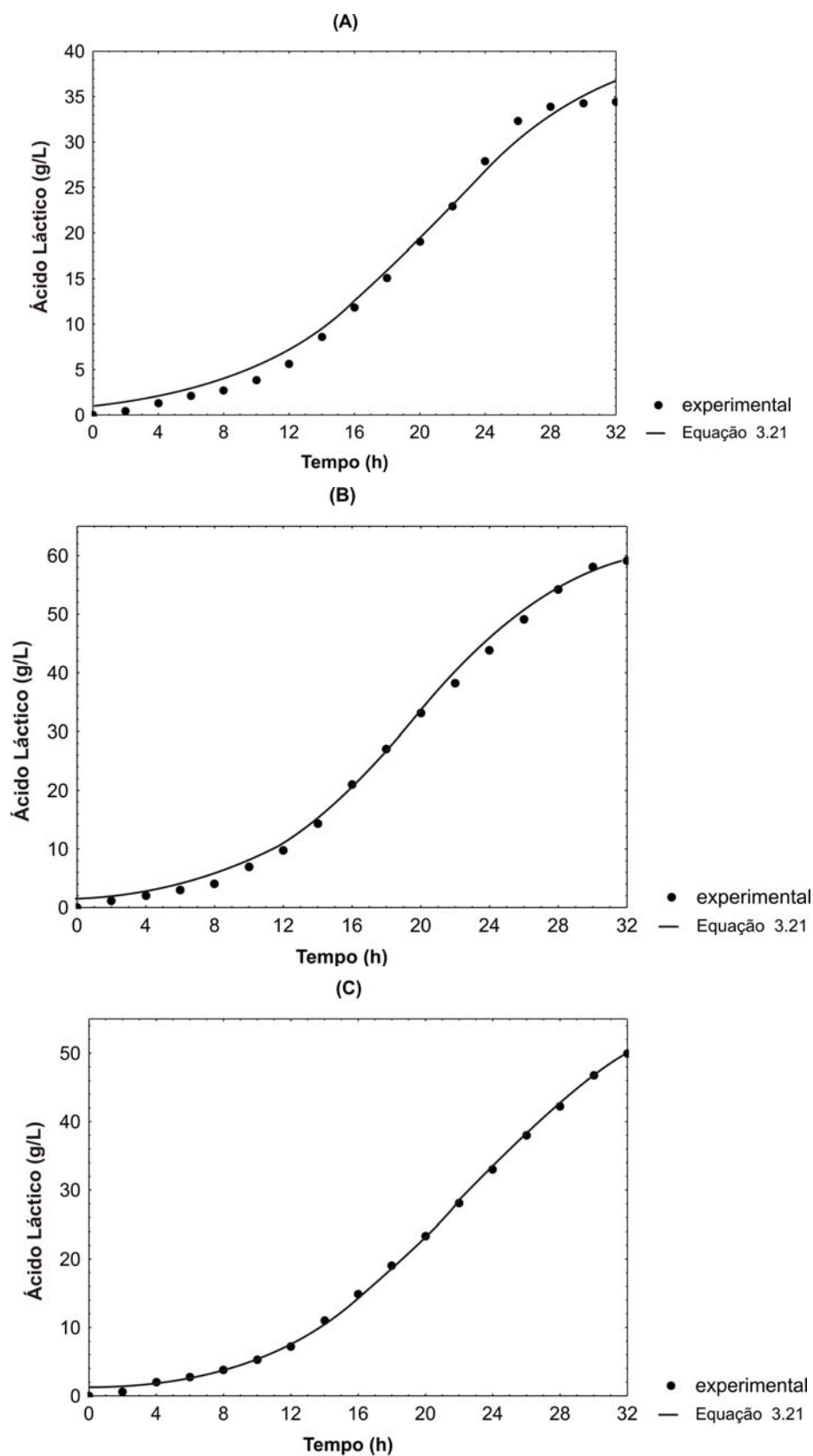


Figura 4.7 – Concentrações de ácido láctico, obtidas experimentalmente, e as preditas pela Equação 3.21, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L.

Após a estimação de r e K_p , calculou-se dP/dt utilizando-se a Equação 3.22:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{K_p^2 r e^{-rt}}{(K_p e^{-rt} + 1)} \quad (3.22)$$

Enfim, com os valores de X , dX/dt e dP/dt , calculados pelas Equações 3.17, 3.18 e 3.22, estimou-se os parâmetros A e B da equação de Luedeking e Piret:

$$\frac{dP}{dt} = A \frac{dX}{dt} + BX$$

Os resultados são exibidos na Tabela 4.10. Como esperado para um processo onde a formação do produto é associada ao crescimento, os parâmetros A , associados ao crescimento, são muito maiores do que B , associados à concentração celular.

Tabela 4.10 – Parâmetros A e B da equação de Luedeking e Piret (1959), para diferentes concentrações iniciais de lactose.

	S_0 (g/L)		
	52	82	112
A (g ác. láctico/g célula)	6,93	6,68	5,8
B (g ác. láctico/g célula·h ⁻¹)	0,23	0,19	0,22
R^2	0,9734	0,9984	0,9964

S_0 = concentração inicial de lactose.

4.2.2.4 - Modelo de consumo de substrato: Equação de Pirt

Cálculo de $Y_{X/S}$ e m_s

Inicialmente, estimou-se os parâmetros a e K_0 da Equação 3.21 por regressão não linear. Os resultados encontram-se na Tabela 4.11.

$$S = K_0 e^{-(a \cdot t)^2} \quad (3.25)$$

O parâmetro K_0 ficou bem próximo das respectivas concentrações iniciais de lactose, como mostra a Tabela 4.11. A adequabilidade desta equação aos resultados experimentais pode ser observado através dos coeficientes de correlação quadráticos R^2 , que explicam de 98,4 a 98,9% da variabilidade dos resultados experimentais. A Figura 4.8 exibe os resultados experimentais da concentração da lactose e os preditos por esta equação. Os maiores desvios ocorreram nas concentrações iniciais de lactose iguais a 52 e 112 g/L, onde os resultados

experimentais mostram concentrações residuais de lactose iguais a 5 g/L e 22 g/L respectivamente, enquanto que a Equação 3.25 aponta para um consumo contínuo até o esgotamento do substrato.

Tabela 4.11 – Parâmetros a e K_o da Equação 3.25.

	S_0 (g/L)		
	52	82	112
K_o (g lactose/L)	53,62	86,65	115,41
a (h ⁻¹)	0,060	0,054	0,047
R^2	0,9835	0,9888	0,9864

S_0 = concentração inicial de lactose.

Após a estimativa de a e K_o , calculou-se dS/dt utilizando-se a Equação 3.26:

$$\frac{dS}{dt} = -2tK_o a^2 e^{-(at)^2} \quad (3.26)$$

Com os valores de X , dX/dt e dS/dt , calculados pelas Equações 3.17, 3.18 e 3.26, estimou-se os parâmetros $Y_{X/S}$ e m_s da equação de Pirt (Equação 3.25). Os resultados são exibidos na Tabela 4.12.

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_s X \right) \quad (3.25)$$

Tabela 4.12 – Parâmetros $Y_{X/S}$ e m_s do modelo de Pirt.

	S_0 (g/L)		
	52	82	112
$Y_{X/S}$ (g células/g lactose)	0,067	0,079	0,045
m_s (g lactose/g células·h ⁻¹)	0,01	0,07	0,11
R^2	0,9844	0,9964	0,9943

S_0 = concentração inicial de lactose.

O decréscimo no valor de $Y_{X/S}$ quando a concentração de lactose aumentou de 82 g/L para 112 g/L evidencia a inibição do crescimento celular provocada pelo substrato. Os valores de m_s mostram que o consumo de substrato para fins de manutenção celular aumentou com o aumento da concentração inicial de lactose.

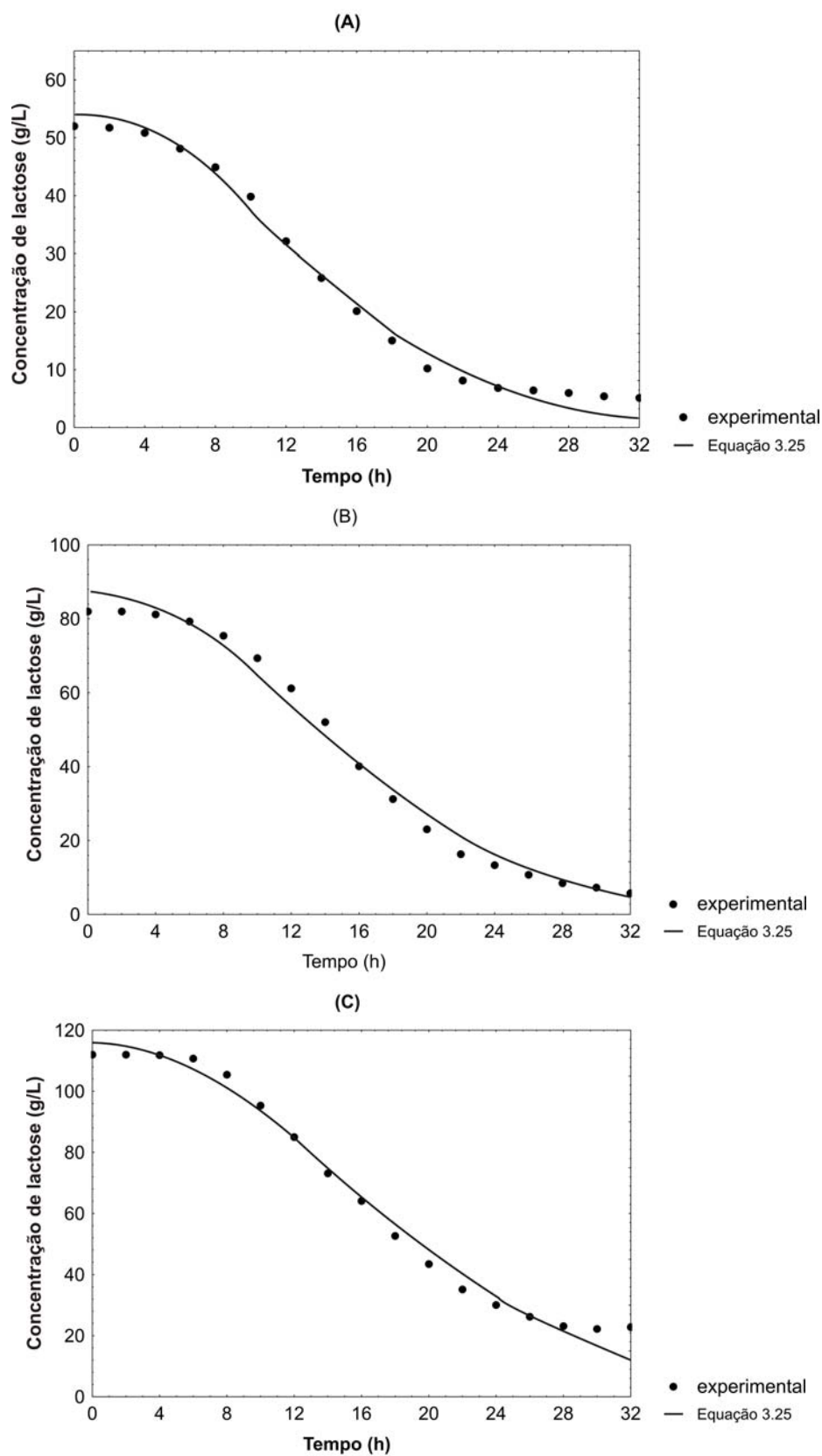


Figura 4.8 - Concentrações de lactose obtidas experimentalmente e as previstas pela Equação 3.25, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L; (B) 82 g/L; (C) 112 g/L.

4.2.3 – Avaliação da modelagem

Os parâmetros cinéticos estimados no item anterior encontram-se na Tabela 4.13. Esses parâmetros foram utilizados na avaliação dos modelos de concentração celular, consumo de substrato e formação de produto.

Tabela 4.13 – Parâmetros cinéticos dos modelos de concentração celular, consumo de substrato e formação de produto.

	<i>S₀</i> (g/L)		
	52	82	112
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0,209	0,244	0,215
K (g cel seca/L)	3,83	6,64	5,89
A (g ác láctico/g cel)	6,93	6,68	5,80
B (g ác láctico/g cel·h ⁻¹)	0,23	0,19	0,22
Y _{X/S} (g cel/g lactose)	0,067	0,079	0,045
m _s (g lactose/g cel·h ⁻¹)	0,01	0,07	0,11

S₀ = concentração inicial de lactose.

4.2.3.1 - Modelo logístico de crescimento

A Figura 4.9 mostra as concentrações celulares obtidas experimentalmente e as previstas pela equação logística, para as concentrações iniciais de 52, 82 e 112 g/L. Os valores do coeficiente de correlação quadrático R² (Tabela 4.4) mostram que cerca de 98,7% da variabilidade dos resultados experimentais foi explicada pelo modelo. Os maiores desvios ocorreram no início da fermentação e na fase estacionária, onde as concentrações permanecem praticamente constantes e portanto dX/dt é igual a zero. A curva sigmoidal descrita pela equação logística mostra que esta situação é prevista somente na condição assintótica, ou seja, quando $t \rightarrow \infty$.

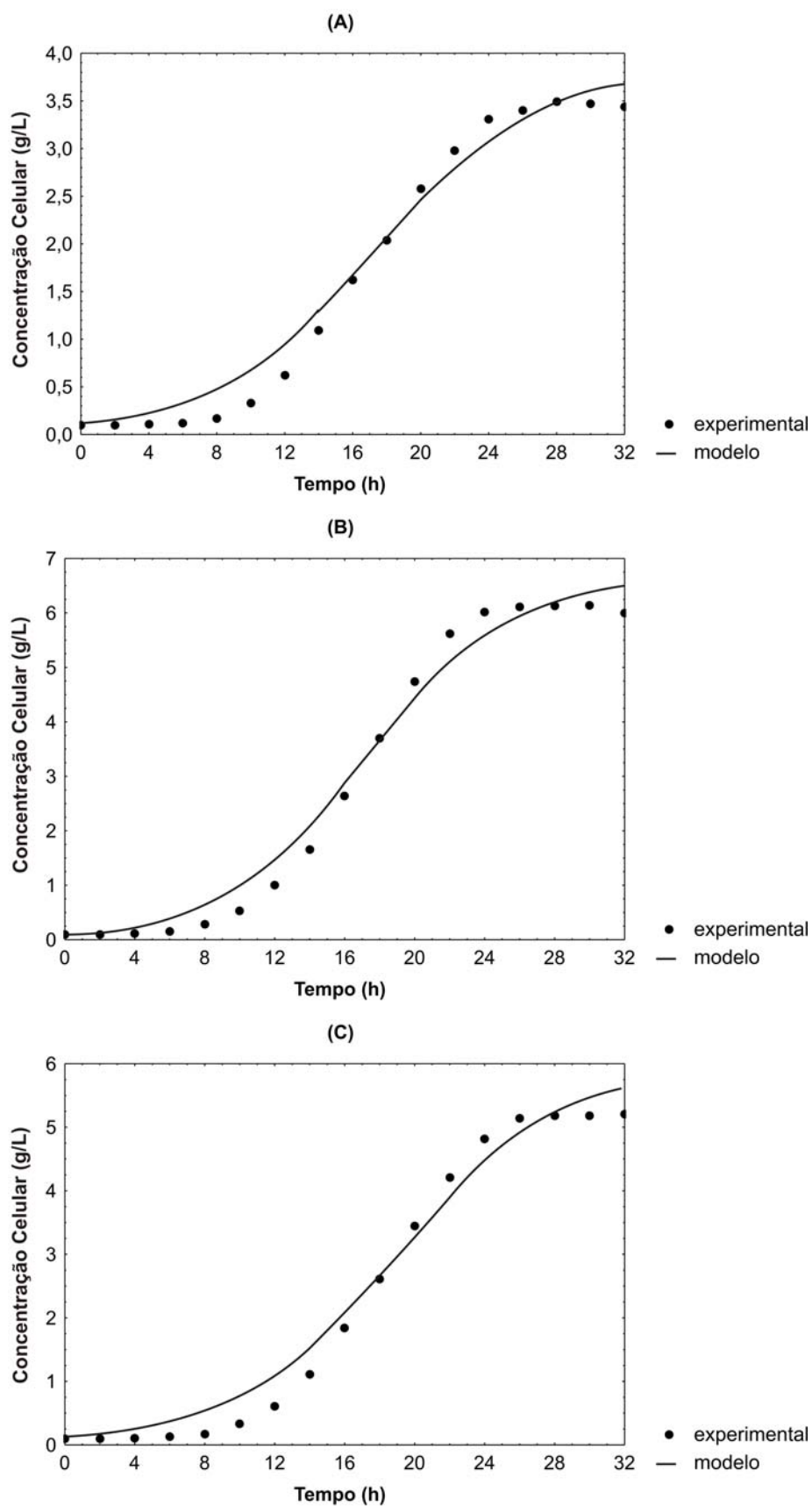


Figura 4.9 – Valores experimentais da concentração celular e os preditos pelo modelo logístico, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L, (B) 82 g/L e (C) 112 g/L.

4.2.3.2 - Modelo de formação do produto: Equação de Luedeking e Piret

O *software* Maple 7 foi utilizado para integrar a Equação 3.20 em relação à variável t e construir a curva da concentração do produto em função do tempo.

$$\frac{dP}{dt} = A \left(\frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1)} - \frac{X_o^2 K \mu_{\max} (e^{\mu_{\max} t})^2}{(K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1))^2} \right) + B \frac{X_o K e^{\mu_{\max} t}}{K + X_o(e^{\mu_{\max} t} - 1)} \quad (3.20)$$

Embora seja amplamente utilizada na modelagem das fermentações lácticas, a equação de Luedeking e Piret não leva em consideração o término da formação do produto, quando ocorre a exaustão da fonte de carbono, como pode ser visto na Figura 4.10. Na concentração inicial de 52 g/L de lactose, a concentração do ácido láctico permaneceu praticamente constante após 26 horas de fermentação, enquanto o modelo prevê um aumento contínuo da formação do produto. Na concentração inicial de 82 g/L de lactose, a curva da concentração do produto tende a um valor constante a partir de 30 horas de fermentação. Isto não ocorreu na concentração inicial de 112 g/L de lactose, pois neste caso a formação do produto não atingiu a fase estacionária no período de 32 horas. Caso a fermentação continuasse, a concentração de ácido láctico atingiria o seu valor máximo e assim permaneceria, enquanto o modelo descreveria um aumento contínuo dessa concentração.

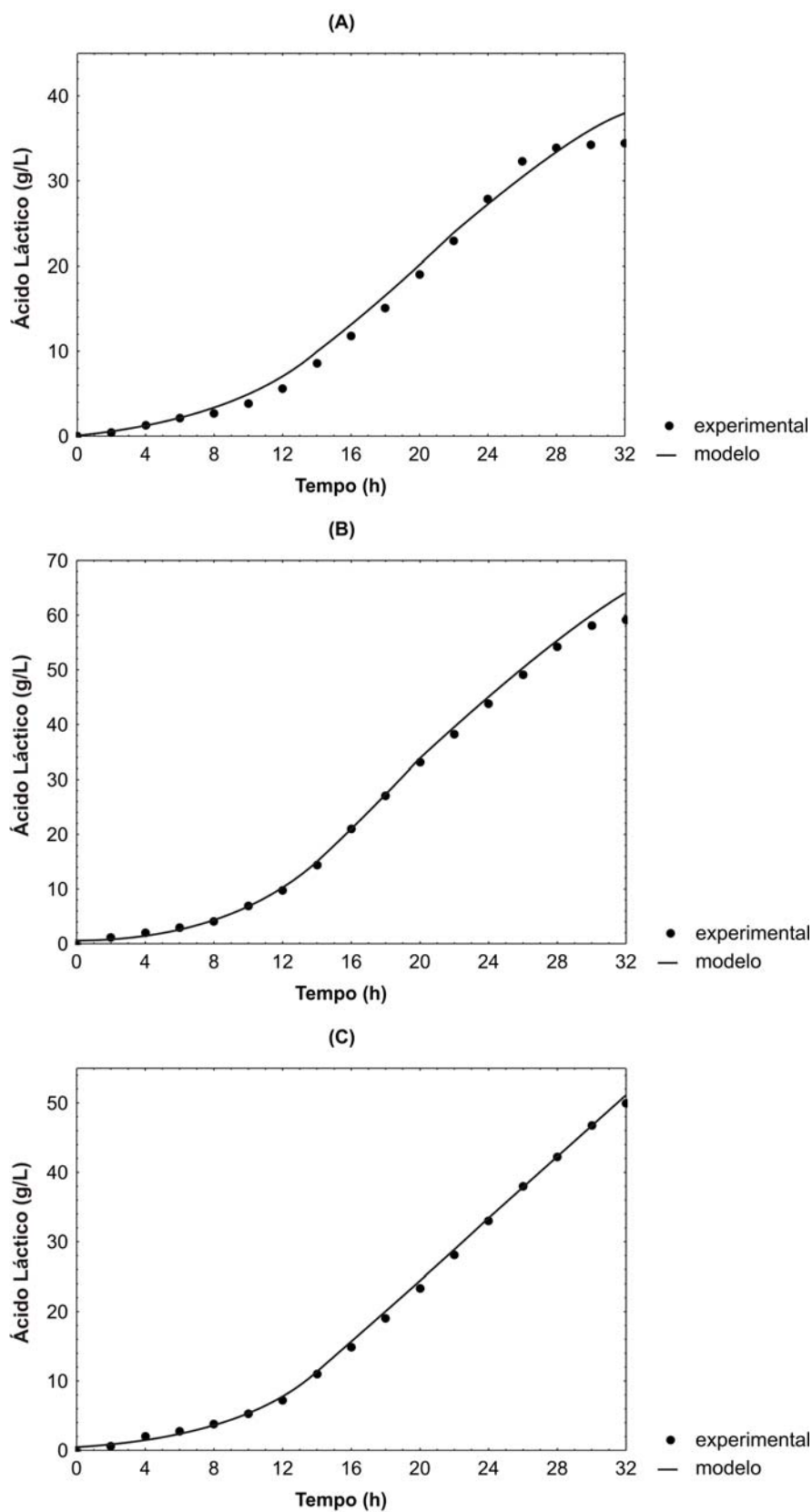


Figura 4.10 - Valores experimentais da concentração de ácido láctico e os preditos pelo modelo de Luedeking e Piret, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L, (B) 82 g/L e (C) 112 g/L.

4.2.3.4 - Modelo de formação do substrato: Equação de Pirt

O *software* Maple 7 foi utilizado para integrar a Equação 3.25 em relação à variável t e construir a curva da concentração do substrato em função do tempo.

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_S X \right) \quad (3.25)$$

A Figura 4.11 exibe os resultados obtidos experimentalmente e os preditos pelo modelo de Pirt. Os maiores desvios em relação aos resultados experimentais ocorreram no final dos experimentos. Neste caso, o modelo de Pirt prevê o consumo total do substrato, enquanto que os resultados experimentais acusaram uma certa concentração residual de lactose. Nas concentrações iniciais de lactose de 52 g/L e 82 g/L, a concentração residual de lactose foi pequena, aproximadamente 5 g/L. Na concentração inicial de lactose de 112 g/L, a concentração residual do substrato foi elevada, cerca de 22 g/L.

A Figura 4.11 mostra que há uma tendência destas concentrações residuais persistirem com o passar do tempo, indicando uma interrupção do consumo antes do esgotamento do substrato. Isto pode ter ocorrido devido a uma inibição pelo produto. O acúmulo de lactato pode ter antecipado a fase estacionária de crescimento do *Lactobacillus helveticus*. Desse modo, passou-se a ter consumo de substrato apenas para manutenção celular, o que fez com que a velocidade de consumo desse substrato fosse reduzida drasticamente. O ácido láctico continuou a ser produzido, como é típico nos processos onde a formação do produto é parcialmente associada ao crescimento, porém com uma velocidade menor. O decréscimo nas velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto, no final dos experimentos, pode ser constatado na Tabela 4.14.

A inibição pelo produto na fermentação láctica é mencionada por vários autores (LUEDEKING; PIET, 1959; TANGO; GHALLY, 1999c; OYETAYO, 2004; DRIDER *et al.*, 2004) e neste trabalho pôde ser comprovada segundo o método descrito por Bonomi e Schmidell (2001). Foi utilizado o modelo de inibição linear proposto por Ghose e Tyagi (1979) apud Bonomi e Schmidell (2001):

$$\mu_x = \mu_s^* - \frac{\mu_s^*}{P_m} P \quad (4.15)$$

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

μ_s^* = velocidade específica de consumo de substrato, quando $S = S^*$ (h^{-1}).

P = concentração do produto quando $S = S^*$ (g produto/L).

S^* = concentração de S para manter μ_x (g substrato/L).

Neste trabalho, escolheu-se $S^* = 22,18$ g/L, que é o maior valor da concentração residual de lactose dentre as fermentações aqui analisadas. Os valores de X e P correspondentes a S^* foram obtidos do Apêndice D. Para a concentração inicial de 112 g/L de lactose, esses valores foram obtidos diretamente, porém para as concentrações iniciais de lactose de 52 g/L e 112 g/L, os valores de X e P foram obtidos por interpolação. As velocidades específicas de crescimento μ_x foram calculadas através das Equações 3.17 e 3.18. Estes resultados encontram-se na Tabela 4.15.

Tabela 4.14 – Velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, a partir de 24 horas de fermentação.

t (h)	S_0								
	52			82			112		
	dX/dt	-(dS/dt)	dP/dt	dX/dt	-(dS/dt)	dP/dt	dX/dt	-(dS/dt)	dP/dt
24	0,128	1,165	1,706	0,214	2,261	2,766	0,237	3,428	2,562
26	0,097	0,881	1,493	0,149	1,830	2,244	0,185	2,978	2,334
28	0,070	0,643	1,241	0,099	1,438	1,717	0,136	2,526	2,005
30	0,050	0,454	0,989	0,064	1,099	1,254	0,097	2,094	1,637
32	0,034	0,309	0,761	0,040	0,816	0,887	0,067	1,699	1,282

Tabela 4.15 – Valores de μ_x e P correspondentes a S^* .

$S^* = 22,18$ g/L		
S_0 (g/L)	μ_x (h^{-1})	P (g ácido láctico/L)
52	0,34	3,86
82	0,18	21,02
112	0,10	25,35

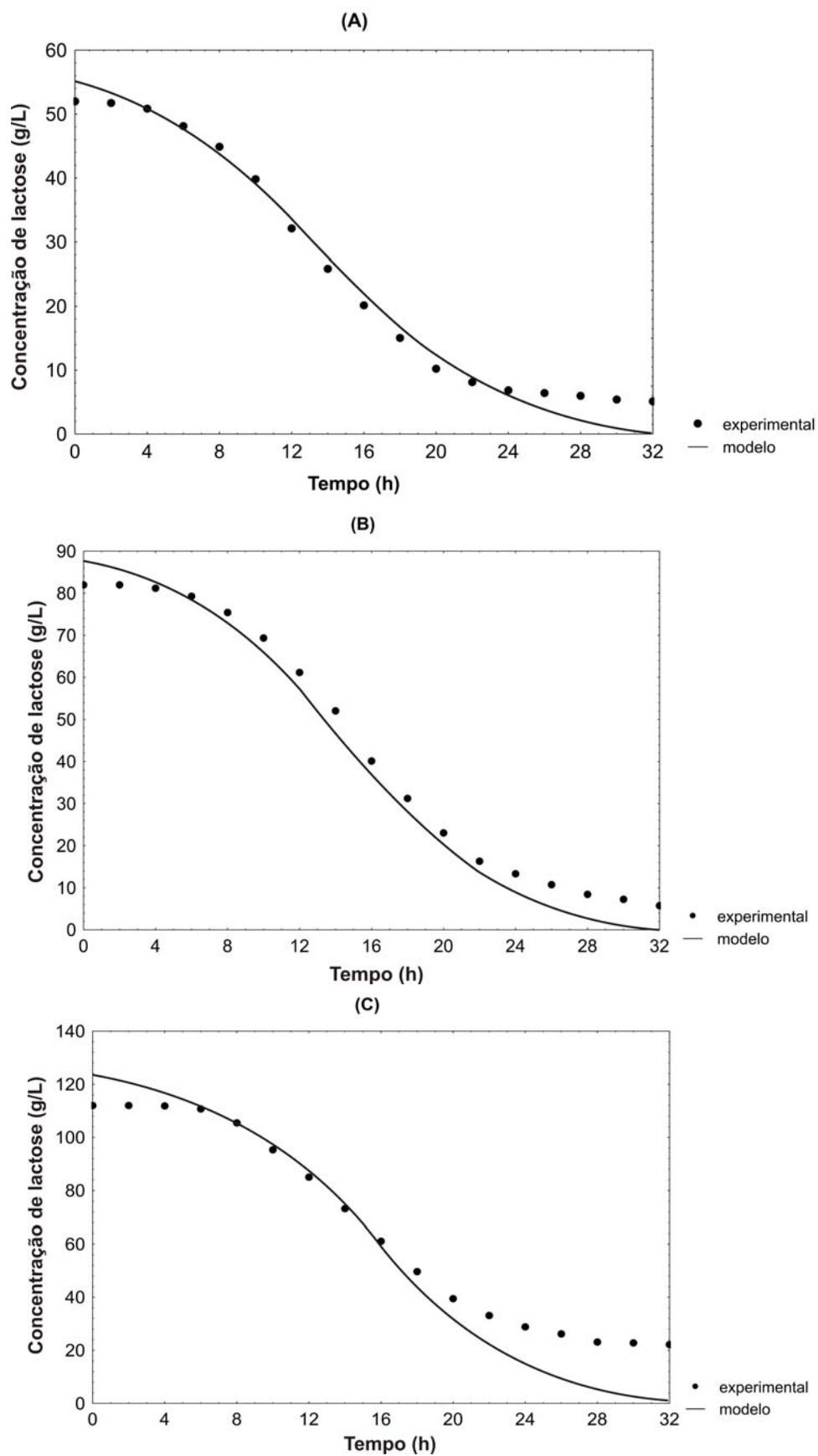


Figura 4.11 - Valores experimentais da concentração de lactose e os preditos pelo modelo de Pirt, para concentrações iniciais de lactose iguais a: (A) 52 g/L, (B) 82 g/L e (C) 112 g/L.

A regressão linear os dados de μ_x em função de P é exibida na Figura 4.12. O valor do coeficiente de correlação quadrático R^2 comprova que houve inibição pelo produto e que o modelo linear (Equação 4.2.2) é adequado para representar essa inibição.

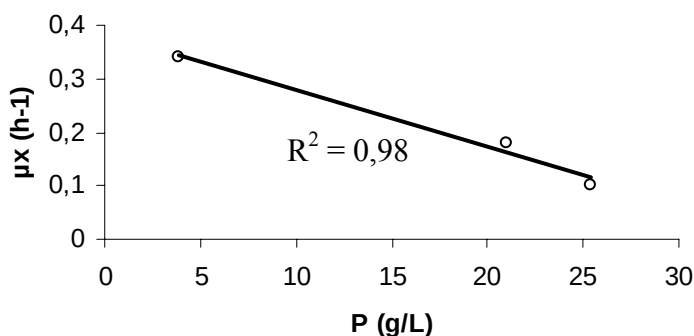


Figura 4.12 – μ_x em função de P , para o modelo de inibição linear de Ghose e Tyagi.

4.2.3.5 – Análise global dos resultados

Com o objetivo de realizar uma análise global da modelagem cinética, foram plotados gráficos dos valores observados *versus* valores preditos para cada modelo separadamente, incluindo todos os resultados obtidos nas concentrações iniciais de lactose de 52, 82 e 112 g/L. Os resultados são exibidos pela Figura 4.13.

Na Figura 4.13 (a), nota-se o afastamento entre os resultados experimentais e os preditos pelo modelo, no início e no final dos experimentos. Nestas fases, as concentrações celulares permanecem constantes e portanto dX/dt é igual a zero, condição não prevista pelo modelo logístico, como visto no Item 4.2.3.1. O desvio esperado entre os resultados experimentais e os do modelo logístico na fase estacionária ocultou a inibição provocada pelo produto. O mesmo aconteceu com o equação de Luedeking e Piret. Com este modelo conseguiu-se um bom ajuste aos resultados experimentais, como mostra a Figura 4.13 (c), porém percebe-se que os maiores desvios ocorreram quando a concentração de ácido láctico situou-se na faixa entre 30 e 50 g/L, ou seja, no final das fermentações. Nesta fase, ocorre uma diminuição acentuada na velocidade de formação do produto. Amrane; Prigent (1994) mostraram que a equação de Luedeking e Piret não consegue prever esta alteração e, conseqüentemente, ocorre um distanciamento entre os resultados experimentais e os preditos pelo modelo. Este comportamento característico da equação de Luedeking e Piret impossibilitou a constatação da inibição provocada pelo produto, que só foi percebida com o modelo de Pirt.

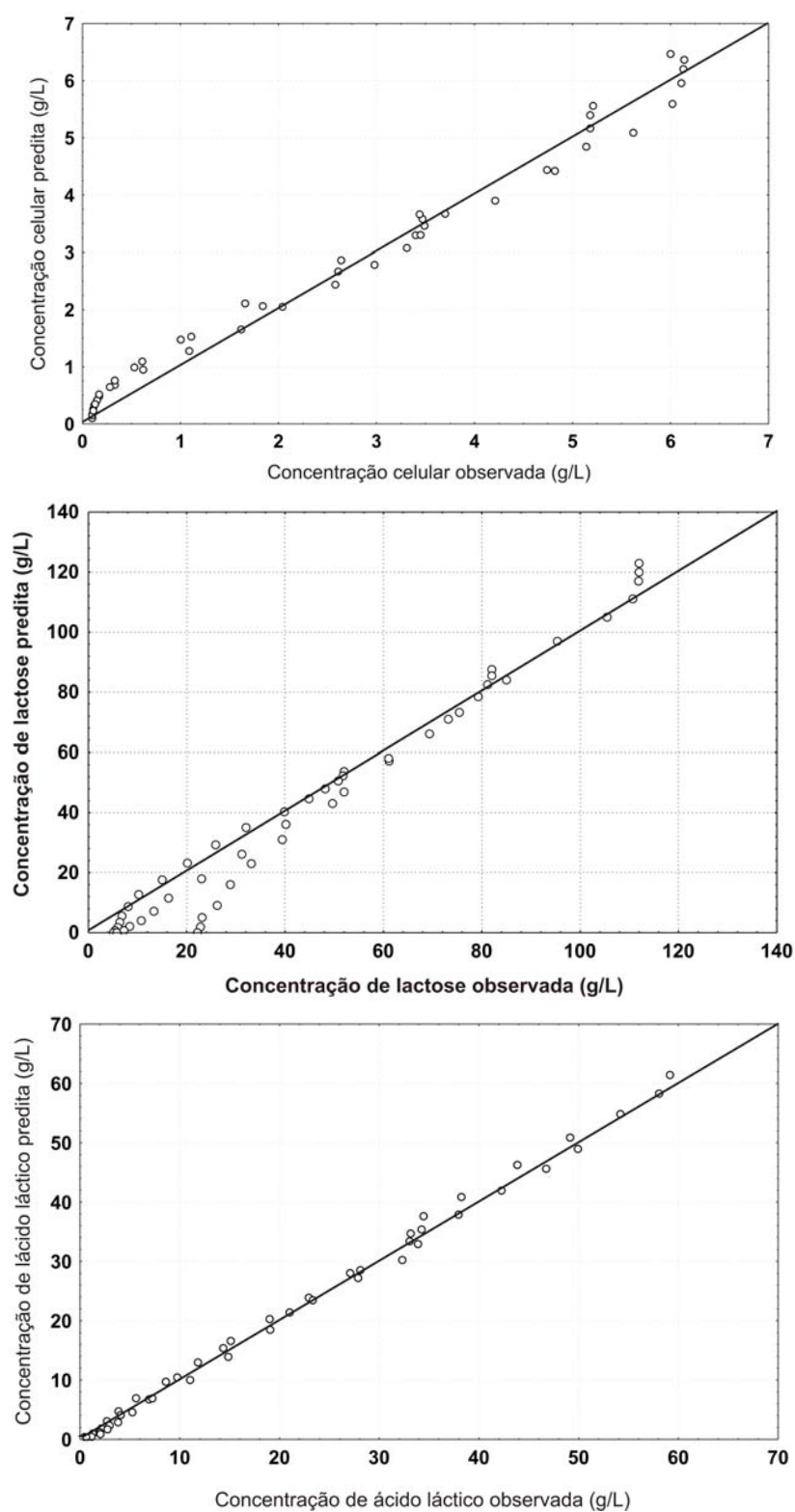


Figura 4.13 – Comparação entre os valores observados e os preditos pelos modelos: (A) de crescimento logístico; (B) de consumo de substrato (Equação de Pirt) e (C) de formação de produto (Equação de Luedeking e Piret).

A qualidade do ajuste dos modelos de crescimento, consumo de substrato e formação do produto aos resultados experimentais foi avaliada através dos coeficientes de correlação quadráticos R^2 . O modelo de Luedeking e Piret foi o que apresentou o melhor ajuste ($R^2=0,9968$), seguido do modelo logístico de crescimento ($R^2=0,9880$). Já o modelo de Pirt reproduziu os resultados experimentais com uma exatidão menor ($R^2=0,9757$). Esta diminuição no coeficiente de correlação ocorreu principalmente devido aos grandes desvios entre os valores observados e os preditos no final das fermentações, como pode ser visto na Figura 4.13 (b). Esses desvios possibilitaram a constatação da inibição do *Lactobacillus helveticus* provocada pelo acúmulo de lactato.

Levando-se em conta que em um sistema biológico as respostas de interesse, além de serem sensíveis às pequenas flutuações das variáveis do processo, são associadas a complexas transformações bioquímicas, pode-se concluir através dos coeficientes de correlação quadráticos que a modelagem utilizada neste trabalho foi adequada para representar os resultados experimentais.

Na modelagem da fermentação homoláctica do soro de queijo realizada por Tango e Ghaly (1999b), foram utilizadas as equações de Luedeking e Piret para a formação do produto e de Pirt para o consumo de substrato. Para o crescimento celular, adotou-se a equação de Monod, com a inclusão de termos para adaptar o modelo às condições de inibição pelo substrato e inibição pelo produto. Os coeficientes de correlação quadráticos foram iguais a 0,98 para a formação do produto, 0,97 para o crescimento celular e 0,92 para o consumo de substrato. Os autores concluíram que a modelagem representou os resultados experimentais com exatidão.

5 – CONCLUSÃO

Das variáveis analisadas, o pH e a concentração de extrato de levedura exerceram as maiores influências sobre a formação do ácido láctico. Houve uma forte interação entre essas duas variáveis. Não houve crescimento celular e formação de produto em pH menor do que 6. Mesmo em condições favoráveis de pH, a formação de produto foi insignificante em concentrações de extrato de levedura inferiores a 12 g/L.

A máxima concentração de ácido láctico prevista pela análise canônica foi igual a 59,38 g/L, nas seguintes condições operacionais: 82 g/L de lactose, 23,36 g/L de extrato de levedura, 40 °C e pH 6,8. Através de uma fermentação realizada nestas condições, atingiu-se a concentração de 59,15 g/L de ácido láctico, valor apenas 0,4% inferior ao previsto pela análise canônica

A fermentação do soro de queijo foi inibida pelo substrato na concentração de lactose de 112 g/L.

A equação logística representou adequadamente o crescimento do *Lactobacillus helveticus*. Os maiores desvios ocorreram no início da fermentação e na fase estacionária, onde a condição de velocidade instantânea de crescimento igual a zero não é prevista pelo modelo. As medidas de vício de Box e de curvatura de Bates e Watts referentes a este modelo demonstraram que existe confiabilidade estatística para os estimadores de mínimos quadrados dos parâmetros.

O ajuste do modelo de Amrane (1999) aos resultados experimentais foi ligeiramente melhor do que o obtido pela equação logística. Entretanto, as medidas de vício de Box e de curvatura de Bates e Watts demonstraram que as inferências estatísticas sobre as estimações dos parâmetros deste modelo não são válidas.

O modelo de Pirt mostrou-se adequado para representar o consumo do substrato, apesar dos desvios que ocorreram no final das fermentações. Através deste modelo foi possível constatar a inibição do *Lactobacillus helveticus* provocada pelo acúmulo de lactato no meio.

Os desvios das equações logística e de Luedeking e Piret em relação aos resultados experimentais, no final das fermentações, já eram esperados do ponto de vista matemático, fato que impossibilitou a verificação da inibição pelo produto através destes modelos.

O modelo de Luedeking e Piret ajustou-se bem aos resultados experimentais da concentração de ácido láctico em função do tempo. Porém, esse modelo não leva em

consideração o término da formação do produto, quando ocorre a exaustão da fonte de carbono.

A partir da análise comparativa entre os resultados obtidos neste trabalho com os da literatura, pode-se concluir que as características fermentativas das diferentes cepas de *Lactobacillus helveticus* são bastante distintas, tanto em termos de velocidade de fermentação, como dos valores alcançados para as concentrações celulares e de ácido láctico. Isto reforça a necessidade de uma avaliação de cada cepa para uma possível aplicação.

6 – SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Substituir o meio de crescimento MRS por outro à base de lactose, buscando diminuir a duração da fase *lag*.

A utilização da concentração ótima de extrato de levedura encontrada neste estudo, 23,36 g/L, é inviável do ponto de vista econômico. Portanto, deve ser realizado um estudo para analisar o impacto da diminuição dessa concentração sobre a produção do ácido láctico e sobre o tempo de fermentação, mantendo-se as demais condições de temperatura, pH e concentração de lactose nos seus valores ótimos.

Buscar fontes de nitrogênio de baixo custo como alternativa em relação ao extrato de levedura.

Desenvolver termos de correção para os modelos testados, para adequá-los melhor às inibições pelo substrato e pelo produto.

APÊNDICE A

MÉTODO DNS PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES

Este método foi utilizado para a determinação das concentrações da lactose presente nas amostras. A faixa de utilização é 0-1 g/L de lactose.

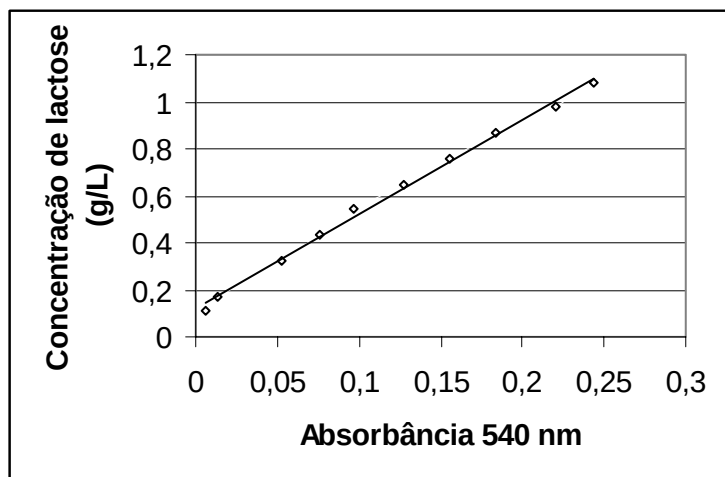
Preparo da solução DNS

- Dissolver 1 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) em 50 mL de água.
- Adicionar 20 mL de NaOH 2N.
- Adicionar 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de Na e K).
- Adicionar água até atingir o volume de 100 mL.

Curva de calibração

- Preparar soluções de lactose em duplicata com concentrações 0,0; 0,1; 0,2; ... 1,0 g/L.
- Colocar 1,0 mL de cada solução em tubos de Folin.
- Adicionar 2,0 mL de solução DNS.
- Ferver por 5 minutos, resfriando em seguida até atingir a temperatura ambiente.
- Adicionar água até atingir o volume de 25 mL.
- Realizar a leitura da absorbância a 540 nm. Utilizar como branco a solução de concentração 0,0.
- Para cada amostra, calcular o valor médio da absorbância.
- Plotar o gráfico Concentração versus Absorbância e, por regressão linear, obter a equação da reta que relaciona essas duas grandezas.
- Para cada nova solução DNS preparada, deve-se construir uma nova curva de calibração.

A seguir é exibido o gráfico que relaciona a absorbância de uma amostra com a sua concentração de lactose, construído especialmente para este trabalho.



$$C \text{ (g/L)} = 3,96 * A_{540} + 0,129 \quad R^2 = 0,9958$$

Determinação da lactose presente nas amostras

- Retirar do fermentador aproximadamente 5 mL da amostra.
- Centrifugar por 6 minutos a 15000 rpm.
- Retirar 2,0 mL do sobrenadante e dividir em dois tubos de Folin.
- Adicionar 2,0 mL de solução DNS em cada tubo.
- Ferver por 5 minutos, resfriando em seguida até atingir a temperatura ambiente.
- Adicionar água até o volume de 25 mL.
- Realizar a leitura da absorbância a 540 nm. Calcular o valor médio para cada amostra.
- Calcular a concentração da lactose utilizando a equação da curva de calibração.

APÊNDICE B

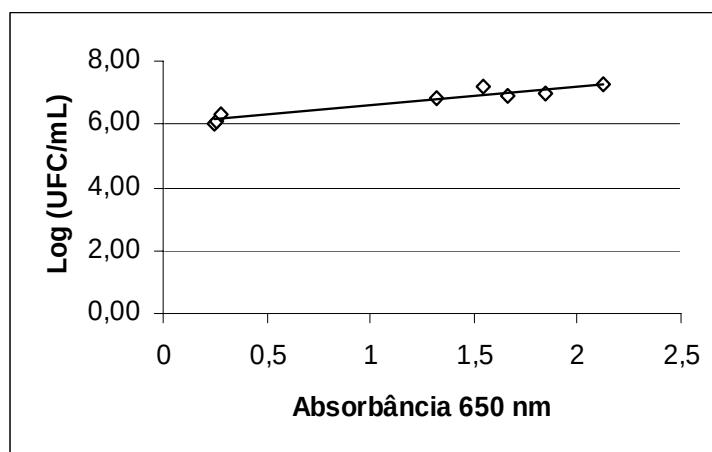
CURVA DE CRESCIMENTO DO *Lactobacillus helveticus*

A cepa encontrava-se em um tubo contendo ágar-MRS. Adicionou-se ao tubo 1 mL de solução salina 0.8%, e esfregou-se suavemente a superfície do meio com um bastão de vidro. Desse modo, formou-se aproximadamente 1 mL de suspensão bacteriana. Essa suspensão foi inoculada em um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo MRS. O erlenmeyer foi incubado à 37°C e 110 rpm, por 42 horas. Em intervalos de 6 horas, contados a partir da inoculação, retiravam-se 2 amostras de 1 mL. Media-se a absorbância de uma das amostras em comprimento de onda de 650 nm. A outra amostra era diluída até diluição 10^{-6} . Da amostra diluída, 50 μ L eram transferidos para uma placa de Petri contendo ágar-MRS. Este procedimento era realizado em triplicata. As placas eram mantidas em estufa à 37°C por 24 horas. Por fim, realizava-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) com o auxílio de um contador de colônias. O resultado da contagem expressava o número de células viáveis por 50 μ L, para diluição 10^{-6} . Este número era multiplicado por $20 \cdot 10^6$ para que o resultado fosse obtido em UFC/mL.

A tabela a seguir exibe o resultado obtido neste trabalho, segundo o procedimento acima.

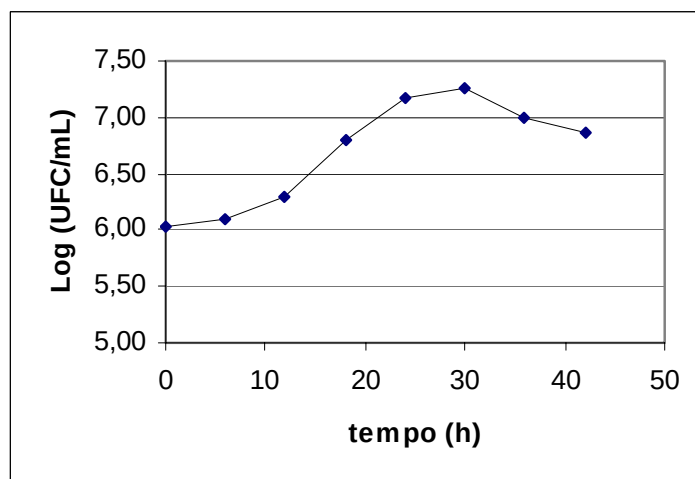
t(h)	DO ₆₅₀	UFC/mL	log (UFC/mL)
0	0,249	1,10E+06	6,04
6	0,26	1,26E+06	6,10
12	0,279	1,98E+06	6,30
18	1,315	6,17E+06	6,79
24	1,542	1,48E+07	7,17
30	2,127	1,82E+07	7,26
36	1,842	9,74E+06	6,99
42	1,658	7,31E+06	6,86

O gráfico abaixo ilustra a relação entre log (UFC/mL) e a absorbância da amostra.



$$\text{Log (UFC/mL)} = 0,592 * A_{650} + 6,003 \quad R^2 = 0,9610$$

Com os dados da tabela anterior, contruiu-se a curva de Log N versus t.



APÊNDICE C

CURVA DE CALIBRAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO BACTERIANA

Procedimento:

- Desenvolver a bactéria em placas de Petri ou tubos inclinados, ou ainda em frascos com 50 mL a 100 mL de meio líquido, por um período de 24 à 48 horas.
- Se a bactéria for desenvolvida em meio líquido, transferir o conteúdo dos frascos para tubos de centrifugação. Caso tenha sido utilizado placas de Petri ou tubos inclinados, suspender as células em água esterilizada, e depois transferir para os tubos de centrifugação.
- Centrifugar a 2200 G durante 20 minutos. Para o cálculo da velocidade de rotação da centrífuga, usar a fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{89000 * G}{R}}$$

S = velocidade de centrifugação (rpm)

G = força relativa de centrifugação

R = distância radial do rotor, medida perpendicularmente do centro do eixo do rotor até o tubo.

- Descartar o sobrenadante. Suspender o precipitado em água estéril. Utilizando o espectrofotômetro, ajustar a turvação da suspensão para aproximadamente 0,7 A (20% T) em comprimento de onda de 650 nm. A determinação da concentração bacteriana deve ser feita na faixa de 0,1-0,7 A (80%-20% T). Valores acima ou abaixo destes estão sujeitos a erro.
- A partir da suspensão de 0,7 A, preparar soluções diluídas nas seguintes proporções: 0, 2/3, 3/8 e 1/10. Estas diluições devem ter as absorbâncias aproximadamente iguais a 0,7, 0,5, 0,3 e 0,1 A, respectivamente.
- Medir a absorbância das quatro diluições. As medições devem ser feitas da solução mais diluída até a mais concentrada, sem lavar a cubeta entre as medições. A água residual da lavagem pode alterar a diluição da amostra. Se os resultados obtidos forem muito diferentes daqueles descritos no item anterior, é necessário identificar a causa do erro e refazer o procedimento.
- Transferir o conteúdo das diluições para cadinhos de porcelana previamente secos em estufa e pesados em balança de precisão.

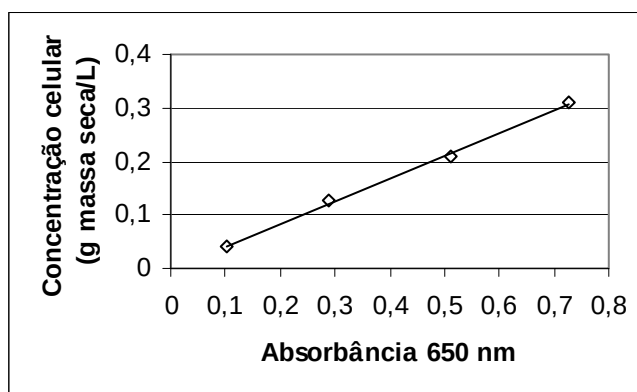
- Manter os cadinhos em estufa à 105°C até que eles atinjam peso constante.
- Acondicionar os cadinhos em dessecadores até que atinjam a temperatura ambiente, e então pesá-los, obtendo a massa de células secas contida nas diluições.
- Preencher o quadro:

	diluições			
	0	2/3	3/8	1/10
g massa seca/L (Y)				
Absorbância (X)				

- Realizar a regressão linear de Y versus X.

Seguindo o procedimento descrito acima, obteve-se os seguintes resultados:

A₆₅₀	X (g massa seca / L)
0,104	0,041
0,289	0,126
0,512	0,211
0,726	0,309



$$X = 0,425 * A_{650} \quad R^2 = 0,9986$$

APÊNDICE D

Concentrações celulares (X), de substrato (S) e de produto (P) em função do tempo, para concentrações iniciais de lactose iguais a 52 g/L, 82 g/L e 112 g/L. As fermentações foram conduzidas à 40 °C e pH 6,8. O meio foi suplementado com 23,36 g/L de extrato de levedura.

t (h)	S_0 (g/L)								
	52			82			112		
	X	S	P	X	S	P	X	S	P
0	0,10	52,00	0	0,10	82,00	0	0,10	112,00	0
2	0,10	51,74	0,46	0,10	82,00	1,16	0,10	112,00	0,62
4	0,11	50,85	1,29	0,11	81,20	1,99	0,11	111,84	2,04
6	0,12	48,12	2,14	0,15	79,28	2,96	0,13	110,72	2,76
8	0,17	44,89	2,70	0,28	75,42	4,08	0,17	105,46	3,82
10	0,33	39,82	3,86	0,53	69,35	6,91	0,33	95,32	5,25
12	0,62	32,11	5,62	1,00	61,18	9,75	0,61	85,02	7,25
14	1,09	25,85	8,61	1,66	52,04	14,36	1,11	73,15	11,04
16	1,62	20,14	11,82	2,64	40,12	21,02	1,84	64,08	14,87
18	2,04	15,04	15,11	3,70	31,22	27,09	2,61	52,66	19,07
20	2,58	10,22	19,02	4,74	23,03	33,15	3,45	43,45	23,34
22	2,98	8,13	22,94	5,62	16,30	38,24	4,21	35,12	28,11
24	3,31	6,84	27,88	6,02	13,32	43,85	4,82	30,04	33,04
26	3,40	6,42	32,32	6,11	10,72	49,15	5,14	26,18	37,96
28	3,49	5,98	33,89	6,13	8,44	54,18	5,18	23,12	42,26
30	3,47	5,40	34,25	6,14	7,25	58,07	5,18	22,78	46,74
32	3,44	5,12	34,45	6,00	5,75	59,15	5,21	22,19	49,92

ANEXO A

Programa para o cálculo das medidas de curvatura de Bates e Watts e do vício de Box.

Adaptado de Ratkowsky (1983).

```

PROGRAMA PARA CALCULO DE VICIO E CURVATURA
C  MODELO LOGÍSTICO DE CRESCIMENTO MICROBIANO
C
C  PROGRAMA PRINCIPAL
C
C
C  IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Y)
    INTEGER JPV(2),LUNOUT,NP,NPTS,NITS
    REAL PARAM(2),DERIVS(34),A(68),QRAUX(2),WK1(3),WK2(17),
    *BIAS(2),Z,Y,VARC(2,2)

C
C  VARIÁVEIS INDEPENDENTES
C
    COMMON/A/ T(17)
C
    WRITE(*,*)'*** ENTRE COM O NUMERO DE PARAMETROS DO MODELO *** '
    READ(*,*) NP
    WRITE(*,*) '*** ENTRE COM O VALOR DOS PARAMETROS ESTIMADOS*** '
    DO 10 I=1,NP
10  READ(*,*) PARAM(I)
    WRITE(*,*) '*** ENTRE COM O NUMERO DE PONTOS EXPERIMENTAIS ***'
    READ(*,*) NPTS
C
C  ARQUIVO DE DADOS'
C
    OPEN(UNIT=11,FILE='So82.DAT',STATUS='OLD')
    DO 20 I=1,NPTS
20  READ(11,*) T(I)
    WRITE(*,*) ' *** ENTRE COM O NUMERO DE ITERACOES ****'
    READ(*,*) NITS
    WRITE(*,*) '*** ENTRA COM A VARIANCIA ***'
    READ(*,*) VAR
    WRITE(*,*) 'VALORES DE TEMPO=',(I,T(I),I=1,NPTS)

```

```

C
  DATA LUNOUT/8/
  CALL BATES(PARAM,VAR,NITS,NPTS,NP,LUNOUT,IFAIL,A,
%      DERIVS,VARC,QRAUX,WK1,WK2,JPVT,BIAS)
  STOP
  END
C
C*****
C
  SUBROUTINE EVAL(PARAM,I,ITASK,WK1,IFAIL,Z,Y,B)
  COMMON/A/ T(17)
  DIMENSION PARAM(2),WK1(3)
C
C
  DATA ZERO/0.0E0/,ONE/1.0E0/,TWO/2.0E0/
C
C
  IFAIL=0
  IF (ITASK.NE.1) GO TO 2222
C
C  CALCULA DERIVADA PRIMEIRA
C  T = TEMPO
C
C  WRITE (*,*) 'T=',(T(I),I=1,17

  WK1(1)=0.1*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1))
  *-0.1*PARAM(1)*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1))**2
  WK1(2)=0.1*PARAM(1)*T(I)*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1))
  *-0.1**2*PARAM(1)*exp(PARAM(2)*T(I))**2/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1))**2*T(I)

C
  RETURN
C
2222 CONTINUE
  IF(ITASK.NE.2) GO TO 3333
C
C  CALCULA SEGUNDAS DERIVADAS
C  T = TEMPO

```

C

```

WK1(1)=-2*0.1*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-
1)**2+2*0.1*PARAM(1)*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1)**3
WK1(2)=0.1*T(I)*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1))-
0.1**2*exp(PARAM(2)*T(I))**2/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1)**2*T(I)-
0.1*PARAM(1)*T(I)*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-
1)**2+2*0.1**2*PARAM(1)*exp(PARAM(2)*T(I))**2/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1)**3*T(I)
WK1(3)=0.1*PARAM(1)*T(I)**2*exp(PARAM(2)*T(I))/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-1))-
3*0.1**2*PARAM(1)*T(I)**2*exp(PARAM(2)*T(I))**2/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-
1)**2+2*0.1**3*PARAM(1)*exp(PARAM(2)*T(I))**3/(PARAM(1)+0.1*(exp(PARAM(2)*T(I))-
1)**3*T(I)**2
RETURN

```

C

3333 CONTINUE

```

IFAIL=1
RETURN
END

```

C

C*****

C

```

SUBROUTINE BATES(PARAM,VAR,NITS,NPTS,NP,LUNOUT,
+             IFAIL,A,DERIVS,RINV,QRAUX,WK1,WK2,JPVT,BIAS)

```

C

C EXTERNAL EVAL

```

INTEGER JPVT(2),NITS,NPTS,NP,LUNOUT,IFAIL,I,J,K,NW,M,ITASK
REAL PARAM(2),A(NPTS,2,2),DERIVS(NPTS,2),RINV(2,2),
*   QRAUX(2),BIAS(2),WK1(3),WK2(NPTS),VAR,STRAD,TEMP,
*   C1,C2,W,ZERO,SQRT,Float

```

C

DATA ZERO/0.0E0/

C

IFAIL=0

C

```

CONVERTE A VARIANCIA PARA RAO PADRAO
IF(VAR.LE.ZERO.OR.NP.LE.0) GO TO 2222
STRAD=SQRT(VAR*Float(NP))

```

C

```

CALCULA AS PRIMEIRAS E SEGUNDAS DERIVADAS, DIVIDINDO POR STRAD
DO 100 I=1,NPTS
ITASK=1

```

```

        CALL EVAL(PARAM,I,ITASK,WK1,IFAIL,Z,Y,B)
        DO 200 J=1,NP
            DERIVS(I,J)=WK1(J)/STRAD
200    CONTINUE
C
        ITASK=2
        CALL EVAL(PARAM,I,ITASK,WK1,IFAIL,Z,Y,B)
        IF(IFAIL.NE.0) GO TO 4444
        NW=0
        DO 300 J=1,NP
            DO 400 K=1,J
                NW=NW+1
                W=WK1(NW)/STRAD
                A(I,J,K)=W
                IF(J.NE.K) A(I,K,J)=W
400    CONTINUE
300    CONTINUE
100 CONTINUE
        CALL ARRAYS(A,DERIVS,STRAD,NPTS,NP,LUNOUT)
C
C   FAZ JPVT=0 PARA POSSIBILITAR A TROCA DE COLUNAS DE TODAS COLUNAS
        DO 700 I=1,NP
            JPVT(I)=0
700 CONTINUE
C
C   DECOMPOSICAO QR DAS PRIMEIRAS DERIVADAS
        CALL SQRDC(DERIVS,NPTS,NPTS,NP,QRAUX,JPVT,WK1,1)
C
C   TRANSFERE A DIAGONAL DE R PARA QRAUX E GUARDA A DIAGONAL PRINCIPAL
C   DA TRANSFORMACAO DE HOUSEHOLDER PARA DERIVS, PADRONIZANDO A
C   TRANSFORMACAO DURANTE O PROCEDIMENTO
        DO 500 I=1,NP
            IF(QRAUX(I).EQ.ZERO.OR.DERIVS(I,I).EQ.ZERO) GO TO 3333
            TEMP=QRAUX(I)
            QRAUX(I)=DERIVS(I,I)
            DERIVS(I,I)=TEMP
            DO 600 J=I,NPTS
                DERIVS(J,I)=-DERIVS(J,I)*QRAUX(I)
600    CONTINUE
500 CONTINUE

```

```
C
C  TRANSFORMA MATRIZ DAS SEGUNDAS DERIVADAS EM ARRANJO ACELERACAO
CALL ACCEL(A,DERIVS,RINV,QRAUX,WK1,JPVT,NPTS,NP)
C
C  CALCULA OS VICIOS DE BOX
CALL BOX(A,RINV,BIAS,WK1,NPTS,NP)
C
C  CALCULA A MEDIDA DE CURVATURA INTRINSECA
M=NP+1
CALL CURVE(A,DERIVS,WK1,QRAUX,WK2,C1,M,NPTS,NITS,NPTS,NP,IFAIL)
IF (IFAIL.EQ.0) GO TO 1111
C
C  DECLARA ERRO NA CONVERGENCIA
IFAIL=5
WRITE(LUNOUT,30) NITS
1111 CONTINUE
C
C  CALCULA A MEDIDA DE CURVATURA DEVIDA A EFEITO DE PARAMETRO
CALL CURVE(A,DERIVS,WK1,QRAUX,WK2,C2,1,NP,NITS,NPTS,NP,IFAIL)
IF(IFAIL.EQ.6) WRITE(LUNOUT,30) NITS
C
C  IMPRIME RESULTADOS
CALL WATTS(A,BIAS,PARAM,C1,C2,NPTS,NP,LUNOUT)
RETURN
C
2222 CONTINUE
C  RAIO PADRAO INCORRETO
IFAIL=3
WRITE(LUNOUT,10)
RETURN
3333 CONTINUE
C
C  MATRIZ SINGULAR
IFAIL=4
WRITE(LUNOUT,20)
RETURN
C
4444 CONTINUE
C  ERRO NA SOBROUTINE EVAL
IFAIL=8
```

```

WRITE(LUNOUT,40)
RETURN
C
C
10 FORMAT(/1H ,43H*** SUBROUTINE BATES: RAO PADRAO INCORRETO//)
20 FORMAT(/1H ,37H*** SUBROUTINE BATES: MATRIZ SINGULAR//)
30 FORMAT(/1H ,50H*** SUBROUTINE BATES: CONVERGENCIA NAO OBTIDA APOS,
+ I10,2X,9HITERACOES//)
40 FORMAT(/1H ,33H*** SUBROUTINE BATES ERRO EM EVAL//)
END
C
C*****
C
SUBROUTINE ACCEL(A,DERIVS,RINV,ALPHA,TEMPV,JPVT,NPTS,NP)
C
C ESTA SUBROUTINE TRANSFORMA A MATRIZ DE DERIVADAS SEGUNDAS NO ARRANJO
C ACELERACAO, USANDO O RESULTADO DA DECOMPOSICAO QR DA MATRIZ DAS
C PRIMEIRAS DERIVADAS, FEITO NA SUBROUTINE BATES
C
C
INTEGER JPVT(2),NPTS,NP,I,J,K,L,IMIN1,JJ,JPLUS1
REAL A(NPTS,2,2),DERIVS(NPTS,2),RINV(2,2),ALPHA(2),
* TEMPV(3),ACCUM,GAMMA,ZERO,ONE
C
DATA ZERO/0.E0/,ONE/1.0E0/
C
C MULTIPLICA MATRIZ DAS SEGUNDAS DERIVADAS POR QR TRANSPOSTA
DO 100 I=1,NP
DO 200 J=1,I
DO 300 K=1,NP
ACCUM=ZERO
DO 400 L=K,NPTS
ACCUM=ACCUM+DERIVS(L,K)*A(L,I,J)
400 CONTINUE
GAMMA=ACCUM/(ALPHA(K)*DERIVS(K,K))
DO 500 L=K,NPTS
A(L,I,J)=A(L,I,J)+GAMMA*DERIVS(L,K)
500 CONTINUE
300 CONTINUE
DO 600 K=1,NPTS

```

```

        A(K,J,I)=A(K,I,J)
600    CONTINUE
200    CONTINUE
100 CONTINUE
C
C  CALCULA A INVERSA DE R
    DO 700 I=1,NP
        DO 800 J=1,NP
            TEMPV(J)=ZERO
800    CONTINUE
        TEMPV(I)=ONE/ALPHA(I)
        IMIN1=I-1
        IF(IMIN1.LT.1) GO TO 1111
        DO 900 JJ=1,IMIN1
            J=IMIN1-JJ+1
            JPLUS1=J+1
            ACCUM=ZERO
            DO 1000 K=JPLUS1,NP
                ACCUM=ACCUM+DERIVS(J,K)*TEMPV(K)
1000    CONTINUE
            TEMPV(J)=-ACCUM/ALPHA(J)
900    CONTINUE
1111   CONTINUE
        DO 1100 J=1,NP
            K=JPVT(J)
            RINV(K,I)=TEMPV(J)
1100   CONTINUE
700 CONTINUE
C
C  FAZ A PRE E POS MULTIPLICACAO DE A POR RINV TRANSPOSTA
C  E POR RINV
    DO 1200 I=1,NPTS
        DO 1300 J=1,NP
            DO 1400 K=1,NP
                ACCUM=ZERO
                DO 1500 L=1,NP
                    ACCUM=ACCUM+A(I,J,L)*RINV(L,K)
1500    CONTINUE
                DERIVS(J,K)=ACCUM
1400    CONTINUE

```

```

1300  CONTINUE
      DO 1600 J=1,NP
        DO 1700 K=1,J
          ACCUM=ZERO
          DO 1800 L=1,NP
            ACCUM=ACCUM+RINV(L,J)*DERIVS(L,K)
1800    CONTINUE
          A(I,J,K)=ACCUM
          A(I,K,J)=ACCUM
1700    CONTINUE
1600  CONTINUE
1200 CONTINUE
      RETURN
      END
C
C*****
C
      SUBROUTINE BOX(A,RINV,BIAS,TEMPV,NPTS,NP)
C
C  ESTA SOBROUTINE CALCULA OS VICIOS DE BOX PARA CADA PARAMETRO
C  ESTIMADO E DEVOLVE ESTES VALORES PARA O ARRANJO DE VICIOS
C
      INTEGER NPTS,NP,I,J
      REAL A(NPTS,2,2),RINV(2,2),BIAS(2),TEMPV(3),ZERO,Float
      DATA ZERO/0.E0/
C
      DO 100 I=1,NP
        TEMPV(I)=ZERO
        DO 200 J=1,NP
          TEMPV(I)=TEMPV(I)+A(I,J,J)
200    CONTINUE
        TEMPV(I)=-TEMPV(I)/Float(2*NP)
100 CONTINUE
      DO 300 I=1,NP
        BIAS(I)=ZERO
        DO 400 J=1,NP
          BIAS(I)=BIAS(I)+RINV(I,J)*TEMPV(J)
400    CONTINUE
300 CONTINUE
      RETURN

```

```

END
C
C*****
C
SUBROUTINE CNTEST(DIR,GRAD,COSA,SINA,THQA,NP,CNVGED)
C
C  ESTA SUBROUTINE FAZ UM TESTE DE CONVERGENCIA PARA A DETERMINACAO
C  ITERATIVA DA
C  CURVATURA MAXIMA INTRINSECA OU DE EFEITO DE PARAMETRO
C
C  INTEGER NP,I
C  REAL DIR(3),GRAD(2),COSA,SINA,THQA,EPS,PI,TEST,ABS,SIGN,ATAN2,
C  +   SGN,ZERO,ONE,TWO,PSF,SQRT
C  LOGICAL CNVGED
C  DATA EPS/1.0E-4/,PI/3.141592654E0/,ZERO/0.E0/,ONE/1.0E0/,
C  +TWO/2.0E0/,PSF/7.5E-1/
C
C  CNVGED=.FALSE.
C  TEST=ONE-EPS
C  IF(ABS(COSA).LE.TEST) GO TO 1111
C
C  CONVERGENCIA
C  SGN=SIGN(ONE,COSA)
C  DO 100 I=1,NP
C    DIR(I)=SGN*GRAD(I)
C  100 CONTINUE
C  CNVGED=.TRUE.
C  RETURN
C
C  NAO CONVERGENCIA
C  1111 CONTINUE
C  SINA=SQRT(ONE-COSA**2)
C  IF(SINA.NE.ONE) GO TO 2222
C  THQA=PSF*PI/TWO
C  RETURN
C  2222 CONTINUE
C  IF(COSA.GE.ZERO) GO TO 3333
C  THQA=PSF*(ATAN2(SINA,COSA)+PI)
C  RETURN
C  3333 CONTINUE

```

```

      THQA=PSF*(ATAN2(SINA,COSA))
      RETURN
      END
C
C*****
C
      SUBROUTINE CURVE(A,TEMPML,DIR,GRAD,TEMPL,CMAX,IM,IN,NITS,NPTS,
+          NP,IFAIL)
C
C  ESTA SUBROUTINE CALCULAS AS MEDIDAS DE CURVATURA MAXIMA INTRINSECA
C  E DE EFEITO DE PARAMETRO POR UM PROCESSO ITERATIVO QUE TERMINA QUANDO
C  A CONVERGENCIA E OBTIDA OU QUANDO O NUMERO MAXIMO DE ITERACOES E
C  EXCEDIDO. FALHA NA CONVERGENCIA E REPRESENTADA PELO NUMERO IFAIL
C  IGUAL A 6.
C
C
      INTEGER IM,IN,NITS,NPTS,NP,IFAIL,I,J,K,ITER,NPMIN1
      REAL A(NPTS,2,2),TEMPML(NPTS,2),DIR(3),GRAD(2),TEMPL(NPTS),
+  CMAX,ACCUM,ALENG,SINA,COSA,SIN,COS,SQRT,THQA,C1,C2,ZERO,ONE
      LOGICAL CNVGED
C
      DATA ZERO/0.E0/,ONE/1.0E0/
C
C  CALCULA O MAXIMO DA CURVATURA
      NPMIN1=NP-1
      IF(NPMIN1.LE.1) GO TO 1111
      DO 400 I=1,NPMIN1
          DIR(I)=ZERO
      400 CONTINUE
      1111 CONTINUE
          DIR(NP)=ONE
          ITER=1
C
C  REALIZA LOOP ATE QUE A CONVERGENCIA SEJA ATINGIDA OU QUE O
C  NUMERO DE ITERACOES SEJA EXCESSIVO
      2222 CONTINUE
          DO 500 I=IM,IN
              DO 600 J=1,NP
                  ACCUM=ZERO
                  DO 700 K=1,NP

```

```

        ACCUM=ACCUM+A(I,J,K)*DIR(K)
700    CONTINUE
        TEMPML(I,J)=ACCUM
600    CONTINUE
500    CONTINUE
        DO 800 I=IM,IN
            ACCUM=ZERO
            DO 900 J=1,NP
                ACCUM=ACCUM+TEMPML(I,J)*DIR(J)
900    CONTINUE
            TEMPL(I)=ACCUM
800    CONTINUE
            DO 1000 I=1,NP
                ACCUM=ZERO
                DO 1100 J=IM,IN
                    ACCUM=ACCUM+TEMPML(J,I)*TEMPL(J)
1100    CONTINUE
                GRAD(I)=ACCUM
1000    CONTINUE
                ACCUM=ZERO
                DO 1200 I=1,NP
                    ACCUM=ACCUM+GRAD(I)*GRAD(I)
1200    CONTINUE
                ALENG=SQRT(ACCUM)
                IF(ALENG.EQ.ZERO) GO TO 4444
                DO 1300 I=1,NP
                    GRAD(I)=GRAD(I)/ALENG
1300    CONTINUE
                COSA=ZERO
                DO 1400 I=1,NP
                    COSA=COSA+DIR(I)*GRAD(I)
1400    CONTINUE
C
C    TESTE DE CONVERGENCIA
        CALL CNTEST(DIR,GRAD,COSA,SINA,THQA,NP,CNVGED)
        IF(CNVGED) GO TO 4444
C
C    TESTE PARA ITERACOES EXCESSIVAS
        ITER=ITER+1
        IF(ITER.LE.NITS) GO TO 3333

```

```

      IFAIL=6
      GO TO 4444
3333 CONTINUE
      C2=SIN(THQA)/SINA
      C1=COS(THQA)-C2*COSA
      DO 1500 I=1,NP
          DIR(I)=C1*DIR(I)+C2*GRAD(I)
1500 CONTINUE
      GO TO 2222
C
C   FINALIZACAO DO LOOP COMECADO EM 2222
4444 CONTINUE
      DO 1600 I=IM,IN
          DO 1700 J=1,NP
              ACCUM=ZERO
              DO 1800 K=1,NP
                  ACCUM=ACCUM+A(I,J,K)*DIR(K)
1800      CONTINUE
              TEMPML(I,J)=ACCUM
1700  CONTINUE
1600 CONTINUE
          DO 1900 I=IM,IN
              ACCUM=ZERO
              DO 2000 J=1,NP
                  ACCUM=ACCUM+TEMPML(I,J)*DIR(J)
2000  CONTINUE
              TEMPL(I)=ACCUM
1900 CONTINUE
          ACCUM=ZERO
          DO 2100 I=IM,IN
              ACCUM=ACCUM+TEMPL(I)*TEMPL(I)
2100 CONTINUE
          CMAX=SQRT(ACCUM)
          RETURN
      END
C
C*****
C
C   SUBROUTINE WATTS(A,BIAS,PARAM,C1,C2,NPTS,NP,LUNOUT)
C

```

C IMPRIME OS RESULTADOS REQUERIDOS PELA SUBROUTINE BATES DE ACORDO COM

C O ESPECIFICADO EM JOB

C

INTEGER NPTS,NP,LUNOUT,I,J,K

REAL A(NPTS,2,2),BIAS(2),PARAM(2),C1,C2,PERCEN,ZERO,HUNDRD

C

DATA ZERO/0.E0/,HUNDRD/1.0E2/

C

C IMPRIMA O ARRANJO ACELERACAO

WRITE(LUNOUT,10)

DO 200 I=1,NP

WRITE(LUNOUT,20)

DO 300 J=1,NP

WRITE(LUNOUT,30) (A(I,J,K),K=1,NP)

300 CONTINUE

200 CONTINUE

C

C IMPRIMA OS VICIOS

WRITE(LUNOUT,40)

DO 400 I=1,NP

IF(PARAM(I).EQ.ZERO) GO TO 2222

PERCEN=BIAS(I)/PARAM(I)*HUNDRD

WRITE(LUNOUT,50) I,PARAM(I),BIAS(I),PERCEN

GO TO 400

2222 CONTINUE

WRITE(LUNOUT,50) I,PARAM(I),BIAS(I)

400 CONTINUE

C

C IMPRIMA AS MEDIDAS DE CURVATURA MAXIMAS

WRITE(LUNOUT,60) C1,C2

RETURN

C

C

10 FORMAT(/1H ,10X,18HARRANJO ACELERACAO,

+ 21H(EFEITO DE PARAMETRO))

20 FORMAT(/1H)

30 FORMAT(1H ,10X,10F12.4)

40 FORMAT(/1H ,10X,13HVICIOS DE BOX,///1H ,8X,9HPARAMETRO,9X,

+ 16HESTIMATIVA DE MQ,16X,5HVICIO,8X,

+ 20HPORCENTAGEM DE VICIO/)

```

50 FORMAT(1H ,6X,9HPARAMETRO,I2,2E20.8,F20.4)
60 FORMAT(////1H ,10X,18HCURVATURAS MAXIMAS//1H ,
+      15HINTRINSECA (IN),11X,F12.4//1H ,
+      24HEFEITO DE PARAMETRO (PE),3X,F12.4)
END
C
C*****
C
      SUBROUTINE SQRDC(X,LDX,N,P,QRAUX,JPVT,WORK,JOB)
C***BEGIN PROLOGUE  SQRDC
C  THIS PROLOGUE HAS BEEN REMOVED FOR REASONS OF SPACE
C  FOR A COMPLETE COPY OF THIS ROUTINE CONTACT THE AUTHORS
C  From the book "Numerical Methods and Software"
C    by D. Kahaner, C. Moler, S. Nash
C    Prentice Hall 1988
C***END PROLOGUE  SQRDC
      INTEGER LDX,N,P,JOB
      INTEGER JPVT(P)
      REAL X(LDX,2),QRAUX(2),WORK(3)
C
      INTEGER J,JP,L,LP1,LUP,MAXJ,PL,PU
      REAL MAXNRM,SNRM2,TT
      REAL SDOT,NRMXL,T
      LOGICAL NEGJ,SWAPJ
C
C***FIRST EXECUTABLE STATEMENT  SQRDC
      PL = 1
      PU = 0
      IF (JOB .EQ. 0) GO TO 60
C
C  PIVOTING HAS BEEN REQUESTED.  REARRANGE THE COLUMNS
C  ACCORDING TO JPVT.
C
      DO 20 J = 1, P
          SWAPJ = JPVT(J) .GT. 0
          NEGJ = JPVT(J) .LT. 0
          JPVT(J) = J
          IF (NEGJ) JPVT(J) = -J
          IF (.NOT.SWAPJ) GO TO 10
          IF (J .NE. PL) CALL SSWAP(N,X(1,PL),1,X(1,J),1)

```

```

        JPVT(J) = JPVT(PL)
        JPVT(PL) = J
        PL = PL + 1
10    CONTINUE
20    CONTINUE
        PU = P
        DO 50 JJ = 1, P
            J = P - JJ + 1
            IF (JPVT(J) .GE. 0) GO TO 40
            JPVT(J) = -JPVT(J)
            IF (J .EQ. PU) GO TO 30
            CALL SSWAP(N,X(1,PU),1,X(1,J),1)
            JP = JPVT(PU)
            JPVT(PU) = JPVT(J)
            JPVT(J) = JP
30    CONTINUE
        PU = PU - 1
40    CONTINUE
50    CONTINUE
60    CONTINUE
C
C    COMPUTE THE NORMS OF THE FREE COLUMNS.
C
        IF (PU .LT. PL) GO TO 80
        DO 70 J = PL, PU
            QRAUX(J) = SNRM2(N,X(1,J),1)
            WORK(J) = QRAUX(J)
70    CONTINUE
80    CONTINUE
C
C    PERFORM THE HOUSEHOLDER REDUCTION OF X.
C
        LUP = MIN0(N,P)
        DO 200 L = 1, LUP
            IF (L .LT. PL .OR. L .GE. PU) GO TO 120
C
C            LOCATE THE COLUMN OF LARGEST NORM AND BRING IT
C            INTO THE PIVOT POSITION.
C
            MAXNRM = 0.0E0

```

```

      MAXJ = L
      DO 100 J = L, PU
        IF (QRAUX(J) .LE. MAXNRM) GO TO 90
        MAXNRM = QRAUX(J)
        MAXJ = J
90      CONTINUE
100     CONTINUE
      IF (MAXJ .EQ. L) GO TO 110
      CALL SSWAP(N,X(1,L),1,X(1,MAXJ),1)
      QRAUX(MAXJ) = QRAUX(L)
      WORK(MAXJ) = WORK(L)
      JP = JPV(T(MAXJ)
      JPV(T(MAXJ) = JPV(T(L)
      JPV(T(L) = JP
110    CONTINUE
120    CONTINUE
      QRAUX(L) = 0.0E0
      IF (L .EQ. N) GO TO 190
C
C      COMPUTE THE HOUSEHOLDER TRANSFORMATION FOR COLUMN L.
C
      NRMXL = SNRM2(N-L+1,X(L,L),1)
      IF (NRMXL .EQ. 0.0E0) GO TO 180
      IF (X(L,L) .NE. 0.0E0) NRMXL = SIGN(NRMXL,X(L,L))
      CALL SSCAL(N-L+1,1.0E0/NRMXL,X(L,L),1)
      X(L,L) = 1.0E0 + X(L,L)
C
C      APPLY THE TRANSFORMATION TO THE REMAINING COLUMNS,
C      UPDATING THE NORMS.
C
      LP1 = L + 1
      IF (P .LT. LP1) GO TO 170
      DO 160 J = LP1, P
        T = -SDOT(N-L+1,X(L,L),1,X(L,J),1)/X(L,L)
        CALL SAXPY(N-L+1,T,X(L,L),1,X(L,J),1)
        IF (J .LT. PL .OR. J .GT. PU) GO TO 150
        IF (QRAUX(J) .EQ. 0.0E0) GO TO 150
        TT = 1.0E0 - (ABS(X(L,J))/QRAUX(J))**2
        TT = AMAX1(TT,0.0E0)
        T = TT

```

```

        TT = 1.0E0 + 0.05E0*TT*(QRAUX(J)/WORK(J))**2
        IF (TT .EQ. 1.0E0) GO TO 130
        QRAUX(J) = QRAUX(J)*SQRT(T)
        GO TO 140
130      CONTINUE
        QRAUX(J) = SNRM2(N-L,X(L+1,J),1)
        WORK(J) = QRAUX(J)
140      CONTINUE
150      CONTINUE
160      CONTINUE
170      CONTINUE
C
C      SAVE THE TRANSFORMATION.
C
        QRAUX(L) = X(L,L)
        X(L,L) = -NRMXL
180      CONTINUE
190      CONTINUE
200      CONTINUE
        RETURN
        END
C
C*****
C
        SUBROUTINE SAXPY(N,SA,SX,INCX,SY,INCY)
C***BEGIN PROLOGUE  SAXPY
C  THIS PROLOGUE HAS BEEN REMOVED FOR REASONS OF SPACE
C  FOR A COMPLETE COPY OF THIS ROUTINE CONTACT THE AUTHORS
C  From the book "Numerical Methods and Software"
C    by D. Kahaner, C. Moler, S. Nash
C    Prentice Hall 1988
C***END PROLOGUE  SAXPY
C
        REAL SX(*),SY(*),SA
C***FIRST EXECUTABLE STATEMENT  SAXPY
        IF(N.LE.0.OR.SA.EQ.0.E0) RETURN
        IF(INCX.EQ.INCY) IF(INCX-1) 5,20,60
        5 CONTINUE
C
C      CODE FOR NONEQUAL OR NONPOSITIVE INCREMENTS.

```

```

C
  IX = 1
  IY = 1
  IF(INCX.LT.0)IX = (-N+1)*INCX + 1
  IF(INCY.LT.0)IY = (-N+1)*INCY + 1
  DO 10 I = 1,N
    SY(IY) = SY(IY) + SA*SX(IX)
    IX = IX + INCX
    IY = IY + INCY
10 CONTINUE
  RETURN

C
C   CODE FOR BOTH INCREMENTS EQUAL TO 1
C
C
C   CLEAN-UP LOOP SO REMAINING VECTOR LENGTH IS A MULTIPLE OF 4.
C
20 M = MOD(N,4)
  IF( M .EQ. 0 ) GO TO 40
  DO 30 I = 1,M
    SY(I) = SY(I) + SA*SX(I)
30 CONTINUE
  IF( N .LT. 4 ) RETURN
40 MP1 = M + 1
  DO 50 I = MP1,N,4
    SY(I) = SY(I) + SA*SX(I)
    SY(I + 1) = SY(I + 1) + SA*SX(I + 1)
    SY(I + 2) = SY(I + 2) + SA*SX(I + 2)
    SY(I + 3) = SY(I + 3) + SA*SX(I + 3)
50 CONTINUE
  RETURN

C
C   CODE FOR EQUAL, POSITIVE, NONUNIT INCREMENTS.
C
60 CONTINUE
  NS = N*INCX
  DO 70 I=1,NS,INCX
    SY(I) = SA*SX(I) + SY(I)
70 CONTINUE
  RETURN

```

```

      END
C
C*****
C
      REAL FUNCTION SDOT(N,SX,INCX,SY,INCY)
C***BEGIN PROLOGUE  SDOT
C   THIS PROLOGUE HAS BEEN REMOVED FOR REASONS OF SPACE
C   FOR A COMPLETE COPY OF THIS ROUTINE CONTACT THE AUTHORS
C   From the book "Numerical Methods and Software"
C       by D. Kahaner, C. Moler, S. Nash
C       Prentice Hall 1988
C***END PROLOGUE  SDOT
C
      REAL SX(*),SY(*)
C***FIRST EXECUTABLE STATEMENT  SDOT
      SDOT = 0.0E0
      IF(N.LE.0)RETURN
      IF(INCX.EQ.0) IF(INCY.EQ.0) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1) IF(INCY.EQ.1) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5) IF(INCY.EQ.5) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.10) IF(INCY.EQ.10) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.20) IF(INCY.EQ.20) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.40) IF(INCY.EQ.40) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.80) IF(INCY.EQ.80) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.160) IF(INCY.EQ.160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.320) IF(INCY.EQ.320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.640) IF(INCY.EQ.640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1280) IF(INCY.EQ.1280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2560) IF(INCY.EQ.2560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5120) IF(INCY.EQ.5120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.10240) IF(INCY.EQ.10240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.20480) IF(INCY.EQ.20480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.40960) IF(INCY.EQ.40960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.81920) IF(INCY.EQ.81920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.163840) IF(INCY.EQ.163840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.327680) IF(INCY.EQ.327680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.655360) IF(INCY.EQ.655360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1310720) IF(INCY.EQ.1310720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2621440) IF(INCY.EQ.2621440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5242880) IF(INCY.EQ.5242880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.10485760) IF(INCY.EQ.10485760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.20971520) IF(INCY.EQ.20971520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.41943040) IF(INCY.EQ.41943040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.83886080) IF(INCY.EQ.83886080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.167772160) IF(INCY.EQ.167772160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.335544320) IF(INCY.EQ.335544320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.671088640) IF(INCY.EQ.671088640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1342177280) IF(INCY.EQ.1342177280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2684354560) IF(INCY.EQ.2684354560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5368709120) IF(INCY.EQ.5368709120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.10737418240) IF(INCY.EQ.10737418240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.21474836480) IF(INCY.EQ.21474836480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.42949672960) IF(INCY.EQ.42949672960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.85899345920) IF(INCY.EQ.85899345920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.171798691840) IF(INCY.EQ.171798691840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.343597383680) IF(INCY.EQ.343597383680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.687194767360) IF(INCY.EQ.687194767360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1374389534720) IF(INCY.EQ.1374389534720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2748779069440) IF(INCY.EQ.2748779069440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5497558138880) IF(INCY.EQ.5497558138880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.10995116277760) IF(INCY.EQ.10995116277760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.21990232555520) IF(INCY.EQ.21990232555520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.43980465111040) IF(INCY.EQ.43980465111040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.87960930222080) IF(INCY.EQ.87960930222080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.175921860444160) IF(INCY.EQ.175921860444160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.351843720888320) IF(INCY.EQ.351843720888320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.703687441776640) IF(INCY.EQ.703687441776640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1407374883553280) IF(INCY.EQ.1407374883553280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2814749767106560) IF(INCY.EQ.2814749767106560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5629499534213120) IF(INCY.EQ.5629499534213120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.11258999068426240) IF(INCY.EQ.11258999068426240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.22517998136852480) IF(INCY.EQ.22517998136852480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.45035996273704960) IF(INCY.EQ.45035996273704960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.90071992547409920) IF(INCY.EQ.90071992547409920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.180143985094819840) IF(INCY.EQ.180143985094819840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.360287970189639680) IF(INCY.EQ.360287970189639680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.720575940379279360) IF(INCY.EQ.720575940379279360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1441151880758558720) IF(INCY.EQ.1441151880758558720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2882303761517117440) IF(INCY.EQ.2882303761517117440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5764607523034234880) IF(INCY.EQ.5764607523034234880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.11529215046068469760) IF(INCY.EQ.11529215046068469760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.23058430092136939520) IF(INCY.EQ.23058430092136939520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.46116860184273879040) IF(INCY.EQ.46116860184273879040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.92233720368547758080) IF(INCY.EQ.92233720368547758080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.184467440737095516160) IF(INCY.EQ.184467440737095516160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.368934881474191032320) IF(INCY.EQ.368934881474191032320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.737869762948382064640) IF(INCY.EQ.737869762948382064640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1475739525896764129280) IF(INCY.EQ.1475739525896764129280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.2951479051793528258560) IF(INCY.EQ.2951479051793528258560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.5902958103587056517120) IF(INCY.EQ.5902958103587056517120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.11805916207174113034240) IF(INCY.EQ.11805916207174113034240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.23611832414348226068480) IF(INCY.EQ.23611832414348226068480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.47223664828696452136960) IF(INCY.EQ.47223664828696452136960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.94447329657392904273920) IF(INCY.EQ.94447329657392904273920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.188894659314785808547840) IF(INCY.EQ.188894659314785808547840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.377789318629571617095680) IF(INCY.EQ.377789318629571617095680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.755578637259143234191360) IF(INCY.EQ.755578637259143234191360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1511157274518286468382720) IF(INCY.EQ.1511157274518286468382720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3022314549036572936765440) IF(INCY.EQ.3022314549036572936765440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6044629098073145873530880) IF(INCY.EQ.6044629098073145873530880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.12089258196146291747061760) IF(INCY.EQ.12089258196146291747061760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.24178516392292583494123520) IF(INCY.EQ.24178516392292583494123520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.48357032784585166988247040) IF(INCY.EQ.48357032784585166988247040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.96714065569170333976494080) IF(INCY.EQ.96714065569170333976494080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.193428131138340667952988160) IF(INCY.EQ.193428131138340667952988160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.386856262276681335905976320) IF(INCY.EQ.386856262276681335905976320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.773712524553362671811952640) IF(INCY.EQ.773712524553362671811952640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1547425049106725343623905280) IF(INCY.EQ.1547425049106725343623905280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3094850098213450687247810560) IF(INCY.EQ.3094850098213450687247810560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6189700196426901374495621120) IF(INCY.EQ.6189700196426901374495621120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.12379400392853802748991242240) IF(INCY.EQ.12379400392853802748991242240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.24758800785707605497982484480) IF(INCY.EQ.24758800785707605497982484480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.49517601571415210995964968960) IF(INCY.EQ.49517601571415210995964968960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.99035203142830421991929937920) IF(INCY.EQ.99035203142830421991929937920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.198070406285660843983859875840) IF(INCY.EQ.198070406285660843983859875840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.396140812571321687967719751680) IF(INCY.EQ.396140812571321687967719751680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.792281625142643375935439503360) IF(INCY.EQ.792281625142643375935439503360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1584563250285286751870879006720) IF(INCY.EQ.1584563250285286751870879006720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3169126500570573503741758013440) IF(INCY.EQ.3169126500570573503741758013440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6338253001141147007483516026880) IF(INCY.EQ.6338253001141147007483516026880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.12676506002282294014967032053760) IF(INCY.EQ.12676506002282294014967032053760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.25353012004564588029934064107520) IF(INCY.EQ.25353012004564588029934064107520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.50706024009129176059868128215040) IF(INCY.EQ.50706024009129176059868128215040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.101412048018258352119736256430080) IF(INCY.EQ.101412048018258352119736256430080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.202824096036516704239472512860160) IF(INCY.EQ.202824096036516704239472512860160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.405648192073033408478945025720320) IF(INCY.EQ.405648192073033408478945025720320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.811296384146066816957890051440640) IF(INCY.EQ.811296384146066816957890051440640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1622592768292133633915780102881280) IF(INCY.EQ.1622592768292133633915780102881280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3245185536584267267831560205762560) IF(INCY.EQ.3245185536584267267831560205762560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6490371073168534535663120411525120) IF(INCY.EQ.6490371073168534535663120411525120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.12980742146337069071326240823050240) IF(INCY.EQ.12980742146337069071326240823050240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.25961484292674138142652481646100480) IF(INCY.EQ.25961484292674138142652481646100480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.51922968585348276285304963292200960) IF(INCY.EQ.51922968585348276285304963292200960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.103845937170696552570609926584401920) IF(INCY.EQ.103845937170696552570609926584401920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.207691874341393105141219853168803840) IF(INCY.EQ.207691874341393105141219853168803840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.415383748682786210282439706337607680) IF(INCY.EQ.415383748682786210282439706337607680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.830767497365572420564879412675215360) IF(INCY.EQ.830767497365572420564879412675215360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1661534994731144841129758825350430720) IF(INCY.EQ.1661534994731144841129758825350430720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3323069989462289682259517650700861440) IF(INCY.EQ.3323069989462289682259517650700861440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6646139978924579364519035301401722880) IF(INCY.EQ.6646139978924579364519035301401722880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.13292279957849158729038070602803445760) IF(INCY.EQ.13292279957849158729038070602803445760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.26584559915698317458076141205606891520) IF(INCY.EQ.26584559915698317458076141205606891520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.53169119831396634916152282411213783040) IF(INCY.EQ.53169119831396634916152282411213783040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.106338239662793269832304564822427566080) IF(INCY.EQ.106338239662793269832304564822427566080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.212676479325586539664609129644855132160) IF(INCY.EQ.212676479325586539664609129644855132160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.425352958651173079329218259289710264320) IF(INCY.EQ.425352958651173079329218259289710264320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.850705917302346158658436518579420528640) IF(INCY.EQ.850705917302346158658436518579420528640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1701411834604692317316873037158841057280) IF(INCY.EQ.1701411834604692317316873037158841057280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3402823669209384634633746074317682114560) IF(INCY.EQ.3402823669209384634633746074317682114560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6805647338418769269267492148635364229120) IF(INCY.EQ.6805647338418769269267492148635364229120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.13611294676837538538534984297270728458240) IF(INCY.EQ.13611294676837538538534984297270728458240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.27222589353675077077069968594541456916480) IF(INCY.EQ.27222589353675077077069968594541456916480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.54445178707350154154139937189082913832960) IF(INCY.EQ.54445178707350154154139937189082913832960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.108890357414700308308279874378165827665920) IF(INCY.EQ.108890357414700308308279874378165827665920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.217780714829400616616559748756331655331840) IF(INCY.EQ.217780714829400616616559748756331655331840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.435561429658801233233119497512663310663680) IF(INCY.EQ.435561429658801233233119497512663310663680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.871122859317602466466238995025326621327360) IF(INCY.EQ.871122859317602466466238995025326621327360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1742245718635204932932477990050653242654720) IF(INCY.EQ.1742245718635204932932477990050653242654720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3484491437270409865864955980101306485309440) IF(INCY.EQ.3484491437270409865864955980101306485309440) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.6968982874540819731729911960202612970618880) IF(INCY.EQ.6968982874540819731729911960202612970618880) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.13937965749081639463459823920405225941237760) IF(INCY.EQ.13937965749081639463459823920405225941237760) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.27875931498163278926919647840810451882475520) IF(INCY.EQ.27875931498163278926919647840810451882475520) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.55751862996326557853839295681620903764951040) IF(INCY.EQ.55751862996326557853839295681620903764951040) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.111503725992653115707678591363241807529902080) IF(INCY.EQ.111503725992653115707678591363241807529902080) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.223007451985306231415357182726483615059804160) IF(INCY.EQ.223007451985306231415357182726483615059804160) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.446014903970612462830714365452967230119608320) IF(INCY.EQ.446014903970612462830714365452967230119608320) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.892029807941224925661428730905934460239216640) IF(INCY.EQ.892029807941224925661428730905934460239216640) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1784059615882449851322857461811868920478433280) IF(INCY.EQ.1784059615882449851322857461811868920478433280) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.3568119231764899702645714923623737840956866560) IF(INCY.EQ.3568119231764899702645714923623737840956866560) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.7136238463529799405291429847247475681913733120) IF(INCY.EQ.7136238463529799405291429847247475681913733120) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.14272476927059598810582859694494951363827466240) IF(INCY.EQ.14272476927059598810582859694494951363827466240) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.28544953854119197621165719388989902727654932480) IF(INCY.EQ.28544953854119197621165719388989902727654932480) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.57089907708238395242331438777979805455309864960) IF(INCY.EQ.57089907708238395242331438777979805455309864960) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.114179815416476790484662877555959610910619729920) IF(INCY.EQ.114179815416476790484662877555959610910619729920) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.228359630832953580969325755111919221821239459840) IF(INCY.EQ.228359630832953580969325755111919221821239459840) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.456719261665907161938651510223838443642478919680) IF(INCY.EQ.456719261665907161938651510223838443642478919680) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.913438523331814323877303020447676887284957839360) IF(INCY.EQ.913438523331814323877303020447676887284957839360) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.1826877046663628647754606040895353774569915678720) IF(INCY.EQ.1826877046663628647754606040895353774569915678720) GO TO 5,20,60
      IF(INCX.EQ.36537540933272
```

```

      DO 30 I = 1,M
        SDOT = SDOT + SX(I)*SY(I)
30 CONTINUE
      IF( N .LT. 5 ) RETURN
40 MP1 = M + 1
      DO 50 I = MP1,N,5
        SDOT = SDOT + SX(I)*SY(I) + SX(I + 1)*SY(I + 1) +
1  SX(I + 2)*SY(I + 2) + SX(I + 3)*SY(I + 3) + SX(I + 4)*SY(I + 4)
50 CONTINUE
      RETURN
C
C   CODE FOR POSITIVE EQUAL INCREMENTS .NE.1.
C
60 CONTINUE
      NS=N*INCX
      DO 70 I=1,NS,INCX
        SDOT = SDOT + SX(I)*SY(I)
70 CONTINUE
      RETURN
      END
C
C*****
C
      REAL FUNCTION SNRM2(N,SX,INCX)
C***BEGIN PROLOGUE  SNRM2
C   THIS PROLOGUE HAS BEEN REMOVED FOR REASONS OF SPACE
C   FOR A COMPLETE COPY OF THIS ROUTINE CONTACT THE AUTHORS
C   From the book "Numerical Methods and Software"
C       by D. Kahaner, C. Moler, S. Nash
C       Prentice Hall 1988
C***END PROLOGUE  SNRM2
      INTEGER      NEXT
      REAL  SX(*), CUTLO, CUTHI, HITEST, SUM, XMAX, ZERO, ONE
      DATA  ZERO, ONE /0.0E0, 1.0E0/
C
      DATA CUTLO, CUTHI / 4.441E-16, 1.304E19 /
C***FIRST EXECUTABLE STATEMENT  SNRM2
      IF(N .GT. 0) GO TO 10
      SNRM2 = ZERO
      GO TO 300

```

```

C      10 ASSIGN 30 TO NEXT
      SUM = ZERO
      NN = N * INCX
C
C      BEGIN MAIN LOOP
      I = 1
20    GO TO NEXT,(30, 50, 70, 110)
30    IF( ABS(SX(I)) .GT. CUTLO) GO TO 85
      ASSIGN 50 TO NEXT
      XMAX = ZERO
C
C      PHASE 1. SUM IS ZERO
C
50    IF( SX(I) .EQ. ZERO) GO TO 200
      IF( ABS(SX(I)) .GT. CUTLO) GO TO 85
C
C      PREPARE FOR PHASE 2.
      ASSIGN 70 TO NEXT
      GO TO 105
C
C      PREPARE FOR PHASE 4.
C
100  I = J
      ASSIGN 110 TO NEXT
      SUM = (SUM / SX(I)) / SX(I)
105  XMAX = ABS(SX(I))
      GO TO 115
C
C      PHASE 2. SUM IS SMALL.
C      SCALE TO AVOID DESTRUCTIVE UNDERFLOW.
C
70    IF( ABS(SX(I)) .GT. CUTLO ) GO TO 75
C
C      COMMON CODE FOR PHASES 2 AND 4.
C      IN PHASE 4 SUM IS LARGE. SCALE TO AVOID OVERFLOW.
C
110  IF( ABS(SX(I)) .LE. XMAX ) GO TO 115
      SUM = ONE + SUM * (XMAX / SX(I))**2
      XMAX = ABS(SX(I))
      GO TO 200

```

```

C
115 SUM = SUM + (SX(I)/XMAX)**2
    GO TO 200
C
C
C      PREPARE FOR PHASE 3.
C
75 SUM = (SUM * XMAX) * XMAX
C
C
C  FOR REAL OR D.P. SET HITEST = CUTHI/N
C  FOR COMPLEX    SET HITEST = CUTHI/(2*N)
C
85 HITEST = CUTHI/FLOAT( N )
C
C      PHASE 3. SUM IS MID-RANGE. NO SCALING.
C
    DO 95 J = I, NN, INCX
    IF (ABS(SX(J)) .GE. HITEST) GO TO 100
95  SUM = SUM + SX(J)**2
    SNRM2 = SQRT( SUM )
    GO TO 300
C
200 CONTINUE
    I = I + INCX
    IF ( I .LE. NN ) GO TO 20
C
C      END OF MAIN LOOP.
C
C      COMPUTE SQUARE ROOT AND ADJUST FOR SCALING.
C
    SNRM2 = XMAX * SQRT(SUM)
300 CONTINUE
    RETURN
    END
C
C*****
C
SUBROUTINE SSCAL(N,SA,SX,INCX)
C***BEGIN PROLOGUE  SSCAL

```

```

C   THIS PROLOGUE HAS BEEN REMOVED FOR REASONS OF SPACE
C   FOR A COMPLETE COPY OF THIS ROUTINE CONTACT THE AUTHORS
C   From the book "Numerical Methods and Software"
C       by D. Kahaner, C. Moler, S. Nash
C       Prentice Hall 1988
C***END PROLOGUE  SSCAL
C
C       REAL SA,SX(*)
C***FIRST EXECUTABLE STATEMENT  SSCAL
C       IF(N.LE.0)RETURN
C       IF(INCX.EQ.1)GOTO 20
C
C       CODE FOR INCREMENTS NOT EQUAL TO 1.
C
C       NS = N*INCX
C       DO 10 I = 1,NS,INCX
C           SX(I) = SA*SX(I)
10    CONTINUE
C       RETURN
C
C       CODE FOR INCREMENTS EQUAL TO 1.
C
C
C       CLEAN-UP LOOP SO REMAINING VECTOR LENGTH IS A MULTIPLE OF 5.
C
C       20 M = MOD(N,5)
C       IF( M .EQ. 0 ) GO TO 40
C       DO 30 I = 1,M
C           SX(I) = SA*SX(I)
30    CONTINUE
C       IF( N .LT. 5 ) RETURN
C       40 MP1 = M + 1
C       DO 50 I = MP1,N,5
C           SX(I) = SA*SX(I)
C           SX(I + 1) = SA*SX(I + 1)
C           SX(I + 2) = SA*SX(I + 2)
C           SX(I + 3) = SA*SX(I + 3)
C           SX(I + 4) = SA*SX(I + 4)
50    CONTINUE
C       RETURN

```

```

      END
C
C*****
C
      SUBROUTINE SSWAP(N,SX,INCX,SY,INCY)
C***BEGIN PROLOGUE  SSWAP
C   THIS PROLOGUE HAS BEEN REMOVED FOR REASONS OF SPACE
C   FOR A COMPLETE COPY OF THIS ROUTINE CONTACT THE AUTHORS
C   From the book "Numerical Methods and Software"
C       by D. Kahaner, C. Moler, S. Nash
C       Prentice Hall 1988
C***END PROLOGUE  SSWAP
C
      REAL SX(*),SY(*),STEMP1,STEMP2,STEMP3
C***FIRST EXECUTABLE STATEMENT  SSWAP
      IF(N.LE.0)RETURN
      IF(INCX.EQ.INCY) IF(INCX-1) 5,20,60
      5 CONTINUE
C
C   CODE FOR UNEQUAL OR NONPOSITIVE INCREMENTS.
C
      IX = 1
      IY = 1
      IF(INCX.LT.0)IX = (-N+1)*INCX + 1
      IF(INCY.LT.0)IY = (-N+1)*INCY + 1
      DO 10 I = 1,N
          STEMP1 = SX(IX)
          SX(IX) = SY(IY)
          SY(IY) = STEMP1
          IX = IX + INCX
          IY = IY + INCY
      10 CONTINUE
      RETURN
C
C   CODE FOR BOTH INCREMENTS EQUAL TO 1
C
C
C   CLEAN-UP LOOP SO REMAINING VECTOR LENGTH IS A MULTIPLE OF 3.
C
      20 M = MOD(N,3)

```

```

      IF( M .EQ. 0 ) GO TO 40
      DO 30 I = 1,M
        STEMP1 = SX(I)
        SX(I) = SY(I)
        SY(I) = STEMP1
      30 CONTINUE
      IF( N .LT. 3 ) RETURN
      40 MP1 = M + 1
      DO 50 I = MP1,N,3
        STEMP1 = SX(I)
        STEMP2 = SX(I+1)
        STEMP3 = SX(I+2)
        SX(I) = SY(I)
        SX(I+1) = SY(I+1)
        SX(I+2) = SY(I+2)
        SY(I) = STEMP1
        SY(I+1) = STEMP2
        SY(I+2) = STEMP3
      50 CONTINUE
      RETURN
      60 CONTINUE
C
C   CODE FOR EQUAL, POSITIVE, NONUNIT INCREMENTS.
C
      NS = N*INCX
      DO 70 I=1,NS,INCX
        STEMP1 = SX(I)
        SX(I) = SY(I)
        SY(I) = STEMP1
      70 CONTINUE
      RETURN
      END
C*****
C
      SUBROUTINE ARRAYS(A,DERIVS,STRAD,NPTS,NP,LUNOUT)
C
C   ESTA SUBROUTINE IMPRIME AS MATRIZES DE PRIMEIRA E SEGUNDA DERIVADAS,
C   SE FOREM REQUERIDAS NA SUBROUTINE BATES
C
      INTEGER NPTS,NP,LUNOUT,I,J,K

```

```

        DIMENSION A(NPTS,2,2),DERIVS(NPTS,2)

C
C   IMPRIME AS PRIMEIRAS DERIVADAS
C
        WRITE(LUNOUT,20)
        DO 100 I=1,NPTS
            WRITE(LUNOUT,30) I,(DERIVS(I,J),J=1,NP)
100    CONTINUE
C
C   IMPRIME AS SEGUNDAS DERIVADAS
C
        WRITE(LUNOUT,40)
        DO 200 I=1,NP
            WRITE(LUNOUT,50) I
            DO 300 J=1,NP
                WRITE(LUNOUT,60)(A(I,J,K),K=1,NP)
300    CONTINUE
200    CONTINUE
C
C   IMPRIME O RAO PADRONIZADO
C
        WRITE(LUNOUT,10) STRAD
        RETURN
C
C
10    FORMAT(////1H ,10X,13HRAIO PADRAO =,E13.6)
20    FORMAT(////1H ,10X,34HPRIMEIRAS DERIVADAS (PADRONIZADAS)//1H ,
        +10HDATA POINT)
30    FORMAT(1H ,I10,10X,8E12.5/(1H ,20X,8E12.5))
40    FORMAT(////1H ,10X,33HSEGUNDAS DERIVADAS (PADRONIZADAS)//1H ,
        +10HDATA POINT)
50    FORMAT(1H ,I5)
60    FORMAT(1H ,10X,8E12.5/(1H ,10X,8E12.5))
        END

```

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, S. I.; TAKAGI, M. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. Biotechnology and Bioengineering, v.37, p. 93-96, 1991.
- AESCHLIMANN, A., VON STOCKAR, U. The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Biotechnology Letters, v. 11, p. 195-200, 1989.
- ÅKERBERG, C.; HOFVENDAHL, K.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ATCC 19435 in whole wheat flour. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 49, p. 682-690, 1998.
- ALVES FILHO, M. A nata do soro. Jornal da Unicamp, Campinas, Brasil, 14-20 out. 2002.
- AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 40, p. 644-649, 1994.
- AMRANE, A., PRIGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 14, p. 529-534, 1998.
- AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. Process Biochemistry, v. 34, n. 1, p. 1-10, 1999.
- AMRANE, A. Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology, v. 7, n. 28, p. 827-834, 2001.

- AMRANE, A. Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 80, p. 345-352, 2005.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical engineering fundamentals. 2^a ed. McGraw-Hill, 1986.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, n. 101, p. 277-294, 1994.
- BARROZO, M. A. S. Transferência de calor e massa entre o ar e sementes de soja em leito deslizante e escoamentos cruzados. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 1995.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial volume II – Engenharia Bioquímica. Edgard Blucher Ltda, 2001.
- BRODY, E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. British Journal of Nutrition, V. 84, P. 39-46(8), November, 2000.
- BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiology, v. 14, n. 4, p. 313-326, 1997.
- BURGOS-RUBIO, C.; OKOS, M. R.; WANKAT, P. C. Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnology Progress, v. 16, p. 305-314, 2000.
- BUSTOS, G.; MOLDES, A. B.; ALONSO, J. L.; VÁZQUEZ, M. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. Food Microbiology, v. 21, n. 2, p. 143-148, 2004.

CASABLANCAS, F. G.; SANTÍN, J. L. Ingeniería Bioquímica. Editorial Sintesis, 1998.

CHANG, D.E.; JUNG, H.C.; RHEE, J.S.; PAN, J.G. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *E. coli* RR. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, p. 1384-1389, 1999.

CHATTERJEE, M. CHAKRABARTY, B. D.; MANDAL, R. K. Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. Biotechnology Letters, v. 19, p. 873-874, 1997.

CHIARINI, L.; MARA, L.; TABACCHIONI, S. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 36, p. 461-464, 1992.

CORRADINI, M. G.; AMÉZQUITA, A.; NORMAND, M. D.; PELEG, M. Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. International Journal of Food Microbiology, v. 106, p. 223-228, 2006.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potencial of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Reviews, v. 16, p. 221-231, 1995.

DAVIDSON, B.E.; LIANOS, R.M.; CANCELLA, M.R.; REDMAN, N.C. and HILLIER, A.J. Current research on the genetics of lactic acid production by lactic acid bacteria. International Dairy Journal, v. 5, n. 8, p. 763-784, 1995.

DRIDER, D.; BEKAL, S.; PRÉVOST, H. Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genetic and Molecular Research*, v. 3, n. 2, p. 273-281, 2004.

EL SABAENY, A. H. Influence of medium composition on lactic acid production from dried whey by *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiologia*, v. 12, p. 411-416, 1996.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual on the Use of the LP-System in Milk Handling and Preservation, Rome, 1999.

FERAIN, T.; GRMYN, D.; BERNARD, N.; HOES, P. and DELCOUR, J. *Lactobacillus plantarum* *ldhL* gene: Overexpression and deletion. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 596-601, 1994.

FU, W. ; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, v. 3, p. 163-170, 1999.

FUJIKAWA, H.; KAIM, A.; MOROZUMI, S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiology*, v. 21, p. 501-509, 2004.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 62, p. 479-490, 1987.

GIRAUD, E.; CHAMPAILLER, A.; RAIMBAULT, M. Degradation of raw starch by a wild amyloytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 60, p. 4319-4323, 1994.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. *Brasil Alimentos*, n. 10, Setembro-Outubro, p. 43-46, 2001.

- GIUREA, A.; KLEIN, T. J.; CHEN, A. C.; GOOMER, R. S.; COUTTS, R. D.; AKESON, W. H.; AMIEL, D.; SAH, R. L. Adhesion of perichondrial cells to a polylactic acid scaffold. Journal of Orthopaedic Research, v. 21, n. 4, p 584-589, 2003.
- GOMES, M. C. Modelos Biomatemáticos - crescimento com regulação em reprodutores contínuos. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2003.
- GONÇALVES, L. M. D.; XAVIER, A. M. R. B.; ALMEIDA, J. S.; CARRONDO, M. J. T. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology, v. 13, p. 314-319, 1991.
- GUERRA, N. P.; PASTRANA, L. Dynamics of pediocin biosynthesis in batch fermentation on whey. Eletronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, v. 1, n. 2, 2003.
- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial volume II – Engenharia Bioquímica. Edgard Blucher Ltda, 2001.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. Enzyme and Microbial Technology, v. 20, p. 301-307, 1997.
- HOFVENDAHL, K.; ÅKERBERG, C.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. HAHN-HÄGERDAL, B. Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 52, p. 163-169, 1999.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable sources. Enzyme and Microbial Technology, v. 26, p. 87-107, 2000.

- HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y. Y.; LEISOLA, M. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+) (S)- lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 56, p. 126-130, 2001.
- ISHIZAKI, A.; VONKTAVEESUK, P. Optimization of substrate feed for continuous production of lactic acid by *Latococcus lactis* IO-1. Biotechnology Letters, v. 18, p. 1113-1118, 1996.
- JAVANAINEN, P.; LINKO, Y-Y. Lactic acid fermentation on barley flour without additional nutrients. Biotechnology Techniques, v. 9, p. 543-548, 1995.
- JEFF WU, C. F., HAMADA, M. Experiments: Planning, Analysis, and Parameter Design Optimization. John Wiley & Sons, New York, 2000.
- KASHEKT, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmatic pH and osmotolerance. FEMS Microbiology Review, v. 46, p. 233-244, 1987.
- KAUFMAN, E-N.; COOPER, S. P.; BUDNER, M. K.; RICHARDSON, G. R. Continuous and simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in a biparticle fluidized-bed bioreactor. Applied Biochemical and Biotechnology, v. 57-58, p. 503-515, 1996.
- KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. Journal of Dairy Science, v. 62, p. 1149-1160, 1979.
- KRISCHKE, W.; SCHRÖDER, M.; TRÖSCH, W. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* spp. *casei*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 573-578, 1991.
- KRISHNAN, S.; BHATTACHARYA, S.; KARANTH, N.G. Media optimisation for production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 using response surface methodology. Food Biotechnology, v. 12, n. 1-2, Mar-Jul, p. 105-121, 1998.

- KULOZIK, U.; WILDE, J. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Enzyme and Microbial Technology, v. 24, p. 297-302, 1999.
- KUROSAWA, H.; ISHIKAWA, H.; TANAKA, H. L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. Biotechnology and Bioengineering, v. 31, p. 183-187, 1988.
- LAM, K. H.; NIJENHUIS, A. J.; BARTELS, H.; POSTEMA, A. R.; JONKMAN, M. F.; PENNING, A. J.; NIEUWENHUIS, P. Reinforced poly(L-lactic acid) fibres as suture material. Journal of Applied Biomaterials, v. 6, n. 3, p. 191-197, 1995.
- LAPIERRE, L.; GERMOND, J.E.; OTT, A.; DELLEY M. and MOLLET, B. D-Lactate dehydrogenase gene (*ldhD*) inactivation and resulting metabolic effects in the *Lactobacillus johnsonii* strains La 1 and N 312. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n. 9, p. 4002-4007, 1999.
- LEE, E. G.; MOON, S. H.; CHANG, Y. K.; YOO, I. K.; CHANG, H. N. Lactic acid recovery using two stage electrodialysis and its modeling. Journal of Membrane Science, nº 145, p. 53-66, 1998.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 3ª ed. Sarvier, 2002.
- LIU, C.; LIU, Y.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN, S. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 113-116, p. 627-638, 2004.
- LIU, X.; SMITH, L.; WEI, G.; WON, Y.; MA, P. X. Surface engineering of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds via self-assembly technique for bone tissue engineering. Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 1, n. 1, p. 54-60, 2005.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. Biotechnology and Bioengineering, v. 67, n. 6, p. 636-644, 2000.

Reprinted from Journal of Biochemical and Microbiological Technology Engineering v. I, n. 4, p. 393-412, 1959.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M.. Manual de Indústrias de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

MALTHUS, T. An Essay on the Principle of Population. London, printed for J. Johnson, in St. Paul's Church-Yard, 1798.

MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. Bioresource Technology, v. 47, n. 3, p. 195-203, 1994.

MAZUCHELI, J.; ACHCAR, J. A. Algumas considerações em regressão não linear. Acta Scientarium, v. 24, n. 6, p. 1761-1770, 2002.

MCBEAN, L., D. The Dairy Council Digest Archives: Emerging health benefits of whey. National Dairy Council, 2003.

MCCANN, K. B.; LEE, A.; WAN, J. Antiviral activity of milk proteins. Australian Journal of Dairy Technology, v. 52, p. 109-118, 2001.

MI-YOUNG, H.; KIM, S.; LEE, Y.; KIM, M.; KIM, S. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/ corn steep liquor/ glicose medium. Bioscience and Bioengineering, v. 96, n. 2, p. 134-140, 2003.

MONTGOMERY. D. C. Design and analysis of experiments. 3ª ed. John Wiley and Sons, 1991.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. Química Orgânica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. p. 152-200.

MUSASHINO CHEMICAL LABORATORY, LTDA. Disponível na Internet via WWW.
URL: <http://www.musashino.com/english/products/lactate>. Arquivo capturado em 15 de maio de 2006.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Respose surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2ª ed. New York: John Wiley and Sons, 2002.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology, v. 7, n. 2, August, 2004.

NAVEENA, B. J.; ALTAF, Md.; BHADRAYYA, K.; MADHAVENDRA, S. S.; REDDY, G. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimisation using RSM. Process Biochemistry, v. 40, p. 681-690, 2005.

NEXANT CHEMSYSTEMS. Biotech routes to lactic acid / polylactic acid. Process Evaluation/Research Planning Program, June, 2002.

NIKKILA, K.K.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. PALVA, A. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+) lactic acid. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, p. 3835-3841, 2000.

NOMURA, Y.; IWAHARA, M.; HONGO, M. Lactic aci production by electrodialysis fermentation using immobilized growing cells. Biotechnology and Bioengineering, v. 30, p. 788-793, 1987.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. Kinetic study of continuos whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology, v. 16, p. 457-466, 1994.

- OYETAYO, V.O. Phenotypic characterisation and assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources African Journal of Biotechnology, v. 3, n. 7, p. 355-357, 2004.
- PAPA, J. L. Visão geral: tratamento de efluentes em laticínios. In: Seminário “Efluentes de Laticínios: Alternativas Tecnológicas e Viabilidade Econômica”. ITAL, 29-30/06/2000.
- PARAJÓ, J. C.; ALONSO, J. L.; MOLDES, A. B. Production of lactic acid from lignocellulose in a single stage of hydrolysis and fermentation. Food Biotechnology, v.11, p. 45-48, 1997.
- PRITCHARD, G. G., COOLBEAR, T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review, v. 12, p. 179-206, 1993.
- RATKOWSKY, D. A. Nonlinear Regression Models. New York: Marcel Dekker, 1983.
- RÉVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M. A. Z. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. Ciência e Tecnologia dos Alimentos, v 20, n 2, May-August, 2000.
- ROY, M., K.; KUWABARA, Y.; HARA, K.; WATANABE, Y.; TORNAI, Y. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. Journal of Dairy Science, v. 85, p. 2065-2074, 2002.
- SCHEPERS, A. W.; THIBAUT, J.; LACROIX, C. *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis. Enzyme and Microbial Technology, v. 30, p. 176-186, 2002.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technology, v. 57, p.1-11, 1996.

- SODEGARD, A. Preparation of poly (L-lactide-graft-acrylic acid) by pre-irradiation grafting. Polymer Preparation, v. 39, p. 215-216, 1998.
- TANGO, M. S. A.; GHALY, A. E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. Biomass and Bioenergy, v. 16, p. 61-78, 1999a.
- TANGO, M. S. A.; GHALY, A. E. Kinetic modeling of lactic acid production from batch submerged fermentation of cheese whey. Transactions of the ASAE, v. 42, n. 6, p. 1791-1800, 1999b.
- TANGO, M. S. A.; GHALY, A. E. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro aeration. Biomass and Bioenergy, v. 17, p. 221-238, 1999c.
- TÉLLEZ-LUIS, S. J.; MOLDES, A. B.; ALONSO, J. L.; VÁZQUEZ, M. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* through response surface methodology. Journal of Food Science, n. 68, v. 4, p 1454-1458, 2003.
- TRINDADE, M. C. Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica das membranas líquidas surfatantes. Dissertação de mestrado. 106 p. Escola de Engenharia da UFMG. Belo Horizonte, 2002.
- UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Reference Manual for U.S. Whey And Lactose Products . Arlington, VA, 2004.
- VENKATESH, K. V.; OKOS, M. R.; WANKAT, P.C. Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*. Process Biochemistry, v. 28, p. 231-241, 1993.
- VERHULST, P. F., Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement, Correspondance Mathématique et Physique, Tome X, pp. 113-121, 1838.

- WACHENHEIN, D. E.; PATTERSON, J. A.; LADISCH, M. R. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. Bioresource Technology, v. 86, p. 157-164, 2003.
- WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 6-35.
- YOO, I. K.; CHANG, H. N.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K.; MOON, S-H. Byproduct formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*. Biotechnology Letters, v. 19, p. 237-240, 1997.
- YUMOTO, I.; IKEDA, K. Direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. Biotechnology Letters, v.17, p. 543-546, 1995.
- ZHANG, D. X.; CHERYAN, M. Direct fermentation of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*. Biotechnology Letters, v. 13, p. 733-738, 1991.