



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PARAIBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

ANDRÉ DE BRITO CARVALHO

**REDE NEURAL PARA PREVISÃO DE VELOCIDADE DE
PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DA AMPICILINA**

**JOÃO PESSOA - PB
2018**

ANDRÉ DE BRITO CARVALHO

**REDE NEURAL PARA PREVISÃO DE VELOCIDADE DE PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DA AMPICILINA**

Trabalho Final de Curso, apresentado à
Coordenação do Curso de Engenharia
Química, do Centro de Tecnologia, da
Universidade Federal da Paraíba em
cumprimento às exigências para obtenção do
título de Engenheiro Químico.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

**JOÃO PESSOA - PB
2018**

C331e Carvalho, André de Brito

Rede Neural para Previsão de Velocidade de Produção Enzimática da Ampicilina. / André de Brito Carvalho. – João Pessoa, 2018.

72f. il.:

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira.

Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Química)
Campus I - UFPB / Universidade Federal da Paraíba.

1 antibiótico 2. ampicilina 3. cinética enzimática, 4 redes neural. I. Título.

BS/CT/UFPB

CDU: 2.ed. 621(043)

ANDRÉ DE BRITO CARVALHO

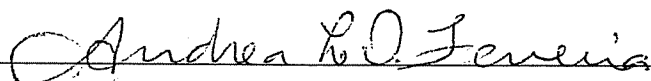
**REDE NEURAL PARA PREVISÃO DE VELOCIDADE DE PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DA AMPICILINA**

Trabalho Final de Curso, apresentado à
Coordenação do Curso de Engenharia
Química, do Centro de Tecnologia, da
Universidade Federal da Paraíba em
cumprimento às exigências para obtenção
do título de Engenheiro Químico.

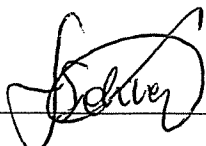
Orientadora: Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

Aprovada em 25 de Junho de 2018

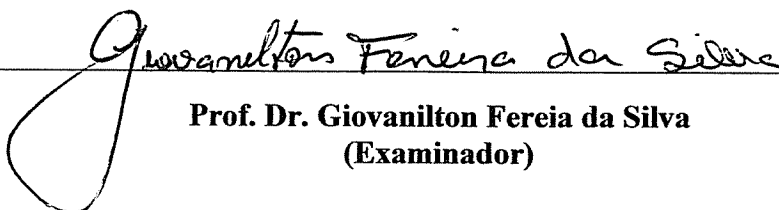
BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira
(Orientador)**



**Msc. Fernanda da Silva Oliveira
(Examinador)**



**Prof. Dr. Giovanilton Ferreira da Silva
(Examinador)**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me concedido saúde, força e perseverança necessária para que eu superasse todas as adversidades e seguisse em frente rumo à conquista de mais uma importante etapa na minha vida.

A minha mãe Eunice e ao meu irmão Vitor.

A minha orientadora Professora Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

A minha namorada

A todos os amigos, que muito apoiaram e contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta graduação.

Aos membros da Banca Examinadora, por aceitarem o convite de participar da etapa final deste trabalho.

RESUMO

Os antibióticos correspondem a maior rede de produção da indústria farmacêutica utilizados na medicina humana e veterinária, principalmente na avicultura e na suinocultura. A produção enzimática de antibióticos é complexa e não linear. Conseqüentemente, sua modelagem possui equações de velocidade com grande número de parâmetros. Nesse contexto, as redes neurais surgem como uma alternativa aos modelos cinéticos convencionais. Trata-se de uma ferramenta computacional que apresenta modelos matemáticos inspirados nos neurônios humanos, o que permite, após treinamento, auxiliar no estudo e aprimoramento dos dados de produção. A aplicação de redes neurais em processos biotecnológicos vem sendo utilizada por anos, podendo ser utilizada para estimar variáveis de estado, determinar fases biológicas, monitorar reatores bioquímicos. Este trabalho utilizou a metodologia de rede neural para obter modelo cinético para a síntese enzimática de ampicilina a partir de éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico catalisada por penicilina G acilase imobilizada em quitosana. A metodologia para o treinamento e simulação da rede neural usada neste trabalho iniciou-se com a obtenção de uma base de dados de velocidades de produção do antibiótico (Ampicilina), de hidrólises do reagente e do produto. A base de dados foi montada em pares de dados de concentração e velocidade para formação da matriz de treinamento, simulação e validação. Para modelar a rede neural foram utilizados comandos no Silab. O número de camadas ocultas, o número de neurônios e o modelo matemático foram definidos para a realização do treinamento, simulação e validação da rede neural. Foram testadas diferentes funções de transferência e a função Pureling mostrou-se a menos precisa. Foram realizados múltiplos treinamentos mudando os seus parâmetros com o objetivo de se obter a melhor combinação de forma a prever a velocidade de produção do antibiótico. A configuração que obteve os melhores resultados em relação aos erros foi usando a função transferência tansig e com 100 neurônios na camada oculta.

Palavras-chaves: antibiótico, ampicilina, cinética enzimática, rede neural.

ABSTRACT

The antibiotics correspond to the largest production network of the pharmaceutical industry used in human and veterinary medicine, mainly in poultry and swine farming. The enzymatic production of antibiotics is complex and non-linear. Therefore, its modelling owns rate equations with a large number of parameters. In this context, neural networks emerge as an alternative to conventional kinetic models. It is a computational tool that presents mathematical models inspired by human neurons, which allows, after training, to assist in the study and improvement of production data. The application of neural networks in biotechnological processes has been used for years, in order to estimate state variables, to determine biological phases, and to monitor biochemical reactors. The present study utilized the neural network methodology to obtain a kinetic model for the enzymatic synthesis of ampicillin from phenylglycine methyl ester and 6-aminopenicillanic acid catalyzed by penicillin G acylase, immobilized on chitosan. The methodology for the training and simulation of the neural network used in this study began with obtaining a database of antibiotic production rates (Ampicillin), hydrolysis of the reagent and the product. The database was assembled in pairs of concentration and velocity data to form a matrix of training, simulation and validation. Commands in Silab were used to shape the neural network. The number of hidden layers, the number of neurons and the mathematical model were defined for the training, simulation and validation of the neural network. Different transfer functions were tested and the Pureling function proved to be the less precise. Multiple training sessions were accomplished, changing its parameters, in order to obtain the best combination to predict the rate of antibiotic production. The transfer function Tansig, with 100 neurons in the hidden layer, provided the configuration that obtained the best results, in regards to the errors.

Keywords: Antibiotic, ampicilina, enzymatic Kinetics,

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	9
2- OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 ANTIBIÓTICOS.....	11
3.1.1 HISTÓRICO.....	11
3.1.2 MODOS DE PRODUÇÃO.....	12
3.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA	15
3.3 Rede Neural Artificial.....	17
3.3.1 APRENDIZADO.....	21
3.3.2 VELOCIDADE DE APRENDIZADO.....	22
3.3.3 ALGORITMOS DE APRENDIZAGEM.....	23
4- METODOLOGIA.....	25
5- RESULTADOS.....	29
5.1 FENILGLICINA.....	29
5.2 ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO.....	32
5.3 AMPICILINA.....	34
5.4 ESTER METÁLICO DE FENILGLICINA.....	36
6- CONCLUSÕES.....	39

1- INTRODUÇÃO

A luta contra infecções bacterianas só tornou-se possível com a descoberta dos antibióticos. A descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, foi um marco para salvar os soldados da primeira guerra mundial. Contudo, a produção na época era lenta, e só a partir de 1940 que o fármaco se tomou disponível para mundo.

Dados atuais, mostram que a venda de antibiótico é responsável por 40% das vendas da indústria farmacêutica. Uma análise dessas vendas de remédios em 76 países revelou que o uso de antibióticos ao redor do globo subiu em média 65% entre 2000 e 2015. Em 2013, o mercado farmacêutico global foi estimado em 1 trilhão de dólares, e no Brasil em cerca de 35 bilhões de dólares. Esperava-se para 2017 um crescimento médio mundial do setor farmacêutico de 4% ao ano, nos principais países da Europa estimava-se que seria entre 1-2% ao ano, já para o Brasil previa-se 10% ao ano no mesmo período (IMS HEALTH, 2012).

O grande consumo de antibióticos, muitas vezes sem controle médico, seleciona cepas bacterianas resistentes a estas drogas, sendo necessária constantes pesquisas visando a descoberta de medicamentos mais eficientes. Portanto, o conhecimento da produção de antibióticos via rotas mais ambientalmente amigáveis é de valor estratégico. No entanto, a cinética da síntese enzimática de antibióticos é complexa e não linear. Conseqüentemente, sua modelagem possui equações de velocidade com grande número de parâmetros.

Nesse contexto, as redes neurais surgem como uma alternativa aos modelos cinéticos convencionais. Trata-se de uma ferramenta computacional que apresenta modelos matemáticos inspirados nos neurônios humanos, o que permite, após treinamento, auxiliar no estudo e aprimoramento dos dados de produção. A aplicação de redes neurais em processos biotecnológicos vem sido utilizada por anos, podendo ser utilizada para estimar variáveis de estado, determinar fases biológicas, monitorar reatores bioquímicos (KARIM, 1997).

Este trabalho utilizou a metodologia de rede neural para obter modelo cinético para a síntese enzimática de ampicilina a partir de éster metílico de fenilglicina (EMFG) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) catalisada por penicilina G acilase imobilizada em quitosana.

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Prever a velocidade de produção de ampicilina usando rede neural como ferramenta de análise.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a programação de rede neural utilizando software Silab;
- Implantar em computador através de rede neural a cinética para representar a síntese do antibiótico;
- Treinar e simular rede neural desenvolvida frente aos dados experimentais e
- Validar a rede neural usando novos conjuntos de dados de síntese em condição diferente da treinada pela rede.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTIBIÓTICOS

2.1.1 HISTÓRICO

A descoberta do primeiro antibiótico, em 1928, foi feita por Alexander Fleming, um médico microbiologista londrino. Fleming havia trabalhado como médico em hospitais militares durante a Primeira Guerra Mundial e, buscava, uma substância que pudesse amenizar a dor causada por infecções bacterianas em soldados (JORNAL, 2009).

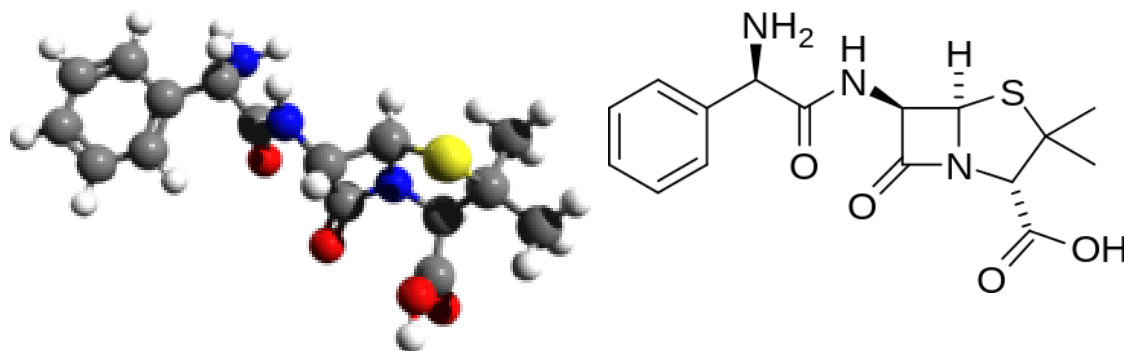
Devido às dificuldades de se produzir penicilina em quantidade satisfatória para ser usada no tratamento de pacientes, causou desinteresse da descoberta de Fleming pela comunidade científica. Foi somente com a eclosão da Segunda Guerra Mundial, em 1939, que dois cientistas, Howard Florey e Ernst Chain, durante 11 anos conseguiram produzir isolar e purificar a penicilina e fornecer uma produção em escala industrial. Começando imediatamente a ser administrado em casos de pneumonia, difteria, sífilis, gonorreia, escarlatina e em muitas outras infecções (AMINOV, 2010; DAVIES E DAVIES, 2010).

Os antimicrobianos são substâncias naturais (antibióticos) ou sintetizados (quimioterápicos) que inibem o crescimento ou causando destruição do microrganismo (SAÉZ-LLORENS,2002). Podem ser classificados como bactericida quando causam a morte do microrganismo ou bacteriostático quando inibem seu crescimento (WALSH,2003). São classificadas quimicamente como, derivados de aminoácidos de açúcares, de acetatos, de propianatos, entre outros (Tavares,1990).

Os antibióticos correspondem a maior rede de produção da indústria farmacêutica utilizados na medicina veterinária e humana (BASTOS, 2012). Sendo largamente usando no tratamento de animais, principalmente na avicultura e na suinocultura (GARCIA-GALAN, 2008). Por trazerem benefícios e malefícios, os antibióticos são obrigados a serem vendidos sobre prescrição médica no Brasil, o que não acontece em alguns países nos quais a venda é livre sem receita médica, sendo esse um dos principais fatores que facilitam o desenvolvimento de resistência bacteriana e muitas vezes a ineficácia dos tratamentos (SOBRVIME, 2001). Atualmente, quando se fala em resistência aos antibióticos, quase que exclusivamente se quer dizer resistência aos antibacterianos em geral, de origem natural, semissintética ou sintética (HEADS OF MEDICINES AGENCIES - HMA, 2012; WHITE, 2012) e segundo estudos de WANMACHER (2004)

mesmo quando são prescritos por médicos 50% dos casos não se faz necessário o uso de antibióticos. A Figura 3.1 mostra a estrutura molecular da ampicilina, antibiótico objeto de estudo deste trabalho.

Figura 3.1 - Estrutura da Ampicilina: (a) estrutura 3D; (b) estrutura molecular



Fonte:

(a)

(b)

2.1.2 MODOS DE PRODUÇÃO

Em comparação aos modos de produção, a indústria química ainda é superior em razão de rendimento das reações que a indústria bioquímica que trabalha ainda com baixos rendimentos, devido que processos envolvendo microrganismos precisam de mecanismos regulatórios complexos (Ferreira, 2003). O desenvolvimento de linhagens mutantes altamente produtivas, a aplicação da tecnologia do DNA-recombinante, melhoramentos na transferência de oxigênio, desenvolvimento de meios de fermentação e estratégias de alimentação de nutrientes, tem proporcionado significativos aumentos de produtividade (Skatrud et al., 1997).

As penicilinas podem ser divididas em três grupos: as biossintéticas, as semi-sintéticas e as sintéticas.

- Biossintética

As penicilinas Biossintética podem ser adquiridas diretamente por meio de caldo de cultura de bioprocessos com diferentes estruturas, as mais utilizadas são as penicilinas G e penicilinas V já que possuem mais interesse clínico. Suas cadeias laterais se diferem pelo radical que está ligada ao ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (SWARTZ, 1985).

A forma mais comum de produção de antibióticos e de culturas é a forma submersa em tanques de agitação mecânica e com ou sem aeração. Em uma fermentação tradicional a maior parte da biomassa requerida para uma velocidade ótima de síntese de antibiótico é obtida durante as primeiras 60-80 horas sendo sua produção total atingindo as 160 horas (CALAM, 1987). Podendo haver uma otimização do processo através de melhorias nos sistemas de agitação e aeração (ELANDER, 1989).

Os processos em regime batelada alimentada com suplementação contínua ou intermitente de nutrientes tem sido empregadas para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem: o controle da quantidade de nutrientes no início da fermentação para garantir que a demanda de oxigênio durante a fase de crescimento não exceda a capacidade de transferência de oxigênio do fermentador; evitar altas concentrações de alguns nutrientes que sejam inibidores ou causem precipitações indesejáveis; regular o metabolismo do microrganismo para aumentar a formação do produto (BAILEY E OLLIS, 1986). O regime em batelada alimentada é empregado também em fermentações onde são distintos os nutrientes necessários para as 19 fases de crescimento e de formação de produto (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

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

- Semissintéticas

As penicilinas semissintéticas são compostas pelos 6-APA e um radical para compor a cadeia lateral, e podem ser adquiridas pela alteração da cadeia lateral das penicilinas biossintéticas e podem ser obtidas por via química e enzimática (HERSBACH

ET AL. 1984). Sendo a via química a utilizada industrialmente a qual precisa grande quantidade de solvente caros e tóxicos, gerando danos ambientais. Sendo a via enzimática o caminho mais ambientalmente amigável.

- Alternativa enzimática

Os principais grupos dos antibióticos de uso médicos são os antibióticos β -lactâmicos, tetracíclicas, aminoglicídeos, macrolídeos, peptídios-cíclicos, estreptograminas e os antibióticos sintéticos. Neste trabalho focou-se no tipo β -lactâmicos (ampicilina). Este representa a maior produção dentre os outros grupos, devido sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade, este possui um anel enzimático comum o β -lactâmico a qual confere a atividade antibacteriana, que atua na inibição da síntese do peptidoglicano, visto que atuam na parede celular não atacando as células eucariontes do ser humano. O anel β -lactâmico pode estar fundido com diversos anéis e elementos que formam uma família deste grupo tais como; penicilina V e G , Meticilina, Oxacilina, Ampicilina , Amoxicilina entre outros (Guimarães *et al.*,2010). A ampicilina é o antibiótico mais usado do grupo β -lactâmicos por ter alto aspecto de atividade, alta solubilidade, alta taxa de absorção e satisfatória estabilidade em condições ácidas. Seu processo de fabricação industrial é realizado por síntese química , este recurso complexo que precisa de proteção no grupo α -amido , temperaturas muito baixas (-30 °C) e produtos químicos muito tóxicos que se tornaram rejeitos como diclorometano, piridina e dimetilamina (OSPINA *et al.*,1996). A cefalexina que possui média anual no mundo de consumo de 3000 toneladas por ano gera entre 30 a 40 kg de resíduo por kg de produto. Considerando que a química fina utiliza reagentes tóxicos e tem um baixo rendimento como provado no Fator E da Tabela 1, então a busca por novas formas de produção é necessária (WEGMAN *et al.*, 2001).

Deste modo, a procura por alternativas catalíticas mais limpas que reduzam ou eliminem a produção de resíduos, principalmente inorgânicos, evitando especialmente o uso de substâncias tóxicas e/ou reagentes perigosos, levando em consideração também o ponto de vista cinético e termodinâmico é de suma importância (OSPINA ET AL.,1996). Os processos biocatalíticos são uma escolha óbvia, neles as reações são realizadas em meio aquoso, pH próximo a neutralidade, temperaturas próximas a ambiente e sem a necessidade da vasta proteção do grupo funcional α -amido. Em suma, uma catálise enzimática está vem como uma promissora escolha por atender todas as necessidades.

Tabela 1 - Produção de resíduo na indústria química (Wegman et al., 2001).

Ramo industrial	Produto (t/a)	Fator
Refinamento de óleo	$10^6 - 10^8$	$\ll 0,1$
Química gera	$10^4 - 10^6$	1 - 5
Química fina	$10 - 10^4$	5 - 50
Farmacêutica	$1 - 10^5$	25 - > 100

Resíduo por produto industrializado (kg/kg)
 Fonte: Wegman et al., 2001

3.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Enzimas são proteínas com propriedades catalíticas. De forma, semelhante a um catalisador, a enzima é capaz de diminuir a energia de ativação de uma reação, aumentando a taxa dessa sem afetar a posição de equilíbrio, isto é, as reações direta e reversa são afetadas na mesma extensão (MARANGONI, 2003).

No início dos anos XX, Michaelis e Menten deram o início aos estudos de modelos cinéticos que descrevem a catálise enzimática. Seu modelo enzimático foi chamado cinética enzimática simples. Apesar de existir modelos cinéticos não propostos por Michaelis e Menten, as equações mais complexas que descrevem a cinética enzimática, são ou derivam do modelo simples de suas equações.

A determinação da constante cinética é realizada medindo-se a quantidade de produto produzido por hora de uma mistura de enzima e seu substrato, obtém-se a parcela de concentração por tempo para o substrato ou produto, conhecido como curva de progresso da enzima reação ou tempo. A taxa de reação (r) corresponde a inclinação da curva de qualquer uma das direções. No início da curva o aumento de concentração do produto ou a redução do substrato tem um caráter aproximadamente linear, este período de tempo limitado onde a curva se comporta linearmente é chamado taxa inicial enzima catalisada, as constantes podem também ser calculadas de forma transiente. Assim, uma série de dados iniciais são obtidas de diferentes concentrações de substrato ou de produto obtendo-se o gráfico de Michaelis-Menten. Este gráfico não é só usado para comparar diferentes isoenzimas que catalisam a mesma reação, ele pode ser utilizado para determinação de constantes cinéticas de curvas não-lineares (DENIZ ET AL 2007). A forma linear da equação de Michaelis-Menten fornece os gráficos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee (COPELAND, 2000; CORNISH-BOWDEN, 1999). Se os

experimentos fossem realizados de forma precisa e perfeita, o gráfico de Michaelis-Menten e as linearizações desse gráfico teriam resultados iguais, pois na realidade experimental o erro esta sempre presente, e por consequência diferentes métodos fornecem valores de parâmetros diferentes porque eles lidam com o erro de maneiras diferentes (CORNISH-BOWDEN, 1999).

Os dados obtidos pelo início da curva contém informações significantes sobre a taxa de reação e a cinética da reação. No entanto, o uso de cursos de tempo em estudos cinéticos não se tornou um método difundido até a última década. O maior motivo para esta situação foi a dificuldade e complexidade da extração e cálculo da reação cinética e constantes cinéticas. O crescente uso de computadores, capacidade crescente de software para eliminar essas limitações além de permitir o melhor uso dos cursos de tempo de reação, permitiu uma melhor precisão nos parâmetros cinéticos obtidos. Um das vantagens desta abordagem é que ele pode ser aplicado tanto no estado estacionário quanto no transiente (DUGGLEBY, 2001). Por exemplo, a Eq. (2.1) é escrita para uma reação enzimática que obedece à cinética de Michaelis-Menten, não é inibido por seus produtos. A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de cinética de reações enzimáticas derivadas da equação de Michaelis-Menten.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\max} xS}{K_m + S} \quad (2.1)$$

Tabela 2 – Modelos cinéticos enzimáticos

Cinética das Reações	Equação
Mihaelis- Menten	$v = \frac{V_{\max} xS}{K_m + S}$
Inibição competitiva	$v = \frac{V_{\max} xS}{K_m x \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) S}$
Inibição não competitiva	$v = \frac{V_{\max} xS}{K_m + Sx \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right)}$
Inibição mista	$v = \frac{V_{\max} xS}{K_m x \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) + Sx \left(1 + \frac{P}{K_{ip2}} \right)}$

3.3 Rede Neural Artificial

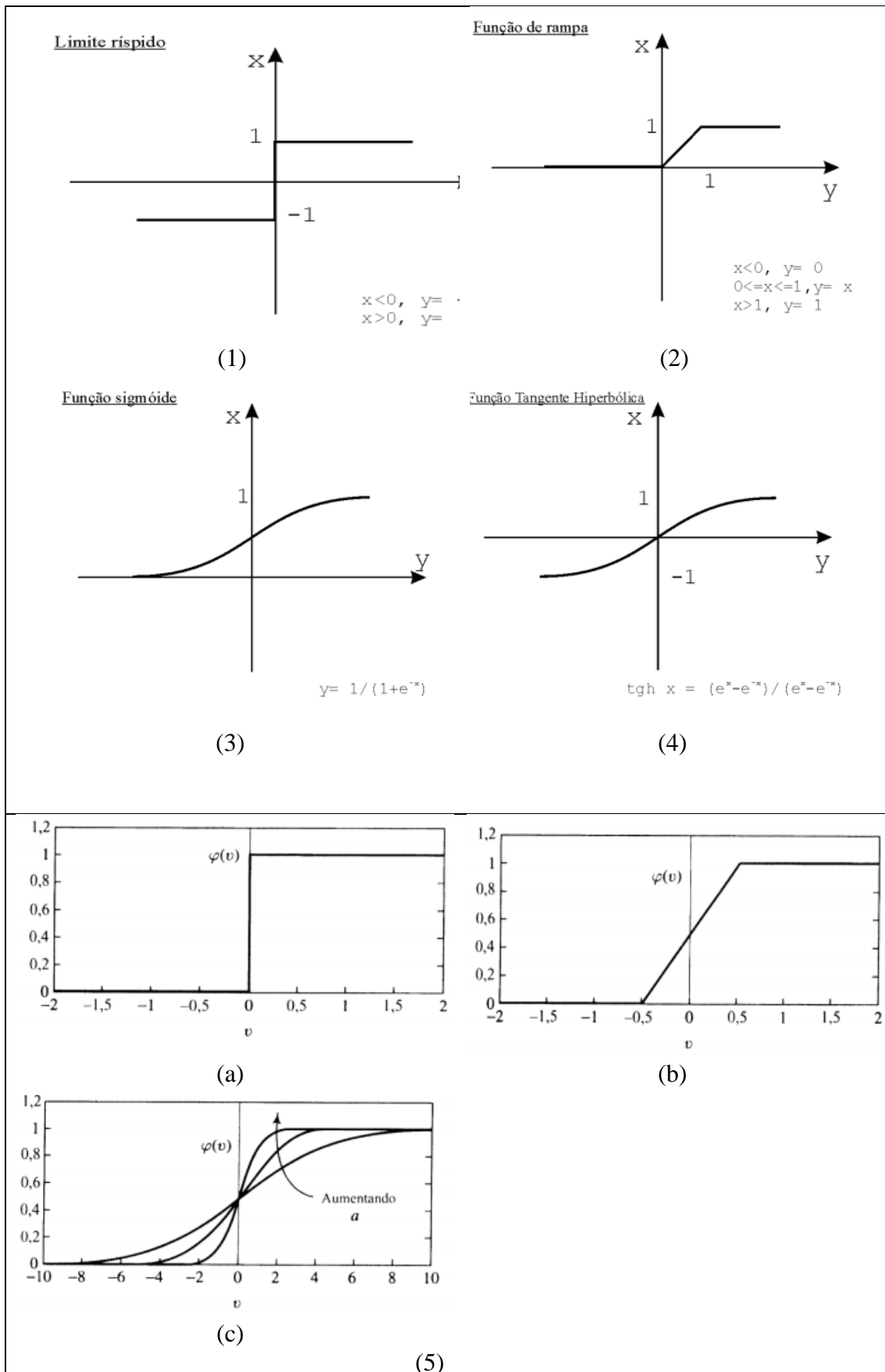
As redes neurais artificiais (RNA) são uma classificação para uma classe de modelos matemáticos que foram inspiradas na estrutura do neurônio biológicos. O cérebro humano tem cerca de 100 bilhões de neurônios interconectados que comunicam entre elas por sinapses. O mecanismo de aprendizagem do cérebro humano, o comportamento sináptico é modificado alterando-se a força interativa entre os neurônios, o neurônio computacional se comporta de maneira similar ao biológico possuindo várias entradas e saídas de informações (PELLICCI, 2001). A atratividade das RNA vem das características notáveis de processamento de informações do sistema biológico como não-linearidade, alto paralelismo robustez, tolerância a falhas, aprendizado, capacidade de lidar com informações imprecisas e difusas, e sua capacidade para generalizar (HAYKIN, 1994).

O funcionamento do neurônio artificial pode ser resumido em 5 etapas conforme é ilustrado na

- 1) os sinais são recebidos do neurônio anterior;
- 2) os sinais são multiplicados por pesos correspondentes a cada ligação;
- 3) os sinais avaliados são somados para demonstrar a combinação de efeitos de cada entrada;
- 4) a soma calculada é modificada por uma função de ativação ou transferência para compensar as inter-relações entre as entradas;
- 5) os sinais ativados seguem para o neurônio posterior (PELLICCI, 2001).

Em alguns modelos simples de RNA, a função de ativação pode ser a função da soma das entradas ponderadas do neurônio, em modelos mas complexos a função de ativação pode ter um processamento atribuído o qual pode ser um valor prévio de saída como uma entrada para o próprio neurônio servindo de auto excitação para a mesma (TAFER 1996).

Quadro 2.1– Etapas da função transferência (kovács, 1996)



O valor de saída do neurônio é produzido após a chamada da função de ativação seguida da função de transferência. Em alguns casos, o neurônio artificial pode não ter efeito no neurônio seguinte, se o valor de ativação não ultrapassar um valor mínimo, este fator é residente das características sigma e que a função transferência tem como propriedade, por isso tem vários tipos de funções de transferência e de ativação. O Quadro 2.1 apresenta as etapas de alguns exemplos de função de transferência.

Se referindo a rede neural por sua estrutura duas classes são usualmente empregadas: rede de múltiplas camadas (*multilayer feedforward network*) (Figura 2.3) e redes recursivas ilustradas nas Figuras 2.4 e 2.5.

Figura 2.3 – Processamento do sinal em um neurônio de uma rede *feedforward* (Pellicci, 2001).

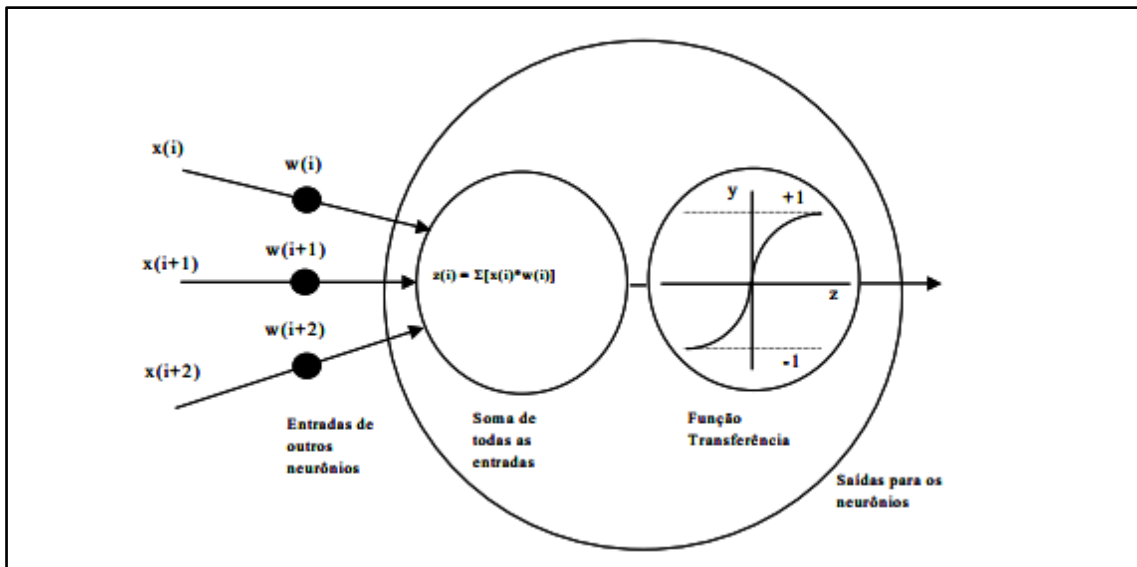


Figura 2.4 – Processamento do sinal em um neurônio de uma rede recursivas(Pellicci, 2001)

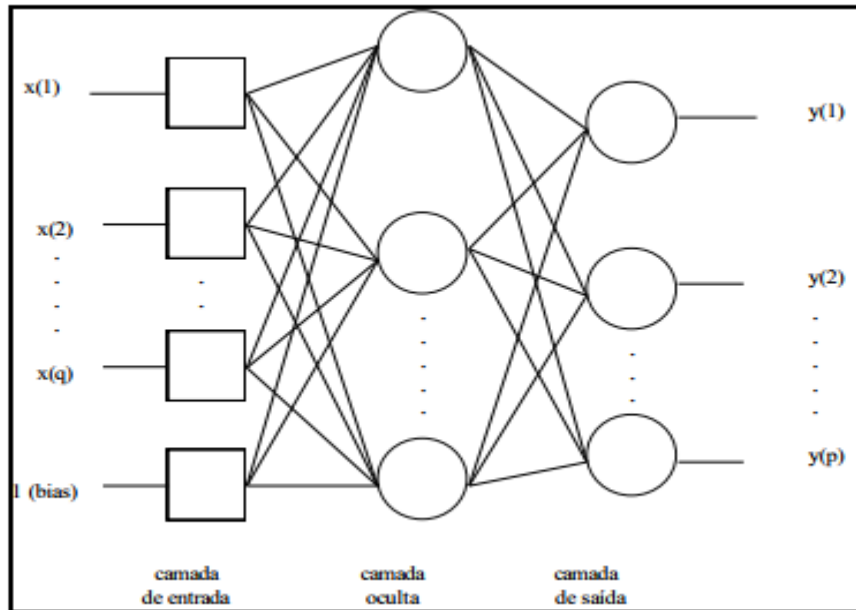
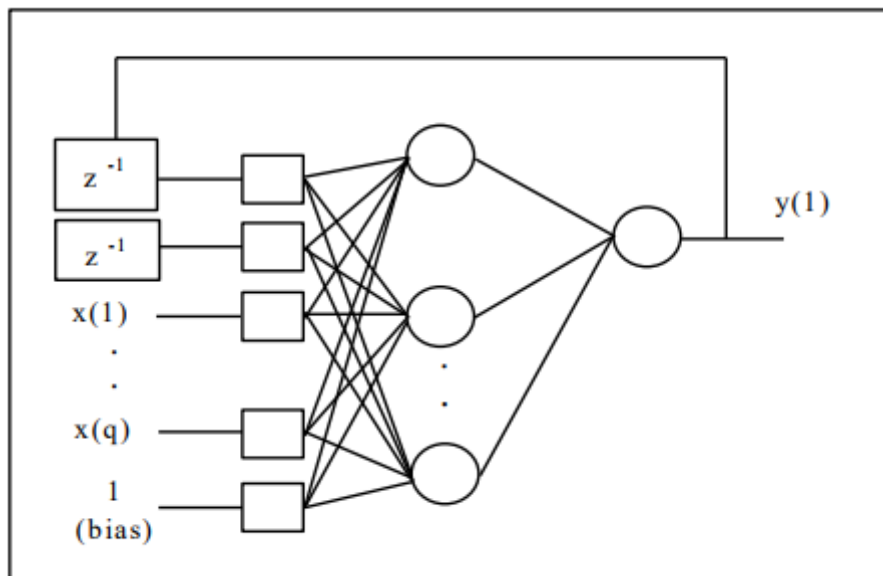


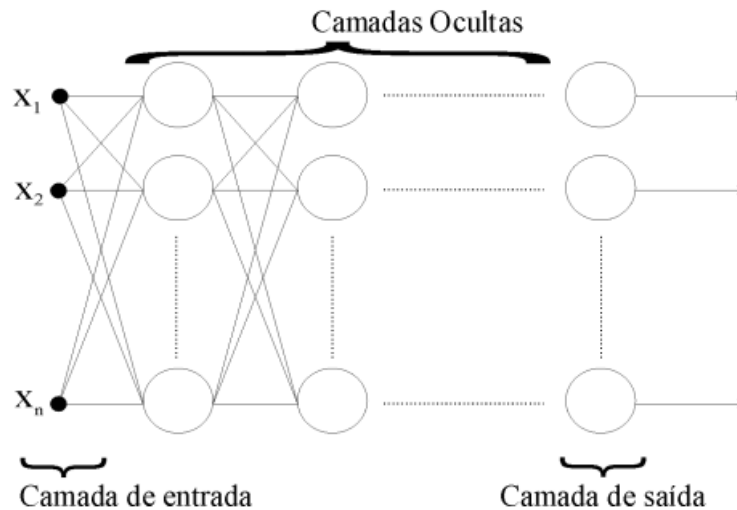
Figura 2.5 – Rede recorrente com auto realimentação (Pellicci, 2001)



A rede neural mais comumente usada é a rede de múltiplas camadas que possuem camadas escondidas (*hidden*), também conhecidas por intermediárias ou ocultas, o número destas camadas podem ser indeterminado e estão situadas entre as camadas de entrada e saída de uma rede neural. Essas camadas são compostas por neurônios artificiais

da mesma forma que as camadas de entrada e saída, não fazem contato com o mundo externo (as extremidades da rede), possuem uma função de transferência de informação para cada neurônio.

Figura 2.6 - : Rede alimentada adiante com camada única



3.3.1 APRENDIZADO

O aprendizado de redes neurais pode ser dividido em duas principais formas: o aprendizado supervisionado e o não supervisionado. As redes neurais têm a competência de aprender por exemplos mostrando as relações das conexões entre os neurônios pertencentes a rede, assim um conjunto de procedimentos definidos para ajustar os parâmetros de uma rede neural para que esta aprenda uma determinada função é chamado de algoritmo de aprendizado (onde a rede procura extrair informações relevantes de padrões de informações apresentadas a ela modelando uma representação própria). Para os diferentes modelos em questão existem suas vantagens e desvantagens.

- Supervisionado

A maioria das redes neurais artificiais tem utilizado o treinamento supervisionado. Neste modo, a saída da rede neural é comparada a saída desejada, a relação será avaliada e serão ajustados através do algoritmo de aprendizagem pela próxima interação ou ciclo. O ajuste sináptico é dependente do valor esperado e do sinal de saída, assim o método de aprendizado tenta reduzir os erros de todos os dados do final de um ciclo. Esse ajuste

trabalha continuamente os pesos até que a rede obtenha uma precisão requerida pelo operador.

O aprendizado supervisionado das redes neurais artificiais deve ser arduamente treinado antes de serem usadas. O treinamento é dado pela apresentação dos dados de entrada e saída a rede, esses dados são frequentemente referenciados ao conjunto de treinamento. O treinamento pode ser considerado completo quando a rede atinge uma performance satisfatória, esse nível quer dizer que a rede alcançou uma precisão estatística conforme as previsões de saída necessária para uma dada sequência de entradas. (BRAGA ,2000)

- Não supervisionado

O treinamento não supervisionado é o próximo passo para o futuro em relação as redes neurais artificiais, tendo em vista que a rede neural aprende sozinha. Estas redes não aceitam influência externa para ajustar os pesos sinápticos, pois ela mesma faz o monitoramento de desempenho interno, testando as regularidades e/ou tendências dos dados de entrada e assim ela se adapta automaticamente as necessidades da rede.

Possui características de auto nivelção , sem qualquer auxílio para determinar se o aprendizado converge ou não. Uma rede com algoritmo de aprendizado não supervisionado deve ter enfatizado a cooperação entre as camadas unidades de processamento, pois há competição entre estas unidade e a base de aprendizado da rede . Normalmente quando a competição pelo aprendizado ocorre de fato, somente os pesos pertencentes a unidade de processamento vencedora é ajustada. (BRAGA ,2000)

3.3.2 VELOCIDADE DE APRENDIZADO

A velocidade de aprendizado de uma rede neural depende de muitos fatores.

- a complexidade da rede;
- o número de camadas (tamanho);
- o paradigma de seleção;
- a arquitetura adotada;
- algoritmo de aprendizado;
- as regras empregadas e
- a precisão desejada.

Todos estes fatores contribuem e alteram o tempo de treinamento da rede. A mudança de qualquer um destes fatores pode estender o tempo de treinamento para uma razão não muito significativa, ou resultar em uma precisão não satisfatória.

3.3.3 ALGORITMOS DE APRENDIZAGEM

Existem muitas leis de aprendizado que estão em uso, em sua maioria são apenas variações da lei mais aplicada, a lei de Hebb. As pesquisas em novas funções de aprendizado continuam buscando modelos mais perfeitos para padrões biológicos. No entanto, o homem ainda está muito distante de descobrir realmente como ocorre o processamento biológico. Por ser um aprendizado extremamente complexo, simplificações matemáticas continuam em desenvolvimento

As leis de aprendizagem mais conhecidas são: (Ferreira, 2003).

- Princípio de aprendizado de Hebb – A primeira e indiscutivelmente a mais conhecida regra de aprendizado, foi apresentada pelo biólogo e psicólogo Donald Hebb. Essa lei foi exposta no seu livro intitulado *The organization of Behavior* de 1949. A regra parte da seguinte prerrogativa, se um neurônio recebe uma entrada proveniente de outro neurônio e ambos estão ativos significando que eles têm o mesmo sinal, os pesos entre os neurônio precisam ser excitados.
- A Lei de Hopfield – Parte do princípio de Hebb com apenas uma exceção a lei de Hopfield especifica a magnitude da excitação ou inibição. Se a saída desejada e o sinal de entrada estão ambos ativos ou inativos, os pesos são incrementados pela taxa de aprendizado, caso contrário decrementados.

A regra Delta de Widrow – Esta regra é uma variação um pouco além do princípio de aprendizado proposto por Hebb. A regra delta apresentada por Widrow é a mais usada nos dias atuais. Essa regra tem como base na idéia da contínua modificação da intensidade e da importância das conexões de entrada, reduzindo muito a variação do valor de saída desejada. A regra delta altera os pesos sinápticos de modo que minimiza o erro quadrático da rede atuando da seguinte forma: o erro calculado na saída é transformado pela derivação da função transferência e conseqüentemente é usado para ajustar os pesos de entrada da camada prévia da rede, ou seja, o erro é retro-propagado para camadas anteriores. Os tipos de rede chamadas de *feedforward* e *backpropagation* derivam seus nomes dos métodos adotados pelo processamento do erro. Para usar a regra delta é importante assegurar que os dados estejam dispostos de forma aleatória ou gerado de forma randômica. Uma vez mal organizado, este conjunto de treinamento pode resultar em uma rede que não convirja na precisão desejada, impossibilitando o aprendizado.

- A lei de aprendizado de Teuvo Kohonen – desenvolvida por Teuvo Kohonen, esta lei é inspirada nos sistemas biológicos onde os elementos competem entre si por uma chance de aprender, ou atualizar/ajustar seus respectivos pesos. A unidade de processamento que possuir o melhor sinal de saída será considerada a mais apta e conseqüentemente passará a ter a capacidade e privilégio de inibir os ajustes sinápticos de seus concorrentes e excitar seus vizinhos. Somente a unidade apta e seus respectivos vizinhos terão permissão para ajustar seus pesos. O paradigma atual usa o seguinte procedimento, é formado uma grande área de vizinhança e a medida que ocorre o processo de treinamento, há uma seleção e conseqüentemente um estreitamento dela .

4-METODOLOGIA

A metodologia para o treinamento e simulação da rede neural usada neste trabalho iniciou-se com a obtenção de uma base de dados de velocidades de produção do antibiótico (Ampicilina), de hidrólises do reagente e do produto. A base de dados foi montada em pares de dados de concentração e velocidade para formação da matriz de treinamento, simulação e validação.

Em seguida, as matrizes de dados foram normalizadas e algumas condições do modelo foram definidas:

- o número de camadas;
- o número de neurônios e
- o modelo matemático que melhor atendessem os dados reais de produção do antibiótico.

Os modelos testados foram *Losing*, *Purelin* e *Tansing*. A regra de treinamento utilizada foi a de Levenberg-Marquardt, uma otimização da regra de treinamento geral de redes de alimentação progressiva. Essa regra permite treinamentos mais rápidos que a regra geral assim, atingindo o erro quadrático médio (MSE) desejado com menos interações.

Para modelar a rede neural foram utilizados comandos no Matlab. O primeiro a ser executado foi o comando *nntool*. Abriu-se a janela de comando no software Matlab, em que a matriz de entrada e de saída de dados é carregada e a rede neural é criada, Figura 3.1. É importante salientar que as matrizes com dados de entrada e de saída devem ser colocadas em linha, uma vez que essa é a forma que o Matlab reconhece dados.

Na sequência, ao clicar em *New*, outra janela é aberta, nela o número de camadas, o número de neurônios e o modelo matemático foram definidos para a realização do treinamento (Figura 3.2). O Matlab, em seu *default* define 80% dos dados como treinamento, 10% dos dados como simulação e 10% dos dados para validação da rede, mas essas proporções podem ser mudadas pelo usuário.

Figura 3.1- Janela para adição dos dados

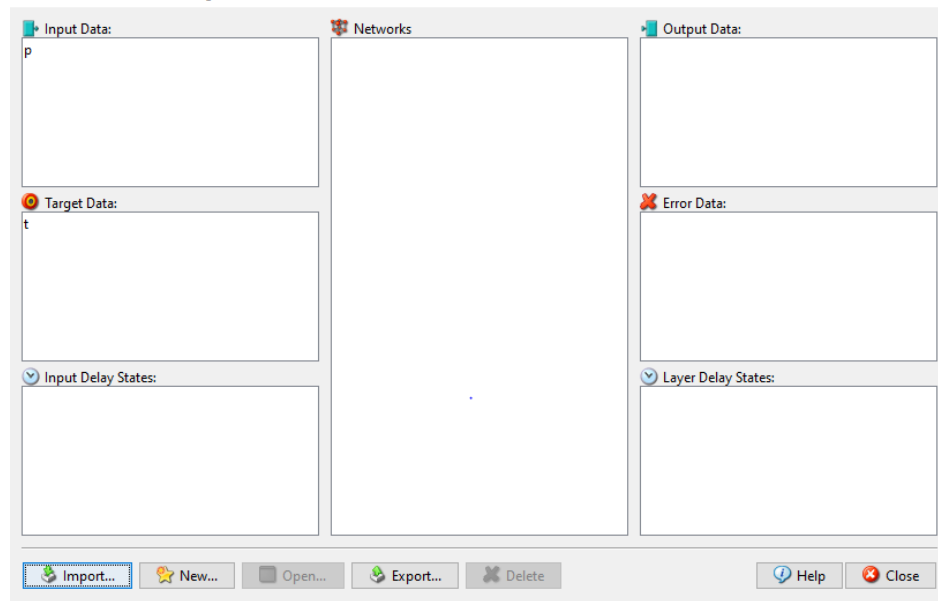
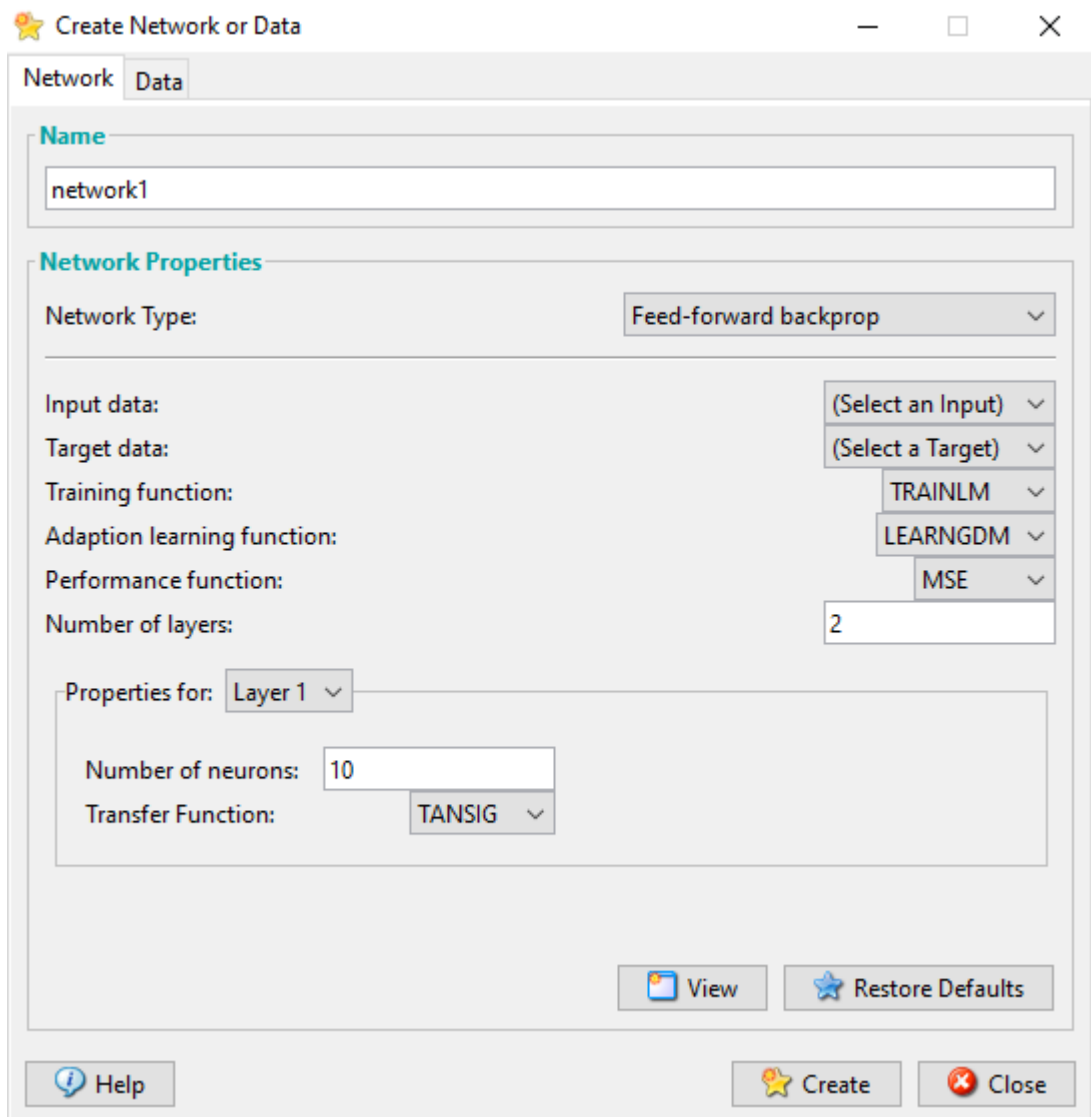
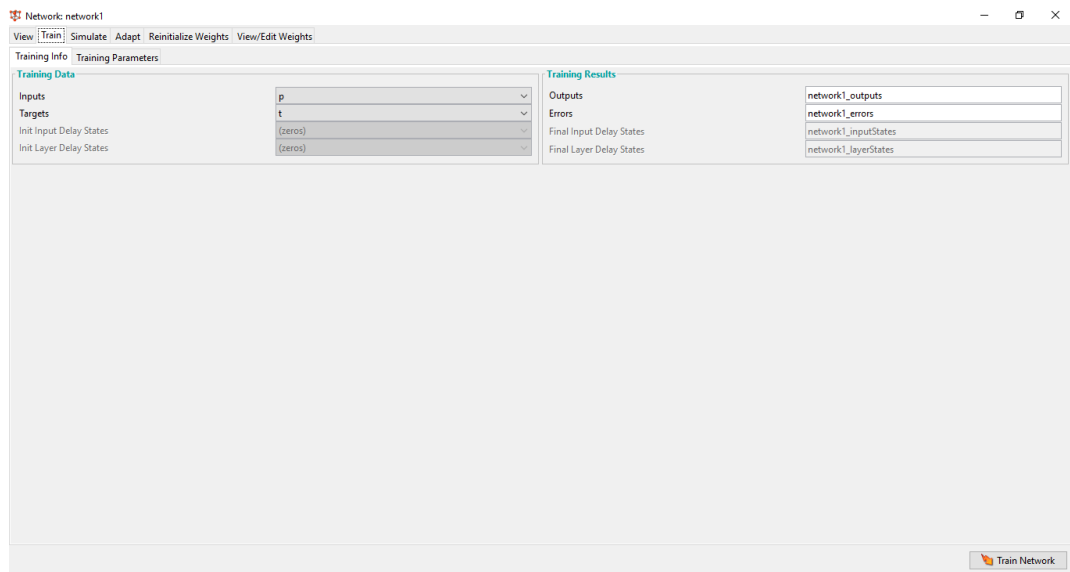


Figura 3.2 – Configurações de rede



Nesta janela (Figura 3.2), pode-se definir número de neurônios, o número de camadas e o modelo matemático a ser testado para o treinamento. Neste trabalho foram avaliados três funções de transferência (*Tansig*, *Purelin* e *Logsig*) e se variou a quantidade de neurônios entre 1 e 500. Em seguida, deve-se clicar no ícone *Create*. A próxima janela (Figura 3.3) a se abrir os dados de entrada e de saída devem ser carregados novamente para iniciar o treinamento da rede neural.

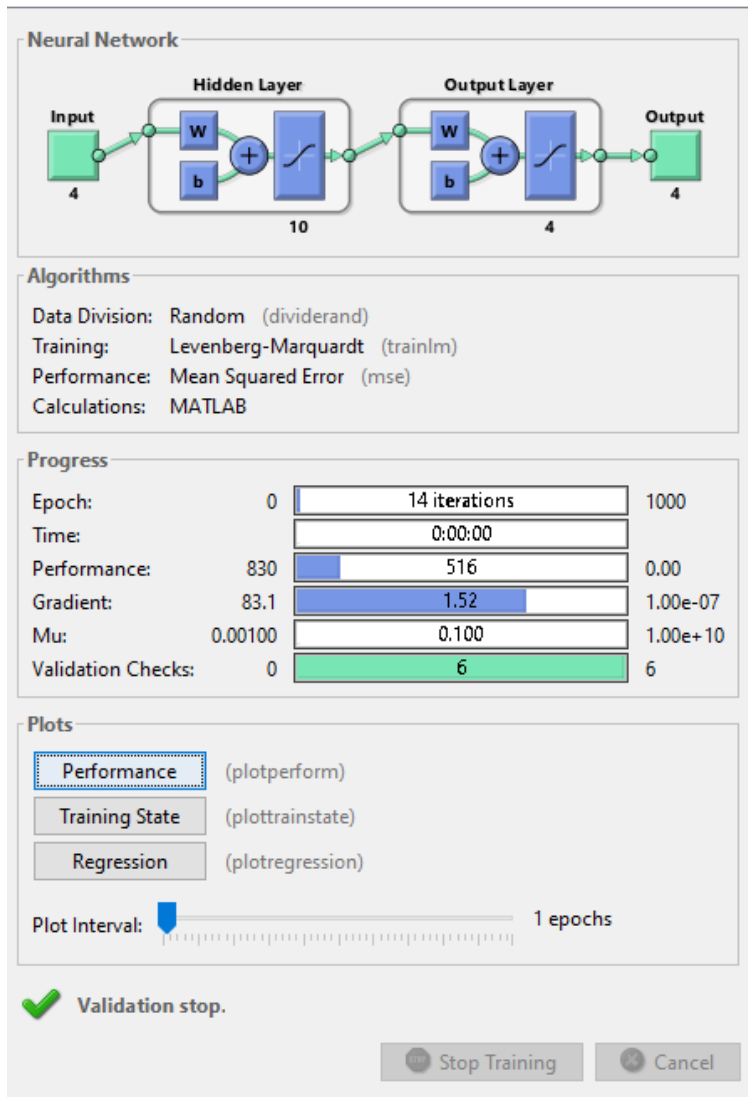
Figura 3.3 – Janela para confirmação de dados



Depois de clicar em *Train Network* foram obtidos os resultados de performance do treinamento de uma das redes testadas neste trabalho. Esses resultados foram avaliados pelo MSE (Média dos erros quadráticos) Figura 3.4.

Também é possível fazer uma avaliação direta do treinamento clicando em *performance*, *training State* e *Regression* que irá plotar gráficos para uma análise se a rede criada com as especificações testadas no momento (modelo matemático, número de camadas e número de neurônio) foi satisfatória.

Figura 3.4 – Janela do Matlab para visualização da rede neural treinada.



5- RESULTADOS

O correto desenvolvimento de uma Rede Neural Artificial (RNA) é uma ferramenta excelente para resolução de problemas (Ramlall, 2009), mas caso não seja bem trabalhada, a RNA pode não encontrar a melhor resposta possível para o conjunto de dados apresentados podendo trazer classificações não precisas ou podendo acarretar problemas de eficiência. O método usado neste trabalho para não obter uma classificação errônea foi a variação de número de neurônios e a mudança das funções de transferência. Os neurônios foram variados de 1 a 500 e as funções de transferência testadas foram *Purelin*, *Tansig* e *Logsing*.

A função de transferência *tansig* é função de transferência tangente hiperbólica sigmoidal. Apresenta a mesma definição da função anterior, entretanto utiliza como função de transferência a tangente hiperbólica sigmoidal, que varia entre -1 e +1. Já a função de transferência *losing* é função de transferência logarítmica sigmoidal. Ela calcula o valor da saída do neurônio a partir das entradas da rede, ou seja, o valor que será transferido para a próxima camada utilizando uma função logarítmica sigmoidal que varia entre 0 e +1. Possui formato de “S”, sendo uma função não linear. A função de transferência *pureling* que seria a função mais simples que obedeceria uma característica linear. A reação enzimática de produção de ampicilina foi realizada a partir dos reagentes éster metílico de fenilglicina e ácido 6-amino penicilânico para formar o antibiótico ampicilina e o produto não desejado fenilglicina usando penicilina G acilase como catalisador. Para um melhor mapeamento de toda a cinética da reação de produção de ampicilina, não só a velocidade de formação do antibiótico foi treinada, mas as velocidades de todos os reagentes e produtos.

5.1 FENILGLICINA

A Figura 4.1 que representa a rede neural que foi treinada, simulada e validada usando a função de transferência *tansig*. Pode-se observar que ela apresentou o melhor desempenho, conseguindo prever as alterações nas velocidades nas diferentes concentrações de fenilglicina testadas, quando comparam-se com os dados experimentais da substância Fenilglicina (FG) A Figura 4.2 também apresenta uma rede neural para previsão de velocidade da formação de FG, entretanto esta rede neural foi treinada,

simulada e validada com a função de transferência *purelin*. Pode-se observar que esta rede não apresentou bons resultados quando comparada com a rede treinada usando a função *tansig*.

Figura 4.1 – Rede neural usando a função de transferência *tansig* para prever a velocidade de formação de Fenilglicina em comparação com dados experimentais.

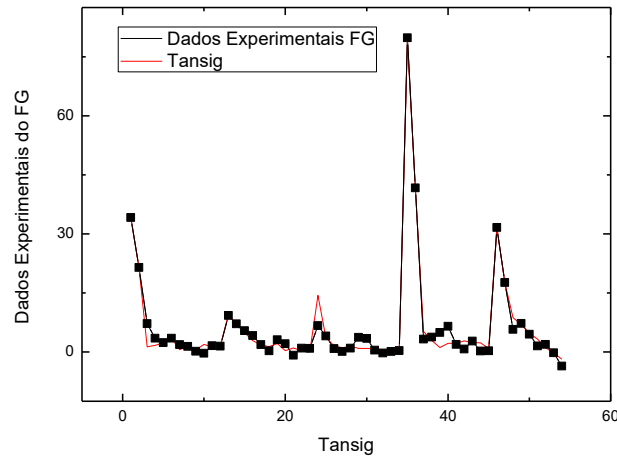
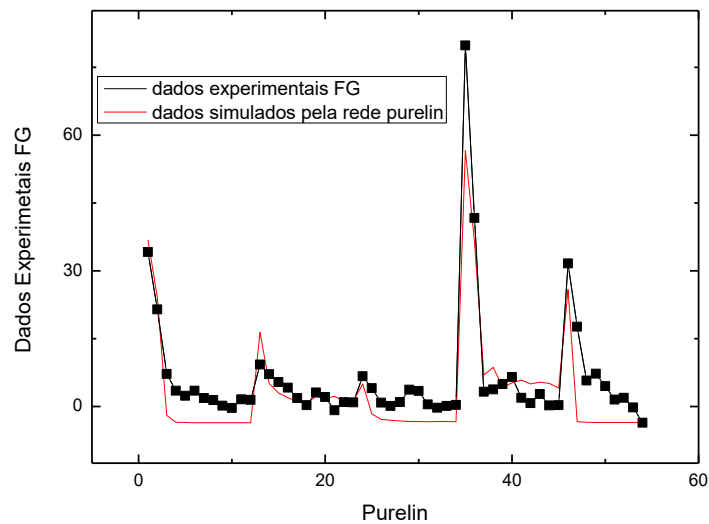


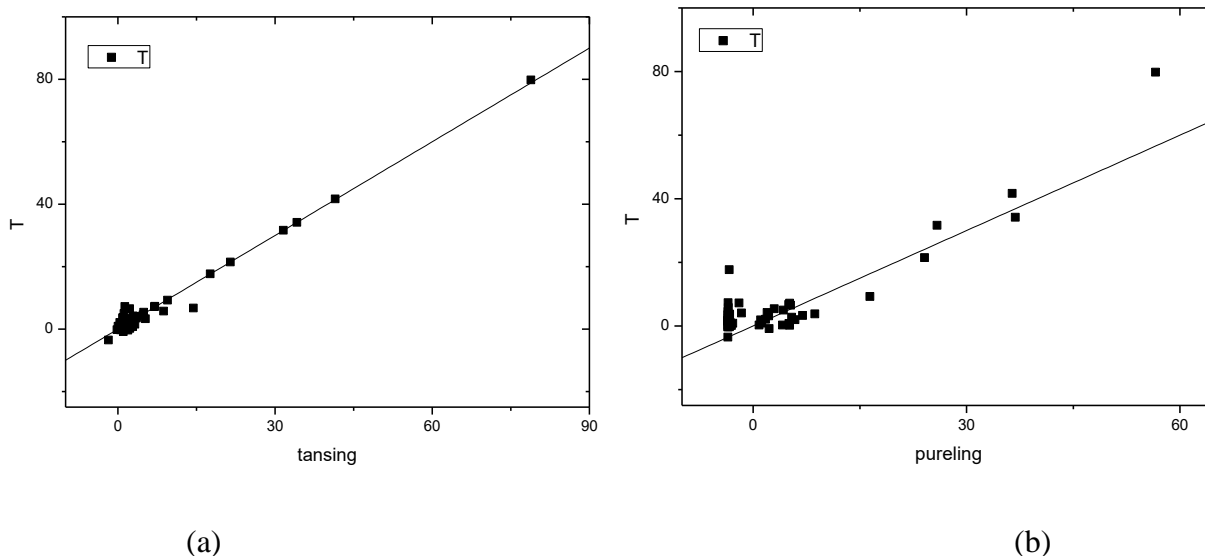
Figura 4.2 – Rede neural usando a função de transferência *purelin* para prever a velocidade de formação de Fenilglicina em comparação com dados experimentais.



Na Figura, 4.3 (a) e (b) pode-se observar os gráficos de dispersão para as duas redes neurais treinadas com as funções de transferência *tansig* e *purelin*. Observa-se a melhor precisão da rede treinada com a função *tansig* e um ajuste não tão satisfatório

quando a rede neural usou a função de transferência *purelin*. É evidente a dispersão dos pontos na Figura 4.3 b, causado pelos dados compilados que dispersaram muito dos dados experimentais. Os gráficos da rede neural treinada, simulada e validada usando a função de transferência *losing* apresentaram comportamento intermediário entre as redes com a função de transferência *purelin* e *tansig*, por isso não foram apresentados neste texto.

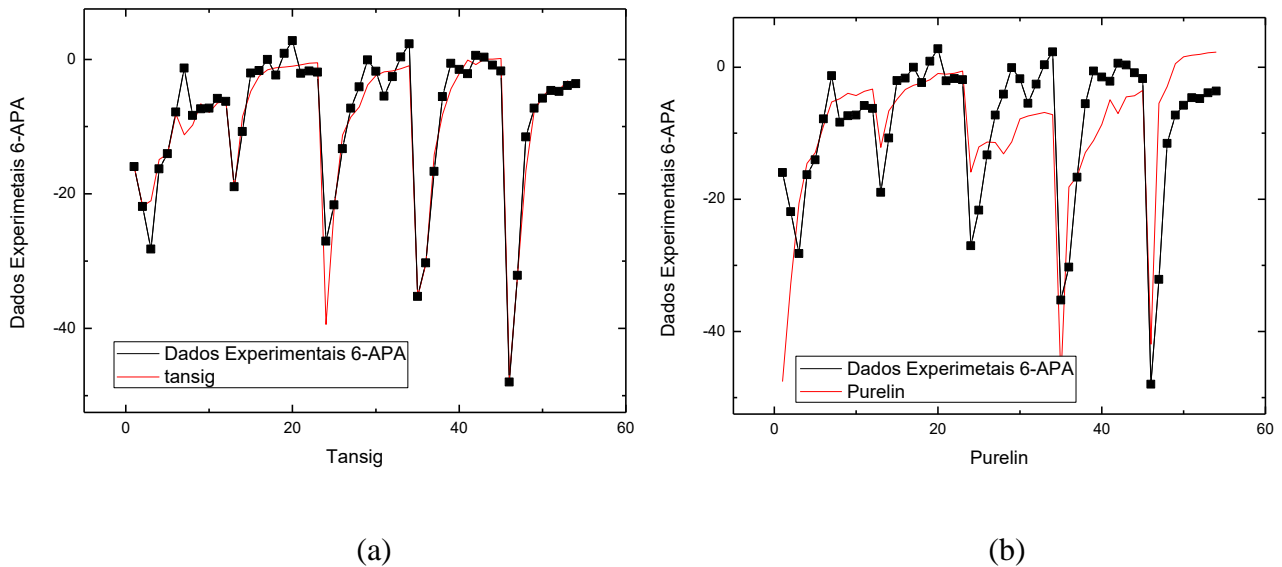
Figura 4.3 – Gráficos de dispersão das redes neurais treinadas com as funções de transferência *tansig* (a) e *purelin* (b) para a fenilglicina.



5.2 ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO

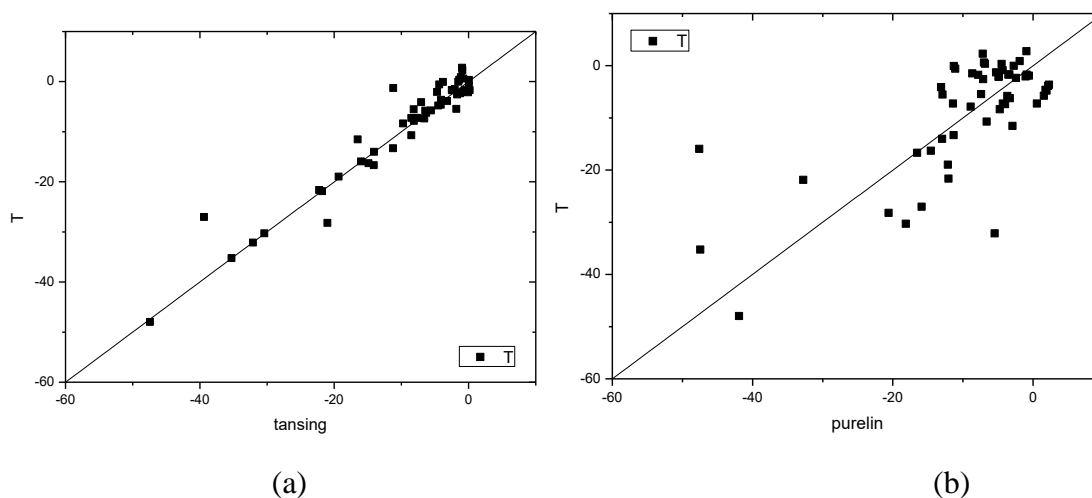
O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) é o reagente chave na reação de produção de ampicilina, é ele que apresenta o anel de tiazolidina em sua formação que confere atividade de antibiótico a molécula. Na Figura 4.4 é mostrado a velocidade de consumo deste reagente em função das diferentes concentrações experimentais estudadas. Novamente a rede neural treinada com a função de transferência *losing* apresentou comportamento intermediário na validação. A melhor rede neural obtida foi quando a função de transferência *tansig* foi utilizada. Devido ao comportamento altamente não linear da reação do consumo de 6-APA, a rede *purelin* também não se mostrou com um melhor desempenho.

Figura 4.4 - Rede neural usando a função de transferência *tansig* (a) e *purelin* (b) para prever a velocidade de consumo de ácido 6-amino penicilânico em comparação com dados experimentais.



Na Figura, 4.4 (a) e (b) pode-se observar os gráficos de dispersão para as duas redes neurais treinadas com as funções de transferência *tansig* e *purelin*. Observa-se a melhor precisão da rede treinada com a função *tansig* e um ajuste não tão satisfatório quando a rede neural usou a função de transferência *purelin*. É evidente a dispersão dos pontos na Figura 4.4 b, causado pelos dados compilados que dispersaram muito dos dados experimentais. Estes gráficos representam a relação do 6-APA com as funções de transferência *tansig* e *purelin* onde se pode perceber que a função de transferência *tansig* se adaptou melhor prevendo as características dos dados experimentais enquanto que a função de transferência *purelin* se afastou muito do padrão experimental. A Figura 4.5 (a) e (b) confirma os resultados discutidos na Figura 4.4. Pode-se observar a maior dispersão da rede neural usando a função de transferência *purelin* quando comparado com os dados experimentais.

Figura 4.5 – Gráficos de dispersão das redes neurais treinadas com as funções de transferência tansig (a) e purelin (b) para o 6-APA.



5.3 AMPICILINA

Como apresentado no Capítulo 2, ampicilina é um antibiótico beta-lactâmico de amplo espectro de ação. Isso significa que ampicilina atua tanto para microrganismos gram-positivos quanto para microrganismos gram-negativos. Essa habilidade de ação e sua estabilidade ao pH ácido do trato digestivo faz deste antibiótico muito mais interessante que a penicilina, pois esta é destruída caso seja administrada oralmente.

A produção de antibióticos é extremamente poluente, a produção via rota enzimática mostra-se uma alternativa ambientalmente amigável em relação a atual rota de produção que é a rota química. Entretanto, a previsão de sua cinética ainda não está totalmente elucidada, pois reações enzimáticas apresentam a característica de ser altamente não linear, assim, a previsão da velocidade de produção de ampicilina via rota enzimática, não consegue ser obtida com modelos cinéticos tradicionais. Previsões de velocidade de produção que apresentam altas concentrações de antibiótico divergem muito dos modelos usados, já que estes foram desenvolvidos em concentrações baixas de substratos (reagentes). A rede neural deste trabalho usou tanto dados experimentais com baixas concentrações de reagentes e produtos quanto altas concentrações de reagentes e produtos. Exemplo de resultado de rede neural pode ser observado na Figura 4.6. Na Figura 4.6 é mostrado a rede neural treinada, simulada e validada para a produção de ampicilina usando duas funções de transferência. Pode-se observar a grande variação de velocidades para este antibiótico e o quanto as três funções de transferência puderam aprender. Dados da rede neural com a função de transferência logsin não são mostrados por apresentar comportamento intermediário a rede neural com as funções de

transferência *tansig* e *purelin*. Os gráficos que representam a dispersão das RNAs das funções de transferência *tansig* e *purelin* para a substância ampicilina que mostrou novamente que a função que mais se adequa aos dados foi a função *tansig* que se mostrou mais fiel ao padrão de velocidade e mais precisa (Figura 4.7).

Figura 4.6 – Rede neural usando a função de transferência *tansig* (a) e *purelin* (b) para prever a velocidade de produção de ampicilina em comparação com dados experimentais.

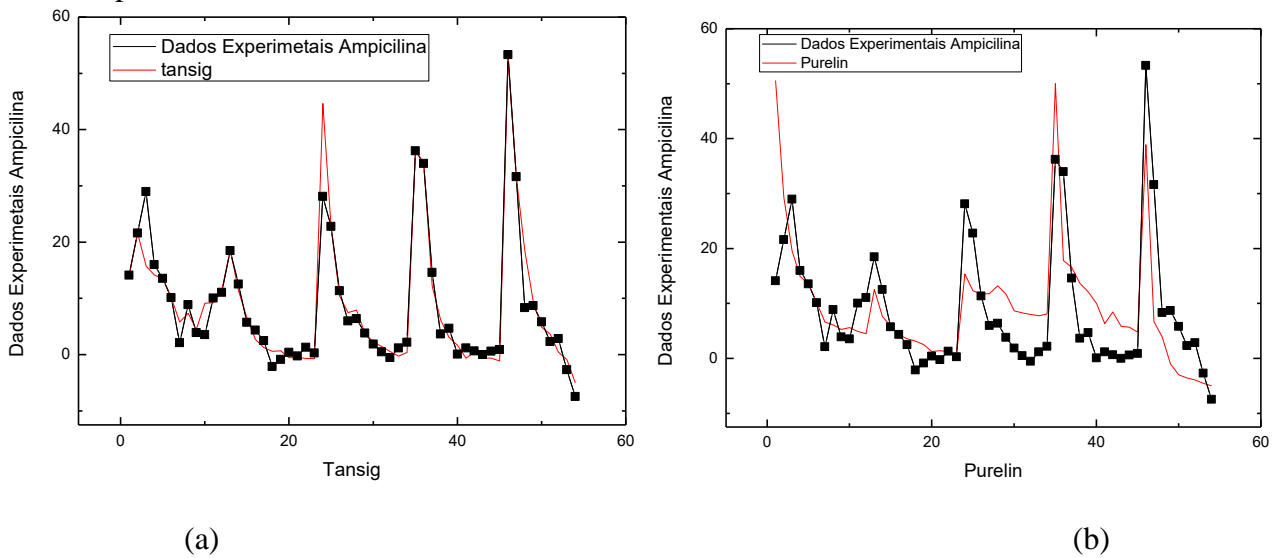
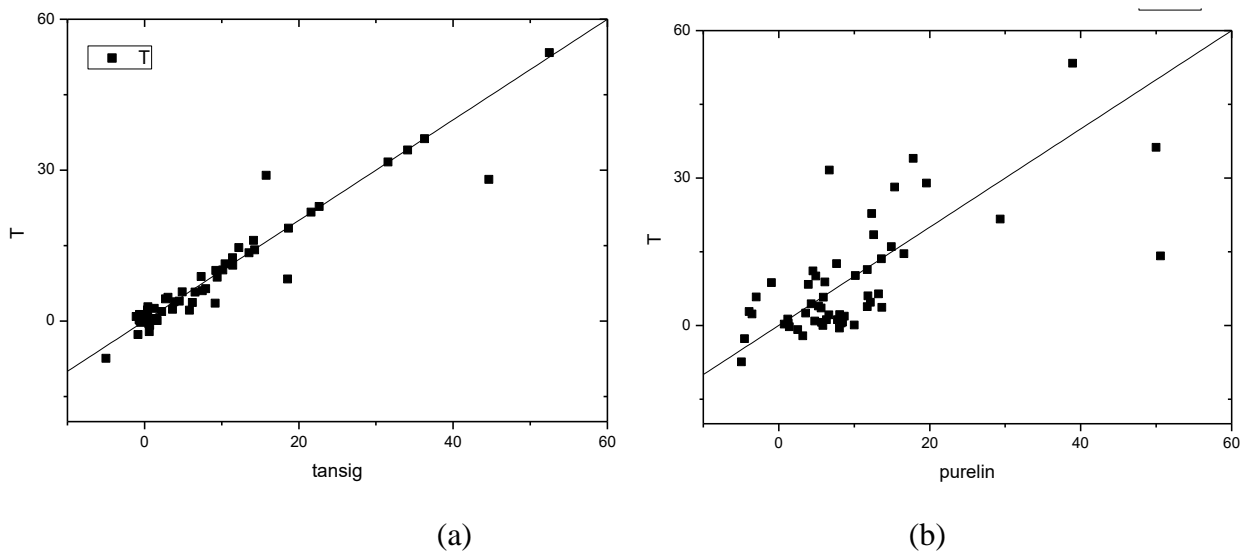


Figura 4.7 – Gráficos de dispersão das redes neurais treinadas com as funções de transferência *tansig* (a) e *purelin* (b) para ampicilina.

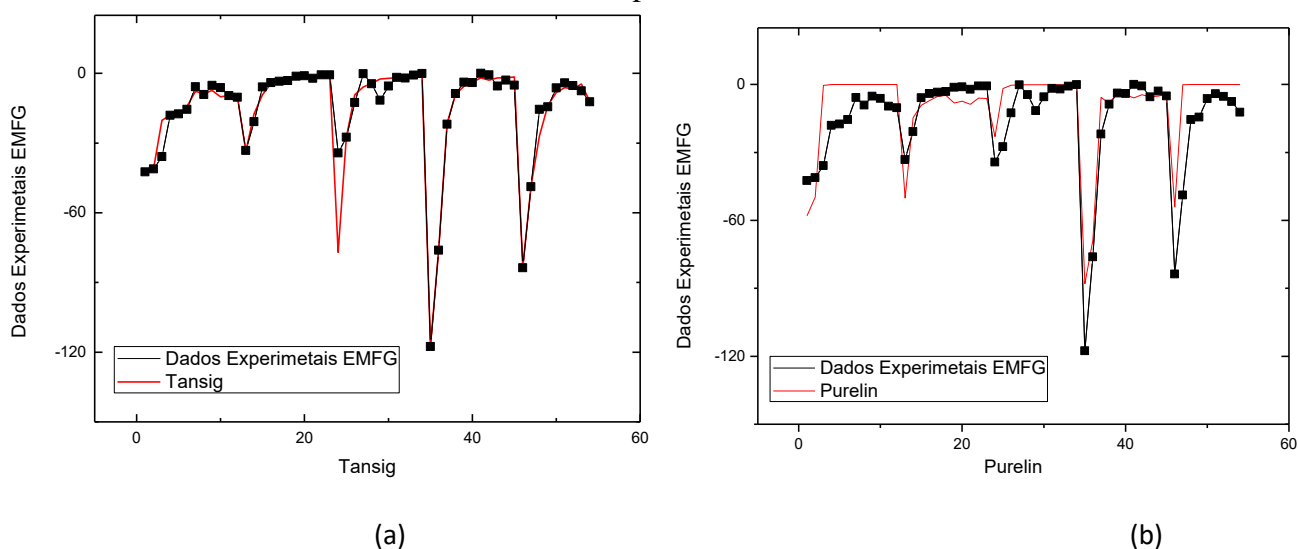


5.4 ESTER METÁLICO DE FENILGLICINA

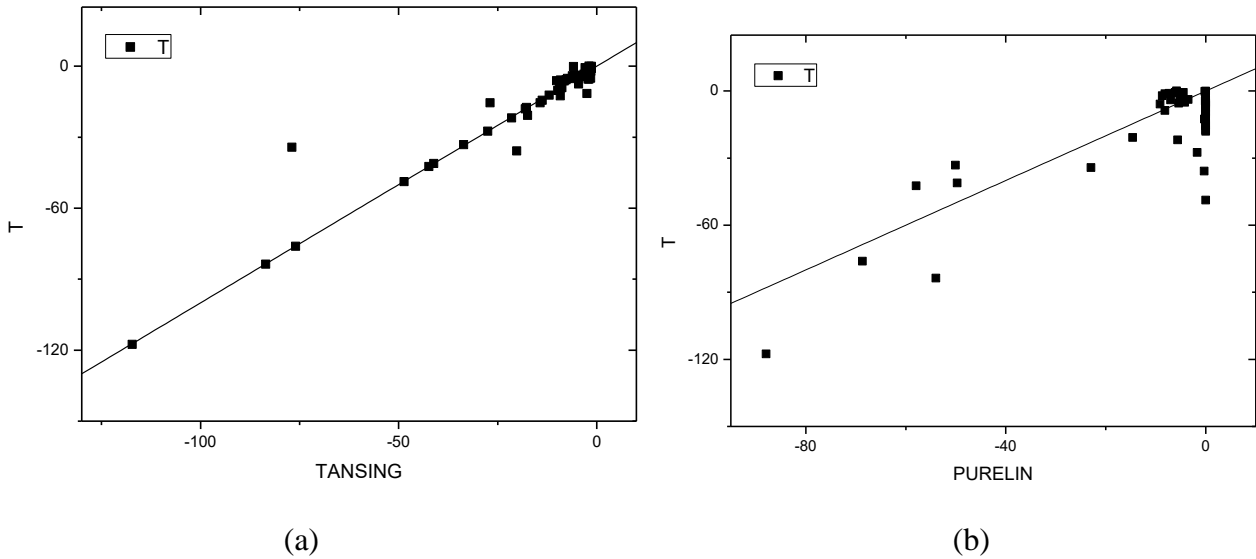
O éster metílico de fenilglicina (EMFG) é o outro reagente usado para a produção de ampicilina. Este reagente sofre hidrólise ao ser colocado em meio aquoso, por isso precisa ter sua velocidade de hidrólise minimizada e sua velocidade de síntese maximizada. Os modelos fenomenológicos não conseguem prever de forma satisfatória este comportamento do EMFG. Por isso, a rede neural foi importante na previsão desta velocidade de consumo do EMFG, além da previsão de formação do antibiótico. Pode-se observar na Figura 4.8 que as redes neurais deste estudo apresentaram bom comportamento para a previsão de consumo deste reagente. Mesmo a rede neural usando a função de transferência *purelin*, esta conseguiu uma previsão adequada da velocidade reacional. Aqui também a função de transferência *losing* foi testada e apresentou comportamento intermediário aos dois limites apresentados.

A Figura 4.9 apresenta os gráficos de dispersão das redes *tansin* e *purelin*, Para o reagente EMFG também foram testadas as funções transferência *tansig*, *purelin* e *losing* e novamente a função de transferência *tansig* se mostrou a mais eficiente para os dados em questão, mostrando para esse tratamento de dados para obter as velocidades de consumo, a função transferência *tansig* foi a que melhor se adaptou as variações de velocidades de produção da ampicilina.

Figura 4.8 – Rede neural usando a função de transferência *tansig* (a) e *purelin* (b) para prever a velocidade de consumo de éster metílico de fenilglicina em comparação com dados experimentais.

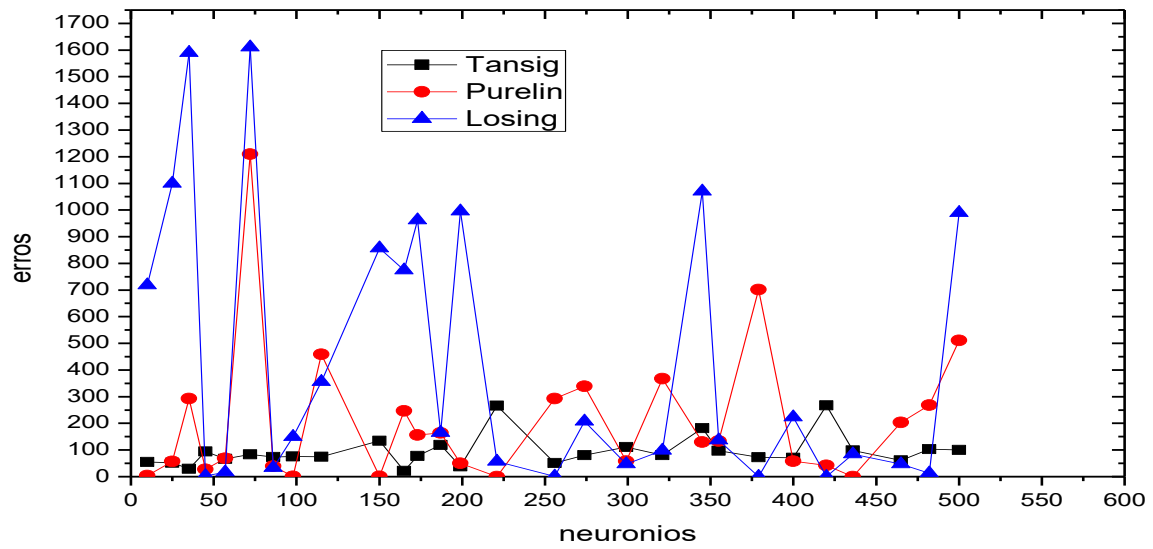


4.9– Gráficos de dispersão das redes neurais treinadas com as funções de transferência tansig (a) e purelin (b) para EMFG.



Como pode ser observado na Figura 4.10, o número de erros quadráticos das redes neurais treinadas em função do número de neurônios. O número de neurônios foi variado nas redes neurais avaliadas com as três funções de transferência (*tansig*, *purelin* e *losing*). Pode-se observar que a rede neural que utilizou a função de transferência *tansig* apresentou o menor número de erros quadráticos para a faixa de número de neurônios testada, assim, essa rede neural apresentou o melhor método para a determinação das velocidade de produção de ampicilina e consumos de seus reagentes. Para todas as redes neurais testadas e apresentadas neste trabalho, foi aplicado o critério de menor neurônio que tivesse o menor número de erros quadráticos para as três funções transferência. Portanto, foi definido o número 100 de neurônios para a rede neural com a função de transferência *tansin* para prever a velocidade de produção de ampicilina.

Figura 4.10 – Erros quadráticos *versus* número de neurônios para as diferentes redes neurais treinadas com as funções de transferência *tansig*, *purelin* e *losing*.



7- CONCLUSÕES

No decorrer deste trabalho foi desenvolvida uma rede neural para previsão de velocidade de produção de ampicilina via rota enzimática.

As redes neurais foram treinadas, simuladas e validadas tanto para a produção do antibiótico quanto para o consumo dos reagentes envolvidos na reação enzimática. A rede neural foi programada em Matlab. Os dados experimentais utilizados foram inicializados nas redes neurais e múltiplos treinamentos mudando os parâmetros de treinamento foram testados. A configuração de rede neural que melhor conseguiu prever tanto a velocidade de formação de ampicilina quanto o consumo dos reagentes foi aquela que apresentou os melhores resultados em relação aos mínimos erros quadráticos e menor número de neurônios na camada oculta. Esses resultados da validação da rede foram alcançados usando a função transferência *tansin* e 100 neurônios na camada oculta.

REFERÊNCIAS

- AMINOV, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1, pp. 134
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd edition., McGraw Hill Book Company, New York, 1986
- BRAGA, A.P., LUDEMIR, T. B., CARVALHO, A. C.P. de L. F. *Redes Neurais Artificiais- Teoria e Aplicações*. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000, 262p.
- BRAS. J .Patol. Med. Lab. vol.45 no.5 Rio de Janeiro Oct. 2009
- CALAM, C. T. *Process Development in Antibiotic Fermentations*. Cambridge University Press, cap.1, 1987.
- Data & analysis center for Software. *Artificial neural Networks Technology*. Disponível por WWW em <http://www.dacs.dtic.mil> (20/09/2000).
- ELANDER, R. P. *Bioprocess Technology in Industrial Fungi*. In: Neeway, J. O. *Fermentations process development of industrial organisms*. cap. 4, Marcel Dekker, New York, 1989
- FERREIRA, A. A. *Abordagem estatística e computacional na otimização de meios de cultura para produção de antibióticos: o caso da cefalosporina C / Amauri Alves Ferreira*. -- São Carlos : UFSCar, 2003. 191 p
- FERREIRA, A,L.O. *Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado*. São Carlos: UFSCar, 2004. 190p
- GARCÍA-GALAN,M.J.; DÍAZAZ-CRUZ,M.S.;BARCELÓ,D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *Trends in Analytical Chemistry*, v.27,n.11,p.1008-1022, 2008
- HAYKIN, S. (1994). *Neural networks: a comprehensive foundation*. New Jersey: Prentice Hall
- HEADS OF MEDICINES AGENCIES - HMA. HMA definitions of the terms “Antibiotic” and “Antimicrobial” 2012. Disponível em: < http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Veterinary_medicines/00-HMA_Vet/02-HMA_Task_Force/03_HMA_vet_TF_AMR/2012_11_HMA_agreed_AB_AM_definiton s.pdf >. Acesso em: 05 abr. 2014
- HOKKA, C. O. e MORAIS, I. *Fermentação Semi Contínua I: Análise do Comportamento da Fermentação para Produção de Penicilina*. *Revista Brasileira de Tecnologia*, v.9, p. 175-180, 1978.
- KARIM, M.; YOSHIDA,N.T; RIVIRA, S.L.; SAUCEDO,V.M.; EIKENSD,B.; OH,G.S. - Review: Global and local neural network models in biotechnonology: application to different cultivation processes *Jouurnal Ferm. Bioeng.*, v. 83, p. 1-11, 1997.

- KOVÁCS, Zsoltl. Redes Neurais Artificiais:fundamentos e Aplicações.Segunda edição,Collegium Cognitio,1996
- OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O. T.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Strategies in the design of an enzymatic process for the synthesis of ampicillin: a whole cell E. coli recombinant penicillin amidase biocatalyst. Prog. Biotechnol., v. 11, p. 464-471, 1996b.
- PELLICCI, R. L. ; NASCIMENTO, C. A. O. . Programa de Simulação via Redes Neurais. 2001. Quím. Nova vol.33 no.3 São Paulo 201
- SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. *Pediatr Infect Dis J.* v. 19, p. 200-206. 2000.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial - Engenharia Bioquímica.* v. 2, Editora Edgard Blucher Ltda, 2001
- SOBRAVIME & AIS – LAC. O que é uso racional de medicamentos. Sobravime São Paulo: p. 50-56. 2001
- SWARTZ, R. W. Penicillins. In: MOO-YOUNG, M. *Comprehensive biotechnology.* Oxford, UK: Pergamon Press, 1985. v.3, p.7-47
- TAFNER, Malcon A Reconhecimento de palavras isoladas usando redes neurais artificiais. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1996
- TAVARES , W. MANUAL DE ANTIBIOTICOS E QUIMIOTERICOS ANTIINFECCIOSOS. Sao Paulo :Atheneu,1990
- WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance,* ASM Press: Washington, 2003
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? *Uso racional de medicamentos:temas selecionados,* Brasília, v. 1, n. 4, mar. 2004
- WEGMAN, M. A.; JANSSEN, M. H. A.; VAN RANTWIJK, F. – Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics – *Adv. Synth. Catal.,* vol. 343, no 6-7, p. 559-576, 2001