

AMARAL, Larissa Souza; POTRICH, Erich. O uso de ferramentas da microbiologia preditiva para análise multivariada em experimentos. In: WORKSHOP DE INOVAÇÃO, PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 4., 2019, São Carlos, SP. *Anais...* São Carlos, SP: IFSP, 2019. p. 16-19. ISSN 2525-9377.

O USO DE FERRAMENTAS DA MICROBIOLOGIA PREDITIVA PARA ANÁLISE MULTIVARIADA EM EXPERIMENTOS

LARISSA SOUZA AMARAL¹; ERICH POTRICH²

¹Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

²Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.

RESUMO: A experimentação na área microbiológica é rotineiramente realizada de maneira univariada em que as condições dos parâmetros experimentais são variadas individualmente. A análise multivariada surge como uma opção de maximização experimental, uma vez que permite a variação de todos os parâmetros simultaneamente, gerando uma maior quantidade de interpretações dos resultados com poucos experimentos além de menos tempo e gastos. O objetivo desse estudo é apresentar o Planejamento Fatorial Completo (PFC) como ferramenta de análise multivariada em experimentos microbiológicos. No decorrer do estudo são apresentadas as etapas necessárias para compreensão, desenvolvimento e análise de resultados como meio de maximização da resposta objetivo seguindo as diretrizes de amostragem em que se define os números de ensaios a serem executados, a influência dos níveis dos parâmetros e a importância de cada parâmetro. Toda essa abordagem bioestatística/matemática perpassa as fronteiras que envolve a rotina laboratorial convencional baseada na experimentação microbiológica univariada surgindo como uma alternativa rápida e eficiente para o desenvolvimento, melhora e otimização de processos microbiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Planejamento Fatorial Completo ². Microbiologia. Bioestatística.

ABSTRACT: Experimentation in the microbiological area is routinely performed of univariate form in which the conditions of the experimental parameters are individually varied. The multivariate analysis emerges as an option of experimental maximization, since it allows the variation of all the parameters simultaneously, generating a greater amount of interpretations of the results with few, experiments besides less time and expenses. The objective of this study is to present the Full Factorial Design (FFD) as a multivariate tool in microbiological experiments. During this study, are present the necessary steps to for understanding development and analysis of the results as a means of maximizing the objective response following the sampling guidelines in which the numbers of tests to be performed are defined, the influence of the parameter levels and the importance of each parameter. All this biostatistical/mathematical approach crosses the boundaries that surround the conventional laboratory routine based on the univariate microbiological experimentation appearing as a fast and efficient alternative for the development, improvement and optimization of microbiological processes.

KEYWORDS: Full Factorial Design ². Microbiology. Biostatistics.

INTRODUÇÃO

Atualmente os experimentos laboratoriais da carreira científica, em qualquer vertente da área microbiológica, são realizados através de uma varredura em busca das melhores condições com quantidades exaustivas de ensaios. Esse tipo de análise experimental é denominado de univariada, em que é analisado um parâmetro por vez. De acordo com Amaral e outros (2018, p.29, tradução nossa), a forma univariada: “[...] permite um maior gasto experimental, demanda um tempo elevado para obtenção e análise dos resultados, além de apresentar respostas objetivas as quais não relacionam a

interação de todas as condições experimentais utilizadas no processo chegando-se a resultados preteridos”. O presente trabalho tem por objetivo apresentar a análise multivariada como uma alternativa a univariada para o delineamento de experimentos laboratoriais microbiológicos, fazendo-se uso do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (PFC 2^3). Sabe-se que todas as pesquisas e experimentações relacionadas a microbiologia, há extensas tentativas para se alcançar um resultado pretendido, ou seja, um ponto ótimo de acordo com a resposta que se almeja. A análise multivariada surge resolvendo esse emblema permitindo que se explore a performance conjunta das variáveis e se determine a influência ou importância de cada uma. (BALBASI, 2013 e MOHAMMED et al., 2017). Todos os parâmetros são variados e analisados simultaneamente levando a uma obtenção mais acelerada dos resultados devido a uma quantidade menor de experimentos, assim economiza-se tempo, gastos e há o usufruto de uma grande variação de análises e interpretações. (BALBASI, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

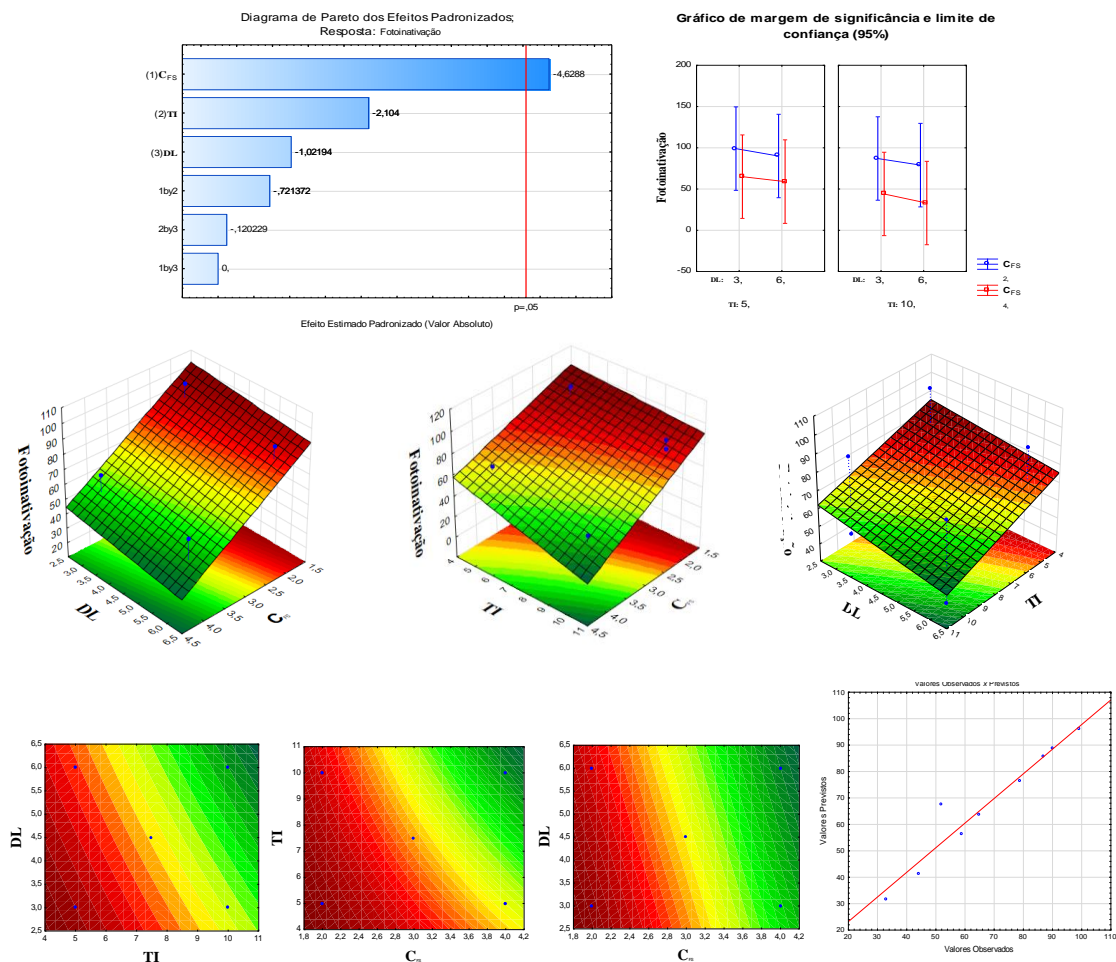
No PFC é selecionado de 2 a 4 parâmetros para se analisar em um processo. Supondo que em um processo seja selecionado 2 parâmetros com dois níveis cada, ou seja, dois valores diferentes para cada parâmetro, logo, a representação será PFC 2^2 (2 níveis para cada um dos 2 parâmetros) que resultam em 4 experimentos diferentes. (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2009). Caso seja escolhido 3 parâmetros, a representação será PFC 2^3 (2 níveis para cada um dos 3 parâmetros) resultando em 8 experimentos, e assim por diante. Para dar continuidade a essa explicação, é necessário abordar uma suposição para fins didáticos. A intenção é demonstrar a empregabilidade e adequação do planejamento fatorial completo a um processo de fotoinativação bacteriana através da terapia fotodinâmica antimicrobiana. Supõe-se que para a fotoinativação de uma bactéria, seja escolhida com base em buscas referenciais, os níveis do parâmetro 1 (Concentração - C_{FS}) igual a 2 e 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, níveis do parâmetro 2 (Tempo de Incubação - TI) de 5 e 10 minutos e os níveis do parâmetro 3 (Dose de Luz - DL) de 3 e 6 J cm^{-2} . Além desses pontos experimentais, é necessário adicionar um ponto central (PC) que seria 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de C_{FS} ; 7,5 min de TI e, finalmente, 4,5 J cm^{-2} de DL. Os PCs são exatamente os pontos no meio de cada nível. Após a obtenção de um suposto resultado nas 9 condições, a matriz experimental foi analisada utilizando um software estatístico chamado de Statistica[®]13 utilizando a função “DOE” com a finalidade de evidenciar a importância dos parâmetros bem como a variação dos níveis, através do diagrama de Pareto e do gráfico de interações dos níveis e dos parâmetros. Além disso, o software permitiu obter os gráficos de superfície de resposta, de contorno e de valores previstos e observados no modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Supondo-se plena validade dos resultados, foi possível observar através do Diagrama de Pareto de acordo com a Fig. 1A que o parâmetro C_{FS} foi estatisticamente significativo estando dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, apresenta o valor-p < 0,05. Todos os demais parâmetros estudados no processo de fotoinativação bacteriana, como TI e DL, não apresentaram significância estatística. As interações entre os parâmetros também não foram significantes estatisticamente. A Fig. 1B também possibilita a visualização dos parâmetros importantes e significantes envolvidos no processo de fotoinativação, no entanto também permite visualizar a influência dos níveis de cada parâmetro. Foi listada três diferentes formas gráficas para enfatizar os resultados como o gráfico de superfície (3D), o gráfico de contorno (2D) e também o gráfico de valores observados e previstos pelo modelo. Os gráficos de superfície, representados pela Fig. 1 (C, D e E) são utilizados para se analisar as interações dos parâmetros e o quanto influenciam na resposta, que no caso é a % de fotoinativação bacteriana além de permitir a visualização de um modelo linear ajustado com R^2 de 0,93. Os gráficos de contorno Fig. 1 (F, G e H) também possibilitam visualizar a interação dos parâmetros. Em ambos os gráficos, de superfície e de contorno, quanto mais vermelho, maior a % de fotoinativação e em verde seria a menor porcentagem. Uma outra análise importante é a observação dos valores obtidos experimentalmente e comparar com os valores previstos dentro do modelo. Através da Fig. 1I foi possível observar todos os valores experimentais de fotoinativação bem como os valores de foram

previstos. Os valores de erro são as diferenças entre os valores observados e os valores previstos. O gráfico permite visualizar se os dados estão ajustados, quanto mais próximos são os valores, mais ajustado está o modelo.

Figura 1 – (A) Diagrama de Pareto, (B) Gráfico de margem de significância e limite de confiança de 95% dos parâmetros, (C, D, E) Gráficos de superfície 3D, (F, G, H) gráficos de contorno 2D e (I) gráfico de valores observados x valores previstos.



CONCLUSÕES

É evidente que ao longo dos últimos anos, muito progresso tem sido feito na área de microbiologia preditiva através de diversos modelos de análises multivariadas. O conhecimento de estatística aplicada, engenharia e microbiologia estão atualmente integrados a microbiologia preditiva. Pesquisadores estão atualmente usando essas ferramentas para executar uma extensa variedade de processos em busca de investigar e resumir os efeitos de condições variáveis. Vários *softwares* estão disponíveis para que os pesquisadores possam desenvolver seus próprios modelos. Na exemplificação didática apresentada, foi feita a análise multivariada através do Planejamento Fatorial Completo 2^3 em um processo de fotoinativação de uma bactéria pela Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. A maximização dos resultados foi realizada através do uso do diagrama de Pareto, do gráfico de significância dos níveis de cada parâmetro, dos gráficos de superfície e de contorno, e dos gráficos de

resultados previstos e observados. A extensa variedade de dados possibilitou um maior entendimento sobre cada parâmetro envolvido no processo levando a conclusão de que o modelo apresentado descreveu adequadamente a representação didática do processo de fotoinativação, podendo ser utilizado em qualquer aplicabilidade na área microbiológica.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L.S., AZEVEDO, E. e PERUSSI, J.R. The response surface methodology speeds up the search for optimal parameters in the photoinactivation of E. coli by photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 22, pp.26-33, 2018.

BALBASI, M. Application of full factorial design method to silicalite synthesis. *Materials Research Bulletin*, 48, pp. 2908-2914, 2013.

MOHAMMED, I., BANKOLE, M., ABDULKAREEM, A. et al. Full factorial design approach to carbon nanotubes synthesis by CVD method in argon environment. *South African Journal of Chemical Engineering*, 24, pp.17-42, 2017.

PEREIRA-FILHO, E.R., et al. Introducing factorial design concepts using experiments with multi-colored chocolates. **The Chemical Educator**, v. 14, p. 200-203, 2009.