

*Modelagem Cibernética de Cultura de
Saccharomyces cerevisiae com base no Ciclo
celular*

Anderson Mazolli Lisboa (anderson47@gmail.com)

André Alann Catarino de Oliveira (alannrj@gmail.com)

Projeto Final de Curso

Orientadores: Ofélia de Queiroz F. Araújo.
Maria Alice Zarur Coelho

AGOSTO/ 2007

Modelagem Cibernética de Cultura de *Saccharomyces cerevisiae*
com base no Ciclo Celular

Anderson Mazolli Lisboa

André Alann Catarino de Oliveira

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Andréa Medeiros Salgado – D.Sc.

Rodrigo Volcan Almeida – D.Sc.

Carlos André Vaz Jr. - M.Sc.

Orientado por:

Ofélia de Queiroz F. Araújo - Ph.D.

Maria Alice Zarur Coelho - D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Agosto / 2007

Lisboa, Anderson Mazolli; Oliveira, André A. C.

"Modelagem Cibernética de Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* com base no Ciclo Celular" / Anderson Mazolli Lisboa; André A. C. Oliveira. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio Janeiro, Escola de Química, 2007.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Ofélia de Queiroz F. Araújo.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Potencial elétrico. 3. Modelagem cibernética. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Maria Alice Zarur Coelho e Ofélia de Queiroz F. Araújo.

I. Título.

Citação:

“A partir desse dia, não guardei mais a menor dúvida a respeito do sucesso da minha invenção.”

Alberto Santos Dumont

AGRADECIMENTOS - Anderson:

Agradeço à todas as pessoas que ajudaram e/ou participaram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

No âmbito pessoal cito todos os parentes presentes e aos ausentes no cotidiano, todas as amizades tanto às de longa data quanto as recentes e finalmente, mas não importante, as namoradas. Estas pessoas ajudaram a desenvolver qualidades tais como: caráter, companheirismo, sinceridade e suprimir muitos dos meus defeitos.

Na formação acadêmica não posso deixar de agradecer a todos os professores (as) e orientadoras que direta ou indiretamente ajudaram a formação do meu atual nível de conhecimento.

Profissionalmente agradeço a todos os chefes (as) e colegas de trabalho principalmente aos mais antigos no ramo por terem me auxiliado à adequar meus conhecimentos e habilidade à necessidade da empresa além de me orientar em vários outros assuntos

AGRADECIMENTOS – André

Agradeço aos meus pais João e Lucinda por todo o carinho e esperança em mim depositada, além de todo o investimento feito em prol do meu futuro, fazendo de tudo para uma melhor formação tanto da minha vida profissional quanto do meu caráter.

Agradeço a minha namorada Lígia, por todo o amor e compreensão para que assim, eu pudesse ter chegado aqui.

Agradeço a todos do Laboratório 113: Roberta, Mariana, Gisele, Tatiana, Livia, as cearenses (Ana e Ariana), Bernardo, Etel, enfim todos, por dias de trabalho em alto astral e um clima muito hospitaleiro.

Agradeço ao Cauê, por ter ajudado muito na confecção desse trabalho contando muitas cicatrizes e tratando algumas imagens, sendo um grande co-co-orientado.

Agradeço ao Carlos André por ter me levado ao mundo da Engenharia Bioquímica e ao estresse celular, mesmo que isso lhe causasse uma acentuada “perda de cabelos”.

Agradeço a Priscilla, por toda a paciência, orientação e amizade que me deu nos momentos de maior desespero, e que como prêmio ganhou o prazer de ser minha orientadora de mestrado.

Agradeço aos meus amigos tanto de dentro como de fora da universidade por todo o apoio e compreensão pelos momentos de ausência.

Agradeço também a minha irmã e ao restante da minha família pela força mesmo nos dias mais difíceis, mesmo nos finais de semana em que estive ausente.

Agradeço as minhas orientadoras:

Ofélia → que mostrou ser uma profissional muito competente e dedicada. Agradeço também pela paciência sempre que precisei de sua ajuda. Espero que o nosso trabalho em equipe continue rendendo frutos como este.

Alice → por ter me dado oportunidade e sempre acreditar no meu potencial, fazendo com que cada vez eu consiga melhorar mais e mais. Sempre presente na medida do possível e sempre atenciosa. Além de ser uma profissional que ganhou o meu respeito e admiração. Será sempre orientadora mesmo que extra-oficialmente.

Agradeço também a Deus por tudo.

Resumo do Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Modelagem Cibernética de Cultura de *Saccharomyces cerevisiae* com base no Ciclo celular

Anderson Mazolli Lisboa (anderson47@gmail.com)

André Alann Catarino de Oliveira (alannrj@gmail.com)

Agosto / 2007

Orientadores: Ofélia de Queiroz F. Araújo - Ph.D.
Maria Alice Zarur Coelho - D.Sc.

Processos bioquímicos cruciais à viabilidade celular dependem do potencial elétrico através da membrana celular. É, portanto plausível propor-se que a aplicação do campo elétrico a uma célula viva promova respostas metabólicas semelhantes àquelas ligadas a outros tipos de estresses.

O presente trabalho visa caracterizar os efeitos da aplicação de potencial elétrico durante o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* S288C (ATCC 26108, α GLC mal gal 2) quanto à respostas fisiológicas (consumo de substrato, produção de etanol e crescimento celular) e à respostas morfológicas (tamanho celular e contagem de cicatrizes). Além de cultivos em uma única batelada, foram conduzidas bateladas com cortes, após esgotamento do substrato. O volume de corte foi de 50% do volume final da batelada, sendo meio fresco adicionado até atingir o volume original da batelada assim como a concentração inicial de glicose. Para a avaliação do ciclo celular utilizou-se o método de contagem de cicatrizes (corante calcoflúor) por microscopia de fluorescência na faixa de comprimento de onda de 330-370 μm . O número total de células, tamanho celular e o número de células em reprodução foram quantificados por processamento digital de imagens.

Observou-se que o potencial elétrico aumenta o transporte de açúcar para a célula evidenciado por um maior consumo de substrato sem que paralelamente fosse observada uma maior taxa de crescimento celular. A produção de glicogênio é impactada assim como a produção de etanol. Adicionalmente, através da técnica de processamento digital de imagens, denota-se o impacto do potencial elétrico na morfologia celular e no histograma de distribuição de tamanhos. Estes indícios foram validados pelas análises de contagem de cicatrizes que apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre a cultura controle e àquela submetida ao potencial elétrico, sugerindo alteração no ciclo celular.

Com base nestas evidências experimentais, é proposto um modelo baseado em rede metabólica simplificada, numa abordagem cibernética e de balanço populacional discretizado em classes de células, de acordo com o número de cicatrizes. O modelo desenvolvido foi empregado na investigação de condições experimentais que exarcebem a produção de etanol, através do desenvolvimento de estratégias de alimentação e aplicação de potencial.

Sumário

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	10
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
II.1 A LEVEDURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE	12
II.2 CICLO CELULAR	13
II.3 APLICAÇÃO DE POTENCIAL ELÉTRICO	14
II.4 MODELAGEM DE SISTEMAS BIOLÓGICOS:	15
<i>Balanco populacional</i>	17
<i>Modelo Populacional por Lumps</i> :	19
<i>Modelo Cibernético</i> :	19
CAPÍTULO III - METODOLOGIA EXPERIMENTAL	25
III.1 MICRORGANISMO:	25
III.2 PREPARO DO INÓCULO:	25
III.3 UNIDADE EXPERIMENTAL:	25
III.4 FORMAS DE CONDUÇÃO DO PROCESSO:	26
III.5 MONITORAÇÃO E ACOMPANHAMENTO:	27
III.5.1 <i>Análises Fisiológicas</i>	27
a) Biomassa:	27
b) Glicogênio:	27
c) Glicose:	28
d) Etanol:	28
III.5.2 <i>Análises Morfológicas</i> :	28
a) Cicatrizes	28
b) Área e volume	29
CAPÍTULO IV - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO	30
IV.1 EXPERIMENTOS EM UMA BATELADA	30
IV.2 EXPERIMENTOS COM BATELADAS POR CORTES	35
CAPÍTULO V - MODELAGEM MATEMÁTICA:	41
V.1 MODELO POPULACIONAL DISCRETO (MPD):	41
V.2 MODELO POPULACIONAL DISCRETO CIBERNÉTICO (MPDC):	47
V.3 BALANÇO POPULACIONAL DISCRETO COM MODELO CIBERNÉTICO EXPANDIDO (MPDCEXP):	54
CAPÍTULO VI - AJUSTES DE PARÂMETROS DO MODELO	57
CAPÍTULO VII - ANÁLISE DO PROCESSO FERMENTATIVO	70
CAPÍTULO VIII - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	74
CAPÍTULO IX - BIBLIOGRAFIA	76

Índice de Figuras

Figura II-1: Ciclo Celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Oliveira <i>et al.</i> 2005)	14
Figura II-2: Modelo morfológicamente estruturado (Hartzis e Porro, 2006).....	17
Figura II-3: Vias Metabólicas Elementares	21
Figura II-4: Interações entre vias elementares.....	22
Figura III-1: Reator Bioeletroquímico.....	26
Figura III-2: Gráficos para exemplificar os experimentos	26
Figura III-3: Curva Padrão de Peso Seco	27
Figura IV-1: Concentração de células e glicose ao longo de um experimento controle (sem aplicação de potencial elétrico).....	30
Figura IV-2: Concentração Celular e de Glicose em experimentos com aplicação de potencial elétrico a partir de S0/2.....	31
Figura IV-3: Perfil da concentração de glicogênio em experimento controle.....	32
Figura IV-4: Perfil da concentração de glicogênio em experimento com aplicação de potencial elétrico.....	32
Figura IV-5: Distribuição de tamanhos dos experimentos sem potencial	33
Figura IV-6: Distribuição de tamanhos dos experimentos com potencial.....	33
Figura IV-7: Perfil da concentração celular, glicose e etanol em experimento controle.....	35
Figura IV-8: Perfil da concentração celular, glicose e etanol em experimento com aplicação de potencial elétrico (em t = 420 min).	35
Figura IV-9: Concentração de glicogênio no experimento controle.	36
Figura IV-10: Concentração de glicogênio no experimento com aplicação de potencial elétrico.	37
Figura IV-11: Distribuição de tamanhos dos experimentos sem aplicação de potencial elétrico.	37
Figura IV-12: Distribuição de tamanhos dos experimentos com aplicação de potencial elétrico.	38
Figura IV-13: Distribuição por idades no ponto de corte dos experimentos.....	39
Figura IV-14: Distribuição por idades ao final dos experimentos.....	39
Figura V-1: Curva experimental de viabilidade celular x idade (Powell <i>et al.</i> , 2000)	44
Figura V-2: Curva simulada de viabilidade celular.....	45
Figura V-3: Relação entre tamanhos das células mãe e filha.....	46
Figura V-4: Rede metabólica de uma célula eucariótica (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway database)	47
Figura V-5: Rede metabólica proposta.....	48
Figura VI-1 Ajuste do MPD sem potencial (experimento 8).	62
Figura VI-2: Ajuste do MPD sem potencial (experimento 9).....	63
Figura VI-3: MPD com potencial.....	64
Figura VI-4: Modelo cibernético sem potencial.....	65
Figura VI-5: Modelo cibernético com potencial.	65
Figura VI-6: Modelo cibernético expandido sem potencial.	66
Figura VI-7: Modelo cibernético estendido com potencial.....	67
Figura VII-1: Simulação de bateladas consecutivas para concentração de 5 g/l de glicose.....	72
Figura VII-2: Visão ampliada da produção de etanol na simulação de concentração inicial de 5 g/l de glicose.	72
Figura VII-3: Simulação de bateladas consecutivas para concentração de 20 g/l de glicose.....	73

Índice de Tabelas

Tabela IV-1: Tabela comparativa da taxa específica de crescimento (μ) e do consumo de glicose (- dS/dt) de ambos os experimentos	31
Tabela IV-2: Tabela comparativa do sigma, da média e do desvio padrão das curvas de distribuição por tamanhos dos experimento em uma batelada.....	34
Tabela IV-3: Fração de células gemulantes dos experimentos com uma batelada com e sem potencial.....	34
Tabela IV-4: Tabela comparativa das taxas específicas de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol de ambos experimentos.....	36
Tabela IV-5: Tabela comparativa do sigma, da média e do desvio padrão das curvas de distribuição por tamanhos.....	38
Tabela IV-6: Fração de células gemulantes nos experimentos com e sem potencial.....	39
Tabela V-1: Diferenças entre as equações dos modelos cibernéticos	55
Tabela VI-1: Valores da literatura utilizados nos modelos	58
Tabela VI-2: Valores obtidos na otimização do modelo populacional discreto (MPD)	58
Tabela VI-3: Valores obtidos na otimização do modelo populacional discreto cibernético (MPDC)	59
Tabela VI-4: Valores otimizados pelo modelo populacional discreto cibernético expandido (MPDCExp)	60
Tabela VI-5: Número de análises experimentais por experimento	61
Tabela VI-6: Resumo das condições experimentais.....	61
Tabela VI-7: Volume dos tamanhos críticos da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hartweell & Unger 1977).....	68
Tabela VI-8: Análise da qualidade de ajustados modelos.....	69
Tabela VII-1 : Simulações em bateladas seqüenciais.....	70

Capítulo I - Introdução

A fermentação como processo industrial apresenta hoje uma importância crescente em setores-chaves da economia. Assim é, que mais de 300 empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos, tendo sido a produção microbiológica em escala industrial iniciada a partir da primeira guerra mundial. Atualmente, existem mais de uma centena de produtos viáveis de serem obtidos através da via fermentativa. O grupo microbiano mais utilizado em fermentações são os fungos, em especial fungos unicelulares: as leveduras (<http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>), organismos eucarióticos, não móveis, aclorofilados, quimiossintetizantes, capazes de se reproduzir sexuadamente e assexuadamente, sendo a forma mais comum de divisão celular por gemulação.

Nas últimas décadas observou-se um aumento maciço no uso de leveduras como modelo de organismo eucarioto para o estudo de fenômenos celulares fundamentais, em parte devido ao aumento dos conhecimentos a cerca de seu genoma, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estes conhecimentos permitem a manipulação do genoma gerando cepas transformadas capazes de expressar uma determinada característica desejada. Assim, genes humanos vêm sendo introduzidos em células de levedura a fim de produzir proteínas como o hormônio do crescimento, insulina, e outros compostos usados no tratamento do câncer. O projeto Genoma, que visa sequenciar todo o genoma humano, tem comparado as seqüências de DNA recém obtidas com àquelas descritas para as leveduras, em 1997, e tem verificado que apresentam por vezes similaridade surpreendente. Esta homologia abriu novos horizontes para o estudo das bases moleculares de diversas enfermidades metabólicas. Tais descobertas ilustram a indubitável importância da levedura, como célula modelo, no desenvolvimento da ciência, em particular da Bioquímica (<http://www.members.tripod.com/emersonam/erveja.html>). Em consequência, há forte produção científica na caracterização deste microorganismo no que se refere ao seu ciclo celular e às suas rotas metabólicas.

A aplicação de potencial ou campo elétrico em células tem sido investigado para a esterilização de alimentos e fármacos onde a aplicação de temperatura, agentes químicos ou ultra-violeta é contra-indicado (Winston Ho *et al.*, 2001). Adicionalmente,

altas tensões elétricas por alguns segundos são aplicadas em procedimentos rotineiros de incorporação de plasmídeos exógenos em células microbianas.

Estudos prévios do Grupo de Pesquisa permitiram escolher o potencial elétrico a ser aplicado e demonstraram que uma baixa tensão aplicada por períodos maiores de tempo (acima do tempo de geração da célula) possibilitaram uma maior permeação de nutrientes para o interior das células de *Saccharomyces cerevisiae* (Araujo *et al.*, 2004). A utilização do potencial também conduziu a alterações no ciclo celular, na taxa de consumo de açúcar e no perfil temporal na produção de etanol (Rocha-Leão *et al.* 2005).

Vodovnik *et al.* (1992) comprovaram que a utilização de campo elétrico pode acelerar o crescimento de células animais do corpo humano e também ser responsável pela dizimação de células cancerígenas. A explicação encontrada pelos autores é que a célula cancerígena, por se reproduzir muito frequentemente, possui uma membrana com diferença de polaridade entre o meio intracelular e extracelular um pouco diferente das células animais saudáveis. Os autores observaram a regeneração mais de células novas restituindo os tecidos danificados e a diminuição do volume dos tumores em ratos inoculados com células cancerígenas.

O objetivo deste trabalho é avaliar os fenômenos envolvidos na aplicação de potencial elétrico no que tange ao ciclo celular e à produção de metabólitos, notadamente de etanol, assim como empregar um modelo com abordagem metabólica para a descrição dos resultados experimentais. A metodologia empregada envolve uma série de experimentos em batelada e em batelada por cortes, sob diferentes condições operacionais, com e sem a aplicação de potencial elétrico. O modelo proposto associa uma abordagem populacional simplificada à estabelecida representação cibernética proposta por Ramkrishna (1998 a,b,c,d) . Regressão linear foi empregada para ajuste dos parâmetros do modelo às condições experimentais observadas. O modelo permitiu avaliar o desempenho em diferentes cenários experimentais identificando situação de significativo aumento de rendimento em etanol.

Capítulo II - Revisão Bibliográfica

II.1 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular porque seu metabolismo possui, semelhantemente aos de eucariotos superiores, mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450), tornando este microorganismo uma valiosa ferramenta de estudo do metabolismo e fisiologia celular. Os ensaios realizados com microorganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. (Soares *et al.* 2005).

Esta levedura destaca-se por realizar uma rápida conversão de açúcar a etanol e gás carbônico (CO₂). Sabe-se que a glicose e outros açúcares exercem um efeito repressivo na síntese de um grande número de enzimas. A esse fenômeno é dado o nome de repressão catabólica. De uma outra maneira, a glicose pode realçar a síntese enzimática. As primeiras são enzimas mitocondriais ou enzimas ligadas à respiração celular, já as segundas são enzimas ligadas ao metabolismo fermentativo.

O ambiente externo e suas mudanças influenciam fortemente o comportamento fisiológico da levedura. O controle da concentração inicial de açúcar em valores baixos impede a fermentação, porém, elevados valores desta concentração promovem a repressão catabólica acompanhada da diminuição do rendimento em biomassa. Em aplicações industriais, o interesse especial no controle de fluxos metabólicos é direcionar a produção para o metabólico de interesse (etanol ou biomassa, por exemplo). A relação entre o consumo de glicose e o ciclo celular é portanto relevante para o desenvolvimento de processos biotecnológicos através do domínio de técnicas para o estímulo de uma cultura por variáveis externas.

II.2 Ciclo Celular

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui quatro fases assimétricas durante o seu ciclo celular controladas pelo seu crescimento (Hartwell & Unger, 1977), como ilustrado na Figura 2.1. Durante o estágio G1, o evento START ocorre somente após a célula adquirir uma determinada massa. Após o START, a célula começa a replicar o seu material genético e também o citoplasma. Componentes sintetizados após o START, durante as fases S e G2 são direcionados para uma gêmula, que cresce progressivamente. No final da fase M, a gêmula se desprende da mãe, gerando uma célula filha com tamanho menor que o da célula mãe. Como a filha é menor, necessitará de um tempo maior para alcançar a massa mínima para o START. Portanto, o ciclo celular da célula filha será maior que o da célula mãe, exceto para cepas que crescem mais rapidamente (Creator & Joyne, 1993).

O envelhecimento da levedura é determinado pelo número de ciclos que a mesma realizou, ou seja, quantas vezes ela se duplicou. *Saccharomyces cerevisiae* se reproduz assexuadamente por gemulação e, como consequência desse processo, a célula mãe retém uma cicatriz de quitina no ponto de gemulação. Como a célula continua se dividindo, os locais onde houve gemulação raramente são re-utilizados (Sinclair & Guarente, 1998). O número de cicatrizes na parede celular está, portanto, diretamente relacionado ao número de vezes que aquela determinada célula se dividiu e é um marcador biológico para definir a idade de uma determinada célula. Tal mecanismo da reprodução induz a co-existência de duas subpopulações: células gemulantes e células não gemulantes (Figura II.1).

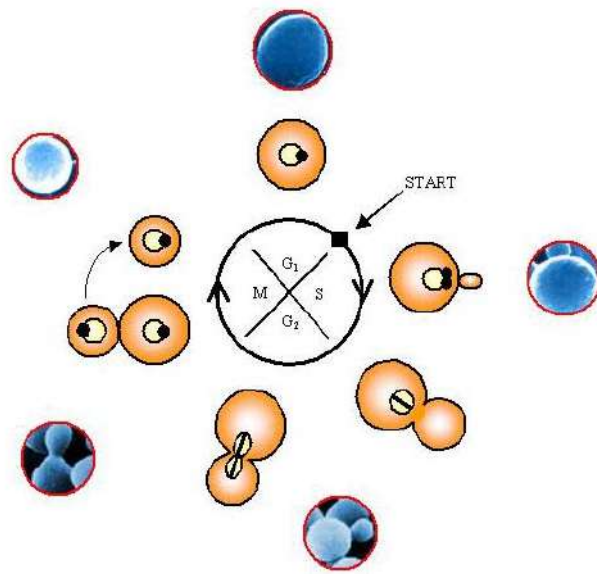


Figura II-1: Ciclo Celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira *et al.* 2005)

Depois de algumas divisões, a célula mãe torna-se substancialmente maior do que a filha gerada (Sinclair & Guarente, 1998). Kevin *et al.* (2003) observaram que células mãe muito velhas tendem a produzir filhas grandes. Por outro lado, células com carência de nutrientes durante períodos prolongados mostram um decréscimo na duração da vida especialmente no que tange à entrada no ciclo celular (Ashrafi *et al.*, 1999): a levedura deficiente em nutrientes pode sobreviver por períodos prolongados durante a fase estacionária, porém se for adicionado nutriente ao meio de cultura, estas células voltam a se replicar. Os autores observaram que o tempo de vida é reduzido em decorrência do estresse nutricional, e que esse decréscimo não estaria associado a mudanças genéticas nas células filhas.

II.3 Aplicação de potencial elétrico

Respostas celulares de microorganismos submetidos a potencial elétrico têm sido reportadas na literatura em biotecnologia (Bartlett *et al.*, 1997), em técnicas bioanalíticas (Lötzbeier *et al.*, 1996; Ci *et al.*, 1997; Gheorghiu and Asami, 1998) e com propósitos médicos (Chen *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2005).

Araújo *et al.* (2004) constataram variações no ciclo celular em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* quando submetidas a estímulos elétricos. Adicionalmente,

observaram através da microscopia ótica que as células se apresentaram menores em culturas submetidas ao estresse quando comparadas aos experimentos sem aplicação de potencial elétrico. Os autores relatam que a aplicação de potencial elétrico forçou o sincronismo da população. A observação de sincronismo em *Saccharomyces cerevisiae* foi relatada em várias outras condições experimentais como após pulsos de baixas concentrações de substrato, pH, aeração ou outra alteração ambiental (Münch *et al.*, 1992).

É importante notar que o estresse promovido por campo elétrico, ou “estresse eletroquímico” apresenta vantagens industriais sobre outros tipos de estresse pois não envolve nenhuma adição de produtos químicos externos, que aumentariam os custos de separação do produto e do tratamento de efluentes. O estresse eletroquímico apresenta dinâmica favorável pois a resposta não está sujeita a inércia apresentada pelo volume reacional, como por exemplo, no estresse térmico.

II.4 Modelagem de Sistemas Biológicos:

Os modelos usualmente empregados na descrição de sistemas biológicos podem ser classificados em (Duarte, 2000):

- a) não-segregados - consideram o comportamento de todas as células na população como sendo idênticas, isto é, a população é constituída por células indiferentes entre si;
- b) segregados – reconhecem as diferenças entre células tais como idade genealógica, tamanho e atividade celular.
- c) estruturados – consideram a célula como sendo composta de partes menores que interagem entre si e resultam no comportamento celular, isto é, o metabolismo.

Os modelos estruturados consideram que a célula possui como objetivo celular a maximização dos processos que envolvem a manutenção da sua viabilidade e da população a qual ela integra. Tal estrutura pode optar pelo crescimento ou pela entrada no estado de latência, também conhecido como quiescência. Na realidade, estes fenômenos envolvem tanto a complexa rede metabólica como o controle da mesma através da alteração de rotas conforme o meio na qual a célula está submetida.

Historicamente, vários modelos matemáticos empíricos foram desenvolvidos sendo empregados na microbiologia para descrever propriedades macroscópicas de

populações celulares. Um exemplo é o tradicional modelo de MONOD (Kovarova-Kovar & Egli, 1998) que relaciona a taxa de crescimento celular com a concentração de substrato, sendo assim um modelo não-segregado e não-estruturado.

O modelo de Monod é descrito pela Equação 2.1:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

onde X corresponde a concentração de células (g/L) e μ a taxa específica de crescimento (h^{-1}).

Por outro lado, a taxa específica de crescimento em meios com limitações nutricionais pode ser descrita pela Equação 2.2:

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad (2.2)$$

onde μ_{\max} é a taxa específica máxima de crescimento (h^{-1}), K_S é a constante de saturação (g/L) e S concentração de substrato (g/L).

A correlação entre a taxa de crescimento e a taxa de consumo de substrato é simplificada pela Equação 2.3.

$$\frac{dX}{dt} = - Y_{X/S} \frac{dS}{dt} \quad (2.3)$$

Onde $Y_{X/S}$ é a taxa de conversão de substrato em células

Observa-se que no modelo de Monod não há nenhuma caracterização celular nem qualquer relação fenomenológica entre o substrato e produto. Estes modelos usualmente empregados ratificam as observações biológicas e bioquímicas e são muitas vezes intuitivas, não prevendo assim, alterações de comportamento de forma dedutiva (Lumsden *et al.*, 1997).

Atualmente muitos modelos estão sendo propostos utilizando a descrição destes sistemas através de balanço populacional, onde a população é descrita como uma densidade de probabilidade de uma variável extensiva. A variável comumente escolhida é a massa, o volume ou a idade (Hartzis e Porro, 2006)

Balanco populacional

A teoria de balanço populacional (TBP) se baseia em estatística para descrever a dinâmica do crescimento da população (Frederickson & Ramkrishna, 1967 *apud* Hatzis & Porro, 2006). Diferente dos modelos contínuos que consideram a população microbiana como homogênea e a biomassa como uma propriedade extensiva da população, os modelos de balanço populacional consideram as diferenças morfológicas e fisiológicas das células como estruturas sub-celulares e composições diferentes.

O estado fisiológico da célula é especificado por uma coleção de propriedades de estado, como exemplo a massa total, o conteúdo protéico, de DNA e de RNA. As equações utilizadas na TBP descrevem as mudanças no ponto entre os estados fisiológicos da população em relação a eventos de crescimento e mudanças no meio.

Hatzis *et al.* (1995) incorporaram, num modelo de balanço populacional, uma estrutura temporal que é inerente aos processos de crescimento. Eles consideraram eventos de crescimento como sendo uma seqüência de estágios contínuos e transições entre estágios controlados por pontos de verificação que são funções dos estados fisiológicos das células. Esta extensão do modelo é a base para descrever a dinâmica da distribuição protéica durante o ciclo celular. Neste sentido, pode-se utilizar o modelo de balanço populacional com base em um dos modelos estruturados morfológicamente como o mostrado na Figura II.2.

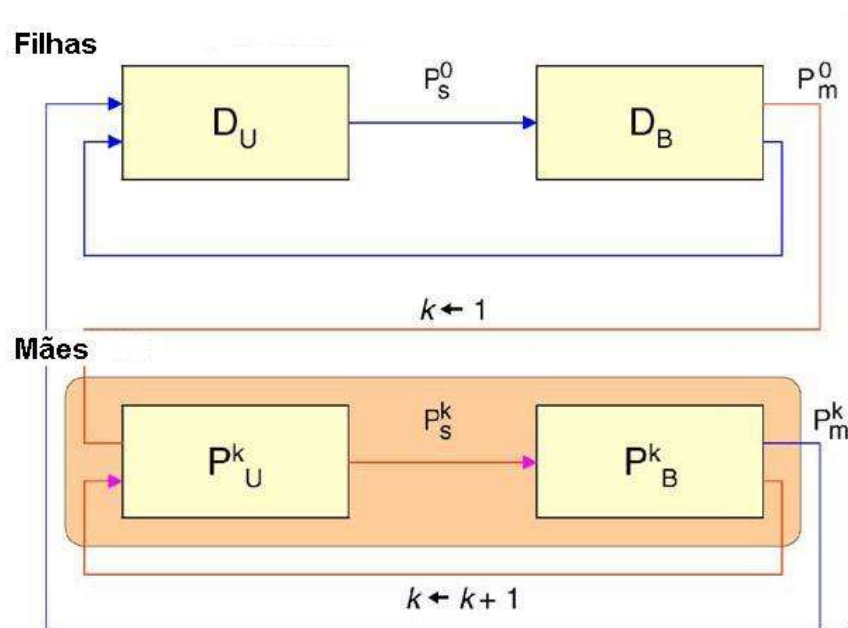


Figura II-2: Modelo morfológicamente estruturado (Hatzis e Porro, 2006)

Como pode ser observado no modelo proposto por Hartzis *et al.* (1995), o ciclo celular é simplificado em dois estágios: as células que não estão gemulando (U) e àqueles que estão em gemulação (B). A Figura II.2 utiliza o índice k para representar o número de gerações ou idade, geralmente menor que 25 gerações para células de leveduras (Jazwinski, 1990 *apud* Hartzis & Porro, 2006).

Estudos similares (Vanoni *et al.*, 1983; Mariani *et al.*, 1986 *apud* Hartzis & Porro, 2006) demonstraram que durante a fase exponencial de crescimento, a fração de células-mãe de primeira geração é igual a soma de todas as células-mãe das gerações posteriores e que as células-mãe com cinco ou mais cicatrizes representam apenas 3% da população.

O Balanço Populacional representa a população através de densidade de probabilidade, variante no tempo e considera a função de densidade de células com massa entre m e $m + dm$, $f(m,t)$. Basicamente com estas funções, pode-se estimar a probabilidade de uma célula de massa m entrar na fase START no próximo tempo dt .

O número de células em um dado instante de tempo é obtido integrando-se a densidade de probabilidade segundo a Equação (2.4), em um dado volume.

$$N_t = \int_V P(m,t) dm \quad (2.4)$$

onde N_t corresponde ao número total de células, P a densidade de probabilidade e m a massa.

Com o número total de células de um dado tamanho ou idade pode-se caracterizar matematicamente o consumo de nutrientes, formação de produto ou crescimento celular. Se, por exemplo, for aplicado o modelo de Monod obter-se-ia para consumo de substrato a taxa descrita pela equação (2.5), descrevendo o consumo de substrato das células com massa m_1 e respectivamente taxa de crescimento μ_1 .

$$\frac{ds_{m1}}{dt} = -\mu_1 \int_V P(m,t) dt \frac{S}{K+S} \frac{1}{Y_{X/S}} \quad (2.5)$$

onde $Y_{X/S}$ é a taxa de conversão de substrato em células

Este tipo de equacionamento demanda grande esforço computacional por envolver a resolução de várias equações íntegro-diferenciais.

Modelo Populacional por Lumps:

O modelo populacional por *lumps* se baseia na discretização das células por classes, isto é, células filhas e células mães com uma cicatriz, mães com duas cicatrizes, mães com três cicatrizes, mães com quatro cicatrizes e mães com mais de quatro cicatrizes.

O ciclo celular é simplificado em duas fases conforme a Figura II.2, A primeira fase de crescimento atinge a massa crítica (Start) de início de gemulação e a fase aonde ocorre a mitose gerando assim uma nova célula filha.

Observando-se a melhor a Figura II.2 nota-se que a massa da célula vai aumentando até ocorrer a mitose, e após a mitose uma parte da massa pertence a mãe e o restante pertence a filha, reiniciando assim um novo ciclo. No modelo populacional por *lumps*, após a mitose, o aumento da massa com o tempo é desconsiderado com objetivo de atualizar o número de células em cada classe e a massa da mãe da nova filha gerada.

Modelo Cibernético:

A modelagem cibernética foi proposta por Ramkrishna (1998 a,b,c,d) com o objetivo de relacionar alterações metabólicas com modificações nutricionais e genéticas. Segundo este modelo, a rede metabólica pode ser dividida em blocos elementares de construção: linear, convergente, divergente e cíclico. Antes de se discutir o modelo e seus blocos, devem ser consideradas as seguintes hipóteses:

- a) a rede metabólica possui objetivos fisiológicos – o microorganismo possui uma limitação de recursos celulares e para garantir seus objetivos fisiológicos, ele direciona a síntese e a atividade enzimática de acordo com a falta destes recursos;
- b) as atividades e as expressões das enzimas que catalisam uma funcionalidade são reguladas por variáveis cibernéticas de controle que otimizam o processo de modo que o microorganismo sempre atinja o seu objetivo fisiológico;
- c) a estrutura da rede metabólica descreve as formas de regulação possíveis, e esta forma é função de sua via metabólica. Em outras palavras, a rede metabólica é criada da melhor forma (estrutura topológica) para que as interações das enzimas entre si possam promover inibição e ativação de forma independente da rota

escolhida. Esta organização metabólica é formada por um conjunto de vias elementares que juntas compõem a rede metabólica. Uma via elementar é isolada, ou seja, somente sofre influência do resto da via metabólica através da entrada (substrato) e saída (produto) de material;

- d) a regulação praticada pela rede metabólica deve-se à estrutura topológica escolhida. Os elementos locais estão sujeitos às restrições dos recursos disponíveis para operar esta via elementar. Esta hipótese implica em várias complicações pois o mapa metabólico não pode ser modelado por um conjunto de reações isoladas sem considerar suas interdependências. Entretanto, é possível admitir que grupos de reações elementares formam uma rede coordenada, onde seus elementos se comunicam entre si. Deste modo, pode-se propor uma estrutura em níveis onde no primeiro nível observam-se as estruturas elementares isoladamente e, em outro nível, consideram-se suas interdependências;
- e) a regulação de uma via elementar não é necessariamente única, podendo várias rotas impactarem esta via. A rede metabólica é suficientemente complexa para que o microrganismo tenha alternativas diferentes (por exemplo, para inibir uma reação) e estas várias alternativas são conseqüências da evolução onde a rede sempre tem o objetivo de atender as necessidades do organismo.

O controle no metabolismo pode ser dividido em três componentes:

1. componente base - é o componente elementar com regulação associada as vias elementares.
2. componente regulatório local - construído a partir dos componentes elementares e rege a iteração entre eles.
3. controle global – baseia-se em sinais de controles nutricionais e topológicos coordenando a atividade de todas as redes metabólicas locais

Uma via elementar é considerada *substitutiva* quando as enzimas competem para a produção de um metabólito comum. Esta via também é denominada de *convergente*. Uma outra configuração da via metabólica ocorre quando as enzimas catalisam reações que competem pelo mesmo metabólito gerando produtos diferentes. Esta via é denominada de *complementar* ou *divergente*. A Figura II.3 apresenta os dois tipos de vias elementares.

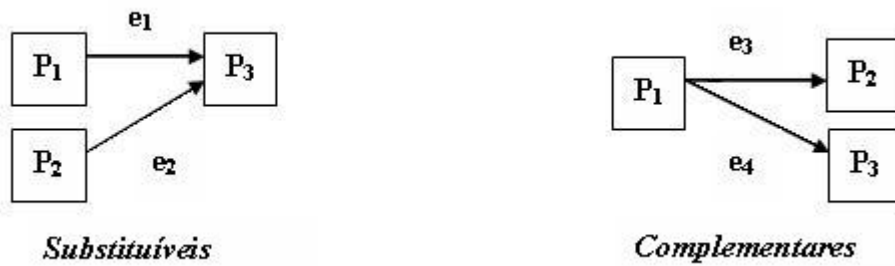


Figura II-3: Vias Metabólicas Elementares

No modelo cibernético a regulação metabólica local é determinada pela regulação global de acordo com a situação fisiológica da célula. As taxas utilizadas nos modelos cibernéticos utilizam uma aproximação do modelo de Monod, a saber:

Taxa de reação:

$$r = \mu^{\max} \left(\frac{e}{e^{\max}} \right) \frac{S}{K + S} \quad (2.6)$$

onde μ^{\max} e K representam respectivamente a taxa e a constante de saturação para um intermediário, e^{\max} e e concentração de enzima máxima e a atual concentração enzimática.

Taxa de expressão enzimática em relação aos metabólitos intermediários:

$$r_e = \alpha \frac{P}{K_e + P} \quad (2.7)$$

onde α e K_e correspondem a taxa e a constante de saturação enzimática, respectivamente.

A expressão e a atividade das enzimas variam de acordo com o tipo de via elementar. Para vias *convergentes* tem-se:

$$\text{Expressão: } u_{e_j} = \frac{r_{e_j}}{\sum_{i=1}^k r_{e_i}} \quad j = 1, 2, 3 \dots k \text{ (número de enzimas)} \quad (2.8)$$

$$\text{Atividade: } v_{e_j} = \frac{r_{e_j}}{\max(r_{e_i})} \quad i = 1, 2, 3 \dots k \quad j = 1, 2, 3 \dots k \quad (2.9)$$

Na via *divergente*, o modo de cálculo segue:

$$\text{Expressão: } u_{e_j} = \frac{r_{e_j} / \prod r_{e_i}}{\sum (r_{e_j} / \prod r_{e_i})} \quad (2.10)$$

$$\text{Atividade: } v_{e_j} = \frac{r_{e_j} / \prod r_{e_i}}{\max(r_{e_j} / \prod r_{e_i})} \quad (2.11)$$

As enzimas podem participar de mais de uma via elementar como mostra a Figura II.4

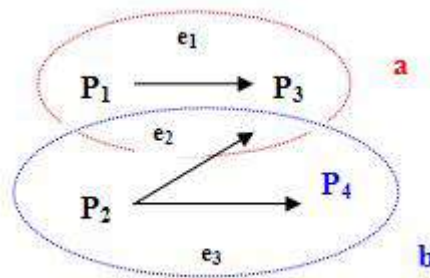


Figura II-4: Interações entre vias elementares

Neste exemplo, a enzima e_2 participa de dois “pools” de reações uma convergente e outra divergente. Neste caso ela possuirá duas atividades e duas expressões, uma em cada via elementar. As atividades e as expressões de enzimas como mostrado na Figura II.4 não podem ser estimadas apenas de acordo com uma única via mas deve-se considerar todas as vias das quais esta enzima participa. Neste sentido, as variáveis metabólicas locais representam a resultante de todas as atividades e expressões de uma enzima, dadas por:

$$u_{e_j}^l = \prod_{i=1}^n u_{e_j}^i \quad \text{- onde } j \text{ é o “pool” do qual a enzima participa} \quad (2.12)$$

$$v_{e_j}^l = \prod_{i=1}^n v_{e_j}^i \quad \text{- onde } j \text{ é o "pool" do qual a enzima participa} \quad (2.13)$$

No exemplo, para as variáveis locais tem-se:

$$u_{e_2}^l = u_{e_2}^a u_{e_2}^b \quad \text{- a enzima participa dos dois conjuntos } \underline{\mathbf{a}} \text{ e } \underline{\mathbf{b}} \quad (2.14)$$

$$u_{e_1}^l = u_{e_1}^a \quad \text{- a enzima 1 só participa do conjunto } \underline{\mathbf{a}} \quad (2.15)$$

$$u_{e_3}^l = u_{e_3}^a; v_{e_2}^l = v_{e_2}^a v_{e_2}^b; v_{e_1}^l = v_{e_1}^a; v_{e_3}^l = v_{e_3}^a \quad (2.16 \text{ a } 2.19)$$

As variáveis globais são o nível mais elevado de controle metabólico que é influenciado diretamente pelas modificações no meio e mudanças de objetivos metabólicos. No caso do modelo empregado neste trabalho, utilizou-se como expressão para a variável global:

$$u_e^g = \frac{K_e}{K_e + S} \quad (2.20)$$

ou seja, a expressão enzimática é máxima quando $S \rightarrow 0$ e mínima para $S \gg K_e$.

Para enzimas que não são influenciadas diretamente pela alteração do meio,

$$u_e^g = 1 \quad (2.21)$$

$$\text{para qualquer enzima, } v_e^g = 1 \quad (2.22).$$

As variáveis completas representam a resultante das modificações provocadas pelas contrações ou expansões das alternativas disponíveis pela célula sem se afastar do seu objetivo principal.

$$U_j = u_j^l u_j^g \quad (2.23)$$

$$V_j = v_j^l v_j^g \quad (2.24)$$

Balço de Massa para variáveis enzimáticas:

A variação da concentração da enzima disponíveis no tempo é dada pela Equação 2.25.

$$\frac{de_j}{dt} = r_{e_j} U_j - (rV_{Pg} + \beta)e_j + r_{e_j}^* \quad (2.25).$$

onde β é o decaimento enzimático, de primeira ordem, $r_{e_j}^*$ é a taxa constitutiva de síntese enzimática, r a taxa de crescimento e V_{Pg} a atividade da enzima do intermediário chave do crescimento (Pg).

Capítulo III - Metodologia Experimental

III.1 Microrganismo:

O microrganismo empregado foi a levedura *Saccharomyces cerevisie* S228C (ATCC 26108, α GLC mal gal 2) mantida a 4°C em meio YPD-agar,(1% de extrato de levedo, 2% peptona, 2% glicose, 3% agar) esterilizado a 100°C por 20 min.

III.2 Preparo do inóculo:

O pré-inóculo foi preparado em 500ml de meio YPD inoculado com células de *Saccharomyces cerevisie* S228C provenientes do *slant* de manutenção, mantidas por um período de 15 horas sob agitação de 160 rpm e temperatura de 28°C.

Este pré-inóculo serviu para inoculação do reator eletroquímico com volume total de 4 litros. A concentração celular inicial foi de aproximadamente 0,75g/L.

III.3 Unidade Experimental:

O biorreator conta com sistemas de agitação mecânica, sensores de oxigênio dissolvido (Actron OX2000), pH (Actron PH2000) utilizados na monitoração do bioprocesso. Os dados medidos pelos sensores foram continuamente enviados para a base de dados do *software* de controle supervisorio (FIX-DMACS 32, The Intellutio Inc.). O teor de oxigênio do meio era mantido constante através de malha de controle PID.

O potencial elétrico aplicado para o estudo de estresse elétrico foi de 0,75 V (Araújo *et al.*, 2004). Para a aplicação de potencial utilizou-se potenciostato (PG-01 Ohnimetra Instrumentos), eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de platina e eletrodo de referência de calomelano saturado, conforme apresentado na Figura III.1.

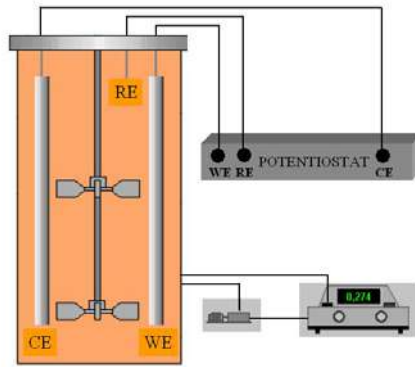


Figura III-1: Reator Bioeletroquímico
 RE = eletrodo referência (SCE); CE = contra-eletrodo (Pt);
 WE = eletrodo de trabalho (Pt), potenciostato e espectrofotômetro acoplado.

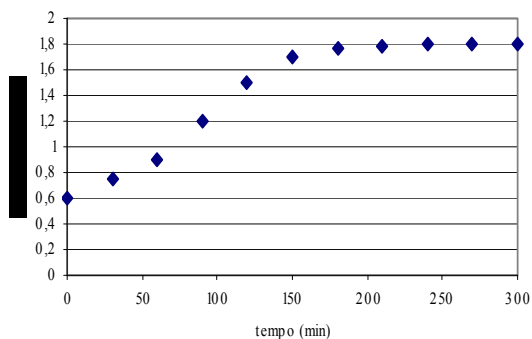
III.4 Formas de condução do processo:

. Batelada sem cortes:

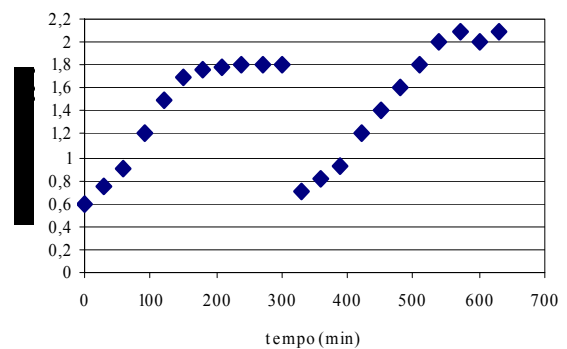
O experimento foi conduzido através de uma única batelada e pré-inóculo como anteriormente mencionado, de acordo com a Figura III.2.a com temperatura e agitação constantes.

. Batelada com cortes:

O experimento com cortes foi conduzido através de duas bateladas seqüenciais, ou seja, retirada de metade do volume do mosto quando da exaustão de substrato e adição de meio novo mantendo a mesma concentração inicial de substrato, de acordo com a Figura III.2.b com temperatura e agitação constantes iguais aos anteriores



(a)



(b)

Figura III-2: Gráficos para exemplificar os experimentos

III.5 Monitoração e acompanhamento:

III.5.1 Análises Fisiológicas

a) Biomassa:

O crescimento celular foi quantificado através do aumento de turbidez do meio de cultura medido em espectrofotômetro (Hach, DR400UV) a 570 nm e convertido a mg peso seco de células/mL através de curva-padrão representada na Figura III.3.

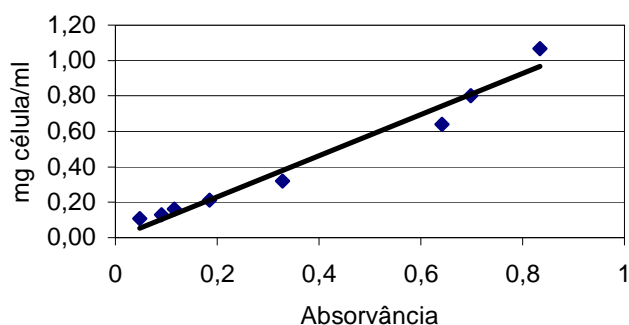


Figura III-3: Curva Padrão de Peso Seco

b) Glicogênio:

Amostras foram retiradas na fase de desaceleração do crescimento, com intervalos de 15 minutos, para a análise do glicogênio intracelular. As amostras foram centrifugadas, sendo as células suspensas em Na_2CO_3 0,25 M e incubadas a 100°C / 1,5 h. A seguir, alíquotas de 200 μL de cada amostra contendo as células em Na_2CO_3 foram incubadas com 50 μL de ácido acético 3M, 700 μL de tampão acetato 0,2M (pH 4,8) e 50 μL da enzima amiloglicosidade fúngica de *Rhizopus sp.* (492 U/mL) em tampão acetato 0,2M (pH 4,8) a fim de hidrolisar todo o glicogênio a 65°C / 30 min. A glicose liberada foi quantificada pelo método da glicose oxidase (In vitro Diagnóstica), de acordo com a metodologia descrita por Ferreira *et al* (2005).

Método de Glicose Oxidase (Manual – In vitro diagnóstica):

Alíquotas de 12 μL de amostra/padrão foram retiradas e o volume completado com 1200 μL de Reagente Enzimático. A amostra homogeneizada foi incubada por 20 min a $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ou 10 min a 37°C . A quantificação de absorvância a 500 nm foi realizada

contra o branco (água destilada) em no máximo 60 minutos e convertida a concentração de glicose através de curva-padrão previamente determinada com solução de glicose de 100 mg/dL ou 5,55 mmol/L.

c) Glicose:

Foram utilizados dois métodos para a quantificação.

. Método de Nelson cuja metodologia é descrita em Nelson (1944), em experimentos conduzidos com uma batelada.

. Método da Glicose Oxidase descrito acima no item II.5.1.b, em experimentos conduzidos com uma batelada.

d) Etanol:

Foi utilizado HPLC (Waters) com coluna Biorad Aminex HPX-87P (300x7,8mm), injetor com um loop de 5 μ L e temperatura de 40°C, fase móvel H₂O com um fluxo de 0,8mL/min e temperatura do forno em 80°C.

III.5.2 Análises Morfológicas:

Três amostras foram retiradas ao longo do crescimento celular para análise de imagens: inicial da batelada, em $S_0/2$ (metade da fase exponencial) ou na realização do corte do ciclo e ao final do processo.

a) Cicatrizes

Para a determinação do histograma de idade populacional foi utilizada metodologia de contagem de cicatrizes com auxílio de calcofluor: 0,5 mL de amostra foi lavado com água deionizada duas vezes, adicionando-se 0,5 ml de solução de 2 μ g/ml calcoflúor (corante) sendo mantidos no escuro por 10 minutos. O corante foi retirado por centrifugação e lavado, novamente, com água deionizada. As células foram suspensas em 0,3ml de água destilada sendo posteriormente preparadas lâminas a fresco para observação em microscópio com magnificação total de 100x, utilizando fluorescência na faixa de 320 a 350 nm. Foram contadas cicatrizes de aproximadamente 50 células em cada lâmina.

b) Área e volume

A análise morfológica de área e volume celular assim como o número de células gemulantes, não-gemulantes e totais foram obtidas por meio do processamento de imagens. A aquisição das imagens foi realizada com auxílio de microscópio ótico (Nikon Elipse E200) equipado com uma câmera CCD (Nikon Coolpix 990), sendo empregado aumento total de 400x. Três conjuntos de imagens contendo cada um no mínimo 100 objetos foram adquiridos ao longo do experimento. Essas imagens foram então tratadas e analisadas através de rotina implementada no ambiente MATLAB 6.1 (The Mathworks Inc), conforme descrito em Coelho *et al.* (2004).

Capítulo IV - Resultados Experimentais e Discussão

IV.1 Experimentos em uma batelada

a) Análise Fisiológica:

Primeiramente foram realizados experimentos ditos “controle”, ou seja, brancos, sem aplicação de potencial. Nesses experimentos foram observadas variações na concentração celular e na concentração de glicose do meio ao longo do tempo de batelada, conforme apresentado na Figura IV.1.

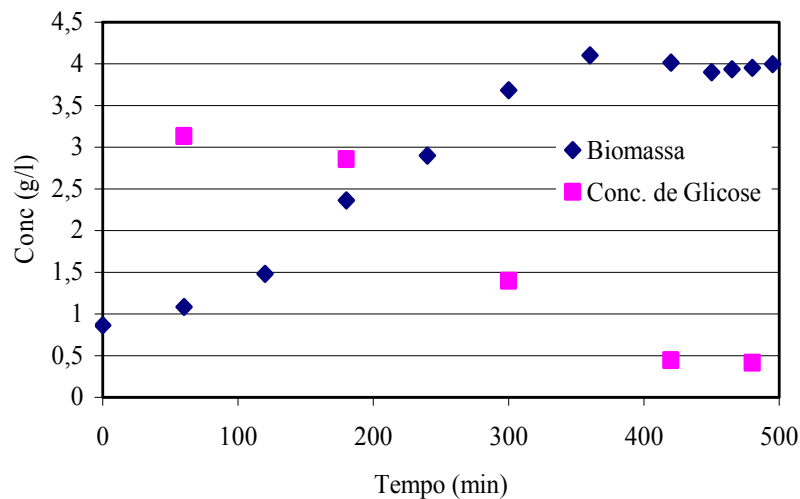


Figura IV-1: Concentração de células e glicose ao longo de um experimento controle (sem aplicação de potencial elétrico)

Em seguida, foram realizados experimentos com aplicação de potencial elétrico a partir da metade da fase exponencial de crescimento (em $S_0/2$). Os resultados obtidos são apresentados na Figura IV.2.

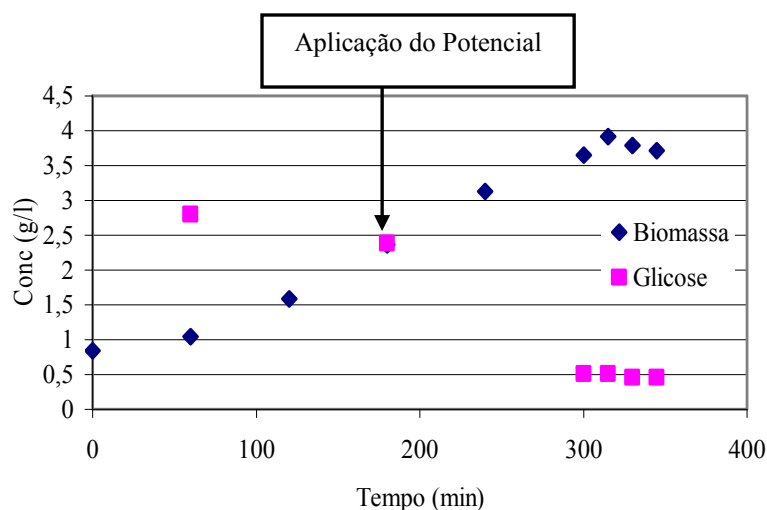


Figura IV-2: Concentração Celular e de Glicose em experimentos com aplicação de potencial elétrico a partir de S0/2.

A Tabela IV.1 mostra as taxas específicas de crescimento (μ) e de consumo de glicose ($-dS/dt$) para os diferentes experimentos realizados, com e sem a aplicação do potencial elétrico.

Tabela IV-1: Tabela comparativa da taxa específica de crescimento (μ) e do consumo de glicose ($-dS/dt$) de ambos os experimentos

Experimento	μ (h^{-1})	$-dS/dt$ ($g/l \cdot h$)
Controle	$0,246 \pm 0,04$	$0,0023 \pm 0,07$
Com potencial	$0,318 \pm 0,04$	$0,0044 \pm 0,07$

A aplicação do potencial elétrico influencia diretamente o aumento (30%) da taxa específica de crescimento o que pode ser explicado através do aumento da divisão celular (como será explicitado no item IV.1.b), além de aumentar (91%) também a taxa de consumo de glicose do microorganismo.

Medidas de acúmulo de glicogênio também foram realizadas a fim de se fazer uma comparação entre os dois tipos de experimentos em uma única batelada. Glicogênio é reconhecido como um dos parâmetros indicativos de estresse celular. Amostras para análise do glicogênio foram retiradas ao final dos experimentos, quando é alcançada a fase estacionária. Os resultados são retratados na Figura IV.3, para o experimento controle e na Figura IV.4, para o experimento com aplicação de potencial.

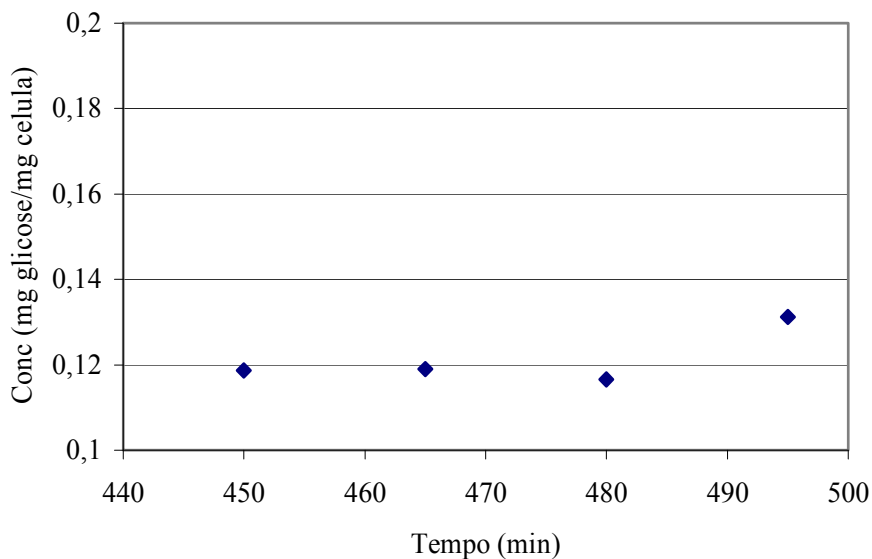


Figura IV-3: Perfil da concentração de glicogênio em experimento controle.

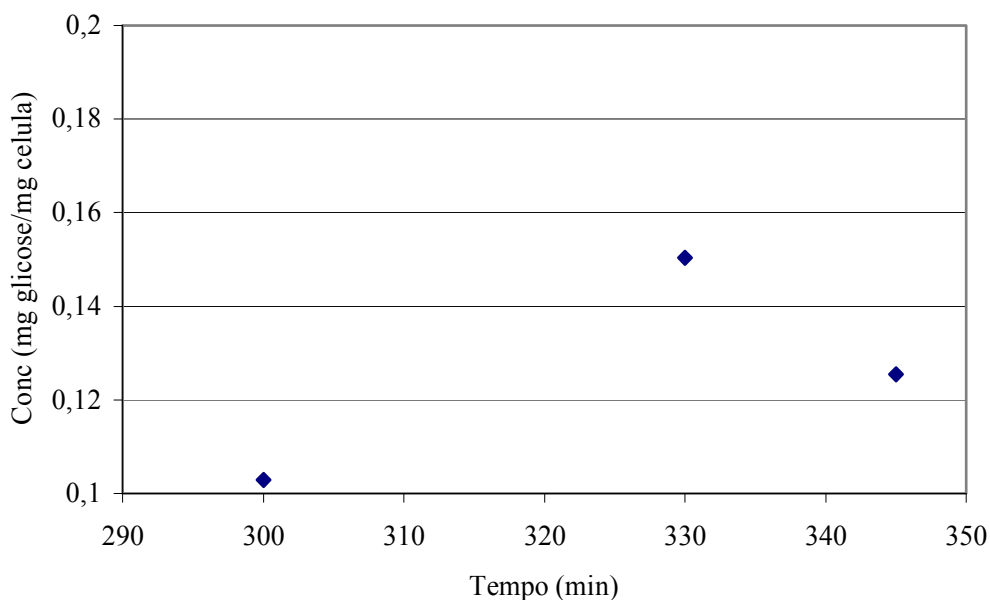


Figura IV-4: Perfil da concentração de glicogênio em experimento com aplicação de potencial elétrico.

O acúmulo de glicogênio em microrganismos ocorre usualmente em períodos de crescimento lento ou na ausência de crescimento onde há excesso da fonte de carbono. Pode-se observar nas Figuras IV.3 e IV.4 que houve acúmulo de glicogênio, porém devido à influência do potencial elétrico essa concentração dentro da célula possui uma leve tendência ao aumento como verificado na Figura IV.4.

Comparando-se todos os resultados dos experimentos conduzidos com uma única batelada, pode-se constatar que o potencial elétrico influencia a taxa de crescimento celular e a de consumo de glicose. Esse aumento não deve se refletir em

aumento da concentração de etanol, mas sim num deslocamento da rota bioquímica para o armazenamento de energia na forma de glicogênio intracelular.

b) Análise Morfológica:

A análise da distribuição de tamanhos da população foi realizada no início do experimento, em S0/2 e ao final do experimento. As áreas foram normalizadas entre 1000 e 6000 pixels, e as distribuições podem ser vistas nas Figuras IV.5 e IV.6.

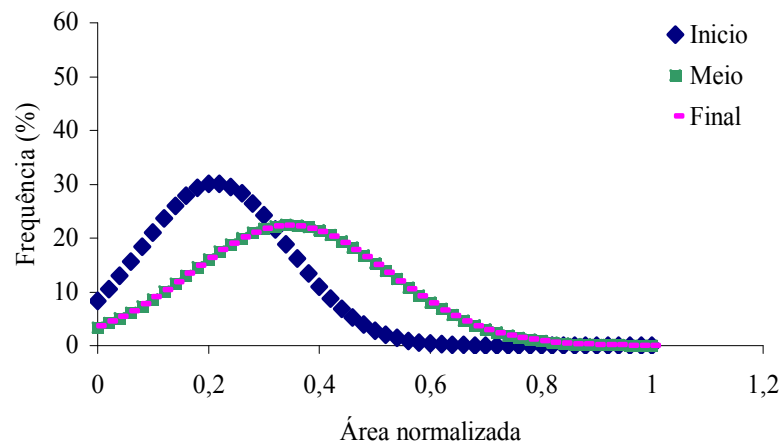


Figura IV-5: Distribuição de tamanhos dos experimentos sem potencial

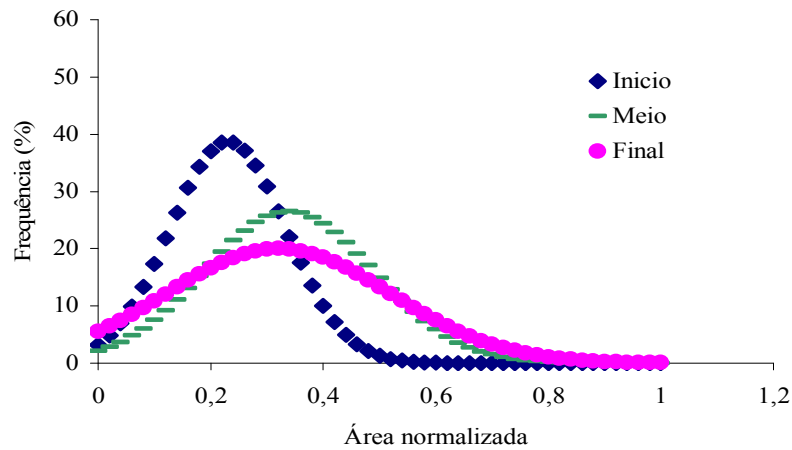


Figura IV-6: Distribuição de tamanhos dos experimentos com potencial

A Equação da Gaussiana é descrita a seguir:

$$p = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-\frac{(t-\mu)^2}{2\sigma^2}} dt$$

onde:

μ → Média

σ → Desvio Padrão

σ^2 → Variância

Esses parâmetros foram estimados pela ferramenta Solver do Excel.

Os resultados demonstram que o curso da batelada conduz a modificações na distribuição por tamanhos, aumentando tanto o sigma como a média, o que indica aumento de tamanho celular e de heterogeneidade da população, como pode ser observado na Tabela IV.2. Contudo, com a estratégia experimental adotada (batelada simples) estas diferenças não podem ser atribuídas à aplicação de potencial elétrico.

Tabela IV-2: Tabela comparativa do sigma, da média e do desvio padrão das curvas de distribuição por tamanhos dos experimento em uma batelada.

Sem Potencial	Início	So/2	Final	Com Potencial	Início	So/2	Final
Sigma	0,1322	0,1778	0,1789	Sigma	0,1031	0,1505	0,1995
Média	0,2120	0,3456	0,3410	Média	0,2305	0,3385	0,3203
Desvio Padrão	11,0609	8,0430	8,0016	Desvio Padrão	13,3184	9,5555	7,1670

Quanto à porcentagem de células gemulantes, notou-se que o potencial elétrico, quando aplicado não resultou em variação significativa, como observado na Tabela IV.3. É possível perceber que tanto na distribuição de tamanhos como na fração de células gemulantes, a população inicial dos experimentos poderiam ser consideradas distintas, o que inviabilizaria conclusões precisas.

Tabela IV-3: Fração de células gemulantes dos experimentos com uma batelada com e sem potencial.

	Corte	Final
Sem potencial	0,64	0,60
Com potencial	0,82	0,58

IV.2 Experimentos com bateladas por cortes

a) Análise Fisiológica:

Igualmente como o realizado com a batelada simples, os experimentos com cortes foram conduzidos com e sem (controle) aplicação de potencial elétrico, sendo o potencial sempre aplicado na segunda batelada, i.e. a batelada inicial foi sempre conduzida sem aplicação de potencial. O objetivo desta estratégia experimental foi partir de um cultivo inicial com células morfológicamente similares, i.e. na mesma fase de crescimento. A Figura IV.7 apresenta os resultados obtidos no experimentos controle.

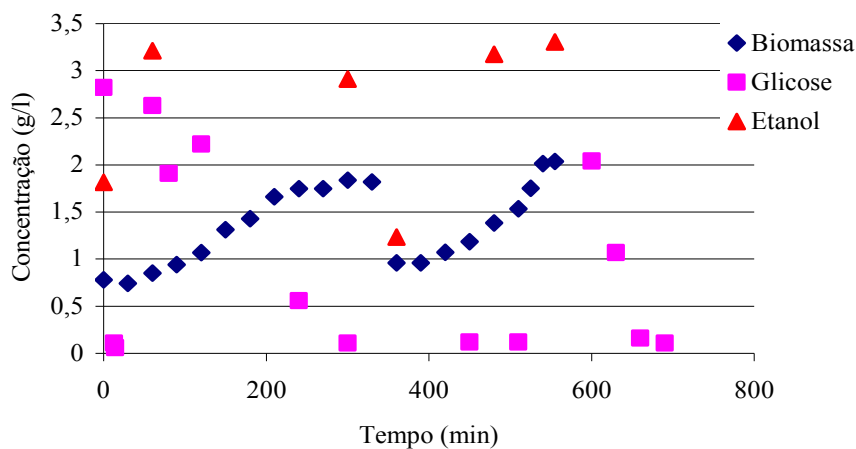


Figura IV-7: Perfil da concentração celular, glicose e etanol em experimento controle.

Perfis típicos obtidos durante os experimentos com aplicação de potencial na segunda batelada encontram-se na Figura IV.8.

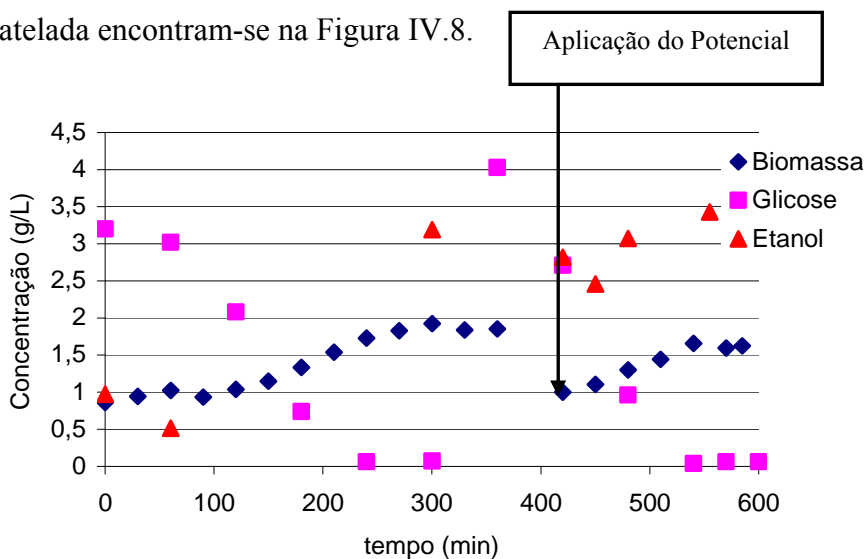


Figura IV-8: Perfil da concentração celular, glicose e etanol em experimento com aplicação de potencial elétrico (em $t = 420$ min).

A Tabela IV.4 apresenta as taxas específicas de crescimento (μ), de consumo de glicose ($-dS/dt$) e produção de etanol ($dEtOH/dt$) dos diferentes experimentos realizados.

Tabela IV-4: Tabela comparativa das taxas específicas de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol de ambos experimentos

Experimento	μ_1 (h^{-1})	$-dS_1/dt$ ($g/l*h$)	$dEtOH_1/dt$ ($g/l*h$)	μ_2 (h^{-1})	$-dS_2/dt$ ($g/l*h$)	$dEtOH_2/dt$ ($g/l*h$)
Controle	$0,258 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,07$	0,0282	$0,37 \pm 0,04$	$0,65 \pm 0,07$	0,0783
Com potencial	$0,264 \pm 0,04$	$1,02 \pm 0,10$	0,0061	$0,36 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,10$	0,1302

Observa-se que houve uma manutenção nos valores de μ mesmo quando o potencial elétrico foi aplicado, denotando que o crescimento celular não é influenciado nem pela estratégia experimental adotada, nem pela aplicação do potencial elétrico. Contudo, a aplicação de potencial gerou um aumento significativo de aproximadamente 166 % na produção de etanol. De acordo com a Tabela IV.4, houve um aumento na taxa de consumo de glicose quando aplicado o potencial elétrico da ordem de 100%. Pode-se então propor que a aplicação de potencial elétrico estaria facilitando o transporte de açúcar para o meio intracelular.

Medidas de acúmulo de glicogênio são retratadas na Figura IV.9 para o experimento controle e na Figura IV.10 para o experimento com aplicação de potencial.

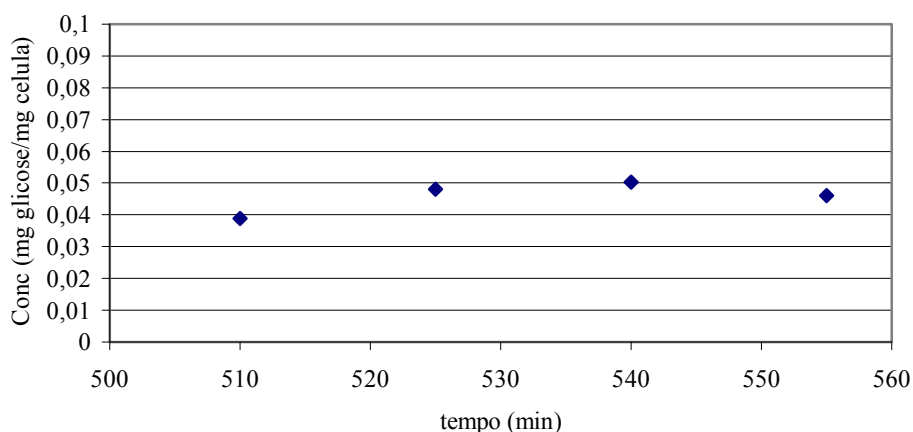


Figura IV-9: Concentração de glicogênio no experimento controle.

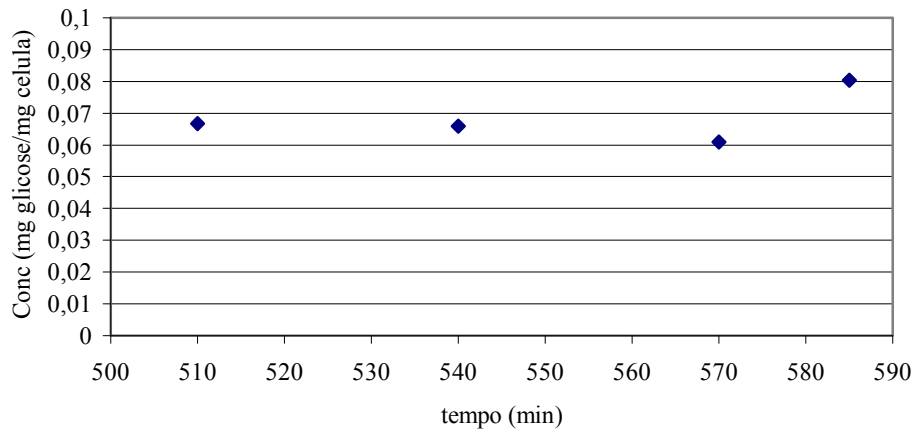


Figura IV-10: Concentração de glicogênio no experimento com aplicação de potencial elétrico.

Através das Figuras IV.9 e IV.10, pode-se concluir que o potencial elétrico influencia diretamente no aumento do conteúdo de glicogênio intracelular. Nota-se que a variação da concentração do glicogênio em experimentos com aplicação de potencial elétrico é consideravelmente maior do que nos experimentos controle.

b) Análise Morfológica:

A análise da distribuição de tamanhos foi realizada no início do experimento, após o corte, e ao final do experimento. As Figuras IV.11 e IV.12 mostram os resultados da análise digital das imagens dos experimentos conduzidos sem e com aplicação de potencial elétrico.

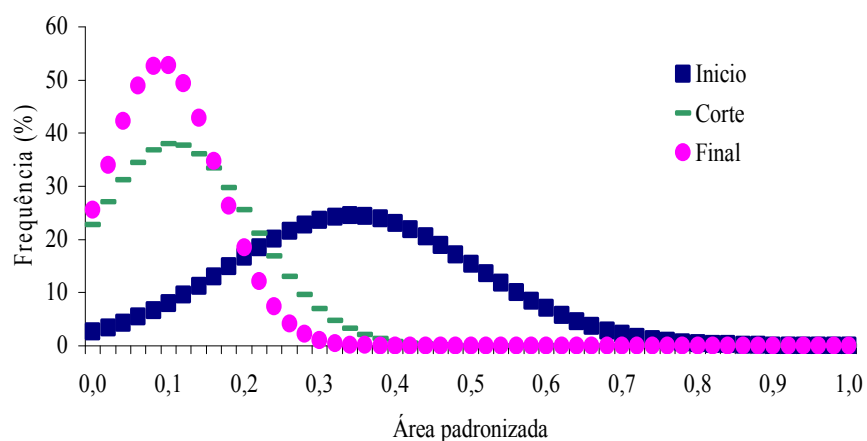


Figura IV-11: Distribuição de tamanhos dos experimentos sem aplicação de potencial elétrico.

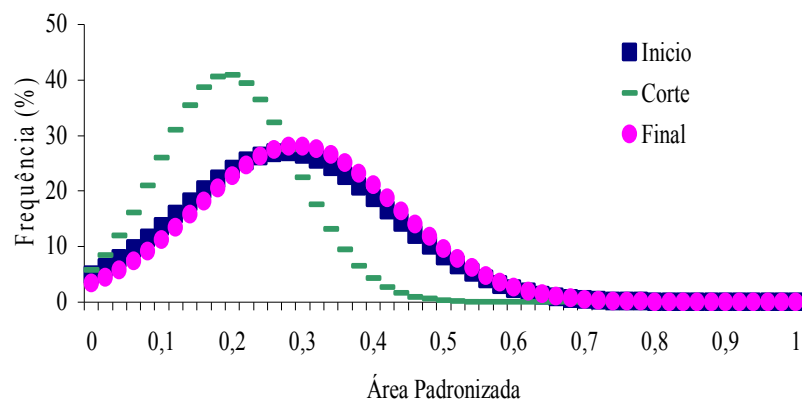


Figura IV-12: Distribuição de tamanhos dos experimentos com aplicação de potencial elétrico.

Os resultados das distribuições de tamanho mostram que até o ponto de corte, ambos os experimentos seguiram de maneira similar não havendo variações muito significativas em sigma e na média (Tabela IV-5), garantindo assim certa homogeneidade da população antes da aplicação do potencial elétrico. Cabe ressaltar também que de acordo com os valores decrescentes de sigma (início e corte) da Tabela IV-5, a população poderia estar entrando em sincronismo celular.

Outrossim, analisando as variações entre sigma e média, após o corte notamos que a aplicação de potencial parece conduzir a população com células menores que pode ser observado com a diminuição da média, enquanto que para o sistema sem aplicação de potencial este comportamento não é observado. Contrariamente, foi detectado ao final dos experimentos uma condição similar àquela encontrada no início do mesmo.

Tabela IV-5: Tabela comparativa do sigma, da média e do desvio padrão das curvas de distribuição por tamanhos.

Sem Potencial	Início	Corte	Final	Com Potencial	Início	Corte	Final
Sigma	0,1625	0,1049	0,1421	Sigma	0,1479	0,0974	0,0750
Média	0,3429	0,1064	0,2923	Média	0,2730	0,1930	0,0909
Desvio Padrão	8,8459	13,4057	10,1733	Desvio Padrão	9,8705	13,9567	16,8563

A Figura IV.13 apresenta réplicas da distribuição por idades no ponto de corte entre as bateladas seqüenciais. Nota-se que após a primeira batelada, a distribuição por idades é próxima demonstrando que no ponto de corte as populações encontravam-se em fases similares de reprodução.

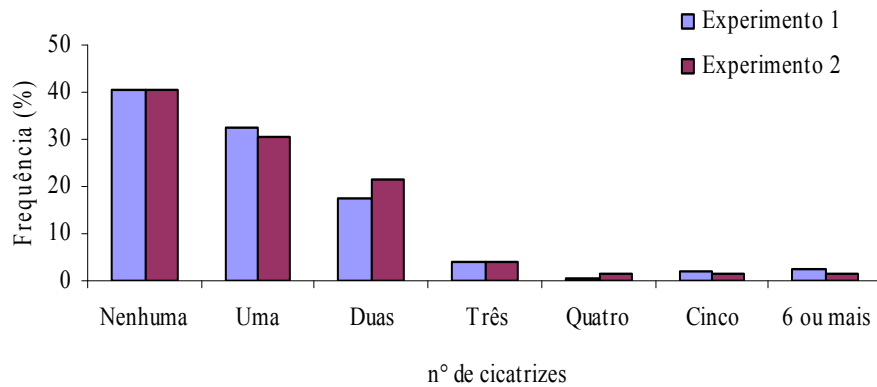


Figura IV-13: Distribuição por idades no ponto de corte dos experimentos

A Figura IV.14 mostra a comparação entre os resultados obtidos ao final da 2ª batelada nos experimentos com e sem aplicação de potencial e na Tabela IV.6, pode-se visualizar a fração de células gemulantes nos experimentos conduzidos com e sem a aplicação de potencial elétrico

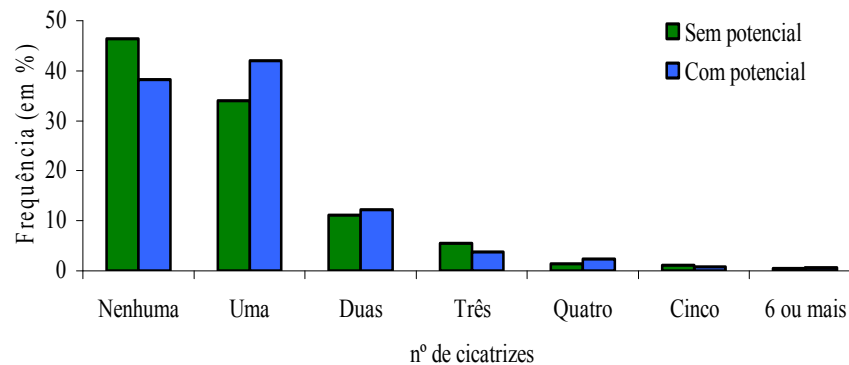


Figura IV-14: Distribuição por idades ao final dos experimentos

Tabela IV-6: Fração de células gemulantes nos experimentos com e sem potencial

	Corte (%)	Final (%)
Sem potencial	51,23	16,13
Com potencial	49,45	64,63

As distribuições apresentadas na Figura IV.14 demonstram que a aplicação de potencial elétrico conduz a um aumento do número de células que entraram em processo de divisão, indicando uma possível aceleração do relógio biológico ou diminuição do tamanho crítico para divisão. Corroborando os resultados obtidos pela

contagem do número de cicatrizes, observam-se comportamentos idênticos no que tange a fração de células em processo de gemulação (Tabela IV.6). A aplicação do potencial elétrico parece induzir o processo de divisão denotado pelo aumento da fração de células gemulantes no final do experimento, comportamento este oposto ao observado para as culturas controle (sem aplicação de potencial).

Capítulo V - Modelagem Matemática:

Neste projeto, duas abordagens são adotadas, a primeira sendo uma abordagem populacional discretizada e a segunda uma abordagem populacional discretizada cibernética.

V.1 Modelo Populacional Discreto (MPD):

O modelo proposto baseia-se nas hipóteses e no ciclo celular descritos no Capítulo II, e segue as seguintes premissas:

- a) Classificação das células por classes (“idades”), sendo cada classe composta de um conjunto idêntico de células:
- Células que não se dividiram (Filhas); i.e, células sem cicatriz;
 - Células que se dividiram uma única vez (uma cicatriz);
 - Células que se dividiram duas vezes (duas cicatrizes);
 - Células que se dividiram três vezes (três cicatrizes);
 - Células que se dividiram quatro vezes (quatro cicatrizes);
 - Células com número de divisão superior a 4 (mais de quatro cicatrizes).

Esta divisão é justificada pelo fato do número de células com mais de quatro cicatrizes ser inferior a 3% da população, verificado experimentalmente e confirmado na literatura (Vanoni *et al.*, 1983; Mariani *et al.*, 1986 *apud* Hartzis & Porro, 2006) e pela dificuldade de se quantificar células com mais de três cicatrizes pelo método utilizado experimentalmente.

- b) Decorrente da premissa de subconjuntos etários idênticos, a representação do crescimento e divisão celulares é feita apenas para uma célula de uma classe etária. A massa desta célula representará a massa média de cada célula da classe.
- c) Cada classe etária apresenta uma massa média celular e um tempo médio de duplicação. Neste sentido, a massa média obrigatoriamente está associada ao tempo médio de replicação uma vez que todas as células possuem a mesma taxa de crescimento, μ .
- d) Dado um histograma populacional inicial, as células de cada classe etária, por possuírem inicialmente massas diferentes, irão se duplicar em tempos diferentes.

e) A célula representante da massa média de sua classe etária (idade), cresce de acordo com a Equação 5.1 até atingir a massa crítica e se dividir.

$$\frac{dm_i}{dt} = \mu_{\max} m_i \frac{S}{K + S}, \quad i = 0, 1, 2, 3, 4, 5. \quad (5.1)$$

onde m_i em g é a massa da célula da classe i no instante t ; μ_{\max} é a taxa específica de crescimento, S é a concentração de substrato em g/L e K é o fator de afinidade em g/l.

Sob divisão, um “censo populacional” atualiza o número de células em cada classe. O número de células na categoria que se divide é redefinido para zero uma vez que a célula originalmente na classe adquiriu mais uma cicatriz migrando para classe etária superior. A divisão aumenta, na mesma quantidade, o número de células filhas.

Como exemplo, imagina-se células com uma cicatriz se dividindo. Ao final da divisão tem-se:

- $m_1 = 0$ e $N_1^{\text{PD}} = 0$. Não há mais células com uma cicatriz uma vez que todas se dividiram, sendo m_i e N_i^{PD} respectivamente a massa da célula e o número de células com i cicatrizes após a divisão.
- $N_2^{\text{PD}} = N_2 + N_1$; as células de uma cicatriz passaram para categoria de duas cicatrizes (N_2^{PD}). N_2 e N_1 são respectivamente o número de células com uma e duas cicatrizes antes do evento “divisão da classe 1”.
- A massa média m_2 decresce uma vez que as novas células recém chegadas na categoria de duas cicatrizes possuem massa menor, e é calculada de acordo com a Equação 5.2, onde é adotada a mesma simbologia.

$$m_2 = \frac{N_2 * m_2 + N_1 * m_1}{N_2 + N_1} \quad (5.2)$$

Procedimento análogo é realizado para as células filhas que são geradas em cada divisão celular. A adoção das classes etárias discretas elimina a abordagem íntegro diferencial do balanço populacional, reduzindo o uso de processamento computacional.

Quanto a resolução numérica do modelo, destaca-se que a integração da Equação 5.1 é interrompida sob qualquer evento de divisão em uma classe,

seguinte-se o censo populacional antes da retomada da integração. Esta solução numérica é possível pelo integrador ode15s do ambiente MATLAB.

f) O tamanho celular para o início do ciclo celular m_{s_i} (massa de Start) varia com a idade conforme a expressão proposta por Vanoni et al. (1983):

$$m_{s_i} = m_{s_0} \left(1 + Q \left(\frac{1 - A^{k_i}}{1 - A} \right) \right) \quad (5.3)$$

onde Q representa a fração de aumento de massa crítica da célula com uma cicatriz em relação às sem cicatrizes, A representa a fração de incremento de massa crítica da célula com uma cicatriz em relação às com idade superior, m_{s_i} massa das células com idade i , m_{s_0} massa crítica das células sem cicatrizes e k representa o número de cicatrizes (idade).

A Equação (5.3), onde o expoente k representa a idade da célula, introduz-se a verificação por Johnston *et al.* (1979) e Vanoni *et al.* (1983) do aumento da massa com o aumento da idade. Vanoni *et al.* (1983) utilizaram valores de Q e A positivos e menores que um sendo $0,5 < A < 0,99$. Assim como descrito por Hatzis e Porro (2006), utiliza-se neste trabalho o valor de $Q = 0,5$ e $A = 0,2$.

g) Cazzador e Mariani (1988) propõem que a massa crítica além de depender da idade também varia com a concentração de substrato em uma função monotônica crescente com saturação. Neste sentido, no presente trabalho, a massa crítica da célula filha é descrita pela Equação (5.4):

$$m_{s_0} = m_0 \frac{1}{1 + e^{-LM \cdot S}} \quad (5.4)$$

sendo LM um parâmetro empírico a ser ajustado aos dados experimentais disponíveis, S a concentração de substrato e m_0 a massa de start da célula filha em meio sem restrição nutricional.

Verifica-se que quanto maior for a concentração de substrato, maior será a massa do ponto onde a célula atinge o tamanho crítico para divisão. A Equação (5.4) traduz a observação de que o tamanho celular diminui em meios mais restritivos em substrato.

h) Para representar o decaimento metabólico com a idade, a curva obtida experimentalmente por Powell *et al* (2000) reproduzida na Figura V.1 foi empregada para correlacionar a viabilidade com a idade celular. A curva empírica de Powell *et al* foi ajustada à Equação (5.5).

$$F_{id} = 1 - \left(\frac{1}{1 + e^{(-L_{id}(k - K_{id}))}} \right) \quad (5.5)$$

onde K_{id} e L_{id} são parâmetros do modelo a serem regredidos .

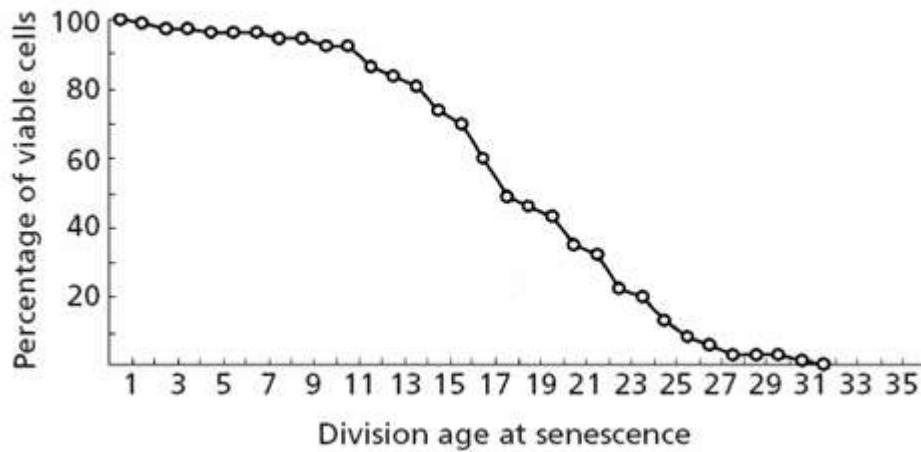


Figura V-1: Curva experimental de viabilidade celular x idade (Powell *et al*, 2000)

Utilizando a Equação 5.5, a curva de Powell *et al* é aproximada na Figura V.2 para valores de $K_{id} = 15$ e $L_{id} = 0,3$.

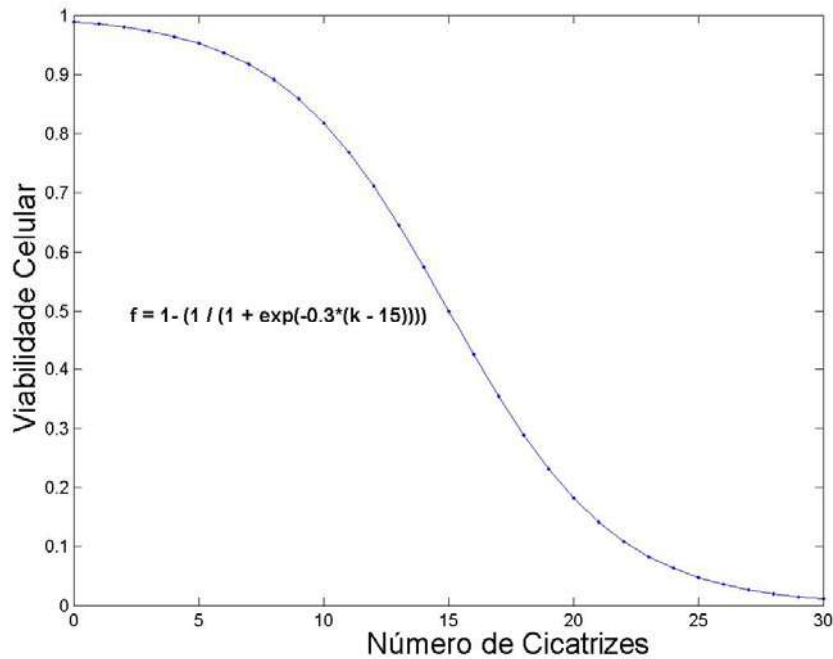


Figura V-2: Curva simulada de viabilidade celular

- i) As taxas de crescimento conforme os estudos de Vaoni *et al.* (1983) são iguais para todas as células independentemente da idade. Para diferenciar células mais velhas e com menor atividade metabólica, foi implementado o fator de idade, descrito pela Equação 5.4, afetando o crescimento de acordo com as Equações 5.6 e 5.7.

$$\frac{dm_i}{dt} = \mu^{\max} m_i \frac{S}{K + S} F_{id_i} \quad (5.6)$$

$$\frac{dS}{dt} = \mu^{\max} m_{total} \frac{S}{K + S} F_{id} Y_{X/S} \quad (5.7)$$

onde $m_{total} F_{id}^i = \sum m_i F_{id}^i$, F_{id}^i é o fator de idade que representa a fração da população viável com idade i .

- j) Para discriminar a condição experimental com e sem aplicação de potencial elétrico ao meio de cultura, adota-se, nas Equações 5.6 e 5.7, uma dependência dos parâmetros K e Y na existência de campo elétrico de acordo com as Equações 5.8 e 5.9.

$$K = K_{cp} Pot + K_{sp} (1 - Pot) \quad (5.8)$$

$$Y_{X/S} = Y_{X/Scp} Pot + Y_{X/Ssp} (1 - Pot) \quad (5.9)$$

Nestas, Pot é uma variável com valor unitário quando há campo elétrico e zero na ausência de campo elétrico.

Os valores de K_{cp} , K_{sp} , $Y_{X/S cp}$ e $Y_{X/S sp}$ são obtidos por regressão não-linear com base nos experimentos. Considera-se, com base em resultados experimentais, que o potencial elétrico não interfere de forma sensível na taxa específica de crescimento, μ^{\max} .

- k) A massa do conjunto célula-gêmula na mitose é 1,6 vezes maior que a massa crítica no ponto de START. Sendo que 1,0 representa a massa da célula mãe e 0,6 a massa da filha após a mitose, de acordo com Vanoni *et al.*, 1983 e conforme mostrado na Figura V.3.

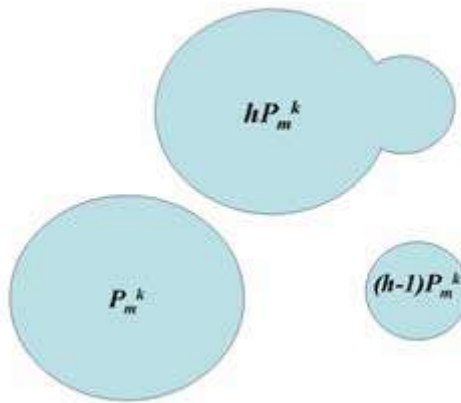


Figura V-3: Relação entre tamanhos das células mãe e filha.

Assim, a massa da célula filha após a divisão é dada pela Equação 5.10.

$$M_{filha} = M_{mitose} \cdot \frac{h-1}{h} \quad (5.10)$$

onde $h = 1,6$.

Adota-se também que a massa da célula no instante de mitose é dada pela Equação 5.11, conforme sugerido por Vanoni *et al.* (1983).

$$M_{mitose} = 1,6M_{Start} \quad (5.11)$$

V.2 Modelo Populacional Discreto Cibernético (MPDC):

O segundo modelo proposto, o Modelo Populacional Discreto Cibernético (MPDC), utiliza uma rede metabólica simplificada para propor uma contribuição cibernética ao modelo populacional discreto. Atualmente, são conhecidas muitas reações químicas em vários ciclos metabólicos de microrganismos. Destes ciclos, pode-se citar:

- Metabolismo de Carboidratos: Glicólise, gliconeogênese, ciclo das pentoses, cadeia de transporte de elétron, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).
- Metabolismo de Lipídios: Oxidação dos ácidos graxos, síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol, fosfolipídios, glicolipídios e triglicerol.
- Metabolismo do nitrogênio: Transaminação, síntese de nucleotídeos, catabolismo de aminoácidos, síntese de aminoácidos não essenciais, ciclo da uréia.
- Metabolismo do DNA, RNA, Proteínas.

A Figura V.4 ilustra a complexidade da rede de reações químicas do metabolismo celular.

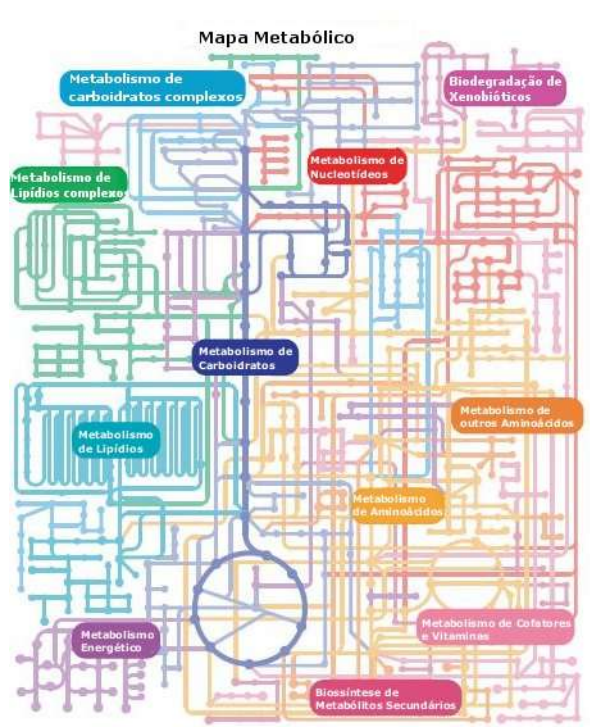


Figura V-4: Rede metabólica de uma célula eucariótica (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway database)

O MPDC utiliza uma simplificação da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e da gliconeogênese, conforme o esquema apresentado na Figura V.5. Assim, considera-se que a glicose (S) é transportada para dentro da célula e é transformada em um produto intermediário (P_1) pela enzima de transporte (e_T), de onde pode seguir três rotas metabólicas:

- rota para o crescimento (X) e manutenção da célula (P_G representando a biossíntese de lipídios, proteínas e demais os metabólitos que a célula produz, ou a utilização para produção energia (ATP) no ciclo de ácido tricarboxílico), utilizando assim as enzimas e_{1a} e e_G ;
- na segunda rota o intermediário é transformado em glicogênio (P_2) como fonte de energia de reserva pela enzima e_{1b} e, quando a concentração de glicose atinge níveis abaixo da necessidade celular, a célula reverte esta reação para produzir P_1 a partir de glicogênio através da enzima e_2 ;
- a terceira rota refere-se a transformação do intermediário em etanol no citoplasma e sua conseqüente difusão para o meio extracelular (d_s).

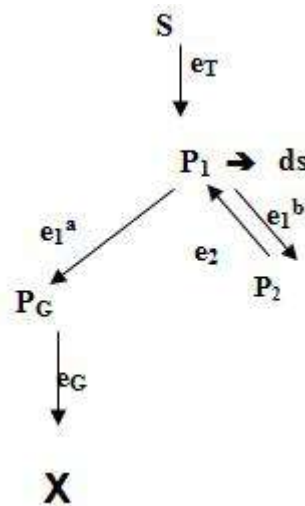


Figura V-5: Rede metabólica proposta

Com base no conjunto de reações apresentado na Figura V.5, propõem-se de acordo com a modelagem cibernética de Ramkrishna *et al.* (1998d) as taxas de indução enzimáticas.

$$r_{er} = \alpha \frac{S}{K + S} \quad (5.12)$$

$$r_{1a} = \alpha \frac{P_1}{K_e + P_1} \quad (5.13)$$

$$r_{e1b} = \alpha \frac{P_1}{K_e + P_1} \quad (5.14)$$

$$r_{e2} = \alpha \frac{P_2}{K_e + P_2} \quad (5.15)$$

$$r_{eg} = \alpha \frac{P_g}{K_e + P_g} \quad (5.16)$$

onde α e K_e correspondem à taxa e à constante de saturação enzimática. Para evitar uma grande expansão no número de parâmetros, assumiu-se que todas as enzimas possuem o mesmo valor para estas constantes. K é a constante de saturação da enzima de transporte de substrato e assume-se estar diretamente influenciada pela aplicação de potencial elétrico conforme a Equação (5.8) definida anteriormente. A base desta hipótese é o emprego de potencial elétrico na permeação de células, e o fato da membrana celular apresentar gradiente elétrico (potencial de membrana).

Considera-se que todas as enzimas possuem as mesmas constantes α e K_e excluindo-se a enzima de transporte que possui o K referente ao consumo de substrato.

Adicionalmente, as concentrações máximas de enzimas são:

$$e_{T_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta} \quad (5.17)$$

$$e_{1a_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta} \quad (5.18)$$

$$e_{1b_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta} \quad (5.19)$$

$$e_{2_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta} \quad (5.20)$$

$$e_{g_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta} \quad (5.21)$$

Nestas expressões, a taxa de síntese enzimática (r^*), a taxa de saturação enzimática (α) e a taxa de decaimento enzimático (β) são consideradas iguais para todas

as enzimas, ainda com o objetivo de minimizar o número de parâmetros. $\mu_{g_{\max}}$ é a taxa máxima de crescimento.

As taxas de consumo de substrato podem ser descritas por:

$$r_T = \mu_T^{\max} \left(\frac{e}{e_T^{\max}} \right) \frac{S}{K_c + S} \quad (5.22)$$

$$r_{1a} = \mu_{1a}^{\max} \left(\frac{e}{e_{1a}^{\max}} \right) \frac{P_1}{K_c + P_1} \quad (5.23)$$

$$r_{1b} = \mu_{1b}^{\max} \left(\frac{e}{e_{1b}^{\max}} \right) \frac{P_1}{K_c + P_1} \quad (5.24)$$

$$r_2 = \mu_2^{\max} \left(\frac{e}{e_2^{\max}} \right) \frac{P_2}{K_c + P_2} \quad (5.25)$$

$$r_g = \mu_g^{\max} \left(\frac{e}{e_g^{\max}} \right) \frac{P_g}{K_c + P_g} \quad (5.26)$$

$$r_{p1} = \mu_{1ds}^{\max} \frac{P_1}{K_{p1} + P_1} \quad (5.27)$$

onde r_{p1} representa a taxa de difusão do etanol para o meio extracelular (não depende da ação de uma enzima), e K_c é a constante de saturação de consumo dos intermediários. Considerou-se todas as enzimas com o mesmo K_c .

A Figura V.5 indica que as enzimas e_T e e_2 produzem o mesmo metabólito P_1 , sendo assim, estas enzimas são consideradas substitutivas (ver Figura II.3). Logo:

$$u_T = \frac{r_{e_T}}{r_{e_T} + r_{e_2}} \quad (5.28)$$

$$u_2 = \frac{r_{e_2}}{r_{e_T} + r_{e_2}} \quad (5.29)$$

$$v_T = \frac{r_{e_T}}{\max(r_{e_T}, r_{e_2})} \quad (5.30)$$

$$v_2 = \frac{r_{e_2}}{\max(r_{e_T}, r_{e_2})} \quad (5.31)$$

Entretanto, as enzimas e_{1a} e e_{1b} competem pelo mesmo intermediário para produzir produtos diferentes. Neste caso, utilizam-se as equações para enzimas competitivas.

$$u_{1a} = \frac{r_{e_{1a}}/P_g}{(r_{e_{1a}}/P_g) + (r_{e_{1b}}/P_2)} \quad (5.32)$$

$$u_{1b} = \frac{r_{e_{1b}}/P_2}{(r_{e_{1a}}/P_g) + (r_{e_{1b}}/P_2)} \quad (5.33)$$

$$v_{1a} = \frac{r_{e_{1a}}/P_g}{\max((r_{e_{1a}}/P_g), (r_{e_{1b}}/P_2))} \quad (5.34)$$

$$v_{1b} = \frac{r_{e_{1b}}/P_2}{\max((r_{e_{1a}}/P_g), (r_{e_{1b}}/P_2))} \quad (5.35)$$

Para se obter as equações das variáveis cibernéticas locais, é necessário analisar-se em quais grupos de reações as enzimas participam simultaneamente. As enzimas e_T e e_g atuam em reações onde somente elas estão presentes produzindo e consumindo um metabólito, neste caso, este caminho é denominado de “caminho metabólito elementar”.

Logo,

$$u_g^l = u_g \quad (5.36)$$

$$u_T^l = u_T \quad (5.37)$$

$$v_g^l = v_g \quad (5.38)$$

$$v_T^l = v_T \quad (5.39)$$

Além do caminho elementar, a enzima e_g conduz a um produto final; logo as atividades e expressões enzimáticas são iguais a um.

$$u_g^l = 1 \quad (5.40)$$

$$v_g^l = 1 \quad (5.41)$$

A enzima e_{1a} participa de quatro grupos de reações, três delas consumindo P_1 e uma gerando P_g . São elas as reações de produção de P_1 a partir de S , conversão de P_1 em P_2 e vice-versa, conversão de P_1 em P_g e, finalmente, conversão de P_g

em X . Assim, encontra-se o valor para a expressão e a atividade locais para a enzima e_{1a} pelas Equações 5.42 e 5.43.

$$u_{1a}^l = u_g \cdot u_{1a} \cdot u_T \cdot u_{1b} \cdot u_2 \quad (5.42)$$

$$v_{1a}^l = v_g \cdot v_{1a} \cdot v_T \cdot v_{1b} \cdot v_2 \quad (5.43)$$

A enzima e_{1b} participa em três grupos de reações por consumir o metabólito P_1 . São elas as reações de produção de P_1 a partir de S , conversão de P_1 em P_2 e vice-versa, conversão de P_1 em P_g .

$$u_{1b}^l = u_T \cdot u_{1a} \cdot u_{1b} \cdot u_2 \quad (5.44)$$

$$v_{1b}^l = v_T \cdot v_{1a} \cdot v_{1b} \cdot v_2 \quad (5.45)$$

A enzima e_2 participa de apenas de uma reação cíclica, envolvendo assim, três grupos de reações por produzir P_1 , a saber: produção de P_1 a partir de S , conversão de P_1 em P_2 , conversão de P_1 em P_g .

$$u_2^l = u_T \cdot u_{1a} \cdot u_{1b} \cdot u_2 \quad (5.46)$$

$$v_2^l = v_T \cdot v_{1a} \cdot v_{1b} \cdot v_2 \quad (5.47)$$

As variáveis cibernéticas globais são aquelas que representam as mudanças nutricionais no meio adotando a premissa de que apenas as enzimas relativas ao crescimento, acúmulo e degradação de glicogênio são influenciadas pela concentração de substrato, isto é, as enzimas e_g , e_{1b} , e_2 .

$$u_g^G = \frac{S}{K_g + S} \quad (5.48)$$

$$v_g^G = 1 \quad (5.49)$$

$$u_{1b}^G = \frac{K_g}{K_g + S} \quad (5.50)$$

$$v_{1b}^G = 1 \quad (5.51)$$

$$u_2^G = \frac{K_g}{K_g + S} \quad (5.52)$$

$$v_{1b}^G = 1 \quad (5.53)$$

$$u_T^G = 1 \quad (5.54)$$

$$v_T^G = 1 \quad (5.55)$$

$$u_{1a}^G = 1 \quad (5.56)$$

$$v_{1a}^G = 1 \quad (5.57)$$

As variáveis cibernéticas completas são calculadas a partir da multiplicação das variáveis cibernéticas locais e globais.

$$u_T^e = u_T^l \cdot u_T^G \quad (5.58a)$$

$$u_{1a}^e = u_{1a}^l \cdot u_{1a}^G \quad (5.58b)$$

$$u_{1b}^e = u_{1b}^l \cdot u_{1b}^G \quad (5.58c)$$

$$u_2^e = u_2^l \cdot u_2^G \quad (5.58d)$$

$$u_g^e = u_g^l \cdot u_g^G \quad (5.58e)$$

$$v_T^e = v_T^l \cdot v_T^G \quad (5.58f)$$

$$v_{1a}^e = v_{1a}^l \cdot v_{1a}^G \quad (5.58g)$$

$$v_{1b}^e = v_{1b}^l \cdot v_{1b}^G \quad (5.58h)$$

$$v_2^e = v_2^l \cdot v_2^G \quad (5.58i)$$

$$v_g^e = v_g^l \cdot v_g^G \quad (5.58j)$$

Os balanços de massa para as espécies relativas ao crescimento, isto é, consumo de substrato, crescimento celular e síntese da enzima de crescimento e_g são dados por:

$$\frac{dS}{dt} = -r_g \cdot v_{e_g} \cdot \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (5.59)$$

$$\frac{dP_g}{dt} = r_{1a} \cdot v_{e_{1a}} - \frac{r_g \cdot v_{e_g}}{Y_{X/P_g}} \quad (5.60)$$

$$\frac{de_g}{dt} = -r_{e_g} \cdot u_{e_g} - (r_g \cdot v_{e_g} + \beta) \cdot e_g + r^* \quad (5.61)$$

Os balanços de massa para as demais enzimas do modelo de rede metabólica são descritos pelas Equações 5.62 a 5.65:

$$\frac{de_{1a}}{dt} = -r_{e_{1a}} \cdot u_{e_{1a}} - (r_g \cdot v_{e_g} + \beta) \cdot e_{1a} + r^* \quad (5.62)$$

$$\frac{de_{1b}}{dt} = -r_{e_{1b}} \cdot u_{e_{1b}} - (r_g \cdot v_{e_g} + \beta) \cdot e_{1b} + r^* \quad (5.63)$$

$$\frac{de_r}{dt} = -r_{e_r} \cdot u_{e_r} - (r_g \cdot v_{e_g} + \beta) \cdot e_r + r^* \quad (5.64)$$

$$\frac{de_2}{dt} = -r_{e_2} \cdot u_{e_2} - (r_g \cdot v_{e_g} + \beta) \cdot e_2 + r^* \quad (5.65)$$

As variáveis de estado não enzimáticas possuem dinâmicas descritas pelas equações dos balanços de massa dados por:

$$\frac{dp_1}{dt} = (r_t \cdot v_{e_t}) + (r_2 \cdot v_{e_2}) - (r_{1a} \cdot v_{e_{1a}}) - (r_{1b} \cdot v_{e_{1b}}) - (r_{p1} \cdot V_{fluxo}) - (r_g \cdot v_{e_g} \cdot P_1) \quad (5.66)$$

$$\frac{dp_2}{dt} = (r_{1b} \cdot v_{e_{1b}}) - (r_2 \cdot v_{e_2}) - (r_g \cdot v_{e_g} \cdot P_2) \quad (5.67)$$

$$\frac{dEtOH}{dt} = (r_{p1} \cdot V_{fluxo}) \cdot X \quad (5.68)$$

$$\frac{dm_i}{dt} = \mu^{\max} m_i \frac{S}{K + S} F_{id_i} \quad (5.69)$$

E, por fim, o balanço de massa para o crescimento das células com i cicatrizes, considerando o fator de idade é dado por:

$$\frac{dm_i}{dt} = r_g \cdot v_{e_g} \cdot F_{id_i} \quad (5.70)$$

V.3 Balanço Populacional Discreto com Modelo Cibernético Expandido (MPDCExp):

Na formulação dos dois modelos (MPD e MPDC), algumas simplificações foram relatadas. Estas simplificações estão presentes nas equações 5.12 a 5.27 e 5.48 a 5.52. Com objetivo de se avaliar a influência destas simplificações no modelo cibernético foi proposto um modelo expandido de acordo com o apresentado na Tabela V.1.

Tabela V-1: Diferenças entre as equações dos modelos cibernéticos

MPDC	MPDCExp
Taxas de indução enzimáticas (α e K_e constantes)	Taxas de indução enzimáticas
$r_{e_T} = \alpha \frac{S}{K + S}$ $r_{1a} = \alpha \frac{P_1}{K_e + P_1}$ $r_{e1b} = \alpha \frac{P_1}{K_e + P_1}$ $r_{e2} = \alpha \frac{P_2}{K_e + P_2}$ $r_{e_g} = \alpha \frac{P_g}{K_e + P_g}$	$r_{e_T} = \alpha_T \frac{S}{K + S}$ $r_{1a} = \alpha_{1a} \frac{P_1}{K_{e_{1a}} + P_1}$ $r_{e1b} = \alpha_{1b} \frac{P_1}{K_{e_{1b}} + P_1}$ $r_{e2} = \alpha_2 \frac{P_2}{K_{e_2} + P_2}$ $r_{e_g} = \alpha_g \frac{P_g}{K_{e_g} + P_g}$
Concentração máxima das enzimas (α constante)	Concentração máxima das enzimas
$e_{T_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{1a_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{1b_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{2_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{g_{\max}} = \frac{\alpha + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$	$e_{T_{\max}} = \frac{\alpha_T + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{1a_{\max}} = \frac{\alpha_{1a} + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{1b_{\max}} = \frac{\alpha_{1b} + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{2_{\max}} = \frac{\alpha_2 + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$ $e_{g_{\max}} = \frac{\alpha_g + r^*}{\mu_{g_{\max}} + \beta}$

As taxas de consumo de substrato (Kc constante)	As taxas de consumo de substrato
$r_T = \mu_T^{\max} \left(\frac{e}{e_T^{\max}} \right) \frac{S}{K_c + S}$ $r_{1a} = \mu_{1a}^{\max} \left(\frac{e}{e_{1a}^{\max}} \right) \frac{P_1}{K_c + P_1}$ $r_{1b} = \mu_{1b}^{\max} \left(\frac{e}{e_{1b}^{\max}} \right) \frac{P_1}{K_c + P_1}$ $r_2 = \mu_2^{\max} \left(\frac{e}{e_2^{\max}} \right) \frac{P_2}{K_c + P_2}$ $r_g = \mu_g^{\max} \left(\frac{e}{e_g^{\max}} \right) \frac{P_g}{K_c + P_g}$ $r_{P1} = \mu_{1ds}^{\max} \frac{P_1}{K_{p1} + P_1}$	$r_T = \mu_T^{\max} \left(\frac{e}{e_T^{\max}} \right) \frac{S}{K_T + S}$ $r_{1a} = \mu_{1a}^{\max} \left(\frac{e}{e_{1a}^{\max}} \right) \frac{P_1}{K_{1a} + P_1}$ $r_{1b} = \mu_{1b}^{\max} \left(\frac{e}{e_{1b}^{\max}} \right) \frac{P_1}{K_{1b} + P_1}$ $r_2 = \mu_2^{\max} \left(\frac{e}{e_2^{\max}} \right) \frac{P_2}{K_G + P_2}$ $r_g = \mu_g^{\max} \left(\frac{e}{e_g^{\max}} \right) \frac{P_g}{K_g + P_g}$ $r_{P1} = \mu_{1ds}^{\max} \frac{P_1}{K_{p1} + P_1}$
As varáveis cibernéticas globais (Kg constante)	As varáveis cibernéticas globais
$u_g^G = \frac{S}{K_g + S}$ $u_{1b}^G = \frac{K_g}{K_g + S}$ $u_2^G = \frac{K_g}{K_g + S}$	$u_g^G = \frac{S}{K_{gg} + S}$ $u_{1b}^G = \frac{K_{g1b}}{K_{g1b} + S}$ $u_2^G = \frac{K_{g2}}{K_{g2} + S}$

Capítulo VI - Ajustes de Parâmetros do Modelo

Foram programados no ambiente MATLAB (The Mathworks Inc) os três modelos propostos:

- a) Modelo Populacional Discreto (MPD);
- b) Modelo Populacional Discreto Cibernético (MPDC);
- c) Modelo Populacional Discreto Cibernético Estendido (MPDCExp).

As Equações Diferenciais Ordinárias foram integradas pela rotina *ode15s*.

O procedimento de regressão dos parâmetros adotado consiste em aplicar o algoritmo de otimização Nelder & Miad (disponível no toolbox de otimização do MATLAB, *fminsearch*) para minimizar a função objetivo descrita pela Equação 6.1

$$F_{obj} = W_1(EtOH_{calc} - EtOH_{exp})^2 + W_2(S_{calc} - S_{exp})^2 + W_3(X_{calc} - X_{exp})^2 + W_4(Hist_{calc} - Hist_{exp})^2 + W_5(Glicog_{calc} - Glicog_{exp})^2 \quad (6.1)$$

onde, EtOH, S, X, Hist e Glicog são respectivamente etanol, glicose (substrato), concentração celular, histograma da concentração celular por idades e glicogênio celular. Os sub-índices *calc* e *exp* representam respectivamente os valores calculados pelo modelo e os valores experimentais. As constantes W_1, W_2, W_3, W_4, W_5 da Equação 6.1 têm como objetivo ponderar a contribuição de cada termo na equação, uma vez que o número total de pontos experimentais de EtOH, S, X, Histograma e Glicogênio são diferentes, e as variáveis envolvidas possuem ordem de grandezas diferentes. Neste trabalho foi empregado o conjunto: $W_1 = 40, W_2 = 7, W_3 = 2,5, W_4 = 8, W_5 = 80$.

Com a finalidade de estabelecer limites e normalizar o espaço de busca da otimização, é implementada a Equação 6.2, limitando assim, o espaço entre zero e um.

$$P_N = \sqrt{\frac{P - lb}{ub - P}} \quad (6.2)$$

onde P_N é o valor do parâmetro normalizado, P valor do parâmetro, lb é o limite inferior e ub o limite superior. No cálculo da função objetivo, o valor do parâmetro é restaurado pela Equação 6.3.

$$P = lb + \frac{(ub - lb)P_N^2}{1 + P_N^2} \quad (6.3)$$

Os parâmetros dos modelos são agrupados em duas classes:

- a) Valores da literatura. Valores definidos a partir da literatura, não submetidos à regressão numérica.

Tabela VI-1: Valores da literatura utilizados nos modelos

Nome	Sigla	Valor	Referência
Fração de aumento de massa crítica entre células de geração maior que um	A	0,5	Hatzis e Porro (2006)
Fração de aumento de massa crítica da célula com a idade genealógica um em relação a filha.	Q	0,2	Hatzis e Porro (2006)
Fração entre a massa da célula mãe em relação a sua filha	h	1,6	Vanoni <i>et al.</i> (1983)
Concentração inicial de glicose intracelular	p_1^0	0,0090 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)
Concentração inicial de glicogênio	p_2^0	0,0053 pg/L	Valor experimental
Concentração inicial do intermediário P_g	p_g^0	0,0091 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)
Concentração inicial da enzima de transporte	e_T^0	0,0042 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)
Concentração inicial da enzima 1a	e_{1a}^0	0,0092 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)
Concentração inicial da enzima 1b	e_{1b}^0	0,0134 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)
Concentração inicial da enzima 2	e_2^0	0,0105 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)
Concentração inicial da enzima g	e_g^0	0,0103 pg/L	Miguez <i>et al.</i> (2004)

- b) Valores ajustados a dados experimentais

Tabela VI-2: Valores obtidos na otimização do modelo populacional discreto (MPD)

Nome	Sigla	Valor Inicial	Valor Final
Logaritmo da massa crítica da menor célula (g)	$\log(m_0)$	-10,10	-10,181
Parâmetro empírico	LM	7,010	7,635
Constante de saturação com potencial (g/l)	K_{cp}	1,438	2,534
Constante de saturação sem potencial (g/l)	K_{sp}	1,156	3,373
Taxa de conversão substrato em Células sem potencial (g/g)	$Y_{x/s_{cp}}$	0,871	0,902
Taxa de conversão substrato em Células sem potencial (g/g)	$Y_{x/s_{sp}}$	0,439	0,855
Taxa específica de crescimento (min^{-1})	μ_{\max}	2,485	0,909
Número de células iniciais	$\log(N)$	10,510	10,400
Constante do fator de idade	K_{id}	4,200	1,000
Parâmetro do fator de idade	L_{id}	1,516	2,315

Tabela VI-3: Valores obtidos na otimização do modelo populacional discreto cibernético (MPDC)

Nome	Sigla	Valor Inicial	Valor Final
Logaritmo da massa crítica da menor célula (g)	$\log(m_0)$	-10.140	-10,198
Parâmetro empírico	LM	7.996	7,578
Constante de saturação com potencial (g/l)	K_{cp}	5.327	3,995
Constante de saturação sem potencial (g/l)	K_{sp}	4.271	4,880
Taxa de conversão substrato em células sem potencial (g/g)	$Y_{x/s_{cp}}$	0.495	0,269
Taxa de conversão substrato em células sem potencial (g/g)	$Y_{x/s_{sp}}$	0.458	0,257
Taxa de conversão de intermediário em células sem potencial (g/g)	$Y_{x/pg}$	2.718	2,252
Número de células iniciais	$\log(N)$	10.922	10,912
Constante do fator de idade	K_{id}	9.134	15,368
Parâmetro do fator de idade	L_{id}	1.137	0,620
Taxa específica máxima da enzima de Transporte (min-1)	$\mu_{T \max}$	0.835	1,757
Taxa específica máxima da enzima 1a (min-1)	$\mu_{1a \max}$	3.872	4,292
Taxa específica máxima da enzima 1b (min-1)	$\mu_{1b \max}$	2.304	0,571
Taxa específica máxima da enzima 2 (min-1)	$\mu_{2 \max}$	0.897	1,985
Taxa específica máxima da enzima de crescimento (min-1)	$\mu_{g \max}$	2.511	2,858
Taxa específica máxima da enzima ds (min-1)	μ_{lds}	1.923	1,601
Constante de saturação de consumo de P1, P2 e S (g/l)	K_c	1.577	1,147
Taxa de saturação da enzima	α	0.968	0,906
Constante de saturação da enzimática (g/l)	K_e	0.066	0,006
Constante de saturação de consumo de P1 (g/l)	K_{p1}	0.360	0,540
Constante de saturação global (g/l)	K_g	0.463	0,015
Taxa de síntese enzimática	r^*	1.088	2,680
Taxa de decaimento enzimático	β	1.689	2,127
Taxa de retirada do etanol intracelular	V_{fluxo}	1.748	1,943

Tabela VI-4: Valores otimizados pelo modelo populacional discreto cibernético expandido (MPDCExp)

Nome	Sigla	Valor Inicial	Valor Final
Logaritmo da massa crítica da menor célula (g)	$\log(m_0)$	-10.100	-10.145
Parâmetro empírico	LM	7.010	8.433
Constante de saturação com potencial (g/l)	K_{cp}	1.438	1.134
Constante de saturação sem potencial (g/l)	K_{sp}	1.156	2.991
Taxa de conversão de substrato em Células sem potencial (g/g)	$Y_{x/s_{cp}}$	0.871	0.789
Taxa de conversão de substrato em Células sem potencial (g/g)	$Y_{x/s_{sp}}$	0.439	0.689
Taxa de conversão de intermediário em Células sem potencial (g/g)	$Y_{x/pg}$	2.485	2.868
Número de células iniciais	$\log(N)$	10.510	10.638
Constante do fator de idade	K_{id}	4.201	4.148
Parâmetro do fator de idade	L_{id}	1.416	2.653
Taxa específica máxima da enzima de Transporte (min-1)	$\mu_{T \max}$	0.906	0.539
Taxa específica máxima da enzima 1a (min-1)	$\mu_{1a \max}$	0.699	0.852
Taxa específica máxima da enzima 1b (min-1)	$\mu_{1b \max}$	0.339	0.432
Taxa específica máxima da enzima 2 (min-1)	$\mu_{2 \max}$	0.472	0.464
Taxa específica máxima da enzima de crescimento (min-1)	$\mu_g \max$	2.224	1.849
Taxa específica máxima da enzima ds (min-1)	μ_{lds}	0.737	3.323
Constante de saturação de consumo de P1 (g/l)	K_{p1}	1.313	0.363
Constante de saturação global de crescimento (g/l)	K_{g1}	0.072	0.101
Taxa de síntese enzimática	r^*	1.011	0.007
Taxa de decaimento enzimático	β	0.295	0.125
Taxa de retirada do etanol intracelular	V_{fluxo}	0.013	0.126
Taxa de saturação da enzima T	α_T	0.011	0.009
Taxa de saturação da enzima 1a	α_{1a}	0.022	0.023
Taxa de saturação da enzima 1b	α_{1b}	0.252	0.331
Taxa de saturação da enzima 2	α_2	0.154	0.145
Taxa de saturação da enzima g	α_g	0.682	0.759
Constante de saturação da enzima 1a (g/l)	$K_{e 1a}$	0.948	0.964
Constante de saturação da enzima 1b (g/l)	$K_{e 1b}$	1.375	0.680
Constante de saturação da enzima 2 (g/l)	$K_{e 2}$	0.415	0.499
Constante de saturação da enzima g (g/l)	$K_{e g}$	1.222	0.032
Constante de saturação de consumo de S (g/l)	K_T	1.078	0.454
Constante de saturação de consumo de P1 (g/l)	K_{1a}	3.238	0.007
Constante de saturação de consumo de P1 (g/l)	K_{1b}	0.424	0.118
Constante de saturação de consumo de P2 (g/l)	K_2	1.428	2.867
Constante de saturação global da enzima de crescimento (g) (g/l)	K_{gg}	1.064	1.101
Constante de saturação global da enzima 1b (g/l)	K_{g1b}	0.548	0.202
Constante de saturação global da enzima 2 (g/l)	K_{g2}	1.598	1.123

Observa-se que todos os experimentos (com e sem potencial) são usados simultaneamente considerando-se como respostas do processo: concentração de glicose (S), concentração celular (X) e concentração de Etanol ($ETOH$). Os dados experimentais estão resumidos na Tabela VI.5.

Tabela VI-5: Número de análises experimentais por experimento

Experimento	Glicose	X	ETOH	Glicogenio	Histograma
1	5	10	-	4	-
2	4	10	-	4	-
3	-	10	-	-	-
4	5	20	-	-	-
5	8	21	8	-	-
6	8	20	8	-	3
7	6	21	6	4	3
8	7	20	7	4	3
9	14	23	-	4	3
10	13	21	-	4	3
11	7	9	-	3	-

As condições experimentais estão resumidas nas Tabela VI.6

Tabela VI-6: Resumo das condições experimentais

Experimento	X_0 (g/L)	S_0 (g/L)	Potencial	Corte
1	0,865	3,3	Sim	Não
2	1,037	2,95	Sim	Não
3	0,314	-	Sim	Não
4	0,696	2,896	Sim	Sim
5	0,875	7,177	Sim	Sim
6	0,881	4,325	Não	Sim
7	0,780	2,700	Não	Sim
8	0,862	1,483	Sim	Sim
9	0,657	2,816	Não	Sim
10	0,816	3,198	Sim	Sim
11	0,841	2,973	Não	Não

As comparações entre os dados experimentais e as simulações de cada modelo são mostradas a seguir:

a) Modelo Populacional Discreto (MPD)

Nas Figuras VI.1 e VI.2 observa-se que o modelo não prevê etanol nem glicogênio, entretanto há uma boa simulação do consumo de glicose. No último gráfico de cada figura observa-se o histograma das frações de células por idade. Nestes histogramas, é possível notar que a soma das frações de células sem cicatrizes e com uma cicatriz aumenta com o tempo como mostrado na Figura IV.14 de análise morfológica. O cálculo de histogramas populacionais é um recurso digno de destaque na formulação desenvolvida neste trabalho

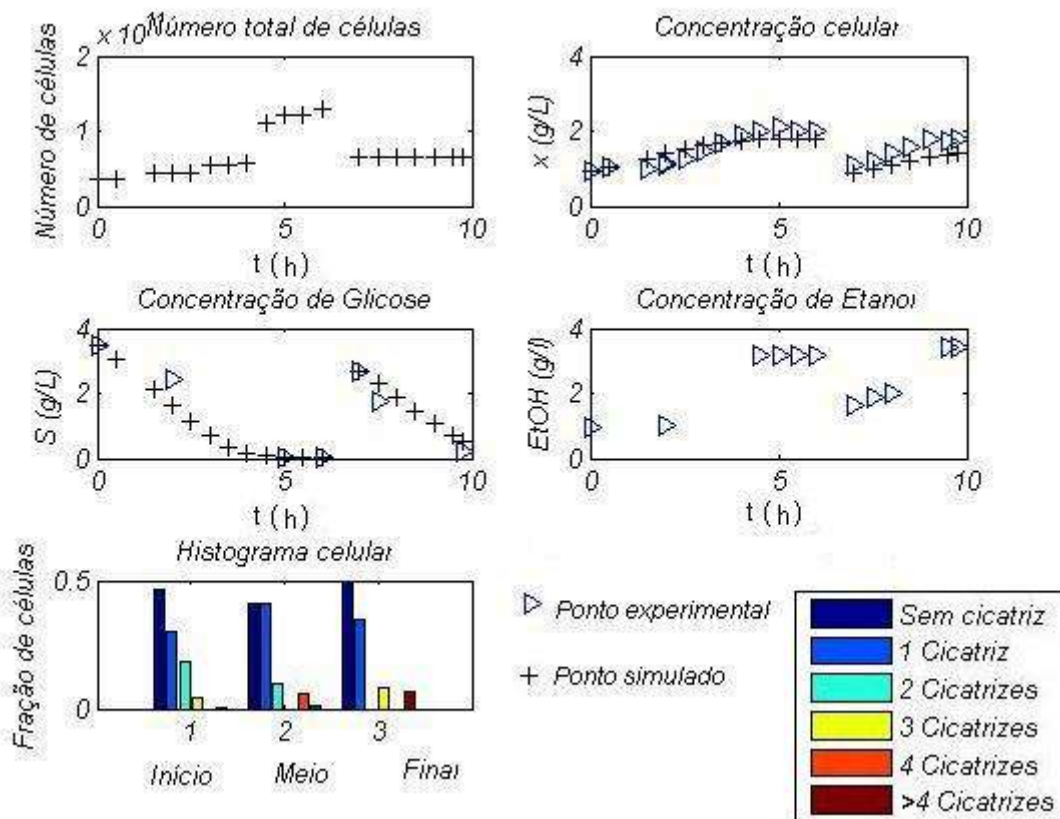


Figura VI-1 Ajuste do MPD sem potencial (experimento 8).

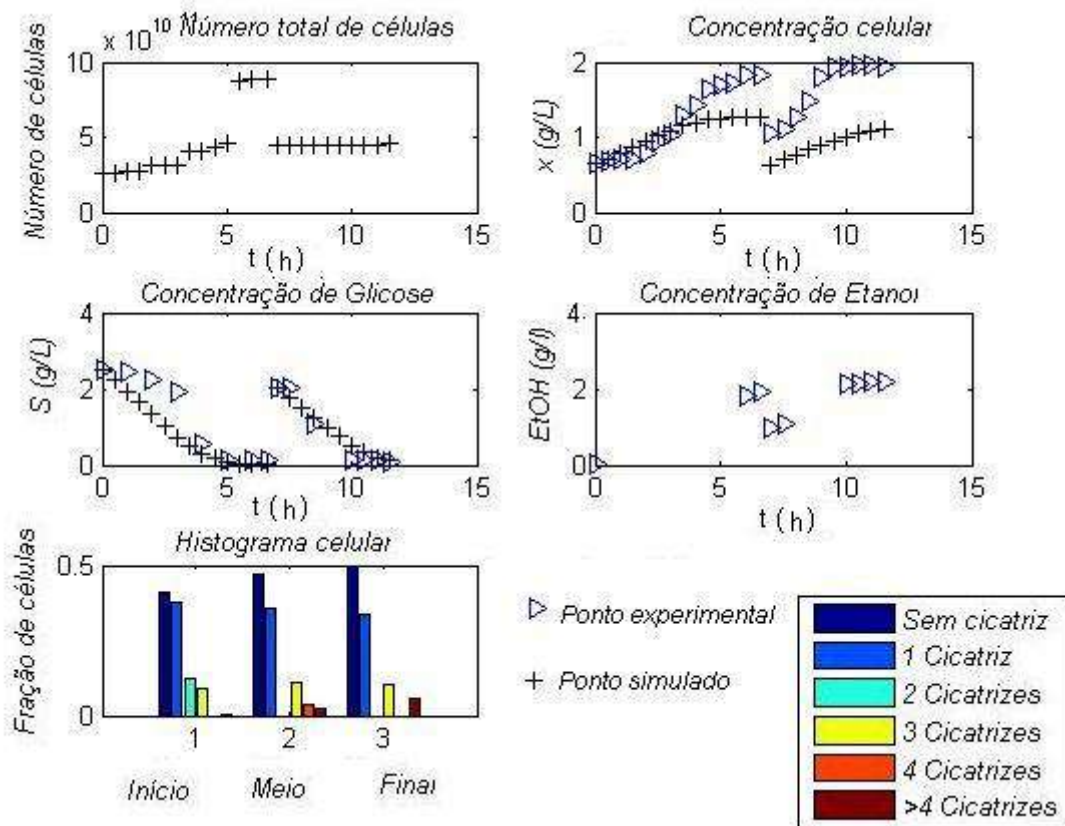


Figura VI-2: Ajuste do MPD sem potencial (experimento 9)

A Figura VI.3 exemplifica a simulação do modelo populacional discreto para experimentos de batelada em cortes com aplicação de potencial elétrico na segunda batelada, após reposição do meio de cultura, conforme descrito no capítulo de Metodologia Experimental.

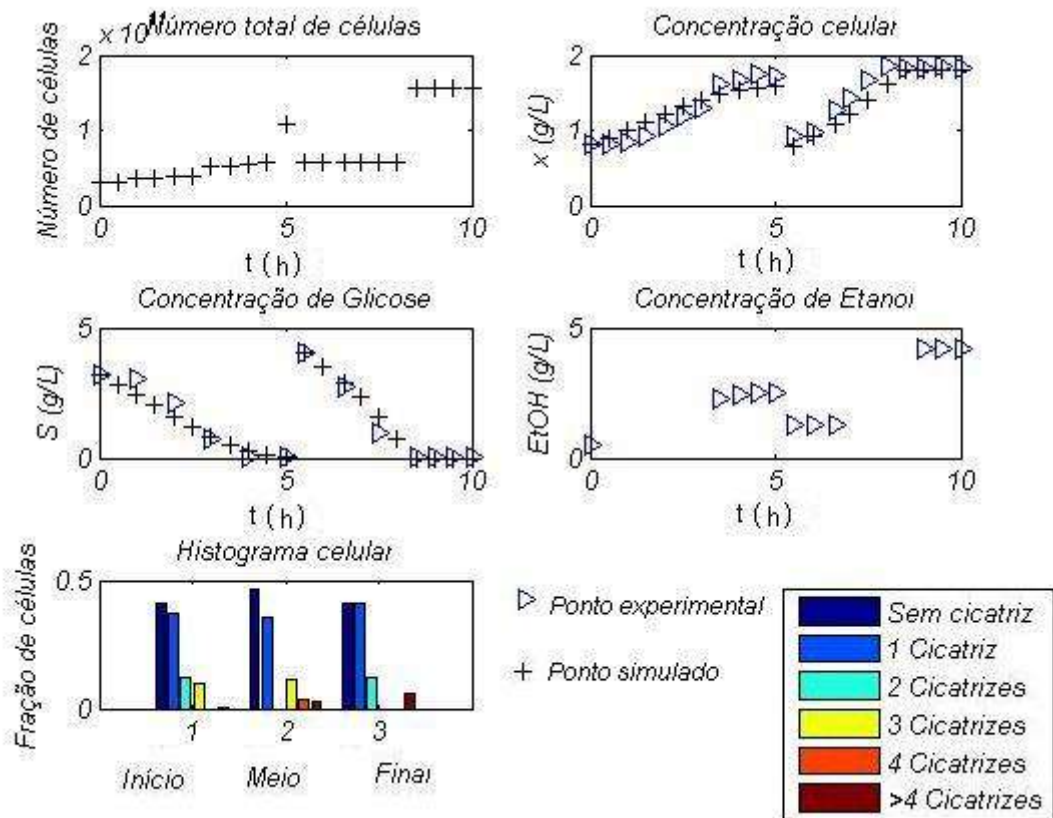


Figura VI-3: MPD com potencial.

Ressalta-se que este modelo se ajustou à grande maioria dos experimentos e ainda previu um decréscimo na população de células sem cicatrizes após a aplicação do potencial elétrico similarmente ao observado experimentalmente.

b) Modelo Populacional Discreto Cibernético (MPDC)

Para o modelo populacional discreto cibernético, a qualidade do ajuste permitiu reproduzir perfeitamente o comportamento da célula em relação ao glicogênio, isto é, quando há excedente de glicose há um acúmulo de glicogênio na célula e quando ocorre restrição nutricional o glicogênio é consumido.

Nas Figuras VI.3 e VI.4 pode-se observar que o modelo representa adequadamente as variações de glicose, células, etanol, glicogênio e histograma tanto nos experimentos sem potencial quanto nos experimentos com potencial. Observa-se o aumento da concentração de glicogênio após a aplicação do potencial elétrico em consonância com os resultados experimentais.

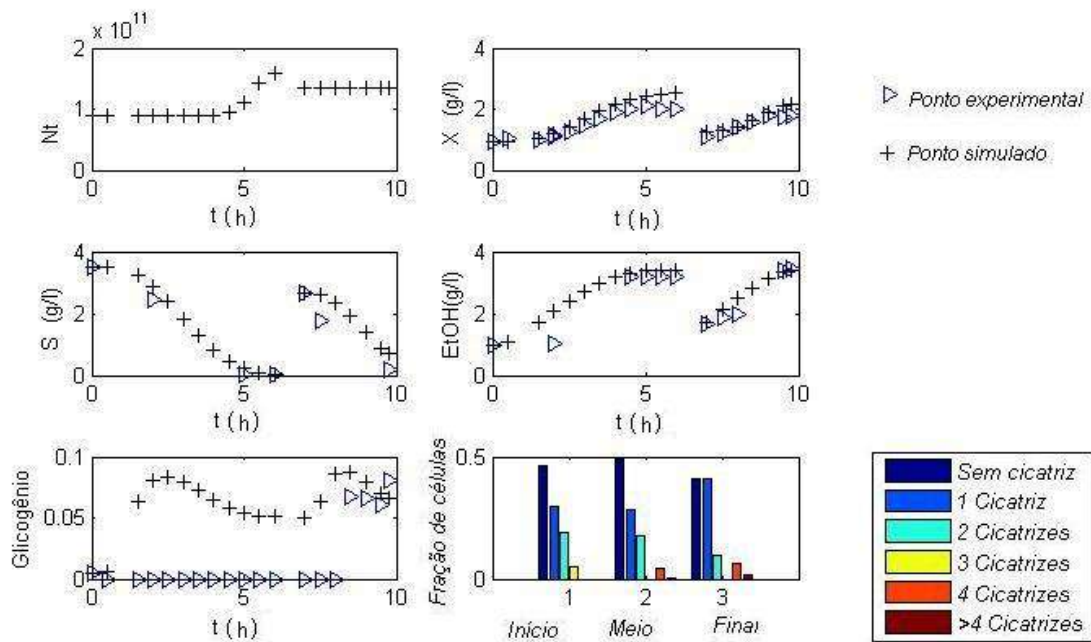


Figura VI-4: Modelo cibernético sem potencial.

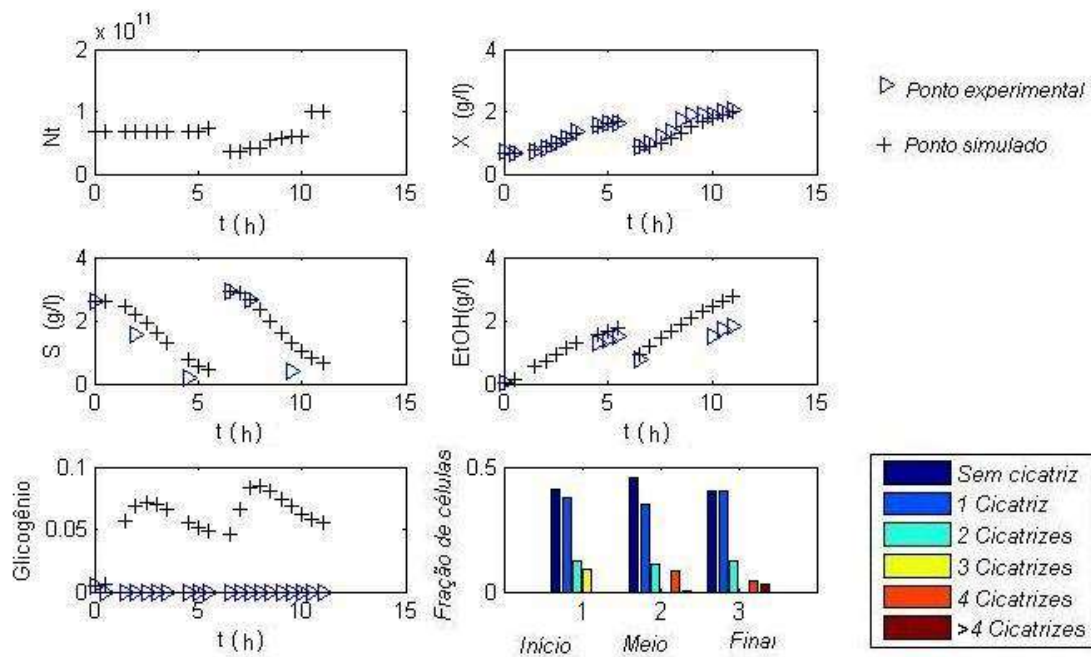


Figura VI-5: Modelo cibernético com potencial.

Apesar das escassas medições de etanol e glicogênio e das diferenças encontradas em alguns experimentos o modelo apresentou resultados satisfatórios, não há necessidade de um modelo cibernético expandido. Entretanto, o Modelo Populacional Discreto Cibernético Expandido foi executado para avaliação da sua capacidade de representação do sistema biológico em questão.

c) Modelo Populacional Discreto Cibernético Expandido (PPDCExp)

i. Experimentos sem aplicação de potencial elétrico

Observando-se a Figura VI.6, nota-se que o MPCDExp com mais parâmetros consegue representar a curva sigmoidal característica do etanol, o que não foi possível no MPDC. Este modelo, entretanto, não reproduz a concentração final de glicogênio nos experimentos. Com o aumento do número de parâmetros, seria necessário expandir o número de análises experimentais de glicogênio.

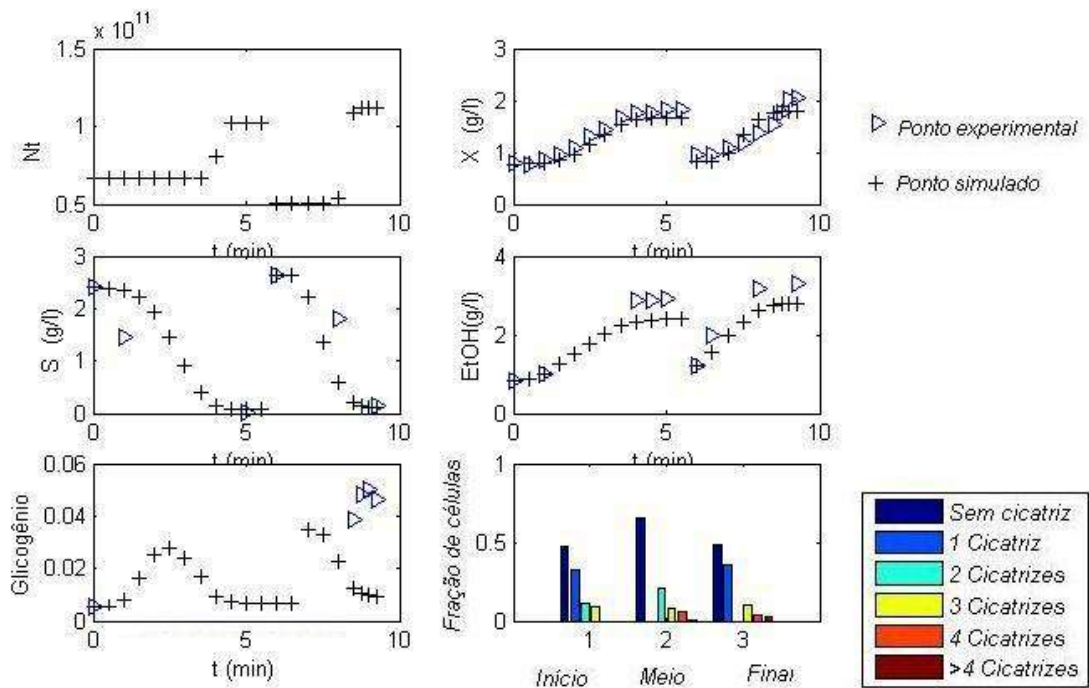


Figura VI-6: Modelo cibernético expandido sem potencial.

ii. Experimentos com aplicação de potencial elétrico

A Figura VI.7 apresenta as mesmas deficiências da Figura VI.5.

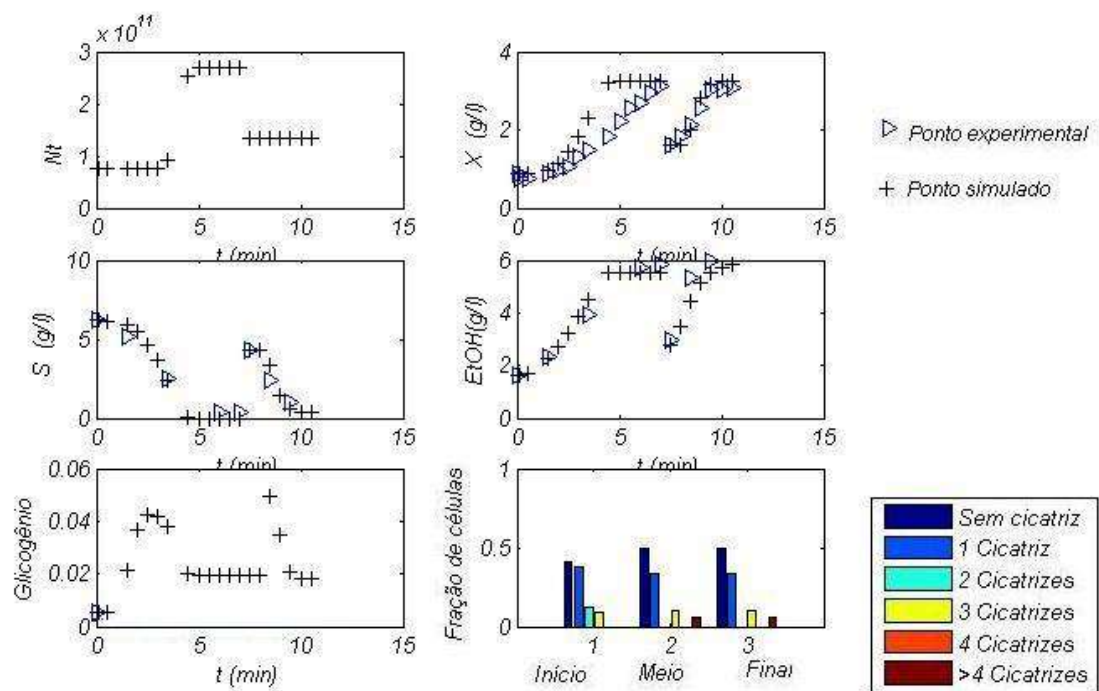


Figura VI-7: Modelo cibernético estendido com potencial.

d) Comparação entre os modelos MPDC e MPDCExp

Ambos os modelos cibernéticos se mostraram capazes de simular com exatidão os resultados experimentais, sendo que o MCPDExp, com mais parâmetros, foi capaz de representar melhor as curvas sigmoidais principalmente para o etanol conforme já mencionado. Entretanto, com o procedimento de otimização utilizado, não foi capaz de representar a concentração de glicogênio intracelular e apresentou respostas menos acuradas em relação aos dados experimentais.

Analisando-se os parâmetros encontrados é possível concluir:

- i. A menor massa crítica das células sem cicatrizes (m_0) e a dependência da massa crítica em relação à concentração de glicose (LM) foi similar para os modelos populacional discreto (MPD) e populacional discreto cibernético (MPDC), indicando coerência entre eles. Os valores de massa crítica sem restrição de substrato (m_0) foram limitados segundo a Tabela 6.7 (Hartwell & Unger, 1977), podendo seu logaritmo variar entre -10,2 e -10,09.

Tabela VI-7: Volume dos tamanhos críticos da *Saccharomyces cerevisiae* (Hartweell & Unger 1977)

Nº de cicatrizes	Volume (μm^3)
0	79.4 ± 15.2
1	108.4 ± 20
2	119.9 ± 20
3	147.6 ± 19

- ii. Os três modelos prevêem uma constante de saturação sob influência de potencial elétrico (K_{cp}) menor que sem aplicação de potencial (K_{sp}). Analogamente, os valores da conversão de substrato em células quando aplicado potencial elétrico é maior quando comparado ao caso sem potencial elétrico aplicado.

e) Análise de sensibilidade na função objetivo

Para se identificar a influência das variáveis de respostas experimentais sobre a função objetivo dos modelos, a Equação 6.4 é proposta.

$$Sens = \frac{F_{obj}}{N^{\circ}_{pontos} * N^{\circ}_{experimentos} - N^{\circ}_{Parâmetros}} \quad (6.4)$$

onde, *Sens* é a sensibilidade; F_{obj} é a função objetivo; N°_{pontos} é o número de pontos experimentais utilizado pelo modelo; $N^{\circ}_{experimentos}$ é o número de experimentos feitos e N° o número de parâmetros que o modelo utiliza.

Três novas funções objetivo são propostas segundo as Equações 6.5 a 6.7.

$$F_{obj}^S = W_2 (S_{calc} - S_{exp})^2 \quad (6.5)$$

$$F_{obj}^X = W_2 (X_{calc} - X_{exp})^2 \quad (6.6)$$

$$F_{obj}^{EtOH} = W_2 (EtOH_{calc} - EtOH_{exp})^2 \quad (6.7)$$

onde, S, X e EtOH representam respectivamente a concentração de glicose, de células e de etanol em g/L e W_2 é uma constante.

A Tabela VI.8 resume os resultados obtidos.

Tabela VI-8: Análise da qualidade de ajustados modelos

Modelo	Função Objetivo	Sensibilidade
1	$F_{obj} = W_2(S_{calc} - S_{exp})^2 + W_3(X_{calc} - X_{exp})^2 + W_4(Hist_{calc} - Hist_{exp})^2$	0,0867
2	$F_{obj} = W_1(EtOH_{calc} - EtOH_{exp})^2 + W_2(S_{calc} - S_{exp})^2 + W_3(X_{calc} - X_{exp})^2 + W_4(Hist_{calc} - Hist_{exp})^2 + W_5(Glicog_{calc} - Glicog_{exp})^2$	0,3624
3	$F_{obj} = W_1(EtOH_{calc} - EtOH_{exp})^2 + W_2(S_{calc} - S_{exp})^2 + W_3(X_{calc} - X_{exp})^2 + W_4(Hist_{calc} - Hist_{exp})^2 + W_5(Glicog_{calc} - Glicog_{exp})^2$	0,9671
2	$F_{obj}^S = W_2(S_{calc} - S_{exp})^2$	0,1111
2	$F_{obj}^X = W_2(X_{calc} - X_{exp})^2$	0,0546
2	$F_{obj}^{EtOH} = W_2(EtOH_{calc} - EtOH_{exp})^2$	0,5621

O modelo 1 é o modelo populacional discreto (MPD), o modelo 2 representa o modelo populacional discreto cibernético (MPDC) e o modelo 3 representa o modelo populacional discreto cibernético expandido (MPDCExp). As constantes W_1 , W_2 , W_3 , W_4 , W_5 representam os pesos da função objetivo levando-se em consideração o número de pontos experimentais e a adequação desejada. Neste trabalho temos: $W_1=40$, $W_2=7$, $W_3=2,5$, $W_4=8$, $W_5=80$.

Segundo os dados da Tabela VI.8, os modelos cibernéticos conseguem reproduzir de forma precisa as curvas de concentração celular obtidas experimentalmente. Entretanto, a adaptação do modelo aos valores de etanol é precária, comprovando que nos experimentos a produção de etanol possui comportamentos diferentes.

Capítulo VII - Análise do Processo Fermentativo

Neste capítulo, explora-se a ferramenta computacional desenvolvida para analisar o desempenho do processo fermentativo frente à condução de bateladas seqüenciais em série; utilizando-se o Modelo Populacional Discreto Cibernético (MPDC). Dois casos foram abordados.

- a) Bateladas conduzidas sem aplicação de potencial elétrico;
- b) Bateladas conduzidas com aplicação de potencial elétrico.

Nesta etapa, investiga-se a influência do potencial elétrico no desempenho do processo permite avaliar o potencial tecnológico da aplicação de potencial na indústria de bioetanol.

Nas bateladas seqüenciais, adota-se o corte ocorrendo ao ser atingido um tempo pré-estabelecido, onde metade da suspensão (células e meio de cultivo) é removida e o volume repostado com meio de cultivo novo com dobro da concentração inicial ($2S_0$) da primeira batelada. As simulações foram efetuadas considerando-se o tempo total das bateladas sendo 20 horas e dois níveis de concentração inicial de glicose (S_0). A Tabela VII.1 resume as simulações efetuadas.

Tabela VII-1 : Simulações em bateladas seqüenciais

Potencial	S_0 (g/L)	Duração das Bateladas (h)	Produção EtOH em regime estabelecido (g/L)	Produtividade (g/L.h)
Não	20	1,5	12,00	12,35
Sim	20	1,5	14,00	12,95
Aumento Porcentual			16,7%	4,8%
Não	5	2,5	2,70	3,24
Sim	5	2,5	3,00	3,44
Aumento Porcentual			1,0%	6,4 %

Nas situações investigadas, a aplicação de potencial elétrico resultou no aumento da produtividade de etanol. O menor incremento na produtividade nos experimentos com concentração de 20 g/L é justificado pelo pequeno crescimento celular no início da simulação em relação ao reduzido tempo de batelada (“wash up”), isto é, o crescimento celular, o consumo de substrato e a conseqüente produção de etanol são pequenos nas primeiras bateladas. Observa-se que a aplicação de potencial elétrico favorece de forma mais notável a produção de etanol em meios com maior disponibilidade de glicose, representando o fenômeno proposto de que o potencial auxilia no transporte de glicose para o meio intracelular. A Figura VII.1 corresponde a simulação para concentração inicial de glicose de 5 g/L enquanto a Figura VII.3 corresponde a simulação para concentração inicial de glicose de 20 g/L, nestas figuras, pode-se observar seis gráficos com as seguintes variáveis no tempo: o número de células, a concentração celular, concentração de glicose, concentração de etanol, glicogênio intracelular e um diagrama glicose x etanol para indicar a entrada em regime estabelecido.

A produtividade da Tabela VII.1 é calculada integrando-se numericamente os valores de etanol no tempo e dividindo-se este valor pela duração total das bateladas. Esta integração é realizada utilizando o método de Simpson sucessivas vezes.

A fórmula do método é descrita por:

$$I \cong \frac{h}{3 * (n - 1)} \left[f(x_0) + 4 * \sum_{i=1,3,5}^{n-1} f(x_i) + 2 * \sum_{i=2,4,6}^{n-2} f(x_i) + f(x_n) \right] \quad (6.8)$$

onde n e h são respectivamente o número de valores e o intervalo de integração, neste caso, o tempo ($x_n - x_0$).

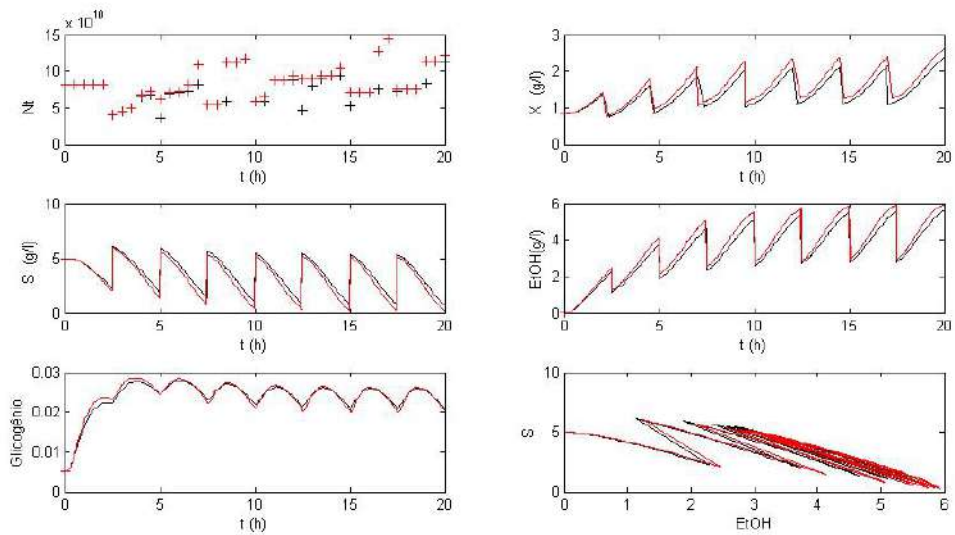


Figura VII-1: Simulação de bateladas consecutivas para concentração de 5 g/l de glicose. As curvas pretas representam a simulação sem potencial e as curvas vermelhas com potencial.

A Figura VII.1 é a visão ampliada do gráfico de produção de etanol no tempo presente na Figura VII.2.

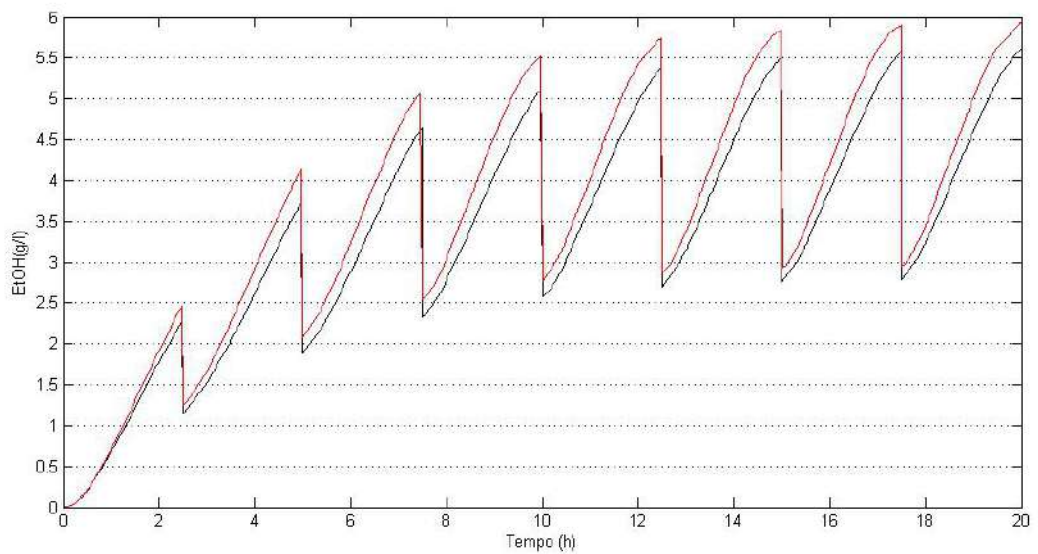


Figura VII-2: Visão ampliada da produção de etanol na simulação de concentração inicial de 5 g/l de glicose.

As curvas pretas representam a simulação sem potencial e as curvas vermelhas com potencial.

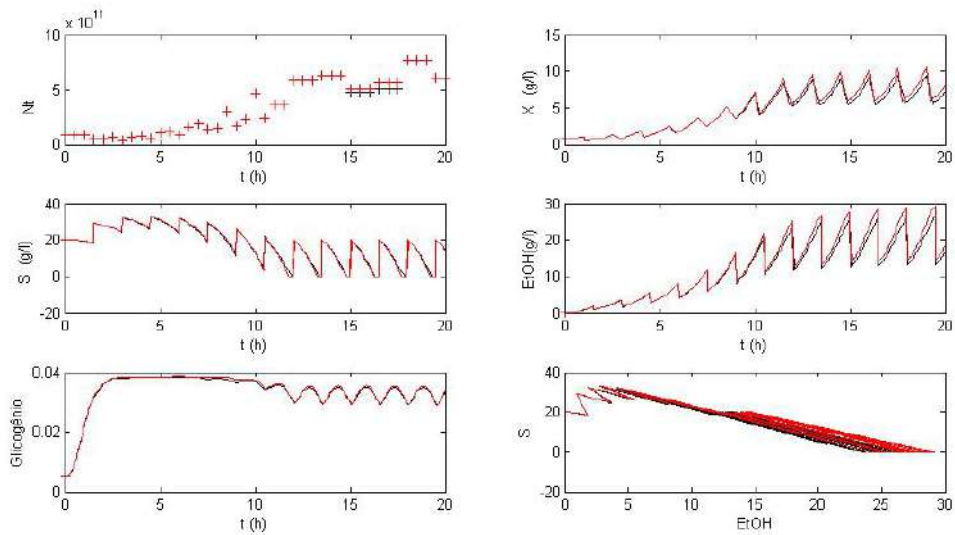


Figura VII-3: Simulação de bateladas consecutivas para concentração de 20 g/l de glicose. As curvas pretas representam a simulação sem potencial e as curvas vermelhas com potencial.

Em ambas as situações simuladas ($S_0=20$ g/L e $S_0=5$ g/L) observou-se uma maior produção de etanol e crescimento celular quando aplicado potencial elétrico ao meio de cultivo. A avaliação de alternativas de condução de cortes onde o tempo de corte é substituído por uma condição de substrato mínima deve ser conduzida, considerando-se o impacto deste patamar mínimo na produtividade do processo.

Uma avaliação definitiva deve necessariamente passar pela incorporação, na análise, de fatores econômicos associados à aplicação de potencial elétrico e ao custo associado às operações auxiliares de cortar uma batelada e arrumar a batelada subsequente.

Na análise, deve ponderar ser avaliada a condução do processo em regime contínuo.

Capítulo VIII - Conclusões e Sugestões

Em experimentos conduzidos em apenas uma única batelada, observou-se que:

- ✓ O potencial elétrico influencia diretamente no aumento na taxa de crescimento celular e na de consumo de glicose.
- ✓ A aplicação de potencial modifica a distribuição por tamanhos, mas não altera de forma significativa a percentagem de células gemulantes, notou-se que o potencial elétrico, quando aplicado não resultou em variação significativa.

Em experimentos conduzidos em batelada seqüencial:

- ✓ Houve uma manutenção dos valores de μ na 1ª batelada o que significa um sincronismo celular e uma consistência nos resultados, visto que a 1ª batelada serve como controle dos experimentos.
- ✓ A aplicação de potencial gerou um aumento significativo na produção de etanol, e um aumento na taxa de consumo de substrato.
- ✓ A variação da concentração do glicogênio em experimentos com aplicação de potencial elétrico é consideravelmente maior do que em experimentos controle.
- ✓ A aplicação de potencial elétrico conduz a um aumento do número de células que entraram em processo de divisão, indicando uma possível aceleração do relógio biológico ou diminuição do tamanho crítico para divisão.
- ✓ Observam-se comportamentos idênticos no que tange a fração de células em processo de gemulação. A aplicação do potencial elétrico parece induzir o processo de divisão denotado pelo aumento da fração de células gemulantes no final do experimento, comportamento este oposto ao observado para as culturas controle (sem aplicação de potencial).
- ✓ No ajuste dos parâmetros do modelo, observa-se a dificuldade de ter boa aproximação com os dados experimentais para todos os experimentos. O fato é atribuído à variabilidade experimental e sugere-se que seja implementada matematicamente a influência da temperatura e do oxigênio, que variam entre um e outro experimento.
- ✓ O modelo populacional discreto cibernético diante do pool de experimentos consegue prever uma melhora promovida pela aplicação de potencial na simulação de bateladas sucessivas.

✓ Para se obter uma avaliação definitiva, deve-se analisar fatores econômicos relativos à aplicação de potencial elétrico e processos auxiliares e outros regimes de processo, por exemplo o regime contínuo.

Capítulo IX - Bibliografia

- Araújo, O.Q.F., Coelho, M.A.Z., Margarit, I.P., Vaz-Junior, C.A., Rocha-Leão, M.H.M. (2004) Electrical Stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures, *Braz. J. Microbiol.*, 35, 97-103.
- Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J.I., Guarente, L.(1999). Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology*, 96, 9100–9105.
- Bartlett, P.N., Pletcher, D., Zeng, J. (1997) Approaches to the integration of electrochemistry and biotechnology, *J.Electrochem. Soc.*, 144 (11), 3705-370.
- Cazzador , C. Mariani, L. (1988) A simulation program based on a structured population model for biotechnological yeast processes, *Appl Microbiol Biotechnol*, 29, 198-202
- Chen, W., Han, Y., Chen, Y., Xie, J.T. (1998) Field-induced electroconformational damages in cell membrane proteins: a new mechanism involved in electrical injury, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 47, 237-245.
- Ci, Y., Feng, J., Jiang, Z., Luo, D. (1997) The voltammetric behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 43, 293-296.
- Creator, J., Joyne, J. (1993) in *The cell cycle – a practical approach* (ed. Fantes, P. and Brooks R.), 69-92, IRL Press, USA.
- Duarte, Marcus Vinicius Eiffle. *Uma modelagem de dinâmica populacional microbiana baseada em idade*. Rio de Janeiro, 2000. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Ferreira, T.F.; Coelho, M.A.Z.; Rocha-Leão, M.H.M.; Um método simples para a obtenção de β -glucana em células de leveduras livres de glicogênio, In: VI COBEQ-IC, UNICAMP-SP, 2005.
- Gheorghiu, E., Asami, K. (1998) Monitoring cell cycle by impedance spectroscopy: experimental and theoretical aspects, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 45, 139-143.
- Hatzis, C., Porro, D. (2006) Morphologically-structured models of growing budding yeast populations, *Journal of Biotechnology* 124, 420-438.
- Hatzis, C., Srienc, F., Fredrickson, A.G. (1995) Multistaged corpuscular models of microbial growth Monte Carlo simulations, *Biosystems*, 36, 19–35.
- Hartwell, L.H., Unger, M. (1977) Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division, *J. Cell Biol.*, 75, 422–435.

Johnston, G.C., Pringle, J.R., Hartwell, L.H., (1977) Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Exp. Cell Res.*, 105, 79–98.

Kovarova-Kovar, Karin., Egli, Thomas., (1998) Growth kinetics of suspended microbial cells: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics, *Microb. and Molecular Biology Reviews.*, 62, 646-666

Lötzbeyer, T., Schuhmann, W., Schmidt, H. Minizymes. (1996) A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron-transfer processes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 42, 1-6.

Lumsden, C.J., Brandts, W.A. and Trainor, L.E.H., 1997. Physical theory in biology: foundations and explorations. World Scientific.

Miguez, M., Coelho, M.A.Z., Rocha-Leão, M.H., Araújo, O.Q. (2004) A cybernetic modelling for growth of mutant diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae*. In: XV COBEQ 2004, Curitiba, Paraná.

Münch, T., Sonnleitner, B., Fiechter, A. (1992) New insights into the synchronization mechanism with forced synchronous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechn.*, 24, 299-314.

Oliveira, A.A.C., Vaz-Junior, C.A., Araújo, O.Q.F., Coelho, M.A.Z. Uso de Processamento Digital de Imagens na Caracterização de Parâmetros Morfológicos de *Saccharomyces cerevisiae*, In: XV Sinaferm 2005, Recife, Pernambuco.

Powell, C., Zandycke, C., Quanin, D., Smart, K. (2000) Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations, *Microbiology* 146, 1023–1034.

Ramkrishna, D., Varner, J. (1998a.) Metabolic engineering from a cybernetic perspective __I. Theoretical preliminaries, *Biotechnol. Prog.*, 15, 407-425.

Ramkrishna, D., Varner, J. (1998b.) Metabolic engineering from a cybernetic perspective __II. Qualitative investigation of nodal architectures and their response to genetic perturbation, *Biotechnol. Prog.*, 15, 426-438.

Ramkrishna, D. Varner, J. (1998c.) Nonlinear analysis of cybernetic models. Guidelines for model formulation, *J. Biotechn.*, 71 , 67–104

Ramkrishna, D., Varner, J. (1998d.) Metabolic Engineering from a Cybernetic Perspective, *Aspartate Family of Amino Acids. Metabolic Engineering*, 1, 88-116

Rocha-Leão, M.H., Coelho, M.A.Z., Margarit, I.P., Oliveira, A.A.C., Gandelman, R., Vaz Jr., C.A., Araujo, O.Q.F. (2005) Biochemical cell responses to electrical stress stimulation. In: 2nd EMPROMER 2005, Rio das Pedras, Rio de Janeiro

Sinclair, D., Mills, K., Guarente, L. (1998) Aging in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, 533–600.

Soares, D.G., Andreazza, A.C., Salvador M. (2005) Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Braz. J. Pharm. Sciences*, 41 (1), 95-100.

Vanoni, M., Vai, M., Popolo, L., Alberghina, L. (1983) Structural heterogeneity in populations of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 156, 1282–1291.

Veiga, V.F., Nimrichter, L., Teixeira, C.A., Morales, M.M., Alviano, C.S., Rodrigues, M.L., Holandino, C. (2005) Exposure of human leukemic cells to direct electric current, *Cell Biochem. Biophys.*, 42, 61-74

Vodovnik, L., Mikiavcic, D., Sersa, G. (1992) Modified cell proliferation due to electrical currents, *Med & Biol. Eng. & Comp.*, 30, 21-28

Winston HO, W., Komalesh, K.S. (2001) Membrane Handbook, Boston: Kluwer Academic Publishers

<http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>, acessado em 03/01/2007

<http://www.members.tripod.com/emersonam/ceveja.html>, acessado em: 03/01/2007

<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html>, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway database, acessado em: 05/09/2006