SIMULAÇÃO DE DINÂMICA POPULACIONAL MICROBIANA: MODELAGEM ESTRUTURADA EM IDADE E INFLUÊNCIA DO CICLO CELULAR

MARCUS VINICIUS EIFFLE DUARTE

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
2006

SIMULAÇÃO DE DINÂMICA POPULACIONAL MICROBIANA:
MODELAGEM ESTRUTURADA EM IDADE E INFLUÊNCIA DO CICLO CELULAR.

MARCUS VINICIUS EIFFLE DUARTE

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Aprovada por:

Prof. José Luiz de Medeiros, D.Sc – Orientador/Presidente

Profa. Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo, Ph.D. – Orientadora

Profa. Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc. – Orientadora

Profa. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Nei Pereira Jr., Ph.D.

Prof. Príamo Albuquerque Melo Jr., D.Sc.

Prof. Roberto de Campos Giordano, D.Sc.

Profa. Verônica Maria de Araújo Calado, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Marcus Vinicius Eiffle.

Simulação de dinâmica populacional microbiana: Modelagem estruturada em idade e influência do ciclo celular

Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2006.

xi, 81 p. ; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2006.

1. Dinâmica Populacional Microbiana; 2. Balanço Populacional; 3. Modelagem de Bioprocessos; 4. Modelos Segregados; 5. Ciclo Celular

I. EQ/UFRJ

II.. Título (série)

À minha família: meus pais, Celso e Marluce, meu irmão Marcus Paulo e minha avó Soledade, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos meus orientadores Ofélia, Maria Alice e José Luiz, cujas paciência, dedicação e confiança foram (*mais uma vez*) além do chamado do dever.

À Adriana, que me apoiou com amor e paciência infinitos.

AGRADECIMENTOS

Não apenas sou um homem de muita sorte, como também abuso repetidamente das improbabilidades, que até hoje me foram favoráveis. Antes que a covardia e a velhice façam com que eu desenvolva um inédito apreço por planejamento, ordem e disciplina, preciso manifestar minha gratidão a muitas pessoas, que foram suficientemente graciosas e generosas para me livrar de enrascadas e tornar a minha vida mais fácil quando meus próprios erros ameaçaram meu bem-estar (ao menos) psicológico. Espero ter agora a boa sorte de não esquecer de agradecer a qualquer um que mereça estar nesta relação. Toda a minha gratidão para:

- Minhas orientadoras mais antigas, as Dras. Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo e Maria Alice Zarur Coelho, que começaram tudo isso há dez anos. Ambas me ensinaram muito mais sobre ciência e a vida do que se espera dos professores, e cometeram a temeridade de nunca perder a confiança em mim. Academicamente, profissionalmente e pessoalmente, encontrá-las foi uma felicidade;

- Meu orientador, o Dr. José Luiz de Medeiros, que me ensinou nestes anos muito mais do que eu esperava aprender, que teve muita paciência para corrigir os meus erros e me deu um grande exemplo de dedicação;

- Meus amigos e parceiros de anos, Sandro Gláucio Maquiné de Souza, Vanessa Trindade e Luciana Portal, por uma infinidade de motivos;

- A Dra. Maria Helena Miguez Rocha-Leão, que se esforçou muito para me iniciar no mundo da Bioquímica e sempre esteve disponível e mostrou extrema boa-vontade para tirar as minhas dúvidas;

- A Dra. Isabel Cristina Pererira Margarit, pelo apoio na obtenção de dados experimentais;

- Carlos André, Bruno, Marcos Paulo e Priscilla, que obtiveram uma parte dos dados experimentais utilizados neste trabalho;

- O pessoal do Laboratório 113 que ainda não foi citado: Danielle, Fabiana, Jair, Raquel, Bia, Flávia, Fernanda, Michele, Alexandre, Etel, Mariana, e Yovanka, que criaram um ambiente de trabalho que não poderia ser melhor, tornando muito prazerosos os agitados dias de trabalho no laboratório;

- A Roselee Lima de Abreu, a quem eu dei muito trabalho na Secretaria da Pós-Graduação; e

- A Capes e o CNPq, que, em diferentes momentos, financiaram este trabalho.

Por fim, agradeço aos milhões de brasileiros cujos impostos custearam meus estudos e todo este trabalho, incluindo até mesmo aqueles que não desejam investir os Recursos Públicos na Universidade Pública. Se não é justo que tão poucos de nós possamos usufruir os benefícios do trabalho e da perseverança de tantos, eu espero, ao menos, vir a retribuir de alguma forma esse investimento.

RESUMO

Os modelos tradicionais de bioprocessos não incorporam a heterogeneidade da biofase, considerando a população constituída de indivíduos idênticos. Estes modelos não são capazes de descrever fenômenos observados experimentalmente, como oscilações espontâneas em culturas contínuas de leveduras e o sincronismo celular.

Este trabalho propõe um modelo segregado estruturado em idade celular para um bioprocesso conduzido por uma população de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentador contínuo agitado. Este modelo computa densidades de números de células ativas, inativas e mortas e considera as influências do ambiente (concentrações de substrato e oferta de oxigênio) e da operação do ciclo celular sobre as taxas de divisão, morte e transições entre as classes ativa e inativa. A definição da classe de células inativas é realizada em acordo com evidências experimentais sobre o fenômeno de quiescência das leveduras. Por fim, são implementados dois conjuntos alternativos de funções para descrever o ciclo celular das leveduras, em termos de duração e massa celular. A definição da variável idade celular associada à idade genealógica das células e da população inativa são características exclusivas do modelo proposto.

O modelo é discretizado através de formalismo Galerkin, e seus parâmetros são ajustados a partir de dados experimentais. O modelo é avaliado na comparação de suas predições com dados obtidos em batelada, sob diversas condições, e suas predições para fenômenos periódicos de culturas contínuas aeradas de *Saccharomyces cerevisiae* são exploradas.

ABSTRACT

Traditional bioprocess models do not account for the biophase heterogeneity, considering the population as made of identical beings. These models are not capable of describing experimentally observed phenomena, as spontaneous oscillations in yeast continuous cultures and cellular synchronism.

This work propounds an age-structured segregated model for a bioprocess carried by *Saccharomyces cerevisiae* on a continuous stirred-tank fermentor. This model calculates densities of active, inactive and dead cells per unit of medium volume, and accounts for the influence of ambient conditions (concentrations of substrate and oxygen feed) and cell-cycle operation on rates of division, death, and transitions between active and inactive cells. The class of inactive cells is defined according to experimental evidence on the quiescence of yeast. Two alternative sets of functions that compute single-cell mass and duration of cell cycles are used by the model. The definitions of a cell age variable related to genealogical age and an inactive population are features unique to the model proposed herein.

The model is discretized using a Galerkin method and its parameters are adjusted from experimental data. The model is evaluated by comparing its predictions with data from batch runs under several operating conditions and its predictions of periodic phenomena observed in aerated continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae* are explored.

SUMÁRIO

1. Introdução 1
2. Revisão Bibliográfica 6
2.1 – Ciclo Celular e Metabolismo 9
2.2 – Modelos de Balanço Populacional 20
3. Modelo de Dinâmica Populacional Microbiana Estruturado em Idade 34
3.1 – Balanço Populacional em Fermentador Contínuo Agitado 37
3.2 – Resolução Numérica do Modelo 41
3.3 – Funções de Divisão e Transições 45
3.3.1 – Função de Divisão 45
3.3.2 – Função de Morte de Células Ativas 48
3.3.3 – Função de Inativação de Células Ativas 50
3.3.4 – Função de Ativação de Células Inativas 52
3.3.5 – Função de Morte de Células Inativas 54
3.3.6 – Coeficientes das Funções de Divisão e Transições 55
3.4 – Função de Consumo de Substrato 56
3.5 – Funções Densidade para Populações Iniciais 58
3.6 – Funções de Ciclo Celular – Distribuições de Massa e Duração 58
3.6.1 – Distribuições de Massa e Duração: Implementação A 61
3.6.2 – Distribuições de Massa e Duração: Implementação B 63
4. Metodologia Experimental 66
5. Bases para Simulação e Ajuste de Parâmetros 69
5.1 – Definição da Variável de Oferta de Oxigênio 69
5.2 – Influência da Concentração de Substrato sobre a Duração do Ciclo Celular 70
5.3 – Parâmetros do Modelo 72
5.4 – Ajuste de Parâmetros 75

6. Resultados: Exploração do Modelo 77
7. Resultados: Testes do Modelo 102
7.1 – Ajuste de Parâmetros com Conjuntos de Experimentos 102
7.2 – Testes de Extrapolação 120
8. Resultados: Comportamentos Periódicos 130
9. Conclusões 137
10. Referências Bibliográficas 141
Apêndice I I.1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* e principais eventos (Fonte: Futcher, 1993) 10
Figura 3.1 – Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*: relação entre divisão e quiescência 36
Figura 3.2 – Sistema em CSTF (agitação perfeita, pressurizado com um gás qualquer) 37
Figura 3.3 – Funções densidade inicial de células 58
Figura 3.4 – Duração do ciclo celular: implementação A – $L_A(a)$ 61
Figura 3.5 – Distribuição de massa celular: implementação A – $M_A(a)$ 62
Figura 3.6 – Distribuição de massa celular: implementação B – $M_B(a)$ 65
Figura 3.7 – Duração do ciclo celular: implementação B – $L_B(a)$ 65
Figura 4.1 – Reator Bioquímico onde foram realizados os experimentos BR-01 a BR-06 67
Figura 6.1 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-01: $ASPBM_A$ 82
Figura 6.2 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-02: $ASPBM_A$ 83
Figura 6.3 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-04: $ASPBM_A$ 84
Figura 6.4 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-N1: $ASPBM_A$ 85
Figura 6.5 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A1: $ASPBM_A$ 86
Figura 6.6 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A6: $ASPBM_A$ 87
Figura 6.7 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-O3: $ASPBM_A$ 88
Figura 6.8 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-01: $ASPBM_B$ 89
Figura 6.9 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-02: $ASPBM_B$ 90
Figura 6.10 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-04: $ASPBM_B$ 91
Figura 6.11 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-N1: $ASPBM_B$ 92
Figura 6.12 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A1: $ASPBM_B$ 93
Figura 6.13 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A6: $ASPBM_B$ 94
Figura 6.14 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-O3: $ASPBM_B$ 95
Figura 6.15 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Concentração das classes de células (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1) 96
Figura 6.16 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Concentrações de biomassa e substrato (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1) 97
Figura 6.17 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição de células ativas (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1) 97
Figura 6.18 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição de células inativas (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1) 98
Figura 6.19 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição de células mortas 98

(S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)
Figura 6.20 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição idades 99
(S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)
Figura 6.21 – Simulação $ASPBM_B$ + parâmetros CONJUNTO 2: Efeito da oferta de oxigênio sobre X 100
e S (batelada, S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L)
Figura 6.22 – Simulação $ASPBM_B$ + parâmetros CONJUNTO 2: Efeito da oferta de oxigênio sobre G, 100
NG e viabilidade celular (batelada, S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L)
Figura 7.1 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-01: $ASPBM_A$ 104
Figura 7.2 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-02: $ASPBM_A$ 105
Figura 7.3 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-04: $ASPBM_A$ 106
Figura 7.4 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-N1: $ASPBM_A$ 107
Figura 7.5 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A1: $ASPBM_A$ 108
Figura 7.6 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A6: $ASPBM_A$ 109
Figura 7.7 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-O3: $ASPBM_A$ 110
Figura 7.8 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-01: $ASPBM_B$ 111
Figura 7.9 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-02: $ASPBM_B$ 112
Figura 7.10 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-04: $ASPBM_B$ 113
Figura 7.11 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-N1: $ASPBM_B$ 114
Figura 7.12 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A1: $ASPBM_B$ 115
Figura 7.13 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A6: $ASPBM_B$ 116
Figura 7.14 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-O3: $ASPBM_B$ 117
Figura 7.15 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-01 121
Figura 7.16 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-02 122
Figura 7.17 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-03 123
Figura 7.18 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-04 124
Figura 7.19 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-05 125
Figura 7.20 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-06 126
Figura 7.21 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento PT-N6 127
Figura 7.22 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento PT-O5 128
Figura 8.1 –$ASPBM_A$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações em X e S sob D = 0,05 h^{-1} 131
Figura 8.2 –$ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações em X e S sob D = 0,05 h^{-1} 131
Figura 8.3 –$ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações em X e S moduladas por D 132
Figura 8.4 –$ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações de populações moduladas por D 133
Figura 8.5 –$ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações para D = 0,005 h^{-1} 134
Figura 8.6 –$ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, influência de λ_S^L sobre respostas periódicas 136

Figura 8.7 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, influência de γ_S^L sobre respostas periódicas 136

Figura AI.1 – Sigmoidal Logística com Aceleração Baixa (λ = 0,5 e γ = 5) I.1

Figura AI.2 – Sigmoidal Logística com Aceleração Unitária (λ = 1 e γ = 5) I.2

Figura AI.3 – Sigmoidal Logística com Aceleração Alta (λ = 10 e γ = 5) I.2

Figura AI.4 – Sigmoidal com Aceleração Unitária Deslocada à Esquerda (FDE, γ = 2,5) I.3

Figura AI.5 – Sigmoidal com Aceleração Unitária Deslocada à Direita (FDD, γ = 7,5) I.3

Figura AI.6 – Diferença entre FDE e FDD (obtenção de modalidade) I.4

Figura AI.7 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*y*), com os mesmos parâmetros (baixa aceleração) I.5

Figura AI.8 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*y*), com os mesmos parâmetros (alta aceleração) I.6

Figura AI.9 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*y*); baixa aceleração *x* alta aceleração I.6

Figura AI.10 – Superfície *f*(*x*)- *f*(*y*) *x f*(*x*)-*f*(*y*), com os mesmos parâmetros (baixa aceleração) I.7

Figura AI.11 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*x*)-*f*(*y*), com a mesma aceleração e deslocadores diferentes I.7

Figura AI.12 – Superfície *f*(*x*) *x g*(*z*) I.8

Figura AI.13 – Superfície *f*(*x*) *x h*(*z*) I.8

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Parâmetros de M_A(a) segundo Chen *et al.* (2000) 62

Tabela 3.2 – Parâmetros *default* de $M_B(a)$ segundo a implementação B (Alberghina *et al.*, 1983) 64

Figura 4.1 – Reator Bioquímico onde foram realizados os experimentos BR-01 a BR-06 68

Tabela 5.1 – Parâmetros fixados para simulação do modelo 74

Tabela 5.2 – Limites e valores iniciais para ajustes de parâmetros 76

Tabela 6.1 – Valores ajustados usando dados de um único experimento: $ASPBM_A$ 78

Tabela 6.2 – Valores ajustados usando dados de um único experimento: $ASPBM_B$ 78

Tabela 7.1 – Valores ajustados usando dados grupos de experimentos: $ASPBM_A$ 102

Tabela 7.2 – Valores ajustados usando dados grupos de experimentos: $ASPBM_B$ 103

NOTAÇÃO

t	Tempo	h
a	Idade celular genealógica	-
$L(a)$	Duração "instantânea" do ciclo celular para indivíduo com idade a, tal que $L(a)^{-1}$ é a taxa de envelhecimento, expressa no contínuo a, por unidade de tempo real	h
O	Variável associada à oferta de oxigênio no CSTF	-
$S^{IN}(t)$	Concentração de substrato na corrente de alimentação	g/L
$S(t)$	Concentração de substrato no CSTF	g/L
$N_A(a,t)$	Densidade de número de células ativas por unidade de volume no CSTF	cél/L
$N_A^{IN}(a,t)$	Densidade de número de células ativas por unidade de volume na alimentação	cél/L
$N_I(a,t)$	Densidade de número de células inativas por unidade de volume no CSTF	cél/L
$N_I^{IN}(a,t)$	Densidade de número de células inativas por unidade de volume na alimentação	cél/L
$N_D(a,t)$	Densidade de número de células mortas por unidade de volume no CSTF	cél/L
$N_D^{IN}(a,t)$	Densidade de número de células mortas por unidade de volume na alimentação	cél/L
F	Vazão da alimentação	L/h
V	Volume do CSTF	L
$B(a,S,O)$	Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de divisão celular em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF	h^{-1}
$D_A(a,S,O)$	Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de morte de uma célula ativa em função da idade, da concentração de	h^{-1}

	substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição ativa → morta)	
$I(a,S,O)$	Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de inativação de uma célula ativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição ativa → inativa)	h^{-1}
$A(a,S,O)$	Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de ativação de uma célula inativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição inativa → ativa)	h^{-1}
$D_I(a,S,O)$	Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de morte de uma célula inativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição inativa → morta)	h^{-1}
$R_S^*(a,S,O)$	Taxa média de consumo de substrato por célula ativa de idade *a* sob as condições ambientais *S* e *O*	g/cél·h
S_0	Concentração inicial de substrato	g/L
$N_{A,0}(a)$	Densidade inicial de número de células ativas por unidade de volume no CSTF	cél/L
$N_{I,0}(a)$	Densidade inicial de número de células inativas por unidade de volume no CSTF	cél/L
$N_{D,0}(a)$	Densidade inicial de número de células mortas por unidade de volume no CSTF	cél/L
N_0	Concentração inicial de células ativas por unidade de volume no CSTF	cél/L
$n_A(a,t)$	Densidade adimensional de número de células ativas por unidade de volume no CSTF	-
$n_A^{IN}(a,t)$	Densidade adimensional de número de células ativas por unidade de volume na alimentação	-

$n_{A,0}(a)$	Densidade adimensional inicial de número de células ativas por unidade de volume no CSTF	-
$n_I(a,t)$	Densidade adimensional de número de células inativas por unidade de volume no CSTF	-
$n_I^{IN}(a,t)$	Densidade adimensional de número de células inativas por unidade de volume na alimentação	-
$n_{I,0}(a)$	Densidade adimensional inicial de número de células inativas por unidade de volume no CSTF	-
$n_D(a,t)$	Densidade adimensional de número de células mortas por unidade de volume no CSTF	-
$n_D^{IN}(a,t)$	Densidade adimensional de número de células mortas por unidade de volume na alimentação	-
$n_{D,0}(a)$	Densidade adimensional inicial de número de células mortas por unidade de volume no CSTF	-
$R_S(a,S,O)$	Taxa média de consumo de substrato da população sob as condições ambientais *S* e *O*	g/L·h
$\phi(a)$	Função pulso retangular, usada como base da discretização do modelo BPM via formalismo Galerkin	-
$U(a)$	Função degrau unitário	-
a_{MAX}	Valor máximo do domínio de idade para simulação do modelo BPM	-
a_{MIN}	Valor mínimo do domínio de idade para simulação do modelo BPM	-
N	Número de discretizações adotadas na implementação do formalismo Galerkin	-
H	Comprimento característico da discretização do modelo BPM no contínuo de idades	-
$c_{A_j}(t)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional de células ativas por unidade de volume no CSTF,	-

	utilizada na discretização do modelo BPM	
$c_{A_j}(0)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional inicial de células ativas por unidade de volume no CSTF, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{A_j}^{IN}(t)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional de células ativas por unidade de volume na alimentação, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{I_j}(t)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional de células inativas por unidade de volume no CSTF, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{I_j}(0)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional inicial de células inativas por unidade de volume no CSTF, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{I_j}^{IN}(t)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional de células inativas por unidade de volume na alimentação, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{D_j}(t)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional de células mortas por unidade de volume no CSTF, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{D_j}(0)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional inicial de células mortas por unidade de volume no CSTF, utilizada na discretização do modelo BPM	-
$c_{D_j}^{IN}(t)$	Coeficientes da série de Fourier referente à densidade adimensional de células mortas por unidade de volume na alimentação, utilizada na discretização do modelo BPM	-
l_j	Coeficientes da série de Fourier referente ao inverso da duração "instantânea" do ciclo celular, utilizada na discretização do modelo BPM	h^{-1}
$b_j(S,O)$	Coeficientes da série de Fourier referente à probabilidade de divisão celular, utilizada na discretização do modelo BPM	h^{-1}

$d_{A_j}(S,O)$	Coeficientes da série de Fourier referente à probabilidade de morte de células ativas, utilizada na discretização do modelo BPM	h^{-1}
$i_j(S,O)$	Coeficientes da série de Fourier referente à probabilidade de inativação de células ativas, utilizada na discretização do modelo BPM	h^{-1}
$d_{I_j}(S,O)$	Coeficientes da série de Fourier referente à probabilidade de morte de células inativas, utilizada na discretização do modelo BPM	h^{-1}
$a_j(S,O)$	Coeficientes da série de Fourier referente à probabilidade de ativação de células ativas, utilizada na discretização do modelo BPM	h^{-1}

1. INTRODUÇÃO

Os processos de transformação executados por microrganismos são explorados pelo homem, de forma artesanal, há milhares de anos (por exemplo, a produção de pães, vinhos e cerveja). Devido aos avanços das biotecnologias, as aplicações industriais de tais processos, embora muitas sejam tradicionais, têm se diversificado nas últimas décadas. Não apenas é vasta a quantidade de produtos, matérias-primas e cepas de microrganismos utilizadas industrialmente, mas também é muito variado o conjunto de modos de operação sob os quais tais processos são conduzidos (em regime batelada ou contínuo, sob condições aeróbias ou anóxicas, usando culturas puras ou mistas, etc.).

A engenharia destes bioprocessos abrange não apenas as áreas do conhecimento tradicionalmente relacionadas à engenharia de processos químicos, mas também precisa abranger conhecimentos bioquímicos, genéticos e de dinâmica populacional. Os fenômenos inerentes aos microrganismos, em escopo individual (metabolismo, reprodução e mutação, por exemplo) ou coletivo (como a competição entre indivíduos), precisam ser adequadamente considerados durante as etapas de projeto, controle e otimização do bioprocesso. Nestas tarefas, a engenharia de bioprocessos tradicionalmente vale-se mais do conhecimento empiricamente obtido sobre o desempenho de uma população de microrganismos sob condições razoavelmente definidas, do que de previsões oriundas de simulação de modelos matemáticos do processo. Isto se deve, em grande parte, à imprecisão dos modelos matemáticos tradicionalmente empregados em bioprocessos (baseados no modelo de Monod – ou o próprio), decorrente, basicamente, de:

(i) falta de conhecimento científico sobre os fenômenos biológicos envolvidos; e

(ii) abordagem tradicionalmente reducionista dos modelos matemáticos que descrevem os bioprocessos.

Sistemas complexos como os caracterizados por interações entre populações de microrganismos e o meio ambiente (seja este um estuário natural ou um meio de cultura definido em reator) não podem ser adequadamente descritos por modelos tradicionais. Modelos que utilizam poucas informações sobre a população e o ambiente (tradicionalmente, apenas a massa total de microrganismos e a concentração do substrato limitante) não conseguem descrever uma ampla gama de comportamentos dinâmicos decorrentes da interação entre ambos (por exemplo, a diauxia). De uma forma geral, o quão mais complexo o fenômeno biológico de interesse, mais informação sobre o mesmo deve estar incluída no modelo usado para descrevê-lo.

Por exemplo, o modelo de Monod descreve muito bem o comportamento de vários processos fermentativos em regime batelada. Para algumas combinações de microrganismos e substratos, uma simples alteração para acrescentar a descrição de os efeitos de inibição sobre o metabolismo microbiano causados por substrato(s) expande o elenco de fenômenos que podem ser descritos. Para que um modelo descreva um fenômeno ainda mais complexo, como as oscilações autônomas observadas em culturas contínuas aeradas de levedura gemulante, outras informações sobre a população microbiana devem ser incluídas no modelo, alterando sua estrutura.

No caso de sistemas biológicos, se a descrição de fenômenos complexos requer o tratamento de mais informações sobre a população, tal expansão é potencialmente trabalhosa. Estes sistemas são caracterizados por ampla variedade de efeitos não-lineares acoplados. As populações são intrinsecamente heterogêneas. Os fenômenos observados macroscopicamente (comportamento da população) são decorrentes da cooperação de fenômenos microscópicos (comportamento dos indivíduos) cuja observação é muito difícil e cara (quando não impossível, dado o atual estágio do conhecimento científico e da tecnologia experimental). Não é por outro motivo, senão tal dificuldade de abordagem, que os modelos “reducionistas”, que incluem pouca informação sobre as características individuais dos microrganismos, têm predominado no desenvolvimento da engenharia bioquímica. Estes modelos costumam reduzir o sistema a um modelo idealizado, onde a

população é homogênea (todos os indivíduos são considerados iguais) e as taxas das transformações catalisadas por microrganismos são dependentes de poucas variáveis observáveis (tipicamente, a massa total da população, comumente denominada biomassa, e a concentração da fonte de carbono limitante – que são variáveis importantes de qualquer bioprocesso, mas não as únicas). O resultado de tal abordagem costuma ser traduzido na ineficiência (ou impossibilidade) em descrever certos fenômenos, na necessidade de utilizar diferentes modelos para diferentes estágios/fases do processo (ou diferentes conjuntos de valores de parâmetros do modelo para cada fase) ou corretores para as predições do modelo (filtros, redes neurais, etc). Entretanto, é inegável o sucesso da aplicação de tais modelos na descrição precisa de comportamentos genéricos, simples, dos bioprocessos.

De toda forma, este sucesso parcial não diminui o interesse da academia e da indústria no desenvolvimento de modelos capazes de descrever fenômenos mais complexos, sobretudo em aplicações industriais ligadas a engenharia genética/metabólica (utilização de microrganismos de fenótipo alterado, com ou sem expressão de genes heterólogos), utilização de microrganismos como sistema modelo para estudos genéticos e bioquímicos de possível aplicação médica - controles do ciclo celular - e a recente disponibilização de técnicas experimentais capazes de extrair grandes quantidades de informações em nível de célula (citometria de fluxo, análise digital de imagens, dentre outros).

O trabalho aqui apresentado baseia-se na utilização de um arcabouço matemático tido como uma das alternativas mais propícias para descrever, com generalidade e precisão, várias classes de comportamentos de processos conduzidos por microrganismos: o *modelo de balanço populacional microbiano* (BPM) (Villadsen e Nielsen, 1992). Os modelos BPM permitem relacionar os comportamentos da população às características intrínsecas dos indivíduos, incluindo informação (implícita ou explícita) sobre os mecanismos bioquímicos e genéticos internos das células (ciclo celular, catabolismo, anabolismo). Entretanto, há um ônus inerente a estas novas possibilidades: tal tipo de modelo é de difícil solução matemática (bem como suas soluções apresentam complexas implementações

computacionais). Isto porque estes modelos incluem (pelo menos) uma equação íntegro-diferencial parcial não-linear (a equação de balanço populacional). Esta equação, em geral, está acoplada a (pelo menos) mais uma: a equação íntegro-diferencial ordinária de balanço material da fonte de carbono limitante. Uma prática comum encontrada na literatura é a distinção de subpopulações de microrganismos, havendo uma equação de balanço populacional para cada subpopulação (Hjortso e Nielsen, 1994; 1995). Nestes casos, a abordagem mais comum é a de dividir as células em "mães" (aptas a dividir/já dividiram ao menos uma vez) e "filhas" (ainda não dividiram/ainda inaptas a dividir).

Este trabalho propõe uma formulação de modelo de dinâmica microbiana via balanço populacional, focando a inclusão dos seguintes aspectos, que, tomados em conjunto, constituem abordagem com diferencial em relação à literatura corrente:

(i) a população de células é dividida em três classes: células vivas operando o ciclo celular normalmente, engajadas no processo de divisão celular (*ativas*); células vivas que não estão crescendo nem dividindo, em estado temporário de suspensão da operação do ciclo celular (*inativas*); células *mortas* (não-viáveis);

(ii) o modelo usa como variáveis contínuas independentes o tempo e a idade celular. Entretanto, ao contrário de abordagens típicas, nas quais a idade é computada como o tempo passado desde o surgimento da célula, aqui a idade é uma variável adimensional associada ao número de divisões (ciclos celulares) completados por cada célula;

Os objetivos deste trabalho também incluem: (i) a obtenção de dados experimentais para guiar a formulação do modelo; (ii) o ajuste de seus parâmetros; e (iii) a formulação e implementação de modelos de balanço populacional microbiano. Por fim, também é objetivo deste trabalho constatar a capacidade do modelo de simular uma classe de fenômenos de dinâmica populacional de interesse particular (oscilações autônomas de variáveis macroscópicas em culturas contínuas aeradas de *Saccharomyces cerevisiae*).

O segundo capítulo, *Revisão Bibliográfica*, faz um levantamento do histórico e do atual *status* dos modelos de balanço populacional microbiano; e da operação do ciclo celular de organismos eucariotos. No terceiro capítulo, *Modelo de Dinâmica Populacional Microbiana Estruturado em Idade*, é apresentado o modelo de BPM estruturado em idade proposto neste trabalho. O quarto capítulo, *Metodologia Experimental*, descreve métodos experimentais utilizados para a obtenção dos dados que foram utilizados para ajustar parâmetros do modelo. O quinto capítulo, *Bases para Simulação e Ajuste de Parâmetros*, descreve os detalhes de implementação do modelo, metodologia de ajuste de parâmetros e condições nas quais o modelo foi simulado. Os capítulos sexto, sétimo e oitavo mostram os *Resultados* obtidos em diferentes explorações, do ajuste de parâmetros à avaliação de comportamentos periódicos de culturas contínuas aeradas de levedura gemulante. As *Conclusões* são apresentadas no capítulo nove, e o décimo capítulo traz a lista das *Referências Bibliográficas*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma descrição matemática adequada da dinâmica de processos de transformação executados por microrganismos requer uma compreensão básica sobre os fenômenos biológicos ocorrendo simultaneamente em dois níveis: (i) *celular* (ou individual); e (ii) *populacional* (ou coletivo). Tais fenômenos biológicos abrangem as mais variadas classes de processos químicos e genéticos, exibindo complexidade singular. Mesmo os mais simples fenômenos biológicos observados superam em muito a complexidade de sofisticados sistemas da indústria de processos químicos. Por exemplo, a mera duplicação de um organismo unicelular eucarioto (como uma levedura) envolve a coordenação de centenas de reações metabólicas acopladas, bem como um grande número de processos genéticos de regulação e verificação. Obviamente, a modelagem da dinâmica de fenômenos microbianos é mais desafiadora do que a modelagem de sistemas químicos tradicionais, mesmo aqueles caracterizados por grandes populações de espécies heterogêneas.

Alguns problemas típicos da modelagem de processos microbianos:

(i) Em nível celular

- a ocorrência de redes de reações metabólicas envolvendo dezenas ou centenas de reações químicas ou enzimáticas;
- o desconhecimento de várias reações destas redes metabólicas; e
- a dificuldade técnica e/ou econômica para determinar experimentalmente os parâmetros envolvidos (constantes cinéticas, coeficientes estequiométricos, etc.);

(ii) Em nível populacional

- a dificuldade de medir a distribuição de propriedades entre os indivíduos;

- a dificuldade de identificar fenômenos de colaboração ou de competição inter ou intraespecíficos;
- necessidade de controle rigoroso das condições experimentais para garantir a reprodutibilidade dos resultados;

As dificuldades apontadas em nível celular são tipicamente associadas às áreas da Bioquímica, Biologia Molecular e Engenharia Metabólica, enquanto aquelas de cunho populacional estão associadas à Dinâmica Populacional e à Tecnologia de Fermentações.

Além disso, a dificuldade matemática e/ou a indisponibilidade de recursos e ferramentas computacionais para a solução dos modelos BPM representam obstáculos consideráveis. Em decorrência disto, os modelos tradicionais de sistemas biológicos empregados no estudo de bioprocessos, notadamente os modelos clássicos (o modelo de Monod e suas extensões), utilizam uma pequena quantidade de informações para descrever e simular tais sistemas, resultando em incapacidade para reproduzir certos comportamentos microbianos observados experimentalmente, como diauxia, oscilações espontâneas ou sincronia celular. Para descrever estes fenômenos, é preciso incorporar ao modelo uma quantidade maior de informações.

Embora um maior detalhamento sobre o sistema permita maior generalidade do modelo, ela implica em maior complexidade matemática. Assim, há diversos tipos de modelos que podem ser utilizados para descrever os sistemas biológicos, a escolher de acordo com as suas capacidades de descrição de fenômenos e os propósitos do simulador.

Em geral, os modelos de processos microbianos são classificados com respeito a dois aspectos (Villadsen e Nielsen, 1992):

(i) *Quanto ao Modelo de Célula* (Tsuchiya *et al.*, 1966)

- *Modelos Não-Estruturados*. Estes modelos descrevem a cinética de crescimento celular considerando o microrganismo como constituído de um único componente; e
- *Modelos Estruturados*. Estes modelos descrevem a cinética de crescimento celular considerando os constituintes intracelulares (DNA, RNA, proteínas, glicogênio, etc.) do microrganismo.

(ii) *Quanto ao Modelo de População* (Ramkrishna, 1979)

- *Modelos Morfologicamente Não-Estruturados.* Estes modelos consideram todas as células idênticas, ou seja, a população possui apenas uma forma morfológica. Estes modelos também são conhecidos como *não-corpusculares* ou *não-segregados*; e
- *Modelos Morfologicamente Estruturados*. Estes modelos consideram uma população microbiana constituída de diversos padrões morfológicos diferentes. São também conhecidos como modelos *corpusculares*. Em especial, quando se considera uma quantidade infinita (isto é, um contínuo) de padrões morfológicos, estes modelos são chamados *segregados*.

A maioria dos modelos segregados apresentados na literatura são modelos de balanço populacional, ou seja, baseados em funções densidade de número de células sob a ação de princípios probabilísticos de conservação, transição, geração e destruição (Villadsen e Nielsen, 1992).

Os modelos de *balanço populacional microbiano* (BPM) constituem o meio mais abrangente disponível para a descrição de fenômenos dependentes da heterogeneidade da biomassa, pois relacionam o comportamento global da população com distribuições probabilísticas de propriedades individuais das células. Estas propriedades individuais são características da operação do *ciclo celular* de um determinado microrganismo. O ciclo

celular é o conjunto de fenômenos coordenados através dos quais uma célula replica todos os seus constituintes e se divide em duas células aproximadamente iguais.

O ciclo celular dos eucariotos é controlado de forma similar em todos os organismos, mas apresenta diferentes detalhes e variações específicas para cada espécie ou cepa. Assim, os parâmetros de um modelo BPM devem ser avaliados para cada cepa. Pelo mesmo motivo, as formas funcionais dos termos do modelo – que controlam fenômenos de reprodução, morte, envelhecimento e consumo de substratos – podem, eventualmente, ser adaptadas especificamente para um determinado modo de operação conhecido do ciclo celular. Entretanto, é desejável a proposição de funções capazes de descrever o comportamento de ampla classe de microrganismos, utilizando-se apenas um conjunto de parâmetros específico para cada tipo ou espécie.

2.1 - CICLO CELULAR E METABOLISMO

Os mecanismos básicos do controle do ciclo celular parecem ser similares nos organismos eucarióticos. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* são dois dos mais simples e poderosos sistemas-modelo para o estudo do controle do ciclo celular de eucariotos.

Hartwell e Unger (1977) mostraram que as células de *Saccharomyces cerevisiae* sofrem divisão assimétrica e que o seu ciclo celular é controlado por massa: há uma massa mínima que a célula deve alcançar para dar início ao processo de divisão. Também estudaram a variação do tempo de geração das células com a sua idade genealógica (número de ciclos) e propuseram um modelo simples para o tamanho da população em função do tempo de duplicação, em condições de crescimento exponencial, e para a distribuição de idades da população.

Uma representação do ciclo celular normal de *Saccharomyces cerevisiae*, incluindo seus eventos-chave, é mostrada na Figura 2.1. A divisão celular de *Saccharomyces*

cerevisiae envolve a formação de uma gêmula, cujo tamanho aumenta até que seja liberada da célula-mãe, resultando em uma célula-mãe e uma célula-filha sem gêmulas. O evento conhecido como "START", ocorrido na fase G_1, dá início a uma etapa de divisão. Após a ocorrência do "START", fatores ambientais, como a escassez de nutrientes, não são mais capazes de impedir o processo de divisão. O "START" é também o ponto de coordenação para vários caminhos semi-independentes de eventos do ciclo celular. A gemulação é um sinal visível de que a célula passou pelo "START", e, em geral, quanto maior a gêmula, mais próxima está a divisão (liberação da gêmula pela célula-mãe).

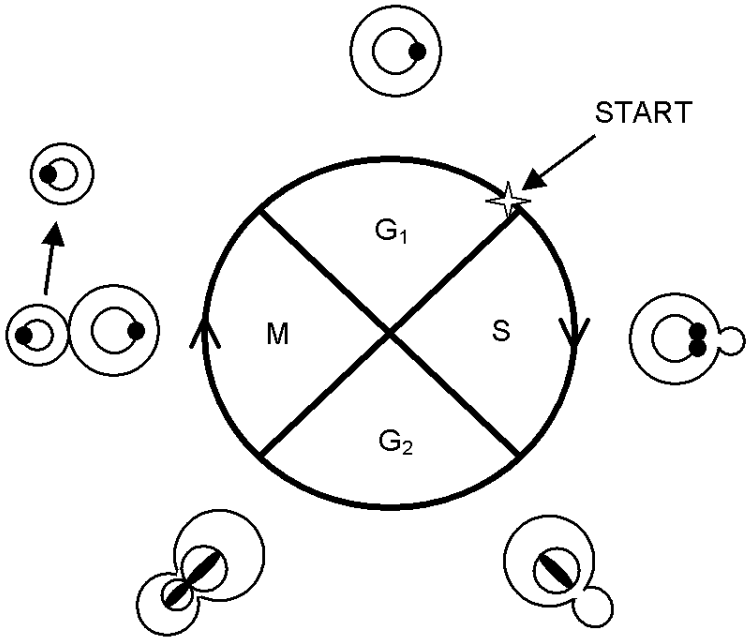

Figura 2.1 – Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* e principais eventos (Fonte: Futcher, 1993)

A etapa limitante de velocidade para o progresso do ciclo celular é a do crescimento e síntese de proteínas. Há um tamanho celular mínimo para o "START", em torno de 35 μm^3 para células haplóides selvagens em meio rico (Futcher, 1993). As células-filhas são menores que as mães e possuem fase G_1 mais longa (à exceção de algumas cepas de rápido crescimento), resultando em um tempo maior para que as filhas completem o ciclo de divisão subseqüente. Este fenômeno impõe um limite para o tempo pelo qual a sincronia celular de uma cultura de levedura gemulante pode ser mantida. Assim, o grau de sincronia

de uma população diminui com as divisões celulares e, para aspectos práticos, é notadamente diminuída após dois ciclos celulares. Outra razão para o desaparecimento da sincronia é a variação intrínseca da duração dos ciclos celulares entre as células (o que é uma característica da maioria dos tipos de células). Uma maneira simples de medir o grau de sincronia é computar a proporção de células em gemulação.

Uma das ferramentas mais importantes para o estudo do ciclo celular é a produção de culturas síncronas, que podem ser obtidas basicamente de duas maneiras (Creator e Joyne, 1993): (i) selecionar e cultivar uma subpopulação de uma cultura com células de mesma idade, ou (ii) induzir a cultura inteira a se dividir ao mesmo tempo usando inibidores químicos, bloqueando e liberando células que contenham defeitos de ciclo celular sensíveis à temperatura, ou por alimentação e inanição ("*starvation*").

Lord e Wheals (1980) realizaram vários experimentos em batelada, obtendo dados de idade celular através da contagem do número de cicatrizes. Ao fim de cada ciclo celular, a célula-mãe adquire uma cicatriz na superfície ao liberar a célula-filha, que não exibe cicatriz. Como cicatrizes subseqüentes não são sobrepostas à primeira, pode-se determinar a idade genealógica das células pelo número de cicatrizes. Estes dados confirmaram as predições do modelo de divisão assimétrica de Hartwell e Unger (1977).

Thompsom e Wheals (1980) publicaram dados de experimentos em fermentador contínuo, sob condições de crescimento balanceado, obtidos como nos experimentos em batelada divulgados anteriormente. Novamente, foi confirmada a validade do modelo de divisão assimétrica e demonstrou-se o aumento da probabilidade de perda de viabilidade das células com o aumento da idade genealógica.

Alberghina *et al*. (1983) usaram citometria de fluxo para obter distribuições de proteínas em *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em batelada. Os dados foram comparados com distribuições teóricas de proteínas a partir do modelo de distribuição de idades de Hartwell e Unger e duas versões modificadas. O melhor ajuste foi obtido pelo modelo

baseado na hipótese de o teor mínimo de proteínas (ou seja, a massa crítica) para o início da gemulação aumentar com a idade genealógica da célula-mãe. Esta hipótese implica no aumento da duração do ciclo celular com a idade genealógica, com a duração da fase de gemulação razoavelmente constante entre diversas classes de células (filhas e mães de diferentes idades genealógicas).

Murray e Kirschner (1989) revisaram os avanços no entendimento das transições do ciclo celular, oriundos de duas abordagens distintas: (i) a bioquímica, com a descrição do ciclo celular como uma máquina bioquímica oscilando entre os estados de mitose e interfase (a "*teoria dos relógios*"), e (ii) a genética, descrevendo o ciclo celular como similar às rotas metabólicas, onde o término de uma etapa propicia o início da subseqüente (a "*teoria dos dominós*"). Voltando a observar dados de experimentos de fusão celular publicados quase vinte anos antes, Murray e Kirschner propuseram uma visão unificada do ciclo celular eucariótico, sugerindo que um único mecanismo bioquímico seria a base do ciclo celular em todos os eucariotos.

Münch *et al.* (1992), publicaram dados sobre uma abordagem nova, àquela época, para a investigação dos mecanismos do ciclo celular de leveduras. Obtendo dados segregados via combinação de biorreator de alta performance e citometria de fluxo, citam a unificação anterior dos pontos de vista da bioquímica e da genética quanto ao ciclo celular. Eles observaram que as informações obtidas através de experimentos dinâmicos com levantamento de dados segregados "(...) ainda não podem ser comparadas com os conhecimentos genético e bioquímico, devido às perspectivas consideravelmente diferentes. Ainda será preciso algum tempo antes que seja vista uma união daquelas com esta visão do ciclo celular.".

Kuryiama *et al*. (1992) detectaram oscilações de curto período (40 a 50 min) em cultura aeróbica contínua de *Saccharomyces cerevisiae* limitada por glicose. Durante a oscilação, foi observada a variação de parâmetros tais como: oxigênio dissolvido, taxa respiratória, concentrações de etanol e acetato extracelular, concentrações de glicogênio,

ATP, NADH, piruvato e acetato dentro das células. Essas variações foram associadas a duas possibilidades: (a) variação da taxa de glicólise regulada por mudança do metabolismo do glicogênio ou (b) regulação retroalimentativa do ciclo do ácido cítrico.

Maddox (1994), ao comentar o então recém-publicado modelo matemático, molecular, da regulação do ciclo celular, ponderou: "De fato, é provável que um modelo deste tipo seja eventualmente o centro de um modelo matemático da célula como um todo. Eventualmente, este será um projeto excedendo em complexidade o Projeto Genoma Humano, com alguns milhares de equações acopladas. Mas os biólogos celulares não devem se desanimar com esta perspectiva. Aqueles que modelam a química da atmosfera da Terra ou mesmo aquela de nuvens de moléculas interestelares estão acostumados a sistemas que são, ao mesmo tempo, tão matematicamente simples quanto complexos."

Hjortso e Nielsen (1994) sugeriram um modelo para interação entre metabolismo e ocorrência de oscilações com base na divisão celular. O ciclo celular de leveduras tem dois pontos de controle: a massa crítica para gemulação e a massa crítica para divisão celular. Devido à composição do meio afetar a localização dos pontos de controle no ciclo celular, uma retroalimentação que estabilize as oscilações pode ser estabelecida entre o meio e uma população celular parcialmente sincronizada, i.e., "(...) Antes da gemulação, a célula acumula carboidratos na forma de trealose e glicogênio. Após a gemulação, existe alta demanda por energia livre de Gibbs e os carboidratos são mobilizados, o que resulta em um grande fluxo através da glicólise. Devido às limitações da capacidade respiratória das leveduras, este alto fluxo leva à formação de etanol". O etanol formado pode ser metabolizado pelas células não gemulantes juntamente com a glicose (a qual está presente em quantidades limitadas), resultando numa maior taxa específica de crescimento para estas células. Além disso, na presença de etanol, a massa crítica para gemulação das células decresce e a massa crítica para divisão celular aumenta. Fornecendo-se as condições iniciais adequadas, este efeito pode resultar na formação de um atrator e, por meio disto, conduzir à estabilização de uma sincronia parcial da cultura.

Val e Tyson (1996) propuseram um modelo para a dinâmica populacional de *Saccharomyces cerevisiae*, estruturado em massa. Este modelo separa as células em duas classes: células pré-START e células pós-START e é resolvido em espaço de estados que compreende a massa, as concentrações de SPF (*START promoting factor*), MPF (*mitosis promoting factor*) e ubiquitina. O modelo obteve uma distribuição de massa estável qualitativamente similar à de dados experimentais. Porém, a faixa de abrangência de massas prevista pelo modelo possuía a metade do comprimento da faixa experimental.

Van Dam (1996) afirma que "um sistema metabólico como a glicólise é propenso a oscilações porque é muito dependente do balanço entre geração e uso de ATP. Além disso, as propriedades cinéticas não lineares das enzimas catalisadoras das reações glicolíticas exacerbam tais oscilações. (...) É possível mostrar que fase e amplitude dessas oscilações são moduladas de forma previsível pela taxa de suprimento de glicose ao meio. (...) É mais difícil a observação de oscilações em células intactas em escala macroscópica porque os reservatórios intracelulares não têm comunicação direta (...)." Adicionalmente, mostrou que "oscilações sustentadas são observadas apenas quando *Saccharomyces cerevisiae* é cultivada até o ponto de diauxia, i.e., o momento de transição entre o cultivo em glicose e etanol após a exaustão da glicose".

Entretanto, Kuryiama *et al.* (1996) realizaram experiências com cultura contínua de *Saccharomyces cerevisiae* usando etanol como substrato carbonáceo. Foram observadas oscilações autônomas nas concentrações de etanol e acetato extracelular, na taxa de consumo de oxigênio, na tensão de oxigênio dissolvido e no pH intracelular. Algumas dessas oscilações foram similares em período e padrão às oscilações das culturas limitadas por glicose, sugerindo que, em ambos os casos, as oscilações tiveram a mesma causa. Os dados destes experimentos sugerem que as oscilações não são causadas pela mudança de pH intracelular, pois as oscilações de pH foram muito diferentes nos casos de alimentação com glicose e alimentação com etanol. Além disso, sugerem não estar na glicólise o ponto de controle das oscilações observadas (de curto período e sustentadas).

Inanição e adições de etanol a culturas de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido utilizadas como agentes de estresse. Koch (1997) enfatiza que o estudo de fenômenos ligados à inanição é uma área promissora em biologia molecular. “Basta dizer que existem mecanismos complexos, ainda pouco conhecidos, que mantêm a célula em estado de animação suspensa (...).” Torna-se evidente que células em inanição têm muitos mecanismos que promovem sua sobrevivência.

Alberghina *et al.* (1998) estudaram os controles do ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, usando células cultivadas em frascos com etanol como fonte de carbono, depois coletadas e transferidas para frascos com meio contendo glicose. A transição de condições ambientais (de um meio nutricionalmente mais pobre – o etanol – para um meio nutricionalmente mais rico – a glicose) ocasionou uma transição em alguns processos celulares, que foram quantificados com a utilização de uma técnica de citometria de fluxo de dupla marcação. No “meio pobre”, a duração do ciclo celular é maior do que no “meio rico”. Ao invés de uma transição declinante monotônica da duração do ciclo celular do valor maior para o menor, foi observado, imediatamente após a transferência, aumento dessa duração. As células cultivadas em etanol que ainda não haviam passado pelo START mostraram uma fase G_1 (pré-START / pré-gemulação) aumentada, enquanto as células gemulantes mostraram aumento do período de gemulação (da emergência da gêmula até a conclusão da mitose, englobando as fases S, G_2 e M). Após algum tempo, a duração da fase G_1 começa a diminuir, até se aproximar do valor esperado para células crescendo em glicose (maior taxa de crescimento específica, ou seja, menor tempo de geração). Já a duração da fase de gemulação diminui rapidamente até um valor próximo ao esperado para cultivo em glicose e permanece constante. A mudança no ambiente nutricional também mostra impacto no tamanho das células-filhas, que aumenta progressivamente durante o período de transição. Entretanto, as massas para início da gemulação e para divisão permanecem inalteradas durante o processo.

Matallana *et al.* (2002) produziram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com maior atividade de glicogênio-sintase e sem atividade de glicogênio-fosforilase, usando técnicas de engenharia metabólica. Durante o cultivo em fase estacionária, as células mostraram maior teor de glicogênio, e uma das cepas apresentou viabilidade estendida sob condições de depleção de glicose.

Alberghina *et al.* (2003) realizaram experimentos com culturas contínuas aeradas de *Saccharomyces cerevisiae*, monitorando o teor de proteínas da população. A partir dos dados gerados são calculados parâmetros relacionados ao ciclo celular, como as durações da fase G_1 e da fase gemulante ($S+G_2+M$), os tamanhos de células recém-nascidas, e tamanhos críticos para início da gemulação e divisão. Os dados sugerem que a glicólise emite um sinal que modula o tamanho crítico para início da gemulação. Essa relação parece ter sido mantida durante a evolução, uma vez que células de mamíferos dependentes de interleucina-3 têm seus tamanhos aumentados com a taxa glicolítica.

Ferrell *et al.* (2003) mostraram que a resposta da Cdc2 à ciclina-B é parecida com a de um interruptor abrupto, e também que a ativação da Cdc2 é histerética. Esses resultados evidenciam que o mecanismo de ativação do complexo Cdc2-ciclina-B é bi-estável, e o complexo funciona como um oscilador autônomo. Conforme as ciclinas acumulam e ativam o complexo mitótico Cdc2-ciclina-B, Cdc2 ativa o APC (*Anaphase-Promoting Complex*), que degrada as ciclinas, desativando Cdc2 (retroalimentação negativa). Por outro lado, Cdc2-ciclina-B estimula seu ativador Cdc25 e inativa os seus inibidores Wee1 e Myt1 (configurando um retroalimentação positiva). A bi-estabilidade é essencial para a robustez dos osciladores biológicos, parecendo ser uma característica comum a eles.

Patnaik (2003) sumarizou e comparou diferentes abordagens para a modelagem de oscilações em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, dividindo-as em duas classes: a dos modelos “mecanísticos” (que têm foco na descrição da dinâmica do metabolismo e do ciclo celular e na interação destes com o meio abiótico) e a dos modelos “de engenharia” (cujo foco é a utilização de descrições simplificadas do metabolismo para gerar respostas que

podem ser comparadas com grandezas mensuráveis macroscopicamente). Ambas as classes de modelos apresentam formulações com sucesso limitado em suas tentativas de descrever os vários comportamentos periódicos observados em culturas de levedura gemulante (oscilações de curtos e longos períodos, em meios cuja fonte de carbono é a glicose ou o etanol), sem uma conclusão definitiva a respeito de uma "complexidade ótima" de tais modelos, ou uma contribuição decisiva para a elucidação dos mecanismos de tais comportamentos.

Murray e Ingolia (2004) discutiram o impacto de décadas de modelagem e simulação sobre o entendimento do ciclo celular eucarioto. Os modelos do ciclo celular seguem princípios biológicos básicos do seu funcionamento, como o aumento da massa celular e a divisão em duas células. Mais recentemente, passaram a incluir o comportamento periódico do ciclo celular, permitindo a construção de osciladores baseados no acúmulo e destruição de ciclinas. Entretanto, os modelos propostos até o presente são capazes de reproduzir qualitativamente comportamentos biológicos observados experimentalmente (bi-estabilidade, histerese), mas não os reproduzem quantitativamente (em parte, devido a escassez de dados quantitativos que permitam guiar o detalhamento dos modelos, bem como o ajuste de seus parâmetros). Ainda, mesmo os modelos mais detalhados (por exemplo, o de Chen *et al.*, 2000) possuem discrepâncias mais ou menos sutis em relação aos mecanismos moleculares da operação do ciclo celular. Ressaltam os autores que os modelos têm sido continuamente aperfeiçoados com os novos avanços provenientes da experimentação, mas apenas recentemente estes modelos começaram a ser usados para orientar novos experimentos.

Westerhoff *et al.* (2005) estudaram a resposta intracelular de uma população de *Saccharomyces cerevisiae* a uma oscilação ambiental, que mostrou o acoplamento da dinâmica metabólica à dinâmica do meio abiótico. Células em crescimento exponencial foram recolhidas, lavadas e suspensas em solução de proteínas. Submetidas a uma alimentação gotejante de solução de baixa concentração de glicose (0,08 mmol/L, freqüência de 1,5 min^{-1}), simulando condições de oscilação de concentração de glicose em

fermentadores industriais devido a deficiências de mistura, o metabolismo das células respondeu com oscilações de mesma freqüência (medidas por fluorescência de NADH). Com o prosseguimento da exposição aos pulsos, a amplitude da resposta das células aumentou até estabilizar. Células submetidas a uma alimentação constante de glicose (com adição média similar ao caso de alimentação em pulsos), mostraram resposta oscilatória similar, indicando que a dinâmica periódica intracelular é uma resposta à baixa concentração de glicose alimentada, e não ao modo pulsante de alimentação. Os experimentos evidenciaram o aumento da afinidade de transportadores de glicose como essencial para a dinâmica periódica observada.

Vanoni *et al.* (2005) mostraram que o tamanho crítico para ocorrência do START em *Saccharomyces cerevisiae* é modulado não apenas por glicose extracelular, mas também por glicose intracelular, uma vez que, segundo os autores, a inativação da rota de monitoramento da glicose extracelular (rota Gpr1/Gpa2) não afeta a taxa de crescimento celular e apresenta influência apenas parcial sobre a modulação de tamanho.

Thomsson, Gustafsson e Larsson (2005) submeteram *Saccharomyces cerevisiae* a condições anaeróbicas de depleção de carbono ou nitrogênio em cultura contínua (D = 0,1 h^{-1}) em várias condições (pH's diferentes, presença de ácido lático ou benzóico) por 24 horas. Os resultados mostram que as células cultivadas em ausência de nitrogênio mantêm boa parte da atividade fermentativa, independente das condições anteriores de cultivo. Já as células cultivadas em depleção de carbono perderam quase toda a capacidade fermentativa. Em nenhuma das condições houve correlação entre consumo de substrato carbonáceo e capacidade fermentativa, demonstrando que a capacidade de adaptação à ausência de carbono depende de energia, ou seja, de reservas internas fermentáveis.

Tamaki *et al.* (2005) mostraram algumas evidências de que a deleção de GPR1 e GPA2 afetam o tamanho de células de *Saccharomyces cerevisiae* influenciando não apenas o mecanismo de divisão celular, mas também diminuindo a taxa de crescimento celular (em contradição com Vanoni *et al.*, 2005). A deleção de GPR1 e GPA2 diminui a resposta do

tamanho celular face à adição de glicose, bem como diminui a taxa de síntese de proteínas. Entretanto, permanecem incertos os mecanismos pelos quais a deleção de GPR1 e GPA2 afetam algumas rotas bioquímicas envolvidas.

McKnight *et al.* (2005) levantaram dados de culturas contínuas de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de limitação de nutrientes (principalmente substrato carbonáceo) que mostram comportamento periódico, decorrente de "explosões" respiratórias. Estes dados mostram que mais da metade do genoma da levedura é expresso periodicamente durante os ciclos metabólicos, evidenciando a divisão temporal dos eventos metabólicos em células eucarióticas.

A simulação de modelos BPM acoplados a modelos moleculares do ciclo celular (Chen *et al.*, 2000), poderia permitir a união do ponto de vista do engenheiro que busca a descrição de fenômenos não-lineares ao enfoque da biologia molecular. Tais modelos "híbridos" auxiliaram não somente o entendimento dos fenômenos bioquímicos intracelulares ainda não explicados, mas também o projeto e a operação de bioprocessos a partir de informações segregadas sobre a população microbiana. Entretanto, para que tais modelos híbridos BPM/moleculares sejam desenvolvidos e mostrem utilidade, os experimentalistas precisarão aperfeiçoar a aplicação de métodos como a citometria de fluxo e a análise automática de imagens à obtenção de informações segregadas com acurácia e rapidez significativas. Além disso, terão os experimentalistas outro trabalho: desenvolver novos experimentos capazes de evidenciar as interações bioquímicas ainda desconhecidas entre a população heterogênea e o ambiente. Estes avanços poderão levar a uma convergência entre os pontos de vista dos engenheiros, dos bioquímicos e dos microbiologistas sobre a utilidade das informações segregadas e dos modelos que as utilizam.

2.2 - MODELOS DE BALANÇO POPULACIONAL

Os modelos de balanço populacional são utilizados na descrição e simulação de sistemas que envolvem geração, destruição e aglomeração de partículas discretas. São geralmente utilizados em modelagem de sistemas particulados, cristalização e sistemas microbianos (Ramkrishna, 1985).

Os modelos de balanço populacional de um sistema computam os números de indivíduos cujas presenças e/ou comportamentos determinam o comportamento global do sistema. Estes indivíduos são distinguidos uns dos outros por um conjunto de variáveis (estados) contínuos ou discretos, internos ou externos. Variáveis externas dizem respeito à localização das partículas no sistema, enquanto as internas referem-se a propriedades intrínsecas dos indivíduos (massa, temperatura, composição, etc). Um indivíduo é caracterizado em um determinado instante por sua "posição" no *espaço de estados* constituído por todas estas variáveis.

A quantidade de microrganismos em um determinado estado é convenientemente descrita através de distribuições de números de células por unidade de volume de meio de cultura. Estas distribuições são governadas por funções densidade (FD's) de números de células por unidade de volume. Usualmente, os modelos de balanço populacional microbiano consideram populações homogeneamente distribuídas no espaço, e tal condição estará pressuposta ao longo deste texto.

Com respeito aos estados, os modelos BPM unidimensionais (um único estado para caracterizar as células) tipicamente utilizam uma dentre as duas variáveis contínuas:

- *Idade celular*. A função densidade de número de indivíduos por volume, $N(a,t)$, é tal que $N(a,t)da$ registra, no instante de tempo t, o número de células por unidade de volume do reator que possui idade em (a, $a + da$). A idade celular pode ser representada como o tempo exato de vida da célula, ou

seja, o tempo decorrido desde a sua formação, ou definida em número de ciclos celulares. Os modelos BPM que incorporam a dependência da idade em funções densidade são ditos *estruturados em idade*.

- *Massa celular*. A função densidade de número de células por volume, $\Phi(w,t)$, é tal que $\Phi(w,t)dw$ registra, no instante t, o número de células por unidade de volume do reator com massa em (w, $w + dw$). Por "massa", entende-se qualquer propriedade da célula que satisfaça uma lei de conservação, como volume da célula ou conteúdo total de proteínas, por exemplo (Srienc *et al.*, 1999). Estes modelos são conhecidos como *estruturados em massa*.

Tradicionalmente, os modelos BPM na literatura são estruturados em massa. Como esta classe de estados (que compreende os já citados volume e conteúdo total de proteínas) é de fácil medição experimental, muitos autores consideram este tipo de modelos BPM mais significativo (Srienc *et al.*, 1999). Com o desenvolvimento na década passada das técnicas de citometria de fluxo e de análise automática de imagens, é provável que se torne mais difundida a medição de propriedades celulares para utilização em modelos BPM estruturados em massa.

Por outro lado, modelos estruturados em idade também encontram aplicação. Recentemente foram desenvolvidas e popularizadas técnicas (Münch *et al.*, 1992a; Srienc, 1999) para medição de propriedades como número de cicatrizes (que registram o número de ciclos celulares executados pela célula até aquele instante) e teor de DNA, a partir das quais podem ser estimados parâmetros do modelo de balanço populacional, bem como estimar a distribuição de idades da população. A título de observação, algumas abordagens encontradas na literatura com modelos BPM estruturados em idade costumam separar a população em dois contínuos de indivíduos: células-mães e células-filhas (Hjortso e Nielsen, 1994, 1995).

Uma das vantagens de modelos BPM é a possibilidade de incorporar informações sobre eventos específicos que ocorrem durante a divisão celular e os mecanismos da

divisão celular (Nielsen e Villadsen, 1992). Por exemplo, se um modelo BPM (estruturado em massa ou idade) inclui informações sobre diferentes fases do ciclo celular, é simples acoplá-lo a uma equação de balanço de massa de um produto formado apenas em uma fase específica do ciclo celular. Da mesma forma, seria simples expressar a taxa de consumo de (um) substrato em função da progressão do ciclo celular (por exemplo, usar uma taxa específica de consumo maior para a fase do ciclo em que a célula está replicando seus constituintes – para a divisão em duas células – e menor para a fase em que a síntese desses constituintes já se encerrou – a célula está próxima à divisão, ou ainda não começou uma nova replicação). Esta informação sobre o ciclo celular pode ser implícita ou explícita. Como exemplo de informação explícita sobre o ciclo celular, alguns modelos estruturados em idade (Hjortso e Nielsen, 1994; Zhu *et al.*, 2000) computam idades de transição (quando a célula começa a replicar seus constituintes) e de divisão (quando a célula filha desprende-se da célula-mãe).

A formulação "clássica" da equação de balanço populacional microbiano estruturado em massa (monovariável) foi derivada pela primeira vez por Fredrickson e colaboradores (Fredrickson e Tsuchiya, 1963; Tsuchiya *et al.*, 1966; Fredrickson *et al.*, 1967) e está representada pela equação (2.1a) (Villadsen e Nielsen, 1992).

$$\frac{\partial \Phi(w,t)}{\partial t} + \frac{\partial \left[R^*(w,t)\Phi(w,t)\right]}{\partial w} = 2\int_{w}^{w_{MAX}} p(w,w',t)b(w',t)\Phi(w',t)dw' - b(w,t)\Phi(w,t) - \frac{F}{V}\Phi(w,t) \qquad (2.1)$$

onde o estado mássico é expresso em g/célula do constituinte intracelular (ou outra propriedade quantitativa qualquer); R^* é a taxa líquida de formação do constituinte considerado (g/célula hora); $p(w,w',t)$ é a densidade de probabilidade de formação de duas células-filhas com teores w e $w' - w$, respectivamente, quando da divisão da célula com teor w' em t, normalmente chamada probabilidade de quebra (este termo origina-se de aplicações dos modelos populacionais a sistemas de moagem); $b(w,t)$ é a densidade de probabilidade de divisão em t para uma célula de teor w. Apenas três hipóteses fundamentais são necessárias para a dedução da Equação 2.1a: (i) as células estão

distribuídas de forma homogênea no espaço; (ii) não há morte celular; e (iii) as células crescem em um único estágio, ou seja, a população de células não está dividida em várias subpopulações, cada uma referente a um estágio (ou fase) do ciclo celular. Quanto a esta última hipótese, há vários exemplos na literatura de modelos BPM estruturados em massa ou em idade que dividem a população em duas subpopulações: a de células-mães e a de células-filhas (Hjortso e Nielsen, 1994, 1995; Zhu *et al.*, 2000).

Um conceito implícito nesta formulação clássica do BPM estruturado em massa expressa através da Equação 2.1 é que *uma célula-mãe divide-se em duas células-filhas, desaparecendo como tal*. Por isso, o termo de geração (o termo integral) é multiplicado por 2 e as células que se dividem são removidas do sistema (termo de desaparecimento por divisão celular).

Claramente, os modelos BPM representam a forma mais geral de descrição da dinâmica de uma população de células microbianas, especialmente porque permitem inferir conhecimento sobre as funções de reprodução e divisão celular, que são desconhecidas para a maioria dos microrganismos (Srienc *et al.*, 1999).

Subramanian e Ramkrishna (1971) empregaram uma combinação dos métodos de resíduos ponderados e de aproximações sucessivas para solucionar numericamente um modelo BPM estruturado em massa. Entretanto, esta abordagem apresenta grande demanda de memória e tempo computacionais, e está limitada ao caso de taxa de crescimento linear, pois esta condição permite o desacoplamento das equações de balanço de células e de balanço de substrato, o que, geralmente, não é possível.

Cazzador e Mariani (1988) apresentaram um modelo para uma fermentação contínua usando levedura gemulante. O modelo consiste de um conjunto de equações diferenciais ordinárias descrevendo a variação de biomassa total e consumo de substrato (modelo não-segregado) e um balanço populacional computando transições entre um pequeno conjunto de subpopulações de leveduras, caracterizadas através da idade

genealógica (número de células-filhas geradas / cicatrizes). O modelo apresentado leva em consideração (i) a divisão assimétrica das leveduras gemulantes; e (ii) o aumento da massa para início da gemulação com a idade genealógica e a dependência dessa massa com a concentração de substrato. O algoritmo de solução proposto consiste de três etapas executadas em seqüência. Na primeira, ocorre a integração do modelo não-segregado entre dois instantes de tempo. Estes instantes são escolhidos adequadamente, em função da discretização da faixa de valores de massa celular utilizada, de forma a ocasionar que as células comecem a gemular ou dividam coincidindo com os instantes escolhidos. Na segunda, já calculados valores de massa da população, concentração de substrato e taxa de diluição no intervalo de tempo selecionado, são computadas as transições entre as subpopulações. Na terceira etapa, computa-se a distribuição de massa de cada subpopulação, de acordo com as equações relacionando massa celular e idade genealógica.

Hjortso e Nielsen (1994; 1995) usaram um modelo de balanço populacional estruturado em idade para investigar oscilações microbianas. Os autores estudaram o surgimento de tais oscilações levando em consideração o ciclo celular dos microrganismos e a relação entre a sincronização parcial da população e os comportamentos oscilatórios. Estes trabalhos propõem a distinção de duas classes de células: “mães” e “filhas”, cujas idades de transição (preparação para a mitose) e de divisão (mitose) são expressas em função da concentração de substrato. Com esta consideração sobre as idades de transição e divisão, pode-se modelar a população de forma que a idade de divisão varie com o mesmo período da variação de substrato, concordando com as observações experimentais sobre a indução de sincronia da população por oscilação controlada das condições ambientais.

Liou *et al.* (1997) apresentaram soluções analíticas para modelos de balanço populacional estruturados em idade e estruturados em massa, no caso de expressões simples de taxa de crescimento. Eles utilizaram uma abordagem de gerações sucessivas, mas sua formulação foi obtida para um ambiente de crescimento invariável, ou seja, com concentração de substrato constante.

Srienc *et al.* (1999) apresentaram um novo esquema numérico para a solução de modelo BPM estruturado em massa, considerando variação da concentração de substrato. O método é uma combinação de dois esquemas de diferenças finitas explícitos no tempo. Os autores alegam que este esquema tem pequena demanda de memória e tempo computacionais, e compararam seus resultados com o do método de Liou e colaboradores (1997), obtendo boa concordância. Uma das vantagens deste método é a possibilidade de utilização de várias formas diferentes para as funções de divisão e quebra (vários métodos anteriores para solução de modelos BPM foram criados de forma a aproveitar as especificidades de cada tipo de função de divisão ou quebra).

Rey *et al.* (1999) apresentaram um método numérico para a solução de um modelo BPM estruturado em massa aplicado a um processo de *Fermentação Auto-Cíclica* (*SCF – Self Cycling Fermentation*). A SCF é uma técnica de fermentação que permite a obtenção de culturas de células sincronizadas, através da remoção periódica de metade do volume do mosto, que é então substituído por meio fresco. Os autores mostram que os organismos sofrem duplicação a cada ciclo, de forma sincronizada. O método apresentado é uma aplicação de elementos finitos, sob formalismo Galerkin com funções-teste de Chapeau, com solução numérica por Newton-Raphson, integração no contínuo de massa por quadratura gaussiana de 3 pontos e esquema de integração no tempo via preditor-corretor de Euler.

Villadsen (1999) publicou uma breve ponderação sobre a aplicação de modelos de balanço populacional aos bioprocessos, destacando aplicações à descrição de fenômenos como as oscilações em culturas contínuas de leveduras e bactérias, à perda de plasmídeos em culturas de células recombinantes, aos efeitos da quebra de hifas em culturas agitadas de fungos filamentosos, entre outros. Ele observou que a aplicação dos modelos populacionais é limitada por dois fatores principais: sua complexidade de resolução e a introdução de fenômenos físicos que estão além da atual capacidade experimental de avaliação. Realmente, embora ainda constitua importante barreira, a manipulação

matemática de modelos BPM é menos desagradável aos bioquímicos e microbiologistas do que a incapacidade de associar a estes modelos explicações simples, mecanísticas e elegantes para os fenômenos intracelulares. Mesmo quando os modelos populacionais descrevem corretamente fenômenos cuja investigação é relevante (como as oscilações em culturas de leveduras), eles não permitem elucidar as causas bioquímicas do que é observado.

Mantzaris *et al.* (2001a,b,c) avaliaram e compararam os diferentes esquemas para solução numérica da formulação genérica do balanço populacional microbiano estruturado em massa (Fredrickson e Tsuchyia, 1967) em uma seqüência de três artigos, cada um dizendo respeito a uma família de métodos: diferenças finitas, espectrais (Galerkin, Tau e colocação) e elementos finitos. Esta série de artigos considera não só o caso monovariável do BPM estruturado em massa clássico (ou seja, apenas um estado), mas também formulações multivariável (as comparações utilizaram formulações com até 3 estados). As avaliações realizadas mostraram uma maior eficiência do melhor entre os métodos de diferenças finitas em relação aos métodos espectrais e de elementos finitos. Embora os métodos de diferenças finitas sejam os de mais simples implementação, expansões de ordens elevadas da derivada espacial exigem a aplicação de condições de contorno numéricas (em adição àquelas impostas pelo problema a resolver), o que pode resultar em lentidão de convergência para alguns esquemas. Esta exigência de condições adicionais de contorno não se mantém para os métodos espectrais e de elementos finitos. Por sua vez, os métodos de Galerkin e Tau possuem uma desvantagem de escala: conforme aumenta a dimensão do espaço de estados, o número de operações matemáticas executadas a cada iteração da integração no tempo aumenta muito mais que no caso das diferenças finitas. Já no caso do método de colocação com transformadas rápidas de Fourier para a avaliação das derivadas espaciais (usando funções de teste senoidais), a quantidade de operações matemáticas por iteração é comparável aos casos de diferenças finitas. Em resumo, os métodos de Galerkin e Tau possuem aumento de tempo de execução (em relação ao aumento da dimensão do espaço de estados) maior que os métodos de diferenças finitas e de colocação. Finalmente, o método dos elementos finitos apresentou performance inferior

aos demais no caso das formulações multidimensionais. Quanto à escolha de algoritmo de integração no tempo, de forma geral, os métodos explícitos de Runge-Kutta (de passo único) apresentaram o melhor desempenho.

Ramkrishna e Mahoney (2002) relacionaram novas tendências e motivações para o desenvolvimento e a aplicação prática de modelos BPM. A primeira destas tendências é a formulação de modelos que façam distinção entre estados externos e internos das partículas, ou seja, que computem a dinâmica da morfologia corpuscular. Tal tipo de formulação é particularmente (mas não unicamente) interessante para a descrição de populações de microrganismos, pois permite exprimir relações entre propriedades das células e as composições de seus compartimentos (citossol, ribossoma, etc.).

Uma segunda tendência é a da solução de problemas inversos, ou seja, da identificação dos modelos de balanço populacional a partir de dados experimentais. Por identificação entenda-se a definição das funções probabilísticas de um modelo (taxas de quebra, agregação, etc), e não meramente a estimação de parâmetros. Tais problemas encontram aplicação prática, uma vez que as técnicas para determinação (até mesmo *on-line*) de distribuições de propriedades de uma população de partículas (cristais, polímeros, células) tornam-se populares. No caso da modelagem de dinâmica populacional microbiana, as técnicas de citometria de fluxo permitem o levantamento de grandes quantidades de dados sobre as células, que podem ser utilizados na solução do problema inverso. Como as soluções de tais problemas são muito sensíveis a discrepâncias nos dados, a disponibilidade de uma grande quantidade de dados é requisito fundamental para que um problema inverso seja resolvido (Ramkrishna e Mahoney, 2002).

A terceira tendência é a utilização de balanços populacionais estocásticos. Os modelos de balanço populacional tradicionais não são estocásticos, uma vez que a densidade de partículas em determinada posição do espaço de estados é unicamente definida para todo e qualquer instante. Ou seja, o número de partículas (como função do tempo e dos estados) não é uma variável estocástica, mas determinística (na verdade, um

valor médio). Como a descrição matemática da dinâmica de uma população através de uma formulação estocástica permite calcular não somente as esperanças das densidades de partículas/indivíduos, mas também as suas flutuações (variância), os balanços populacionais estocásticos são particularmente úteis para a simulação de populações pequenas. Tradicionalmente, resultados de simulações de balanços populacionais determinísticos apresentam grande discrepância em relação a dados experimentais, quando as populações apresentam um tamanho reduzido.

Outra tendência recente para a aplicação industrial dos balanços populacionais é a de sua utilização para a síntese de controladores. Face às crescentes demandas do controle de qualidade de produtos obtidos através de processos de populações heterogêneas (processos de cristalização, polimerização e fermentação) e à disponibilidade da tecnologia para levantamento *on-line* de propriedades corpusculares (no caso de microrganismos, distribuições de volume, teores de proteínas, DNA, etc.), os modelos de balanço populacional tornam-se importantes para fins de controle e otimização de processos. Nestes casos, é preciso atenção especial à escolha e implementação do esquema de simulação numérica do modelo, pois estes resultados são utilizados em tempo real.

Entre os fenômenos dinâmicos observados em culturas contínuas de *Saccharomyces cerevisiae*, a oscilação de grandezas macroscópicas (como densidade de células e concentração de substrato) é um dos mais instigantes para os pesquisadores. Naturalmente, um dos objetivos de controle que desponta como óbvio candidato para a aplicação de modelos BPM à síntese de controladores baseados em modelo é a estabilização de tais oscilações. Zhu e colaboradores (Zhu *et al.*, 2000) usaram a formulação clássica do BPM estruturado em massa para desenvolver um controlador preditivo linear (LMPC) com tal objetivo. Especial cuidado foi tomado quanto à escolha das funções de probabilidade de divisão e de partição, para assegurar a capacidade do modelo em gerar soluções periódicas estáveis. Como em outras aplicações (Hjortso e Nielsen, 1995), as formulações empregadas para estas funções possuem como parâmetros massas de transição e divisão, que são funções da concentração do substrato. O modelo BPM é transformado em um conjunto de

equações diferenciais ordinárias empregando o método de colocação ortogonal e o método de elementos finitos. Para a aplicação do modelo na síntese do LMPC, este é linearizado em torno de um estado de operação e discretizado no contínuo de tempo, usando um intervalo Δt uma ordem de grandeza inferior ao período de oscilação considerado para o sistema. Manipulando a vazão e a concentração de substrato da corrente de alimentação, o LMPC é capaz de estabilizar oscilações, mas não de controlar a distribuição de massas.

Mantzaris *et al.* (2002) realizaram uma avaliação teórica de controlador não-linear baseado em modelo BPM. Neste artigo, foi empregado um modelo de balanço populacional estruturado em massa, considerando duas subpopulações, cada uma operando em um diferente estágio do ciclo celular. Tal distinção foi realizada para considerar um produto que é formado em apenas um estágio do ciclo celular. O objetivo de controle era manter a produtividade de um sistema contínuo em torno do valor máximo, manipulando a concentração de substrato na corrente de alimentação. O controlador baseado no modelo BPM alcançou seu objetivo e obteve desempenho superior a um controlador PI e a um controlador baseado em uma linearização do modelo.

Henson, Mhaskar e Hjortso (2002) propuseram um modelo BPM estruturado em massa acoplado a um "modelo estruturado" para o meio abiótico, apesar de o termo "modelo estruturado", no campo dos processos fermentativos, ser tradicionalmente aplicado a modelos que descrevem as variações de constituintes internos dos microrganismos. De fato, a formulação proposta é tão somente um modelo BPM para descrever a proliferação celular acoplado a um conjunto de EDO's que descrevem os balanços em fase líquida de glicose, etanol, oxigênio dissolvido e dióxido de carbono. O foco da formulação apresentada é gerar respostas macroscópicas que possam ser comparadas diretamente a grandezas facilmente mensuráveis, permitindo um simples processo de ajuste dos parâmetros, para que o modelo BPM descreva quantitativamente comportamentos oscilatórios de culturas contínuas de *Saccharomyces cerevisiae*. O modelo foi discretizado usando colocação ortogonal sobre elementos finitos. Um procedimento para escolha do subconjunto de parâmetros mais sensíveis através de PCA (*Principal*

Component Analysis) é aplicado, e os parâmetros escolhidos são estimados usando dados dinâmicos. Esses dados foram obtidos com a mudança do modo de operação de corridas em batelada para experimentos contínuos, em condições de oscilações espontâneas. Estimando apenas 3 parâmetros foi possível gerar respostas em razoável acordo com os dados dinâmicos obtidos.

Henson, Muller e Reuss (2002) apresentam um modelo populacional baseado na abordagem de conjunto de células (*cell ensemble*) utilizando modelo de célula previamente desenvolvido (Wolf e Heinrich, 2000). Esse modelo computa o transporte de glicose, a transformação da glicose em glicerol, etanol e um *pool* de acetaldeído e piruvato, e o transporte desse *pool* para o exterior da célula e sua posterior degradação por cianeto. Um conjunto de 1000 células gera oscilações de NADH em uma população que vai progressivamente sincronizando os comportamentos periódicos das células individuais, conforme o acetaldeído/piruvato é excretado. Esta abordagem permite a reprodução de uma série de outros comportamento periódicos, mostrando efeitos de sincronização e dessincronização. Para comparação, os autores formulam um modelo com base na equação de balanço populacional (Nielsen e Villadsen, 1992) estruturado sobre um espaço de variáveis internas correspondentes às seis espécies intermediárias do modelo de célula utilizado na abordagem de conjunto de células. Enquanto a solução do modelo BPM é intratável computacionalmente, pois, para uma quantidade de discretizações n, um modelo discretizado em todas estas variáveis internas resultaria em um conjunto de $n^6 + 1$ EDO's acopladas, a abordagem do conjunto de células para m células resulta em $6m + 1$ EDO's.

Henson, Zhang e Kevrekidis (2003) estudaram a redução de ordem de um BPM estruturado em massa. Para isso, foi utilizada uma combinação de métodos de *proper orthogonal decomposition* e projeção Galerkin. Desta forma, a redução do modelo consiste em (i) gerar uma autofunção-base adequada para a construção do modelo de forma empírica, aplicando o método de análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) a resultados de simulação do modelo completo, e (ii) projetar o modelo completo sobre as autofunções-base usando o método de Galerkin, de forma a

produzir o modelo de ordem reduzida. O modelo consiste de uma equação íntegro-diferencial parcial para a densidade de células e de um conjunto de equações diferenciais ordinárias para nutrientes e produtos (glicose, etanol, CO_2). O modelo BPM foi simulado para gerar o conjunto de dados usados na redução de ordem, através de um algoritmo de colocação ortogonal em elementos finitos, gerando um conjunto de 117 equações diferenciais ordinárias usando o pacote ODESSA. Comparando os resultados dos modelos, completo e reduzido, para simulações em vários valores de taxa de diluição D, percebe-se que um modelo reduzido com aproximadamente um terço das EDOs do modelo completo é satisfatório.

Henson (2003) revisou as mais recentes (até aquele momento) contribuições para a modelagem de populações microbianas usando duas diferentes abordagens: a equação de balanço populacional (EBP) e o conjunto de células ("*cell ensemble*"). O método do conjunto de células usa uma descrição detalhada do metabolismo e do ciclo celulares, simulando células individuais com performances diferentes (geralmente, através de conjuntos de parâmetros aleatoriamente perturbados para cada célula do conjunto). Ambas as abordagens podem gerar grandes conjuntos de equações que são computacionalmente intratáveis. De forma geral, enquanto a abordagem da EBP permite soluções para um alto número de células (população grande) utilizando poucas grandezas (geralmente uma: massa ou idade) para descrever o estado intracelular, o conjunto de células permite soluções geradas a partir de um reduzido número de células utilizando descrições muito detalhadas do estado intracelular (vetor de estados de ordem elevada). Ainda não há comparações diretas entre as duas abordagens, já que há poucas referências a problemas solucionados através de ambos os métodos (Henson, Muller e Reuss, 2002); entretanto, há evidência de que um maior detalhamento do modelo metabólico usando o método de conjunto de células pode não levar a uma resposta mais adequada da população simulada (Hynne, Dano e Sorenson, 2001).

Ramkrishna (2003) sumarizou o potencial de aplicação de modelos cibernéticos a otimização e controle de processos biológicos, ressaltando que se trata de uma abordagem

propícia à descrição da regulação metabólica em face de mudanças no meio abiótico. Em comparação aos modelos BPM, os modelos cibernéticos são mais simples matematicamente, embora sejam capazes de descrever dinâmicas complexas (como múltiplos estados estacionários e histerese), e apresentam soluções numéricas com menor custo computacional.

Henson (2004) apresentou uma modelagem de oscilações espontâneas exibidas por *Saccharomyces cerevisiae* em culturas contínuas aeradas usando etanol como fonte de carbono, baseada em abordagem de conjunto de células (*cell ensemble*) utilizando modelo de célula desenvolvido previamente (Wolf *et al.*, 2001). Este modelo de célula inclui descrições para as rotas de (i) assimilação de sulfato, (ii) degradação de etanol, (iii) fosforilação oxidativa e ciclo do ácido cítrico mitocondriais e (iv) transporte e consumo de ATP no citossol e na mitocôndria. O modelo populacional para investigar a sincronização de oscilações mediadas por H_2S mostrou oscilações espontâneas, em acordo qualitativo com dados de literatura. Para convergir concentrações intracelulares médias foram necessárias 100 células, enquanto um conjunto de 10 000 células foi usado para simular condições transientes. Os resultados mostram a importância do acoplamento entre transporte pela membrana do mediador e sua taxa de remoção do meio abiótico, bem como das taxas de produção de metabólitos inibidores de retroalimentação metabólica (neste caso, a cisteína), na faixa de valores de parâmetros em que as oscilações são previstas.

Wu e Chang (2005) propuseram um controlador PI para processos fermentativos que apresentam oscilações espontâneas. Tal processo é simulado através de um BPM estruturado em idade, formulado como uma equação diferencial parcial para a densidade de células e duas equações diferenciais ordinárias para as concentrações de substrato e substrato efetivo. O modelo considera um organismo que se multiplica por fissão binária, com taxa de envelhecimento unitária. Os sistemas apresentados (malhas aberta e fechada) foram simulados através de uma combinação de métodos de linha e diferenças finitas. Manipulando a taxa de diluição, o controlador proposto mostrou bom desempenho ao estabilizar oscilações de densidade de células. A formulação apresentada neste trabalho

considera a ausência de medidores *on-line*, usando estimadores *off-line* e uma abordagem de estado pseudo-estacionário.

Hatzis e Porro (2006) propuseram um modelo morfologicamente estruturado para descrever distribuições de tamanhos de *Saccharomyces cerevisiae*, explicitando mecanismos de operação do ciclo celular, construído a partir do trabalho de Vanoni *et al.* (1983). O modelo de balanço populacional proposto consiste de um conjunto de 2(N + 1) equações de balanço populacional, escritas aos pares para as subpopulações não-gemulante e gemulante com idades genealógicas entre 0 (recém-nascidas) e N ciclos/cicatrizes. Para cada classe não-gemulante, uma equação íntegro-diferencial parcial de ordem 1; para cada classe gemulante, uma equação diferencial parcial de ordem 1. Não foi considerado o efeito do meio ambiente (concentração de substrato) sobre as propriedades da população. O modelo proposto permite a exploração analítica de alguns casos simples (os exemplos dos autores são o crescimento balanceado exponencial e a população não-segregada – usando a massa celular média de cada classe), o que é uma vantagem considerável em relação a outros modelos BPM.

3. MODELO DE DINÂMICA POPULACIONAL MICROBIANA ESTRUTURADO EM IDADE

O modelo de dinâmica populacional microbiana apresentado neste trabalho aborda a população de células como organismos heterogêneos, cujo estado interno pode ser caracterizado por sua posição instantânea no ciclo celular. Para descrever uma população cujas células são diferenciadas de acordo com o número de divisões efetuadas (ciclos celulares completados) e suas posições internas na progressão do ciclo celular, é definida uma variável contínua *a*, associada à *idade genealógica* das células, de forma que a parte inteira da variável *a* indica o número de ciclos celulares já completados por uma célula, e a parte decimal seja proporcional à sua posição no ciclo celular que está sendo executado.

Dadas as características do ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*, também é considerado que a sua operação (e, portanto, o estado interno das células) é influenciada por condições ambientais, as quais serão representadas através da concentração de substrato carbonáceo e por uma variável relacionada à oferta de oxigênio às células.

Desta forma, o modelo é formulado para uma população de células divididas em três classes:

(i) *células ativas*: as células ditas *ativas* são aquelas que estão aptas a executar imediatamente todas as operações internas relativas ao ciclo celular, caso as condições ambientais não sejam impeditivas (ou seja, de acordo com os critérios deste trabalho, caso o ambiente oferte às células fonte de carbono);

(ii) *células inativas*: as células ditas *inativas* são aquelas que não estão aptas a progredir *imediatamente* no ciclo celular em condições ambientais favoráveis. Estas células podem se encontrar neste estado por vários

motivos, sendo considerados como os principais para a formulação deste modelo: (i) acúmulo de lesões internas no aparato celular, ocorridas durante ciclos de crescimento e divisão anteriores ou ocasionadas por defeitos genéticos, e (ii) mudanças metabólicas internas, de forma a permitir que a célula possa subsistir em condições ambientais adversas prolongadas (depleção de fonte de carbono). Essas mudanças podem incluir alteração na expressão de vários genes, na ativação de enzimas e nos transportadores de substrato, impedindo a replicação do DNA; e

(iii) *células mortas*: células que acumularam lesões internas suficientes para impedir definitivamente a execução do ciclo celular e qualquer rota metabólica

A definição de células inativas utilizada neste trabalho é parcialmente compatível com a definição de "células quiescentes" usada por Gray *et al.* (1999), no que tange à influência da depleção de substrato sobre a inativação/quiescência das células. Em particular, neste trabalho será assumido que as células tornam-se inativas apenas na fase G_1, antes da ocorrência do START (início da gemulação), sob a influência das condições ambientais (concentração de substrato); sob este aspecto, a inativação que o modelo apresentado descreve é assemelhada à fase quiescente G_0 descrita na literatura (Figura 3.1). Será assumido também, por simplificação, que o consumo de substrato das células inativas é desprezível. Ambas estas características das células inativas aqui definidas concordam especificamente com as seguintes características de leveduras quiescentes em fase G_0 (Gray *et al.*, 1999):

(i) não proliferam (não executam mitose);
(ii) não aumentam massa e volume; e
(iii) permanecem na fase não-gemulante;

Ainda, estas características das células inativas podem implicar em outras características de células quiescentes verificadas experimentalmente, como a redução de taxas de transcrição e síntese de proteínas em relação às observadas durante crescimento balanceado (Gray *et al.*, 1999). Entretanto, como o fenômeno da quiescência celular é notavelmente complexo, não é pretensão da definição dotada concordar com todas as características observadas das leveduras quiescentes, mas pretende-se não discordar de nenhuma característica essencial registrada na literatura. Uma descrição mais próxima de todas essas características intrínsecas às células quiescentes seria possível apenas através de um modelo que computasse taxas metabólicas, o que não faz parte do escopo deste trabalho. Por fim, a adoção dos termos "ativas" e "inativas" sublinha a intenção de descrever as dinâmicas gerais apresentadas por células proliferantes e quiescentes, sem a pretensão de descrever de forma mecanística tais fenômenos. Outros detalhes referentes às características e mecanismos de inativação serão citados ao longo deste capítulo (nas seções referentes às funções de inativação e consumo de substrato), e na seção 5.2.

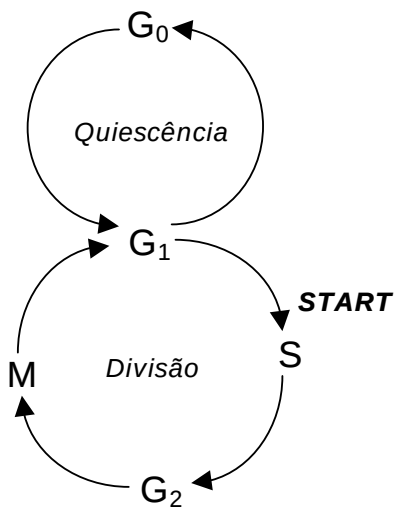

Figura 3.1 – Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*: relação entre divisão e quiescência

O modelo BPM estruturado em idade aqui apresentado descreve a dinâmica populacional destas 3 classes de células, computando taxas de divisão, transição entre classes e consumo de fonte de carbono através de quatro equações: uma equação íntegro-diferencial parcial (o balanço populacional de células ativas), duas equações diferenciais parciais (balanços populacionais de células inativas e mortas) e uma equação diferencial ordinárias (balanço de substrato carbonáceo), todas não-homogêneas e de ordem 1. O modelo apresentado considera ainda um valor constante para uma variável relacionada à oferta de oxigênio à população, cujo significado será esclarecido posteriormente, e será apresentado na sua formulação mais genérica, considerando a operação em um fermentador contínuo de agitação perfeita, ou *CSTF – Continuous Stirred-Tank Fermentor*.

3.1 - BALANÇO POPULACIONAL EM FERMENTADOR CONTÍNUO AGITADO

A Figura 3.2 mostra de forma esquemática o sistema modelado.

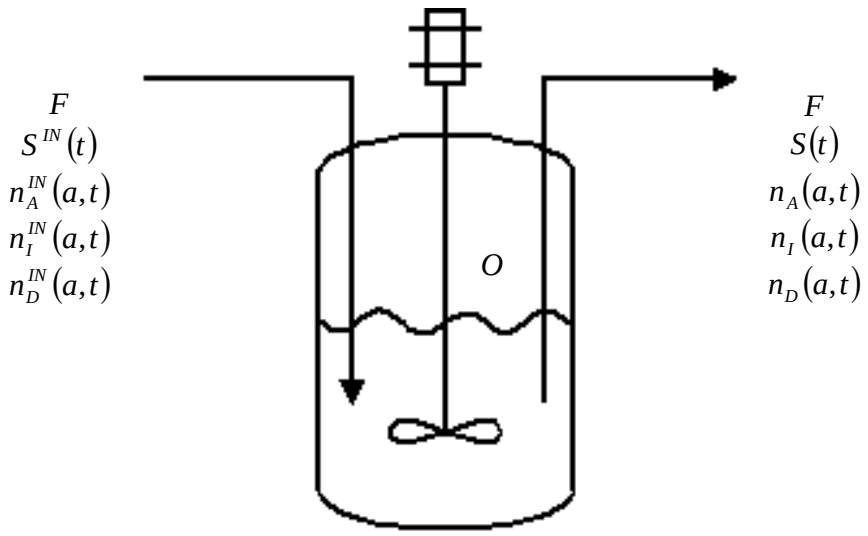

Figura 3.2 – Sistema em CSTF (agitação perfeita, pressurizado)

Consideram-se as seguintes variáveis e parâmetros do processo:

t	Tempo	(h)
a	Idade celular genealógica	-
$L(a)$	Duração "instantânea" do ciclo celular para indivíduo com idade a, tal que $L(a)^{-1}$ é a taxa de envelhecimento, expressa no contínuo a, por unidade de tempo real	(h)
O	Variável associada à oferta de oxigênio no CSTF	-
$S^{IN}(t)$	Concentração de substrato na corrente de alimentação	(g/L)
$S(t)$	Concentração de substrato no CSTF	(g/L)
$N_A(a,t)$	Função densidade de número de células ativas por unidade de volume no CSTF	(cél/L)
$N_A^{IN}(a,t)$	Função densidade de número de células ativas por unidade de volume na alimentação	(cél/L)
$N_I(a,t)$	Função densidade de número de células inativas por unidade de volume no CSTF	(cél/L)
$N_I^{IN}(a,t)$	Função densidade de número de células inativas por unidade de volume na alimentação	(cél/L)
$N_D(a,t)$	Função densidade de número de células mortas por unidade de volume no CSTF	(cél/L)
$N_D^{IN}(a,t)$	Função densidade de número de células mortas por unidade de volume na alimentação	(cél/L)
F	Vazão da alimentação	(L/h)
V	Volume do CSTF	(L)

O sistema está sujeito às condições iniciais:

$$S_0 = S(0)$$

$$N_{A,0}(a) = N_A(a,0)$$

$$N_{I,0}(a) = N_I(a,0)$$

$$N_{D,0}(a) = N_D(a,0)$$

Consideram-se ainda as funções abaixo que definem *de forma genérica* termos ou coeficientes nas equações do modelo:

$B(a,S,O)$ Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de divisão celular em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF

$D_A(a,S,O)$ Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de morte de uma célula ativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição ativa $\rightarrow$ morta)

$I(a,S,O)$ Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de inativação de uma célula ativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição ativa $\rightarrow$ inativa)

$A(a,S,O)$ Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de ativação de uma célula inativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição inativa $\rightarrow$ ativa)

$D_I(a,S,O)$ Densidade de probabilidade, no contínuo de tempo, de morte de uma célula inativa em função da idade, da concentração de substrato e da oferta de oxigênio no CSTF (transição inativa $\rightarrow$ morta)

$R_S^*(a,S,O)$ taxa média de consumo de substrato por célula ativa ($g \cdot cél^{-1} \cdot h^{-1}$) de idade a sob as condições ambientais S e O.

Por conveniência, as equações do modelo são adimensionadas e escaladas pela introdução da concentração total (cél/L) de microrganismos ativos na condição inicial do reator (N_0), da seguinte forma

$$N_0 = \int_0^\infty N_{A,0}(a)da \tag{3.1}$$

$$n_A(a,t) = \frac{N_A(a,t)}{N_0} \qquad n_{A,0}(a) = \frac{N_{A,0}(a)}{N_0} \qquad n_A^{IN}(a,t) = \frac{N_A^{IN}(a,t)}{N_0}$$

$$n_I(a,t) = \frac{N_I(a,t)}{N_0} \qquad n_{I,0}(a) = \frac{N_{I,0}(a)}{N_0} \qquad n_I^{IN}(a,t) = \frac{N_I^{IN}(a,t)}{N_0}$$

$$n_D(a,t) = \frac{N_D(a,t)}{N_0} \qquad n_{D,0}(a) = \frac{N_{D,0}(a)}{N_0} \qquad n_D^{IN}(a,t) = \frac{N_D^{IN}(a,t)}{N_0}$$

$$R_S(a,S,O) = N_0 R_S^*(a,S,O) \tag{3.2}$$

A formulação genérica do modelo BPM estruturado em idade está mostrado nas Equações 3.3 – 3.7. A função R_S será definida na seção 3.4.

$$\frac{\partial n_A(a,t)}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial a}\left[\frac{n_A(a,t)}{L(a)}\right] = \frac{F}{V}\left[n_A^{IN}(a,t) - n_A(a,t)\right] \tag{3.3}$$
$$- \left[D_A(a,S,O) + I(a,S,O)\right]n_A(a,t) + A(a,S,O)n_I(a,t) + \int_0^\infty B(a,S,O)n_A(a,t)da$$

$$\frac{\partial n_I(a,t)}{\partial t} = \frac{F}{V}\left[n_I^{IN}(a,t) - n_I(a,t)\right] - \left[D_I(a,S,O) + A(a,S,O)\right]n_I(a,t) + I(a,S,O)n_A(a,t) \tag{3.4}$$

$$\frac{\partial n_D(a,t)}{\partial t} = \frac{F}{V}\left[n_D^{IN}(a,t) - n_D(a,t)\right] + D_A(a,S,O)n_A(a,t) + D_I(a,S,O)n_I(a,t) \tag{3.5}$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = \frac{F}{V}\left[S^{IN}(t) - S(t)\right] - \int_0^\infty R_S(a,S,O)n_A(a,t)da \tag{3.6}$$

$$t = 0, \quad n_A(a,0) = n_{A,0}(a), \quad n_I(a,0) = n_{I,0}(a), \quad n_D(a,0) = n_{D,0}(a), \quad S(0) = S_0 \tag{3.7}$$

3.2 - RESOLUÇÃO NUMÉRICA DO MODELO

O modelo (Eqs. 3.3 – 3.7) foi resolvido no contínuo de idades usando-se o formalismo Galerkin (Fletcher, 1984). Através deste procedimento, é possível transformar a equação íntegro-diferencial parcial do modelo em um sistema de equações diferenciais ordinárias no tempo.

Com esta finalidade foi escolhida como base funcional de dimensão N, o conjunto $\{\phi_k(a)\}_N$ de funções pulso retangular mostradas na Equação 3.8 :

$$\phi_j(a) = \frac{1}{\sqrt{h}}\left[U(a-(j-1)h) - U(a-jh)\right] \tag{3.8}$$

onde $U(a)$ é a função degrau unitário e h é o comprimento característico da discretização do contínuo de idades que irá resultar sob as formas da Equação 3.8, de acordo com a Equação 3.9.

$$h = \frac{a_{MAX} - a_{MIN}}{N} \tag{3.9}$$

onde a_{MIN} normalmente é igual a zero e a_{MAX} é a idade máxima a ser abrangida pela simulação, sendo aqui adotados 10 ou 20 ciclos reprodutivos para este valor. Com respeito a isto, os dados de Lord e Wheals (1980) mostram que em média as células de *Saccharomyces cerevisiae* participam de 3 a 4 eventos reprodutivos, embora haja registros de indivíduos com mais de 37 eventos desta natureza. O valor adotado para N foi de 50 para (a_{MAX} = 10) ou 100 (para a_{MAX} = 20). Com estas definições, verifica-se que a base selecionada é ortonormal com respeito ao produto interno definido na Equação 3.10.

$$\int_0^\infty \phi_j(a)\phi_k(a)da = (\phi_j, \phi_k) \tag{3.10}$$

A aplicação do formalismo Galerkin demanda inicialmente a colocação de todas as funções do problema sob a forma de truncamentos de séries de Fourier a partir da base $\{\phi_k(a)\}_N$. Para funções dependentes do tempo e do índice *a*, os coeficientes de Fourier dependerão do tempo, como mostrado nas Equações 3.11 – 3.19.

$$n_A(a,t) = \sum_{j=1}^{N} c_{A\,j}(t)\phi_j(a) \tag{3.11}$$

$$n_{A,0}(a) = \sum_{j=1}^{N} c_{A\,j}(0)\phi_j(a) \tag{3.12}$$

$$n_A^{IN}(a,t) = \sum_{j=1}^{N} c_{A\;j}^{IN}(t)\phi_j(a) \tag{3.13}$$

$$n_I(a,t) = \sum_{j=1}^{N} c_{I\,j}(t)\phi_j(a) \tag{3.14}$$

$$n_{I,0}(a) = \sum_{j=1}^{N} c_{I\,j}(0)\phi_j(a) \tag{3.15}$$

$$n_I^{IN}(a,t) = \sum_{j=1}^{N} c_{I\;j}^{IN}(t)\phi_j(a) \tag{3.16}$$

$$n_D(a,t) = \sum_{j=1}^{N} c_{D\,j}(t)\phi_j(a) \tag{3.17}$$

$$n_{D,0}(a) = \sum_{j=1}^{N} c_{D\,j}(0)\phi_j(a) \tag{3.18}$$

$$n_D^{IN}(a,t) = \sum_{j=1}^{N} c_{D\;j}^{IN}(t)\phi_j(a) \tag{3.19}$$

Da mesma forma, outras funções como a taxa de envelhecimento (Eq. 3.20), as densidades de probabilidade de divisão (Eq. 3.21) e transições (Eqs. 3.22 – 3.25), escrevem-se na base em questão, conforme abaixo. Note-se a dependência, em cada caso, dos coeficientes de Fourier com as variáveis restantes (tais como *S*, *O*) que influenciam a

função original. As funções densidade de probabilidade de divisão e de transições serão definidas na próxima seção.

$$\frac{1}{L(a)} = \sum_{j=1}^{N} l_j \phi_j(a) \tag{3.20}$$

$$B(a,S,O) = \sum_{j=1}^{N} b_j(S,O)\phi_j(a) \tag{3.21}$$

$$D_A(a,S,O) = \sum_{j=1}^{N} d_{A\,j}(S,O)\phi_j(a) \tag{3.22}$$

$$I(a,S,O) = \sum_{j=1}^{N} i_j(S,O)\phi_j(a) \tag{3.23}$$

$$D_I(a,S,O) = \sum_{j=1}^{N} d_{I\,j}(S,O)\phi_j(a) \tag{3.24}$$

$$A(a,S,O) = \sum_{j=1}^{N} a_j(S,O)\phi_j(a) \tag{3.25}$$

Os coeficientes de Fourier das funções densidade de populações iniciais (Eqs. 3.12, 3.15 e 3.18) e de entrada (Eqs. 3.13, 3.16 e 3.19), são obtidos a partir das respectivas formas funcionais (apresentadas na seção seguinte) via tratamento para construção de séries de Fourier conforme mostrado nas Equações 3.26 – 3.31.

$$c_{A\,j}(0) = \int_0^{\infty} \phi_j(a) n_{A,0}(a)da = \frac{1}{\sqrt{h}} \int_{(j-1)h}^{jh} n_{A,0}(a)da \tag{3.26}$$

$$c_{I\,j}(0) = \int_0^{\infty} \phi_j(a) n_{I,0}(a)da = \frac{1}{\sqrt{h}} \int_{(j-1)h}^{jh} n_{I,0}(a)da \tag{3.27}$$

$$c_{D\,j}(0) = \int_0^{\infty} \phi_j(a) n_{D,0}(a)da = \frac{1}{\sqrt{h}} \int_{(j-1)h}^{jh} n_{D,0}(a)da \tag{3.28}$$

$$c_{A\;j}^{IN}(t) = \int_0^{\infty} \phi_j(a) n_A^{IN}(a,t)da = \frac{1}{\sqrt{h}} \int_{(j-1)h}^{jh} n_A^{IN}(a,t)da \tag{3.29}$$

$$c_{I\ j}^{IN}(t)=\int_0^\infty \phi_j(a)n_I^{IN}(a,t)da=\frac{1}{\sqrt{h}}\int_{(j-1)h}^{jh} n_I^{IN}(a,t)da \tag{3.30}$$

$$c_{D\ j}^{IN}(t)=\int_0^\infty \phi_j(a)n_D^{IN}(a,t)da=\frac{1}{\sqrt{h}}\int_{(j-1)h}^{jh} n_D^{IN}(a,t)da \tag{3.31}$$

No procedimento Galerkin, as relações (Eqs. 3.11 – 3.25) são substituídas nas Equações 3.3 – 3.5, gerando resíduos dependentes do tempo (*t*) e da idade (*a*). Em seguida, impõe-se que os produtos internos de tais resíduos com as funções-base (Eq. 3.8) sejam nulos. Finalmente, obtém-se o sistema de equações diferenciais ordinárias no tempo (Eqs. 3.32 – 3.36), a ser resolvido para os coeficientes de Fourier das funções densidade populacionais de células ativas, inativas e mortas e para a concentração de substrato no reator.

$$\frac{dS(t)}{dt}=\frac{F}{V}\left[S^{IN}(t)-S(t)\right]-\sum_{j=1}^{N} n_{A\,j}(t)\int_0^\infty R_S(a,S,O)\phi_j(a)da \tag{3.32}$$

$$\frac{dn_{D\,j}(t)}{dt}=\frac{F}{V}\left[n_{D\ j}^{IN}(t)-n_{D\,j}(t)\right]+\frac{d_{A\,j}(S,O)n_{A\,j}(t)+d_{I\,j}(S,O)n_{I\,j}(t)}{\sqrt{h}} \tag{3.33}$$

$$\frac{dn_{I\,j}(t)}{dt}=\frac{F}{V}\left[n_{I\ j}^{IN}(t)-n_{I\,j}(t)\right]+\frac{i_j(S,O)n_{A\,j}(t)-\left[d_{I\,j}(S,O)+a_j(S,O)\right]n_{I\,j}(t)}{\sqrt{h}} \tag{3.34}$$

$$\frac{dn_{A1}(t)}{dt}=\frac{F}{V}\left[n_{A_1\ 1}^{IN}(t)-n_{A1}(t)\right]-\left[\frac{l_1}{h^{3/2}}+\frac{d_{A1}(S,O)+i_1(S,O)}{\sqrt{h}}\right]n_{A1}(t)$$
$$+\frac{a_1(S,O)n_{I1}(t)}{\sqrt{h}}+\frac{1}{\sqrt{h}}\sum_{j=1}^{N} b_j(S,O)n_{A\,j}(t) \tag{3.35}$$

$$\frac{dn_{A\,j}(t)}{dt}=\frac{F}{V}\left[n_{A\ j}^{IN}(t)-n_{A\,j}(t)\right]-\left[\frac{2l_j}{h^{3/2}}+\frac{d_{A\,j}(S,O)+i_j(S,O)}{\sqrt{h}}\right]n_{A\,j}(t)$$
$$+\frac{a_j(S,O)n_{I\,j}(t)}{\sqrt{h}}+\left[\frac{l_{j-1}}{h^{3/2}}\right]n_{A\,j}(t)+\left[\frac{l_j}{h^{3/2}}\right]n_{A\,j-1}(t) \tag{3.36}$$
$$(j>1)$$

3.3 - FUNÇÕES DE DIVISÃO E TRANSIÇÕES

As funções densidade de probabilidade (temporais) propostas para os termos de divisão, ativação e inativação foram construídas com base na função sigmoidal logística (Eq. 3.37). Como exceção, as funções densidade de probabilidade (temporais) propostas para os termos de morte de células ativas e inativas são exponenciais. Cada uma delas será discutida em detalhes nos sub-itens a seguir.

$$f(\zeta) = \frac{1}{1 + e^{-\lambda(\zeta - \gamma)}} \tag{3.37}$$

O *Apêndice I* ilustra propriedades da função sigmoidal, e também mostra superfícies criadas por combinação (multiplicação) de duas funções sigmoidais e por combinação de uma função sigmoidal e termos exponenciais presentes nas funções de probabilidade de divisão e inativação celulares, representando o comportamento de cada uma das funções formuladas e evitando a reprodução de várias figuras muito parecidas nas Seções 3.3.1 a 3.3.5.

3.3.1 – FUNÇÃO DE DIVISÃO

A divisão celular ocorre apenas em condições ambientais favoráveis, suficientes para o crescimento da célula-mãe até o tamanho crítico para a ocorrência do START e a replicação do material genético. Considera-se que tanto a concentração da fonte de carbono e a oferta de oxigênio são fatores ambientais relevantes para esse processo, devendo influenciar a taxa de divisão. Adicionalmente, evidência experimental mostra que as células perdem sua capacidade de executar o ciclo celular com sucesso progressivamente com as divisões efetuadas (Lord e Wheals, 1980). Assim, a forma genérica proposta para a probabilidade de ocorrência de divisão celular em $(t, t + \Delta t)$ é mostrada na Equação 3.38.

$$B(a,S,O)\Delta t = \rho^B p_O^B p_S^B p_a^B \Delta t \tag{3.38}$$

onde

p_O^B	Densidade de probabilidade de ausência de evento impeditivo relacionado à oferta de oxigênio
p_S^B	Densidade de probabilidade de ausência de evento impeditivo relacionado à oferta de substrato
p_a^B	Densidade de probabilidade de ausência de evento impeditivo relacionado à idade genealógica
$\rho^B \Delta t$	Probabilidade de ocorrência de iniciador reprodutivo na janela (t, $t + \Delta t$)

A Equação (3.38) reflete o modelo de densidade de probabilidade de divisão a partir da conjunção de eventos independentes, tanto ambientais (relacionados ao substrato S e à oferta de oxigênio representada por O) quanto por fatores metabólicos e genéticos (relacionados à idade genealógica a). Também é levado em consideração um fator independente relacionado à incidência aleatória de um iniciador do processo reprodutivo. Nota-se que este termo de “iniciação” ou “deflagração” de divisão é constante e proporcional à largura da janela de espera de sua ocorrência.

Propõe-se que concentrações muito pequenas de substrato dificultem a divisão celular, com a probabilidade de sucesso da mitose aumentando com essa concentração; após um determinado valor, qualquer acréscimo na concentração de substrato não mostra influência sobre a probabilidade de divisão, que é máxima. Assim, a forma proposta para o termo de divisão celular em função da concentração de substrato está mostrada na Equação 3.39.

$$p_S^B = \frac{1}{1+e^{-\lambda_S^B\left(O-\gamma_S^B\right)}} \tag{3.39}$$

Propõe-se que uma baixa oferta de oxigênio tenha pouco impacto sobre a probabilidade de divisão celular, com aumento dessa probabilidade proporcional ao aumento da oferta, até valores moderados. A total ausência de oxigênio (condição anóxica) não deve ser impeditiva para o sucesso da mitose. Adicionalmente, propõe-se que uma oferta exagerada de oxigênio ocasione um ambiente fortemente oxidativo, com influência negativa sobre a capacidade de divisão. A Equação 3.40 mostra um termo para a divisão dependente da variável *O* com essas características.

$$p_O^B = \frac{1}{1+e^{-\lambda_{O,1}^B\left(O-\gamma_{O,1}^B\right)}} - \frac{1}{1+e^{-\lambda_{O,2}^B\left(O-\gamma_{O,2}^B\right)}} \tag{3.40}$$

$$\gamma_{O,2}^B > \gamma_{O,1}^B \qquad \lambda_{O,1}^B > \lambda_{O,2}^B$$

Por fim, considera-se que a probabilidade de divisão celular decresce progressivamente com a idade genealógica. Entretanto, devido à natureza da variável contínua *a* (ligada ao número de ciclos celulares executados / cicatrizes na superfície das células-mães), é necessário utilizar uma forma especial para a probabilidade de divisão em função de *a*, para expressar a ocorrência de divisão em valores inteiros de *a* (ou, no mínimo, próximos aos valores inteiros). A Equação 3.41 mostra uma função que satisfaz a essas condições.

$$p_a^B = \left(1-\frac{1}{1+e^{-\lambda_a^B\left(O-\gamma_a^B\right)}}\right)e^{-\left(\frac{Pc}{DP}\right)^2\frac{(z-1)^2}{2}} \tag{3.41}$$

$$z = \frac{a}{\mathrm{P}_C} - trunc\left(\frac{a}{\mathrm{P}_C}\right)$$

A Equação 3.14 não está definida apenas em função da sigmoidal, apresentando um fator exponencial que recebe dois parâmetros: um período (P_C em ciclos celulares, habitualmente igual a 1) e um desvio-padrão (*DP*, próximo de 0,1). Além disso, este fator exponencial é função não da idade *a*, mas do resto da divisão da idade por P_C (*trunc* é a função de truncamento, retornando a parte inteira de seu argumento). Este fator (uma função com imagem em [0,1]) estabelece a impossibilidade de uma célula se dividir imediatamente após uma divisão anterior, criando artificialmente um período de espera entre uma divisão e outra, e, desta forma, sincronizando ou alinhando os eventos reprodutivos com os momentos finais do ciclo celular. Quanto menor o valor de *DP*, mais aguda é a concentração forçada de evento reprodutivo ao final do ciclo celular.

O comportamento da função $B(a,S,O)$ pode ser visualizado através das superfícies típicas mostradas no *Apêndice I* (com especial destaque para a Figura AI.12).

3.3.2 – Função de Morte de Células Ativas

A morte de células ativas ocorre por fatores associados ao estado interno das células ou devido a condições ambientais desfavoráveis à manutenção do metabolismo e das estruturas básicas. A forma proposta para a probabilidade de ocorrência de morte de células ativas em $(t, t + \Delta t)$ é mostrada na Equação 3.42.

$$D_A(a,S,O)\Delta t = \alpha^{D_A}\Delta t + \rho_O^{D_A} p_O^{D_A}\Delta t + \rho_S^{D_A} p_S^{D_A}\Delta t + \rho_a^{D_A} p_a^{D_A}\Delta t \qquad (3.42)$$

onde

$p_O^{D_A}$ Densidade de probabilidade de ocorrência de evento com potencial letal devido à oferta de oxigênio

$\rho_O^{D_A}\Delta t$ Probabilidade de incidência de evento com potencial letal em $(t, t + \Delta t)$ sob influência de fatores ambientais (O)

$p_S^{D_A}$ Densidade de probabilidade de ocorrência de evento com potencial letal devido

à concentração de substrato

$\rho_S^{D_A}\Delta t$ Probabilidade de incidência de evento com potencial letal em (t, $t + \Delta t$) sob influência de fatores ambientais (S)

$p_a^{D_A}$ Densidade de probabilidade de ocorrência de evento com potencial letal devido ao estado interno da célula

$\rho_a^{D_A}\Delta t$ Probabilidade de incidência de evento com potencial letal em (t, $t + \Delta t$) sob influência do estado interno da célula

$\alpha^{D_A}\Delta t$ Probabilidade de incidência de evento letal em (t, $t + \Delta t$) não potencializado por condições ambientais ou etárias

É formulada a hipótese de eventos letais em (t, $t + \Delta t$) pertencerem a duas *classes distintas*: (i) aqueles não potencializados ou atenuados por condições ambientais ou etárias (incidência aleatória) e (ii) aqueles que podem ser enfraquecidos ou reforçados por estas condições. É admitida a independência nos mecanismos de atenuação/agravamento de um evento letal da 2ª classe citada, com relação às influências de idade e oferta de oxigênio. Estes eventos serão realmente letais apenas se o viés imposto pelas condições etárias ou ambientais permitir, de forma independente. Para simplificar a formulação do modelo, será considerado que todos os iniciadores de evento letal são idênticos,

$$\rho_O^{D_A} \equiv \rho_S^{D_A} \equiv \rho_a^{D_A} = \rho^{D_A} \tag{3.43}$$

resultando na formulação final da probabilidade de morte de células ativas, mostrada na Equação 3.44.

$$D_A(a,S,O)\Delta t = \alpha^{D_A}\Delta t + \rho^{D_A}\left(p_O^{D_A} + p_S^{D_A} + p_a^{D_A}\right)\Delta t \tag{3.44}$$

Os termos dependentes da oferta de oxigênio e da concentração de substrato são baseados na função sigmoidal, de forma que a probabilidade de morte aumenta com o enriquecimento do meio em oxigênio até um valor que ocasiona a saturação desse termo, e

com o empobrecimento do meio em substrato abaixo de um certo valor, como mostrado nas Equações 3.45 e 3.46.

$$p_O^{D_A} = \frac{1}{1+e^{-\lambda_O^{D_A}\left(O-\gamma_O^{D_A}\right)}} \tag{3.45}$$

$$p_S^{D_A} = 1-\frac{1}{1+e^{-\lambda_S^{D_A}\left(S-\gamma_S^{D_A}\right)}} \tag{3.46}$$

O termo dependente da idade, excepcionalmente, é baseado na função exponencial (Eq. 3.47). A subtração de 1 desloca a imagem da função, tornando nula a probabilidade imediata de morte de células recém-nascidas.

$$p_a^{D_A} = e^{\lambda_a^{D_A} a} - 1 \tag{3.47}$$

3.3.3 – Função de Inativação de Células Ativas

Na formulação do modelo, considera-se a inativação de células ativas como um mecanismo de autopreservação das células, face à depleção prolongada de fonte de carbono no meio e a uma avançada idade genealógica, condições nas quais o progresso do ciclo celular pode ser encerrado sem sucesso, resultando em morte (perda definitiva de viabilidade celular). Não será considerada qualquer influência da oferta de oxigênio sobre a inativação. Adicionalmente, será considerado que a inativação de uma célula ocorre durante o início da fase G_1, uma vez que, após iniciada a fase S, as células de *Saccharomyces cerevisiae* não interrompem a progressão do ciclo celular (Nasmyth, 1996). Assim, a forma para a probabilidade de inativação de uma célula ativa em $(t, t + \Delta t)$ é mostrada na Equação 3.48.

$$I(a,S,O)\Delta t \equiv I(a,S) = \alpha^I \Delta t + \rho_S^I p_S^I \Delta t + \rho_a^I p_a^I \Delta t \tag{3.48}$$

onde

p_S^I	Densidade de probabilidade de inativação celular relacionada a fatores ambientais (S)
$\rho_S^I \Delta t$	Probabilidade de incidência de evento inativador em (t, $t + \Delta t$) sob influência de fatores ambientais (S)
p_a^I	Densidade de probabilidade de inativação celular relacionada ao estado interno da célula
$\rho_a^I \Delta t$	Probabilidade de incidência de evento inativador em (t, $t + \Delta t$) sob influência do estado interno da célula
$\alpha^I \Delta t$	Probabilidade de incidência de evento inativador em (t, $t + \Delta t$) não potencializado por condições ambientais ou etárias

É formulada, também neste caso, a hipótese de eventos inativadores em (t, $t + \Delta t$) pertencerem a duas *classes distintas*: (i) aqueles não potencializados ou atenuados por condições ambientais ou etárias (incidência aleatória) e (ii) aqueles que podem ser enfraquecidos ou reforçados por estas condições. É admitida a independência nos mecanismos de atenuação/agravamento de um evento inativador da 2ª classe citada, com relação às influências de idade e concentração de substrato, de forma independente. Para simplificar a formulação do modelo, será considerado que ambos os iniciadores de evento inativador são idênticos

$$\rho_S^I \equiv \rho_a^I = \rho^I \tag{3.49}$$

resultando na formulação final da probabilidade de inativação, mostrada na Equação 3.50.

$$I(a,S)\Delta t = \alpha^I \Delta t + \rho^I \left(p_S^I + p_a^I\right)\Delta t \tag{3.50}$$

Ambos os termos de inativação (dependentes do substrato e da idade) são baseados na função sigmoidal, apenas com tendências diferentes: enquanto a probabilidade de inativação aumenta com a idade, diminui com o aumento da concentração de substrato. Entretanto, o termo dependente da idade possui um fator exponencial similar ao usado na Equação 3.41, cuja função é concentrar a probabilidade de inativação no início do ciclo celular. Esse termo exponencial (uma função com imagem em [0,1]) recebe dois parâmetros: um período P_C em ciclos celulares (P_C = 1) e um desvio-padrão DP (DP = 0,1), e é função não da idade a, mas do resto da divisão da idade por P_C (*trunc* é a função de truncamento, retornando a parte inteira de seu argumento). Estes termos são mostrados nas Equações 3.51 e 3.52.

$$p_S^I = 1 - \frac{1}{1 + e^{-\lambda_S^I \left(S - \gamma_S^I\right)}} \tag{3.51}$$

$$p_a^I = \frac{1}{1 + e^{-\lambda_a^I \left(a - \gamma_a^I\right)}} e^{-\left(\frac{Pc}{DP}\right)^2 \frac{z^2}{2}} \tag{3.52}$$

$$z = \frac{a}{Pc} - trunc\left(\frac{a}{Pc}\right)$$

O comportamento da função $I(a,S)$ pode ser visualizado através das superfícies típicas mostradas no *Apêndice I* (com especial destaque para a Figura AI.13).

3.3.4 – FUNÇÃO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS INATIVAS

Seguindo a lógica que guiou a formulação da função de probabilidade de inativação celular, a probabilidade de ativação de uma célula inativa aumenta com a concentração de substrato e é maior para as células que executaram poucos ciclos de divisão. Também aqui é considerado que a oferta de oxigênio não afeta a ativação das células. Assim, a forma para

a probabilidade de ativação de uma célula inativa em (t, $t + \Delta t$) é mostrada na Equação 3.53.

$$A(a,S,O)\Delta t \equiv A(a,S)\Delta t = \alpha^{A}\Delta t + \rho_S^A p_S^A \Delta t + \rho_a^A p_a^A \Delta t \tag{3.53}$$

onde

p_S^A	Densidade de probabilidade de ativação celular relacionada a fatores ambientais (S)
$\rho_S^A \Delta t$	Probabilidade de incidência de evento ativador em (t, $t + \Delta t$) sob influência de fatores ambientais (S)
p_a^A	Densidade de probabilidade de ativação celular relacionada ao estado interno da célula
$\rho_a^A \Delta t$	Probabilidade de incidência de evento ativador em (t, $t + \Delta t$) sob influência do estado interno da célula
$\alpha^{A}\Delta t$	Probabilidade de incidência de evento ativador em (t, $t + \Delta t$) não potencializado por condições ambientais ou etárias

É formulada também neste caso a hipótese de eventos ativadores de células inativas em (t, $t + \Delta t$) pertencerem a duas *classes distintas*: (i) aqueles não potencializados ou atenuados por condições ambientais ou etárias (incidência aleatória) e (ii) aqueles que podem ser enfraquecidos ou reforçados por estas condições. É admitida a independência nos mecanismos de atenuação/agravamento de um evento ativador da 2ª classe citada, com relação às influências de idade e concentração de substrato, de forma independente. Também neste caso, para simplificar a formulação do modelo, será considerado que ambos os iniciadores de evento ativador são idênticos

$$\rho_S^A \equiv \rho_a^A = \rho^A \tag{3.54}$$

resultando na formulação final da probabilidade de ativação, mostrada na Equação 3.55.

$$A(a,S)\Delta t = \alpha^{A}\Delta t + \rho^{A}\left(p_S^A + p_a^A\right)\Delta t \tag{3.55}$$

Ambos os termos de inativação (dependentes do substrato e da idade) são baseados na sigmoidal, e são mostrados nas Equações 3.56 e 3.57.

$$p_S^A = \frac{1}{1+e^{-\lambda_S^A\left(S-\gamma_S^A\right)}} \tag{3.56}$$

$$p_a^A = 1-\frac{1}{1+e^{-\lambda_a^A\left(a-\gamma_a^A\right)}} \tag{3.57}$$

3.3.5 – Função de Morte de Células Inativas

Será considerado na formulação deste modelo que as células inativas perdem em definitivo sua viabilidade por mecanismos independentes de fatores ambientais. Assim, a probabilidade de ocorrência de morte de células inativas em (t, $t + \Delta t$) depende apenas do estado interno das células e é mostrada na Equação 3.58.

$$D_I(a,S,O)\Delta t \equiv D_I(a)\Delta t = \alpha^{D_I} + \rho^{D_I} p_a^{D_I} \tag{3.58}$$

onde

$p_a^{D_I}$	Densidade de probabilidade de ocorrência de evento com potencial letal devido ao estado interno da célula
$\rho^{D_I}\Delta t$	Probabilidade de incidência de evento com potencial letal em (t, $t + \Delta t$) sob influência do estado interno da célula
$\alpha^{D_I}\Delta t$	Probabilidade de incidência de evento letal em (t, $t + \Delta t$) não potencializado por condições ambientais ou etárias

É formulada a hipótese de eventos letais em (t, $t + \Delta t$) pertencerem a duas *classes distintas*: (i) aqueles não potencializados ou atenuados por condições etárias (incidência aleatória, como, por exemplo, "defeitos" genéticos) e (ii) aqueles que podem ser enfraquecidos ou reforçados por estas condições.

O termo dependente da idade, como no caso da probabilidade de morte de células ativas, é baseado na função exponencial (Eq. 3.59). A subtração de 1 desloca a imagem da função, tornando nula a probabilidade imediata de morte de células recém-nascidas.

$$p_a^{D_I} = e^{\lambda_a^{D_I} a} - 1 \tag{3.59}$$

3.3.6 – Coeficientes de Fourier das Funções de Divisão e Transições

Todas as constantes de iniciação (ρ's), residuais (α's), de deslocamento (γ's) e de aceleração (λ's) das funções apresentadas nas seções 3.3.1 a 3.3.5 podem ser ajustadas via sintonia das respostas macroscópicas preditas pelo modelo final com comportamentos conhecidos ou obtidos experimentalmente. Este procedimento pode ser guiado estatisticamente ou empiricamente via minimização de soma ponderada de quadrados de desvios com respeito a dados experimentais sobre dinâmica populacional microbiana.

A geração dos coeficientes de Fourier de $B(a,S,O)$, $D_A(a,S,O)$, $I(a,S,O)$, $A(a,S,O)$ e $D_I(a,S,O)$ se dá de acordo com as Equações 3.60 – 3.64.

$$b_j(S,O) = \int_0^\infty B(a,S,O)\phi_j(a)da \tag{3.60}$$

$$d_{Aj}(S,O) = \int_0^\infty D_A(a,S,O)\phi_j(a)da \tag{3.61}$$

$$i_j(S,O) = \int_0^\infty I(a,S,O)\phi_j(a)da \tag{3.62}$$

$$a_j(S,O) = \int_0^\infty A(a,S,O)\phi_j(a)da \tag{3.63}$$

$$d_{I\,j}(S,O) = \int_0^\infty D_I(a,S,O)\phi_j(a)da \tag{3.64}$$

Assim, usando-se integração trapezoidal (admitida, apesar da baixa precisão, porque os parâmetros ainda estão indefinidos), chega-se às expressões mostradas nas Equações 3.65 – 3.69.

$$b_j(S,O) = \rho^B p_o^B p_S^B \frac{\sqrt{h}}{2}\left[p_a^B\Big|_{(j-1)h} + p_a^B\Big|_{jh}\right] \tag{3.65}$$

$$d_{Aj}(O) = \left(\alpha^{D_A} + \rho^{D_A} p_O^{D_A}\right)\sqrt{h} + \rho^{D_A}\frac{\sqrt{h}}{2}\left[p_a^{D_A}\Big|_{(j-1)h} + p_a^{D_A}\Big|_{jh}\right] \tag{3.66}$$

$$i_j(S) = \left(\alpha^I + \rho^I p_S^I\right)\sqrt{h} + \rho^I\frac{\sqrt{h}}{2}\left[p_a^I\Big|_{(i-1)h} + p_a^I\Big|_{ih}\right] \tag{3.67}$$

$$a_j(S) = \left(\alpha^A + \rho^A p_S^A\right)\sqrt{h} + \rho^A\frac{\sqrt{h}}{2}\left[p_a^A\Big|_{(j-1)h} + p_a^A\Big|_{jh}\right] \tag{3.68}$$

$$d_{I_j} = \left(\alpha^{D_I} + \rho^{D_I}\right)\sqrt{h} + \rho^{D_I}\frac{\sqrt{h}}{2}\left[p_a^{D_I}\Big|_{(j-1)h} + p_a^{D_I}\Big|_{jh}\right] \tag{3.69}$$

3.4 - FUNÇÃO DE CONSUMO DE SUBSTRATO

As funções relativas às taxas R_S^* e R_S são formuladas empiricamente neste trabalho a partir de expressões análogas clássicas (encontradas em modelos tipo Monod), sendo admitida independência da idade celular. Esta proposição resultou da ausência de informação sobre consumo de substrato em contexto segregado.

Em relação à oferta de oxigênio, são feitas as considerações:

(i) a taxa específica de consumo de substrato é maior nas culturas aeradas que nas culturas anóxicas; e

(ii) um ambiente fortemente oxidante, ao provocar alterações metabólicas nas células, diminui a taxa específica de consumo de substrato

Assim, adotou-se para a taxa de consumo de substrato a forma mostrada nas Equações 3.70 e 3.71.

$$R_S(a,S,O) = N_0 R_S^*(a,S,O) \equiv N_0 R_S^*(S,O) \tag{3.70}$$

$$R^* = \left[f_{O,1}^S \mu_{AEROBIC} + \left(1 - f_{O,1}^S\right) \mu_{ANAEROBIC} \right] \left(1 - f_{O,2}^S\right) \frac{S}{K_S + S} \tag{3.71}$$

O termo $f_{O,1}^S$ é responsável por mudar a taxa específica de consumo de substrato entre o valor inferior (cultura anóxica) e o valor superior (cultura aerada), de acordo com a oferta de oxigênio, e está mostrado na Equação 3.72.

$$f_{O,1}^S = \frac{1}{1 + e^{-\lambda_O^{S,1}\left(O - \gamma_O^{S,1}\right)}} \tag{3.72}$$

O termo $f_{O,2}^S$ diminui a taxa específica de consumo de substrato em culturas aeradas, quando a oferta de oxigênio é excessiva, causando um efeito deletério sobre as células, e está mostrado na Equação 3.73

$$f_{O,2}^S = \frac{1}{1 + e^{-\lambda_O^{S,21}\left(O - \gamma_O^{S,2}\right)}} \tag{3.73}$$

3.5 - FUNÇÕES DENSIDADE PARA POPULAÇÕES INICIAIS

A função densidade adimensional inicial de células ativas usada neste trabalho (Figura 3.3) foi escolhida de forma a concordar qualitativamente com os dados experimentais de Lord e Wheals (1980) a respeito de *Saccharomyces cerevisiae*. A função correspondente para células inativas foi assumida como igual em forma à de vivas, com 10% de seu valor. Usualmente, a condição inicial usada ao longo deste trabalho é a ausência de células mortas.

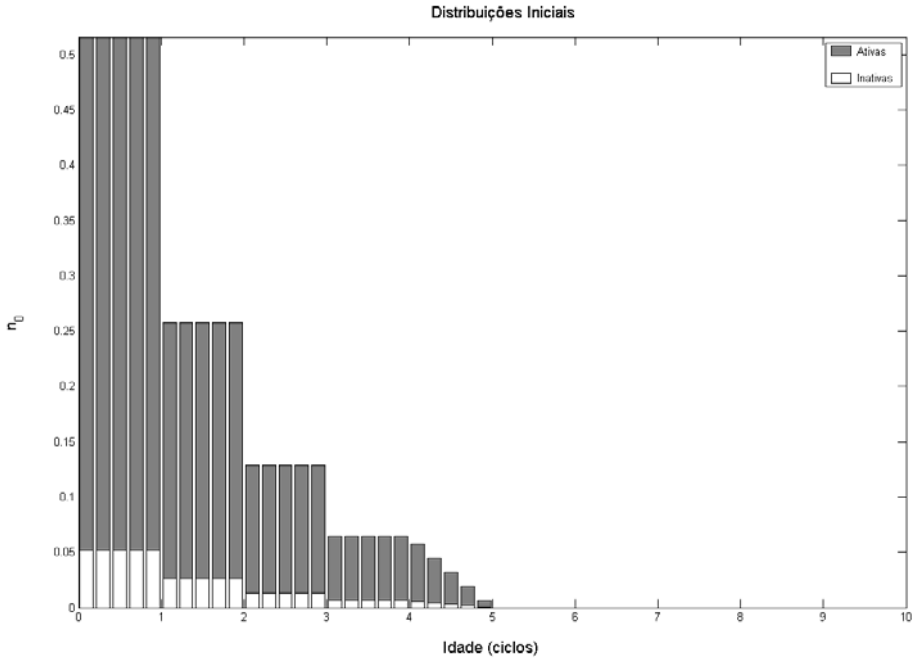

Figura 3.3 – Funções densidade inicial de células

3.6 - FUNÇÕES DE CICLO CELULAR – DISTRIBUIÇÕES DE MASSA E DURAÇÃO

A formulação do modelo torna necessária a definição de duas funções relacionadas à operação do ciclo celular:

(i) a função de duração do ciclo celular $L(a)$; e

(ii) a distribuição de massa celular $M(a)$

A função $L(a)$ é intrinsecamente necessária ao modelo, pois faz parte do seu equacionamento (Eq. 3.3). Já a função distribuição de massa celular *M(a)* (que relaciona a massa de um indivíduo com sua idade a), embora não influencie nenhuma das taxas presentes no modelo (isto é, tais termos dependem apenas de a, S e O), é necessária para gerar respostas associadas com a distribuição de massa da população, bem como com valores globais como a massa total de células vivas e mortas, etc.

A função distribuição de massa celular também foi usada para o cálculo das frações de células em gemulação e fora de gemulação. A identificação visual do estado de gemulação é praticamente definida pelo nível de massa celular (normalmente quando a massa ou volume do indivíduo ultrapassa um determinado nível – por exemplo, 120% ou 125% da massa de referência de indivíduo adulto).

Neste trabalho foram realizadas simulações com duas implementações diferentes para as funções $L(a)$ e $M(a)$:

(i) a implementação A usou dados obtidos a partir do trabalho de Chen *et al.* (2000), que simularam o ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* usando um modelo que computa a dinâmica de diversas enzimas-chave dos processos envolvidos; e

(ii) a implementação B usou dados obtidos a partir do trabalho de Alberghina *et al.* (1983), que analisaram a distribuição de proteínas em células de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes idades e permitiu o estabelecimento de uma relação entre as massas críticas para gemulação e divisão e a idade genealógica utilizada como referência em outros trabalhos (Cazzador e Mariani, 1988; Hatzis e Porro, 2006)

Em *ambas as implementações*, os coeficientes de Fourier l_j da função taxa de envelhecimento $L^{-1}(a)$, são, como nos casos precedentes, obtidos utilizando integração trapezoidal (Eq. 3.74)

$$l_j = \frac{\sqrt{h}}{2}\left[\frac{1}{L(jh)} + \frac{1}{L((j-1)h)}\right] \tag{3.74}$$

É *muito importante* ressaltar que, embora ambas as funções de massa e duração usadas neste trabalho dependam exclusivamente da idade genealógica *a*, sabe-se que as condições ambientais, *especialmente a concentração de fonte de carbono*, influenciam ambas. É esperado que, em ambientes ricos em substrato carbonáceo, as células apresentem maior massa, talvez acompanhada de um ciclo celular de menor duração. Entretanto, não há dados disponíveis a respeito da variação dessas grandezas com a concentração de substrato. Sobressai na literatura o trabalho de Alberghina *et al.* (1998) que mostra a resposta das massas críticas para ocorrência de gemulação e mitose e da duração do ciclo celular a uma mudança nutricional no ambiente, de uma cultura em etanol (meio nutricionalmente mais pobre) para cultura em glicose (meio nutricionalmente mais rico). Entretanto, essa mudança envolve uma grande reconfiguração do aparato enzimático interno, associada às mudanças de rotas metabólicas executadas em cada ambiente (bem como de transporte de substrato). É incerto que as respostas observadas possam, de alguma forma, ser extrapoladas para variações na concentração de glicose. Desta forma, não foi incorporada ao modelo a influência da concentração de substrato sobre as funções de massa e duração. Porém, *para evitar que o modelo gere respostas incongruentes para condições de depleção de substrato, será utilizada nas simulações uma função de S para alterar a duração do ciclo celular nestas condições, que será abordada no Capítulo 5, na seção 5.2.*

Adicionalmente, não será considerada neste trabalho a influência da oferta excessiva de oxigênio sobre estas funções de ciclo celular.

As sub-seções seguintes descreverão as implementações de $M(a)$ e $L(a)$ utilizadas neste trabalho.

3.6.1 – DISTRIBUIÇÕES DE MASSA E DURAÇÃO: IMPLEMENTAÇÃO A

Nesta implementação, as funções $L_A(a)$ e $M_A(a)$ e seus parâmetros foram obtidos a partir do trabalho de Chen e colaboradores (2000). A distribuição de duração de ciclos celulares para *Saccharomyces cerevisiae* segue padrão médio observado experimentalmente e mostrado na Equação 3.75 e na Figura 3.4. A função $M_A(a)$ é apresentada na Equação 3.76.

$$L_A(a) = 146 \text{ min}, \quad 0 < a \leq 1 \qquad (3.75)$$
$$L_A(a) = 100 \text{ min}, \quad \text{a} > 1$$

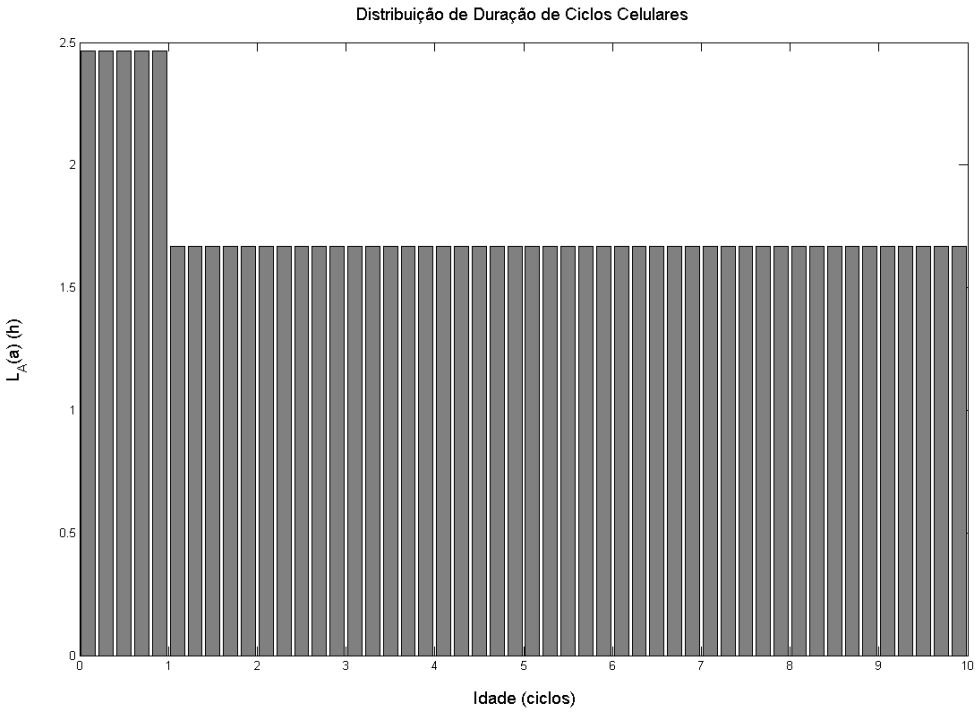

Figura 3. 4 – Duração do ciclo celular: implementação A – $L_A(a)$

$$M_A(a) = M_0 m(a) e^{q(a)C_A(a)[a - trunc(0{,}999999a)]} \tag{3.76a}$$

$$n = 1 + trunc(0{,}999999a) \tag{3.76b}$$

$$C_A(a) = \int_{trunc(a)}^{1+trunc(a)} L_A(a)da \tag{3.76c}$$

onde *trunc* é a função de truncamento (retorna a parte inteira de seu argumento) e $C(a)$ é a duração (h) do ciclo n ao qual corresponde a idade a. Os parâmetros da Equação 3.76 estão listados na Tabela 3.1. A Figura 3.5 apresenta o comportamento de $M_A(a)$ segundo esta implementação.

Tabela 3.1 – Parâmetros de M_A(a) segundo Chen *et al.* (2000)

***m*(*a*)**	***q*(*a*) (h^{-1})**	
0,7107	0,0057	$0 \le a \le 1$
0,9281	0,0058	$1 < a \le 2$
0,9482	0,0058	$2 < a \le 3$
0,9561	0,0058	$a > 3$

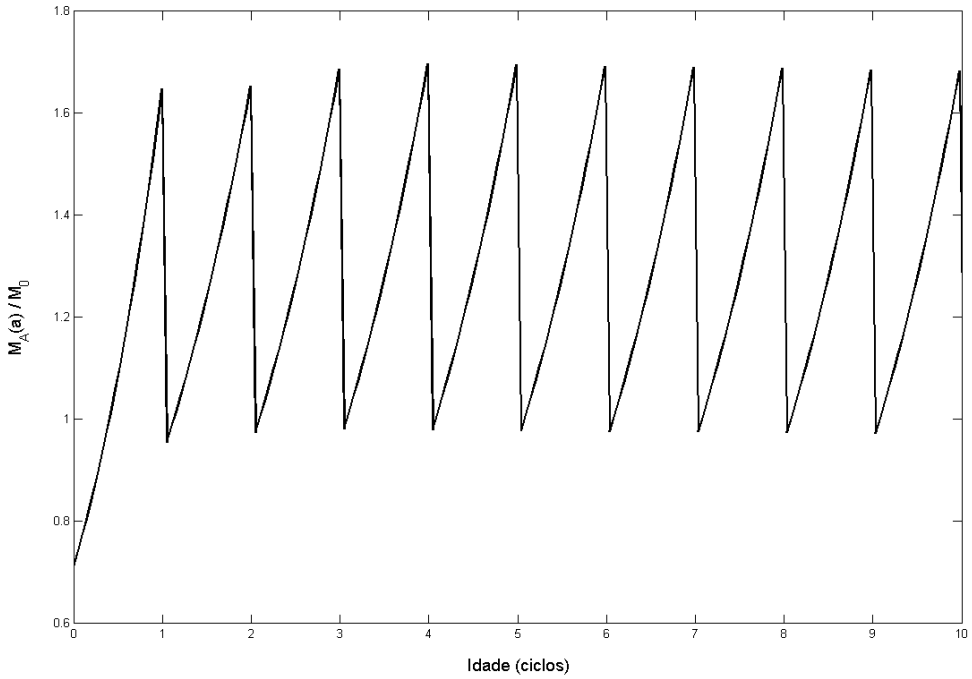

Figura 3.5 – Distribuição de massa celular: implementação A – $M_A(a)$

3.6.2 – DISTRIBUIÇÕES DE MASSA E DURAÇÃO: IMPLEMENTAÇÃO B

Nesta implementação, as funções $L_B(a)$ e $M_B(a)$ e seus parâmetros foram obtidos a partir do trabalho de Alberghina e colaboradores (1983). A função $M_B(a)$ segundo esta implementação está descrita nas Equação 3.77 – 3.80.

$$m_B^k = m_B^0\left(1 + Q\frac{1-A^k}{1-A}\right) \tag{3.77}$$

$$k = trunc(a)$$

$$m_M^k = hm_B^k \tag{3.78}$$

$$m_P^k = (h-1)m_m^{k-1} \tag{3.79}$$

$$M_B(a) = m_N e^{C_B[a-trunc(0,999999a)]}, a < 1 \tag{3.80}$$

$$M_B(a) = m_P^k e^{C_B[a-trunc(0,999999a)]}, a \geq 1$$

$$C_B(a) = \int_{trunc(a)}^{1+trunc(a)} L_B(a)da$$

onde

k	Número de ciclos celulares já executados, computado como a parte inteira de a (k = 0, para células recém-nascidas)
m_B^0	Massa crítica para ocorrência do *START* e início da gemulação para células recém-nascidas (k = 0)
m_B^k	Massa crítica para ocorrência do *START* e início da gemulação para células que já executaram k ciclos celulares
m_M^k	Massa crítica para ocorrência da mitose para células que já executaram k ciclos celulares
m_P^k	Massa da célula-mãe no início do ciclo celular k, imediatamente após se dividir no ciclo k – 1

m_N Massa da célula recém-nascida

h Relação entre m_M^k *e* m_B^k ($h > 1$)

Q Parâmetro proporcional ao crescimento relativo da massa crítica para gemulação de uma célula-mãe entre a sua primeira divisão m_B^1 e a massa crítica para gemulação de uma célula recém-nascida m_B^0 ($Q < 1$)

A Parâmetro proporcional ao crescimento relativo da massa crítica para gemulação de uma célula-mãe entre dois ciclos subseqüentes, após o primeiro ($A < 1$)

A função $L_B(a)$ é deduzida a partir das equações 3.77 – 3.79, considerando que todas as células possuem a mesma taxa individual de crescimento, e está mostrada na Equação 3.81.

$$L_B(a) = L_0, k = 0 \tag{3.81}$$

$$L_B(a) = \ln\left(\frac{m_M^k}{m_P^k}\right) L_0, k \geq 1$$

$$k = trunc(a)$$

Os parâmetros usados neste trabalho para as funções $M_B(a)$ e $L_B(a)$ segundo a implementação B estão listados na Tabela 3.2. As funções $M_B(a)$ e $L_B(a)$ segundo esta implementação são apresentadas nas Figuras 3.6 e 3.7, respectivamente.

Tabela 3.2 – Parâmetros *default* de $M_B(a)$ segundo a implementação B (Alberghina *et al.*, 1983)

Parâmetro	Valor
m_B^0	$1{,}20M_0$ g/cél
h	1,5
Q	0,5
A	0,2
L_0	146 min

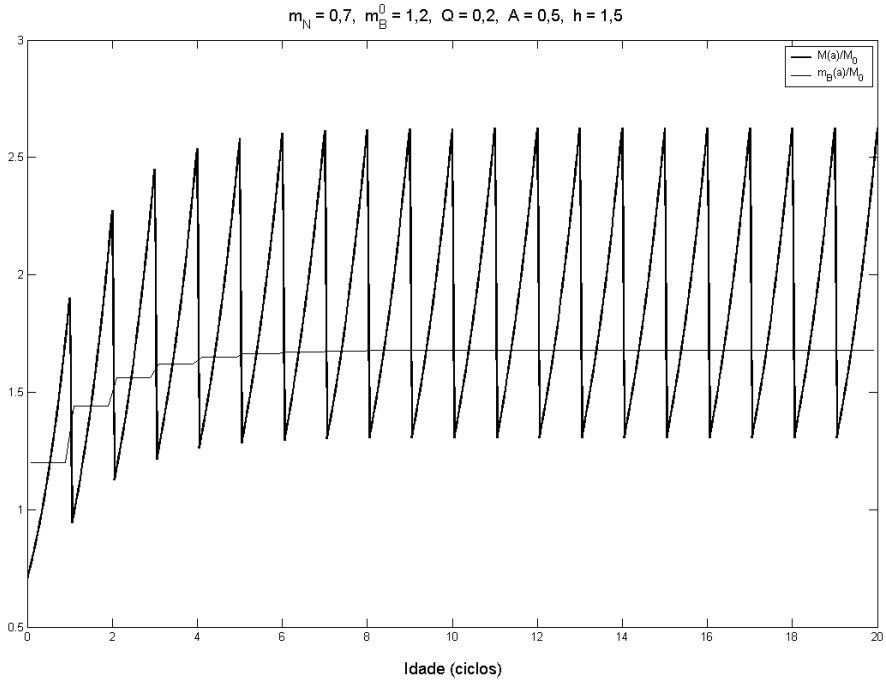

Figura 3.6 – Distribuição de massa celular: implementação B – $M_B(a)$

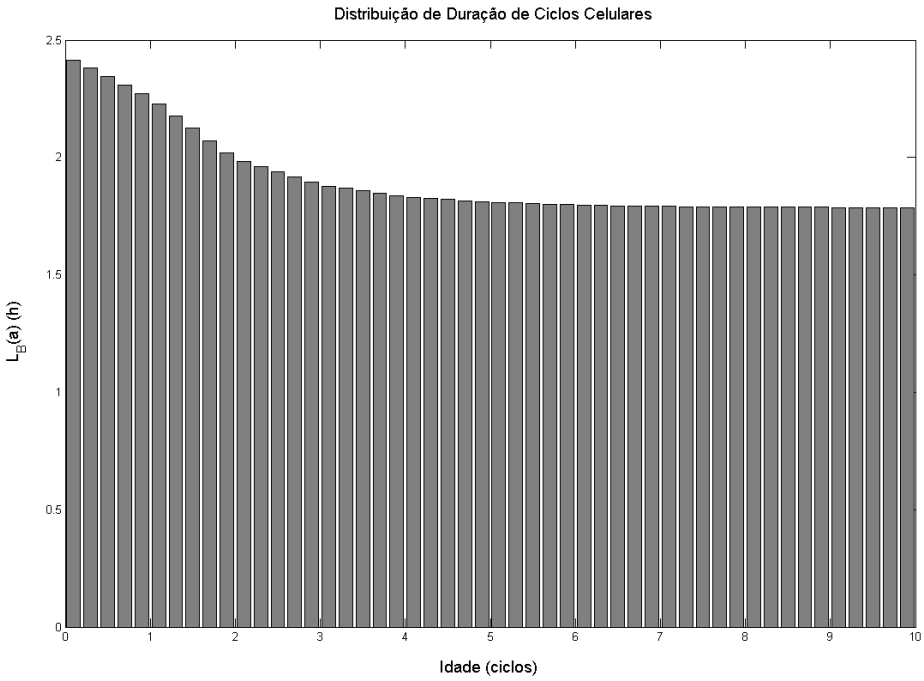

Figura 3.7 – Duração do ciclo celular: implementação B – $L_B(a)$

4 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados alguns conjuntos de dados experimentais, de forma a guiar a formulação do modelo, bem como para avaliar quantitativamente as suas respostas. Todos estes conjuntos foram obtidos monitorando culturas em batelada de *Saccharomyces cerevisiae*, usando glicose como fonte de carbono, e são divididos em dois grupos:

(i) dados obtidos pelo Grupo de Engenharia de Sistemas Biológicos (Escola de Química / Universidade Federal do Rio de Janeiro). A cepa utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* S288C (ATCC 26108, SUC2 mal gal2 CUP1 sta1 sta2 sta3 STA10). O reator bioquímico para a realização dos experimentos foi construído em acrílico, em formato retangular, com um volume total de aproximadamente 300 mL e dividido igualmente em três compartimentos, como é mostrado na Figura 4.1. O reator não apresenta as melhores condições para culturas microbianas (por exemplo, a presença de arestas em ângulos retos favorece a precipitação); porém, possui baixo custo e mostrou-se satisfatório. O reator apresenta orifícios em sua parte superior para a colocação de termômetros, tubulação de ar e para amostragem. Todos os experimentos foram conduzidos sob aeração forçada através de difusores sinterizados posicionados no fundo dos reatores. A manutenção dos microrganismos em suspensão foi garantida por essa forma de aeração. As células foram pré-crescidas a 28°C em agitador rotatório a 160 rpm em meio YPD (extrato de levedo, 1%; peptona, 2% e glicose, 2%). Em seguida, foram reinoculadas em meio YPD modificado (extrato de levedo, 1%; peptona, 0,64% e glicose, 2%) de modo a se obter a concentração inicial de células desejada. A concentração celular foi quantificada em espectrofotômetro a 570 nm, correlacionada com peso seco de células. A maioria das medidas foi realizada em intervalos regulares de 10 minutos. Foram retiradas, a cada

30 minutos, alíquotas para centrifugação. O sobrenadante foi recolhido e congelado para posterior análise de açúcares pelo Método de Nelson (Martelli, 1968). A contagem do número de células viáveis, não viáveis e em gemulação foi realizada em câmara de Newbauer, com auxílio de azul de metileno vital (BSCS-US, 1970). Estes dados abrangem 6 conjuntos, que serão citados doravante como conjuntos BR-01 a BR-06.

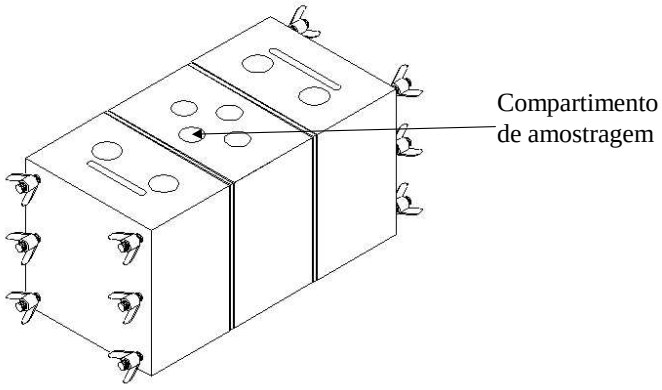

Figura 4.1 – Reator Bioquímico onde foram realizados os experimentos BR-01 a BR-06

(ii) dados obtidos no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal (Coelho *et al.*, 2004). A cepa utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32167, pré-crescida em agitador rotatório a 30°C e 120 rpm por 15 horas, em meio composto por 0,4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,0 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 5,0 g/L KH_2PO_4, 1,0 g/L extrato de levedura e 5,0 g/L glicose. As bateladas foram conduzidas em reator agitado a 30°C, 400 rpm e com vazão de gás de 1 NL/min, sendo algumas destas bateladas conduzidas em *condições hiperbáricas*. A pressão interna foi ajustada através da pressão de entrada do gás comprimido na entrada e da abertura da válvula de controle de pressão da saída gasosa. A concentração de biomassa foi estimada por espectrofotometria a 620 nm, usando curva de calibração para medições

com peso seco de células. A concentração de glicose foi medida através do método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (Miller, 1959) e a concentração de etanol foi determinada por HPLC (Jasco, Great Dunmow, Essex, UK) com uma coluna Chrompack (ácidos orgânicos) e um detetor RI (830-PU, Jasco). A viabilidade celular foi determinada com azul de metileno. As frações de células não-viáveis e gemulantes foi medida usando procedimentos de análise digital de imagens (Coelho *et al.*, 2004). Estes dados abrangem 6 conjuntos, obtidos em diferentes atmosferas internas ao reator: (a) ar em pressões de 1 e 6 bar (conjuntos PT-A1 e PT-A6, respectivamente); (b) oxigênio puro em pressões de 3 e 5bar (conjuntos PT-O3 e PT-O5, respectivamente); e (c) nitrogênio puro em pressões de 1 e 6bar (conjuntos PT-N1 e PT-N6, respectivamente).

A Tabela 4.1 sumariza quais grandezas foram medidas durante a realização de cada experimento.

Tabela 4.1 – Sumário dos experimentos

Experimento	**Medições de**			
	Biomassa	**Substrato**	**Gemulantes / Não-Gemulantes**	**Não-Viáveis**
BR-01	58	1(*)	4	4
BR-02	61	9	-	-
BR-03	52	9		
BR-04	7	7	7	7
BR-05	35	-	-	-
BR-06	40	-	-	-
PT-XY	5	5	5	5

(*) Apenas o valor inicial

5 - BASES PARA SIMULAÇÃO E AJUSTE DE PARÂMETROS

A simulação do modelo formulado neste trabalho necessita da definição de alguns detalhes ainda imprecisos e de valores para todos os parâmetros do modelo. As próximas seções visam a clarificar estes detalhes, explicar como os parâmetros do modelo foram fixados ou ajustados a partir dos dados experimentais e apresentar seus valores.

5.1 – DEFINIÇÃO DA VARIÁVEL DE OFERTA DE OXIGÊNIO

O modelo formulado nas Equações 3.3 – 3.6 não inclui uma equação para balanço de oxigênio dissolvido no meio líquido, entretanto, algumas das funções de probabilidade do modelo são dependentes de uma variável *O*, até aqui descrita como associada à oferta de oxigênio às células. Os dados experimentais utilizados para guiar a construção das funções de probabilidade e consumo de substrato e para ajustar os parâmetros do modelo não incluem medições de oxigênio dissolvido; entretanto os conjuntos de dados BR-01 a BR-06 foram realizados em ambientes aerados, e os conjuntos de dados de prefixo PT incluem 2 conjuntos obtidos em condições anóxicas e 4 conjuntos de dados obtidos em presença de oxigênio (adicionalmente, os dados de prefixo PT incluem 4 conjuntos em condições hiperbáricas).

Para tentar inferir a influência da aeração em cada experimento, considera-se que:

(i) as condições de aeração podem ser consideradas homogêneas e constantes ao longo de cada experimento;

(ii) em cada conjunto de experimentos realizados em bases comparáveis, dada a condição (i), o efeito da oferta de oxigênio ao meio sobre a dinâmica populacional é qualitativamente idêntico e quantitativamente comparável; e

(iii) no caso dos experimentos em condições hiperbáricas o efeito da oferta diferenciada de oxigênio é mais significativo do que o efeito da pressão do sistema sobre as células, conforme explicitado por Coelho *et al.* (2004).

Assim, define-se a variável *O* como a razão entre a pressão parcial de oxigênio na atmosfera do reator e a pressão parcial do oxigênio no ar a pressão atmosférica, como é mostrado na Equação 5.1

$$O = \frac{y_{O_2} P}{0{,}21} \tag{5.1}$$

onde

y_{O_2}	Fração molar de oxigênio na atmosfera do reator, ou seja, y_{O_2} = 0 para as atmosferas de N_2 (condições anóxicas), y_{O_2} = 0,21 para as atmosferas aeradas e y_{O_2} = 1 para as atmosferas de O_2 puro
P	Pressão absoluta da atmosfera do reator (em bar)
0,21	Pressão parcial aproximada do O_2 no ar atmosférico (P_{ATM} = 1bar)

5.2 – Influência da Concentração de Substrato sobre a Duração do Ciclo Celular

Como foi explicado ao fim da seção 3.6, as funções de massa celular e duração do ciclo celulares dependem apenas da idade *a*, devido à falta de dados para formulação de funções de ciclo celular dependentes da concentração de substrato. Entretanto, a independência da duração do ciclo celular com a concentração de substrato ocasiona uma resposta incongruente: quando o meio está privado de substrato, as células continuam envelhecendo, pois $L^{-1}(a)$ é constante. Devido à definição da variável *a* utilizada neste modelo, *envelhecer* significa *progredir no ciclo celular*. Se a taxa de transição no espaço da idade $L^{-1}(a)$ é constante para qualquer valor de *S*, isso significa que, na ausência de fonte de carbono, as células continuam *indefinidamente* a executar o ciclo celular e, eventualmente,

dividirão (ao alcançar o próximo valor inteiro de *a*), dando origem a novas células, que continuarão envelhecendo.

Uma forma de evitar esse comportamento fisicamente implausível seria definir as funções de probabilidade de morte e inativação de forma que a ausência total de substrato exaurisse imediatamente a população de células ativas; entretanto, todas as evidências experimentais mostram que, em condições nutricionais muito pobres, as células de *Saccharomyces cerevisiae* mantêm sua viabilidade por longo período. Infere-se que as células *interrompem de imediato a execução do ciclo celular e vão progressivamente mudando o metabolismo*, de forma a manter a viabilidade nessas condições, e são capazes de retomar (ao menos parcialmente) as rotas metabólicas abandonadas e a execução do ciclo celular quando a oferta de fonte de carbono aumenta até um valor suficiente (Gray *et al.*, 1999). Eventualmente, células que estão gemulando quando o meio torna-se pobre em substrato de forma abrupta, tentam completar a mitose – algumas têm sucesso e outras não. Este comportamento é a base das definições de células *ativas* e *inativas* no início do Capítulo 3.

Se, como descrito no parágrafo acima, condições de depleção de substrato levam células ativas a interromper a execução do ciclo celular, deve-se considerar que $L(a)$ tende a um valor infinito. Na verdade, é possível que este seja um comportamento gradual, com um aumento suave da duração do ciclo celular com a diminuição da concentração de substrato. Porém, devido à momentânea ignorância a respeito de tal dinâmica de $L(a)$, para evitar que o modelo descreva uma população onde células envelhecem e dividem mesmo na total ausência de substrato, a função $L(a)$ será substituída no modelo por uma função $L'(a,S)$, cujo inverso está mostrado na Equação 5.2.

$$L'^{-1}(a,S) = \frac{1}{1+e^{-\lambda_S^L\left(S-\gamma_S^L\right)}} L^{-1}(a) \tag{5.2}$$

Usando um valor grande para o acelerador λ_S^L, o termo sigmoidal da função $L'(a,S)$ apresenta um comportamento de interruptor da função $L(a)$ em torno do valor γ_S^L, fazendo com que, para $S < \gamma_S^L$, $L'^{-1}(a,S) \to 0$, e para $S > \gamma_S^L$, $L'^{-1}(a,S) \to L^{-1}(a)$. Os valores escolhidos para os parâmetros λ_S^L e γ_S^L estão tabelados na seção 5.3.

Segundo esta proposição, ambas as funções $L'(a,S)$ e $I(a,S)$, atuando em conjunto, devem contribuir para descrever a quiescência da população de levedura gemulante sob influência de depleção de substrato, de forma a concordar qualitativamente com a literatura (Gray *et al.*, 1999)

5.3 – PARÂMETROS DO MODELO

Devido à grande quantidade de parâmetros das funções de divisão, transições e consumo de substrato, torna-se inviável realizar um ajuste para o conjunto completo de parâmetros. Desta forma, optou-se por fixar os valores de menor impacto sobre as respostas do modelo (os aceleradores λ's, os deslocadores γ's e os parâmetros de incidências aleatórias α's) e ajustar os parâmetros aos quais as respostas do modelo são mais sensíveis (os iniciadores ρ's e as taxas específicas de consumo de substrato $\mu_{AEROBIC}$ e $\mu_{ANAEROBIC}$). Os valores fixados para estes parâmetros foram escolhidos de forma a tentar reproduzir qualitativamente as respostas esperadas, após análise de simulações preliminares. Algumas observações a respeito da escolha destes parâmetros:

(i) todos os λ's e γ's dos termos dependentes da idade foram escolhidos de forma a evitar obter distribuições de células muito espalhadas, de forma que a fração de células com $a > 4$ não seja significativa, respeitando a idéia de que as células que executaram menos ciclos celulares tenham maior probabilidade de divisão e ativação e que as células que já

executaram alguns ciclos tenham maiores probabilidades de inativação e morte;

(ii) os parâmetros do termo dependente de substrato da função de divisão foram escolhidos de forma a tornar praticamente nula a probabilidade de divisão para S = 0 e permitir que esta probabilidade alcance seu valor máximo em um valor pequeno de S;

(iii) os parâmetros do termo dependente de O da função de divisão foram escolhidos de forma que uma oferta moderada de oxigênio rapidamente aumente a probabilidade de divisão e uma oferta exagerada de oxigênio diminua de forma mais suave essa probabilidade ($\gamma_{O,2}^{B} > \gamma_{O,1}^{B}$, $\lambda_{O,1}^{B} > \lambda_{O,2}^{B}$);

(iv) os parâmetros do interruptor que alterna a taxa específica de consumo de substrato entre os valores dos modos de operação anóxico e aerado foram escolhidos de forma que o interruptor alterne totalmente (desvio de 0,1%) entre ambos os modos entre os valores O = 0 e O = 1, apresentando o valor médio para O = 0,5;

(v) os parâmetros do termo dependente de O que diminui a taxa de consumo de substrato (efeito de estresse oxidativo) foram escolhidos de forma a que essa diminuição seja suave e ocorra apenas para ambientes fortemente oxidantes;

(vi) os parâmetros do termo dependente de S para a duração do ciclo celular foram escolhidos de forma que $L^{-1}(a)$ seja praticamente nulo para S = 0;

(vii) os parâmetros específicos das funções de ciclo celular são apresentados nas Tabelas 3.1 e 3.2; e

(viii) para ambas as funções de divisão e inativação, P_C = 1 e DP = 0,1.

Os parâmetros fixados têm seus valores listados na Tabela 5.1. As simulações foram realizadas em espaço de idade compreendido entre a_{MIN} = 0 e a_{MAX} = 20, usando uma quantidade de discretizações N = 100.

Tabela 5.1 – Parâmetros fixados para simulação do modelo

		Parâmetro	Valor Fixado
B	1	$\lambda_{O,1}^{B}$	1
	2	$\gamma_{O,1}^{B}$	1
	3	$\lambda_{O,2}^{B}$	0,5
	4	$\gamma_{O,2}^{B}$	12
	5	λ_{S}^{B}	100
	6	γ_{S}^{B}	0,1
	7	λ_{a}^{B}	5
	8	γ_{a}^{B}	2
D_A	9	α^{D_A}	1e-9
	10	$\lambda_{O}^{D_A}$	1
	11	$\gamma_{O}^{D_A}$	7
	12	$\lambda_{S}^{D_A}$	1
	13	$\gamma_{S}^{D_A}$	0,1
	14	$\lambda_{a}^{D_A}$	0,05
I	15	α^{I}	1e-9
	16	λ_{S}^{I}	5
	17	γ_{S}^{I}	0,5
	18	λ_{a}^{I}	5
	19	γ_{a}^{I}	1
D_I	20	α^{D_I}	1e-9
	21	$\lambda_{a}^{D_I}$	0,05
A	22	α^{A}	1e-7
	23	λ_{S}^{A}	1
	24	γ_{S}^{A}	0,1
	25	λ_{a}^{A}	5
	26	γ_{a}^{A}	0
R_S	27	K_S	2
	28	$\lambda_{O,1}^{S}$	25
	29	$\gamma_{O,1}^{S}$	0,5
	30	$\lambda_{O,2}^{S}$	0,25
	31	$\gamma_{O,2}^{S}$	16
L	32	λ_{S}^{L}	1000
	33	γ_{S}^{L}	0,2

Ressalta-se que (i) a resposta de biomassa $X(t)$ do modelo é obtida pela multiplicação da função de massa $M(a)$ e da soma das densidades de células, e a porcentagem de células não-viáveis $NV(t)$ é a soma das frações de células inativas e mortas, como mostrado nas Equações 5.3 e 5.4.

$$X(t) = N_0 \sum_{a=a_{MIN}}^{a=a_{MAX}} M(a)\left[n_A(a,t) + n_I(a,t) + n_D(a,t)\right] \tag{5.3}$$

$$NV(t) = 100 N_0 \frac{\sum_{a=a_{MIN}}^{a=a_{MAX}} n_I(a,t) + n_D(a,t)}{\sum_{a=a_{MIN}}^{a=a_{MAX}} n_A(a,t) + n_I(a,t) + n_D(a,t)} \tag{5.4}$$

5.4 – AJUSTE DE PARÂMETROS

A estimação dos parâmetros do modelo foi realizada por comparação entre as respostas preditas e os dados experimentais, via minimização de função objetivo dada pela soma ponderada dos quadrados de desvios entre valores medidos e calculados pelo modelo, para todos os experimentos.

Cada experimento consiste de coleção de dados de crescimento, consumo de substrato etc., ao longo do tempo. Os dados amostrados ao longo de cada experimento foram: (a) concentração de biomassa total X (g/L), (b) concentração de substrato S (g/L), (c) porcentagem de células gemulando G, (d) porcentagem de células não-gemulando NG e (e) porcentagem de células não-viáveis NV. Entretanto, nem todos os tipos de dados estão disponíveis para todos os experimentos do pacote BR-01–BR-06. Incertezas experimentais forneceram ponderadores para os contribuintes da função-objetivo. Basicamente,

consideraram-se desvios-padrão de 10% sobre valor experimental para as leituras de biomassa (g/L) e concentração de substrato (g/L), e desvios padrões de 20% sobre valor experimental para as demais classes de medidas. Os ponderadores da função-objetivo foram calculados pelos inversos dos quadrados dos desvios padrões absolutos estimados para os valores medidos. A função-objetivo considera o quadrado dos desvios entre respostas do modelo e valores medidos para biomassa, substrato e porcentagem de células não-viáveis, ignorando as porcentagens de células gemulantes e não-gemulantes.

A minimização do objetivo de estimação foi realizada através do algoritmo Simplex Nelder-Mead disponível no MATLAB versão 6.5 (The Mathworks, Inc.), atuando sobre faixas de valores pré-definidas para os parâmetros. Todos os ajustes mostrados nos Capítulos 6, 7 e 8 foram realizados a partir dos mesmos valores iniciais, usando sempre os valores da Tabela 5.1 para os parâmetros fixados previamente. Nos ajustes para conjuntos de experimentos incluindo apenas condições aeradas, $\mu_{ANAEROBIC}$ foi mantido constante, com valor qualquer, por ser irrelevante. Da mesma forma, em ajustes de experimentos em condições anóxicas, $\mu_{AEROBIC}$ foi mantido constante, com valor qualquer, por ser irrelevante. Apenas nos ajustes incluindo experimentos em ambos os tipos de condições de operação (aerada e anóxica), ambas as taxas específicas de consumo de substrato $\mu_{AEROBIC}$ e $\mu_{ANAEROBIC}$ foram ajustadas simultaneamente. Os valores iniciais e limites para ajuste de parâmetros estão mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Limites e valores iniciais para ajustes de parâmetros

Parâmetro	Limite Inferior	Valor Inicial	Limite Superior
ρ^{B}	4	11,79	14
ρ^{D_A}	0,001	0,0016	1
ρ^{I}	0,001	0,99	1
ρ^{D_I}	0,001	0,010	1
ρ^{A}	0,001	0,98	1
$\mu_{ANAEROBIC}$	0	3,97	6
$\mu_{AEROBIC}$	4	10,39	12

6 – RESULTADOS: EXPLORAÇÃO DO MODELO

A capacidade do modelo em descrever a dinâmica populacional de culturas de *Saccharomyces cerevisiae* foi explorada através comparações entre predições do modelo e dados experimentais. Para isso, foram realizados alguns ajustes de parâmetros, cada um utilizando dados de um único experimento do pacote descrito no Capítulo 4 (conjuntos BR-01 a BR-06, PT-N1 e PT-N6, PT-A1 e PT-A6, PT-O3 e PT-O5). Entre os experimentos BR, foram escolhidos 3 para esses ajustes: BR-01 (que, como a maioria dos experimentos BR, possui dados de biomassa mas apenas a medição da concentração inicial de substrato), BR-02 (que possui acompanhamento temporal da concentração de substrato) e BR-04 (que foi realizado em condições de depleção de substrato, permitindo um acompanhamento prolongado da perda de viabilidade das células em tal condição). Entre os experimentos PT, foram escolhidos 4 conjuntos, de forma a tentar inferir a capacidade do modelo de descrever o efeito de condições anóxicas e o efeito de condições de superoxigenação: PT-N1 (ambiente a 1bar de N_2), PT-A1 (ambiente a 1bar de ar), PT-A6 (ambiente a 6bar de ar) e PT-O3 (ambiente a 3bar de O_2).

Os parâmetros ajustados usando cada experimento separadamente, para o modelo utilizando funções de ciclo celular segundo as implementações A e B estão mostrados nas Tabelas 6.1 e 6.2. Para facilitar a distinção dos resultados obtidos pelo modelo usando cada implementação das funções de massa e duração, doravante o modelo em conjunto com a implementação A será chamado $ASPBM_A$, e o modelo em conjunto com a implementação B será chamado $ASPBM_B$.

A última linha de cada tabela traz o critério usado para computar a fração de células gemulando. No caso $ASPBM_A$, o critério usado adotado é o de que *estão gemulando as células que possuem massa tal que*

$$M_A(a) \geq \left[\frac{m_B}{M_0}\right] M_0 \tag{6.1}$$

onde o parâmetro m_B/M_0 é avaliado para cada conjunto de dados (o valor-base é 1,25). No caso ASPBMB, a massa para início de gemulação é calculada intrinsecamente pelo modelo de massa celular adotado (Eq. 3.77), usando os parâmetros da Tabela 3.2, exceto por m_B^0/M_0 , que é avaliado para cada conjunto de dados.

Tabela 6.1 – Valores ajustados usando dados de um único experimento: $ASPBM_A$

Parâmetro	BR-01	BR-02	BR-04	PT-N1	PT-A1	PT-A6	PT-O3
ρ^B	11,5468	10,2349	11,9895	11,9424	10,2426	5,3795	10,7038
ρ^{D_A}	0,002383	0,001997	0,005406	0,002096	0,002134	0,001018	0,003498
ρ^I	0,9920	0,9950	0,1005	0,09120	0,3218	0,08649	0,9975
ρ^{D_I}	0,01325	0,03116	0,3496	0,001007	0,02583	0,001089	0,008318
ρ^A	0,9859	0,9772	0,9979	0,004576	0,8170	0,03291	0,9337
$\mu_{ANAEROBIC}$	-	-	-	3,5879	-	-	-
$\mu_{AEROBIC}$	5,0244	7,5102	4,0032	-	4,0309	4,0094	4,0023
m_B/M_0	1,25	1,25	1,25	1,40	1,30	1,40	1,40

Tabela 6.2 – Valores ajustados usando dados de um único experimento: $ASPBM_B$

Parâmetro	BR-01	BR-02	BR-04	PT-N1	PT-A1	PT-A6	PT-O3
ρ^B	11,2902	11,3525	11,9689	13,9797	11,7748	11,7567	10,4792
ρ^{D_A}	0,002175	0,001660	0,002425	0,002555	0,002065	0,003121	0,003610
ρ^I	0,9920	0,004486	0,1717	0,06987	0,3118	0,02585	0,9915
ρ^{D_I}	0,02211	0,004969	0,001022	0,001016	0,02203	0,03628	0,008661
ρ^A	0,9809	0,9895	1,4785	0,001254	0,8777	0,006752	0,9862
$\mu_{ANAEROBIC}$	-	-	-	4,8087	-	-	-
$\mu_{AEROBIC}$	5,4322	9,2586	4,0009	-	4,0022	10,8797	4,2499
m_B^0/M_0	1,25	1,20	1,25	1,20	1,20	1,20	1,20

As Figuras 6.1 – 6.7 mostram os ajustes dos experimentos escolhidos (BR-01, BR-02, BR-04, PT-N1, PT-A1, PT-A6 e PT-O3) usando $ASPBM_A$; as Figuras 6.8 – 6.14 apresentam os ajustes correspondentes usando $ASPBM_B$. Em todas as sub-figuras, as linhas (cheias e hachuradas) representam respostas do modelo, e marcadores indicam valores medidos. Na 3ª sub-figura, *NG* indica a fração de células *N*ão-*G*emulando e *G* indica a fração de células *G*emulando. Na 4ª sub-figura, *NV* é o total de células *N*ão-*V*iáveis (soma de inativas e mortas, conforme Eq. 5.4)

Os resultados mostram que $ASPBM_A$ e $ASPBM_B$ apresentam respostas similares em biomassa, substrato e fração de células não-viáveis, mas diferentes em relação às frações de células gemulando e não-gemulando (comparando, por exemplo, as Figuras 6.7 e 6.14). De toda forma, as respostas *G*, *NG* e *NV* apresentam disparidades em relação aos valores medidos muito superiores a quaisquer disparidades apresentadas pelas respostas *X* (Eq. 5.3) e *S*. Além da possibilidade óbvia de escolha inadequada de alguns dos valores dos parâmetros fixados na Tabela 5.1, ou de que alguma das várias funções de probabilidade seja melhor descrita de outra maneira, tais disparidades e os comportamentos preditos pelo modelo podem ser devidos a diversos fatores:

(i) a medição experimental das frações de células gemulantes, não-gemulantes e não-viáveis por coloração e contagem ao microscópio é mais difícil que as medições de concentrações de biomassa e substrato, embutindo maior erro. Assim, estas grandezas podem estar com maior variância, ou com desvios sistemáticos. Seria necessário um conjunto maior de dados para avaliar de forma adequada a qualidade dessas medições como informação para ajuste do modelo;

(ii) há uma disparidade entre os valores ajustados de $\mu_{AEROBIC}$ para os conjuntos BR-01 e BR-02 nas Tabelas 6.1 e 6.2, especialmente quando confrontados com os valores ajustados de ρ^B para ambos os conjuntos. Estes dois parâmetros (taxa específica de consumo de substrato em condição aerada e

iniciador de divisão, respectivamente) são os mais importantes para as respostas do modelo. Para os valores similares de ρ^B mencionados, a diferença observada em $\mu_{AEROBIC}$ indica um consumo específico de substrato significativamente diferente entre os dois experimentos (o que pode ser verificado visualmente comparando as Figuras 6.1 e 6.2, sub-figuras 1 e 2), apesar de realizados em condições próximas (mesma cepa, concentrações iniciais de substrato abundantes, apesar de diferentes, mesmos parâmetros de aeração, etc). Isto pode ser devido a alguma discrepância operacional não percebida durante a execução de algum dos experimentos, que pode ter influenciado até mesmo o metabolismo, como, por exemplo, diferenças de aeração. Infelizmente, não estão disponíveis medições de etanol produzido, para verificação;

(iii) no caso das medições de células não-viáveis, percebe-se que, em praticamente todos os experimentos onde tal grandeza foi medida, há valores que não parecem lógicos. Dada uma porcentagem de não-viáveis no início da batelada NV_0, na fase de crescimento em ambiente abundante em fonte de carbono, as próximas medições de *NV* deveriam cair (a população está aumentando rapidamente, pois as condições ambientais assim o permitem, ao mesmo tempo em que não oferecem estímulo aos processos de perda de viabilidade), e só voltar a subir após o ambiente ser esgotado de fonte de carbono. Embora este comportamento seja verificado nas respostas do modelo, as medições experimentais apresentam vários pontos que não seguem esta lógica (por exemplo, veja as Figuras 6.4 a 6.7);

(iv) os resultados mostram a dificuldade em capturar corretamente a influência da oferta de oxigênio sobre a dinâmica populacional, como pode ser verificado em particular no conjunto PT-O3 (Figuras 6.7 e 6.14), quando o ambiente fortemente oxidante aparenta ser prejudicial às células, pois o crescimento aparentemente desacelera apesar de o meio ainda possuir uma

concentração de substrato mais que suficiente para a proliferação. Entretanto, as poucas quantidade e variedade dos experimentos conduzidos em condições de excesso de oferta de oxigênio não são suficientes para permitir conclusões definitivas sobre a qualidade dos ajustes. Adicionalmente, o efeito hiperbárico não-associado à oferta de oxigênio está presente nos dados experimentais, mas ausente da formulação do modelo; e

(v) o modelo computa as frações G e NG através da massa celular (Eqs. 3.77 e 6.1); entretanto, as funções de ciclo celular não apresentam dinâmica associada ao ambiente (são independentes de S e O), conforme discutido previamente (seções 3.6 e 5.2). A ausência de dinâmica relacionada às condições ambientais nos modelos de $L(a)$ e $M(a)$ obviamente é refletida sobre as predições de G e NG, impedindo que o modelo reproduza comportamentos como, por exemplo, o "cruzamento" dos valores medidos G^{EXP} e NG^{EXP} (Figuras 6.3 – 6.7), exceto nos casos em que tal comportamento possa ser causado nas repostas do modelo em decorrência da aceleração da taxa de perda de viabilidade. Não é surpreendente que a melhor comparação para os valores G e NG entre o simulado e o medido ocorra no conjunto BR-04, conduzido em depleção prolongada de substrato, em condições aeradas sem estresse hiperbárico. Cabe aqui repetir que a função-objetivo usada em todos os ajustes computa o quadrado dos desvios entre respostas do modelo e valores medidos para biomassa, substrato e porcentagem de não-viáveis, ignorando as porcentagens de gemulantes e não-gemulantes.

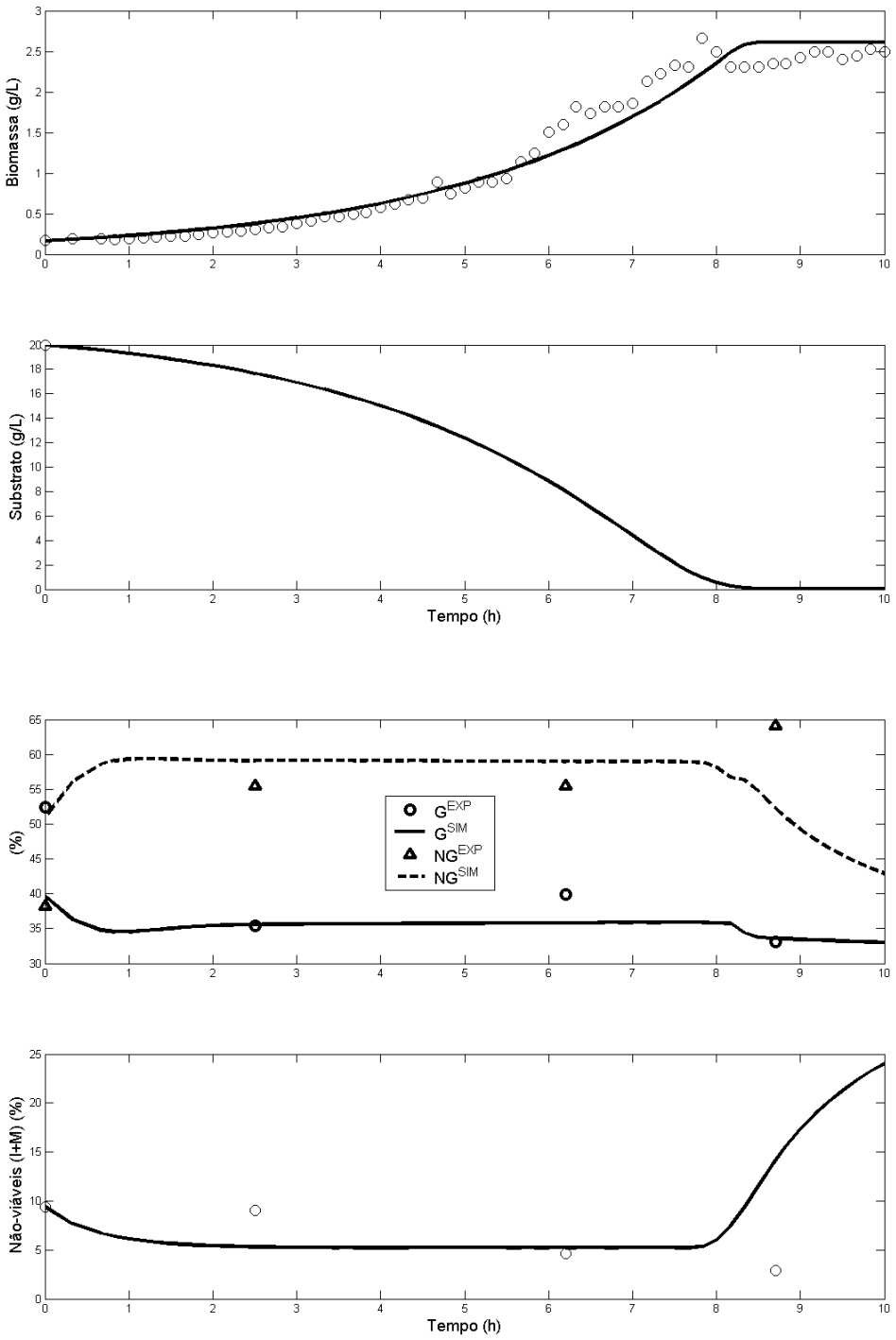

Figura 6.1 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-01: $ASPBM_A$

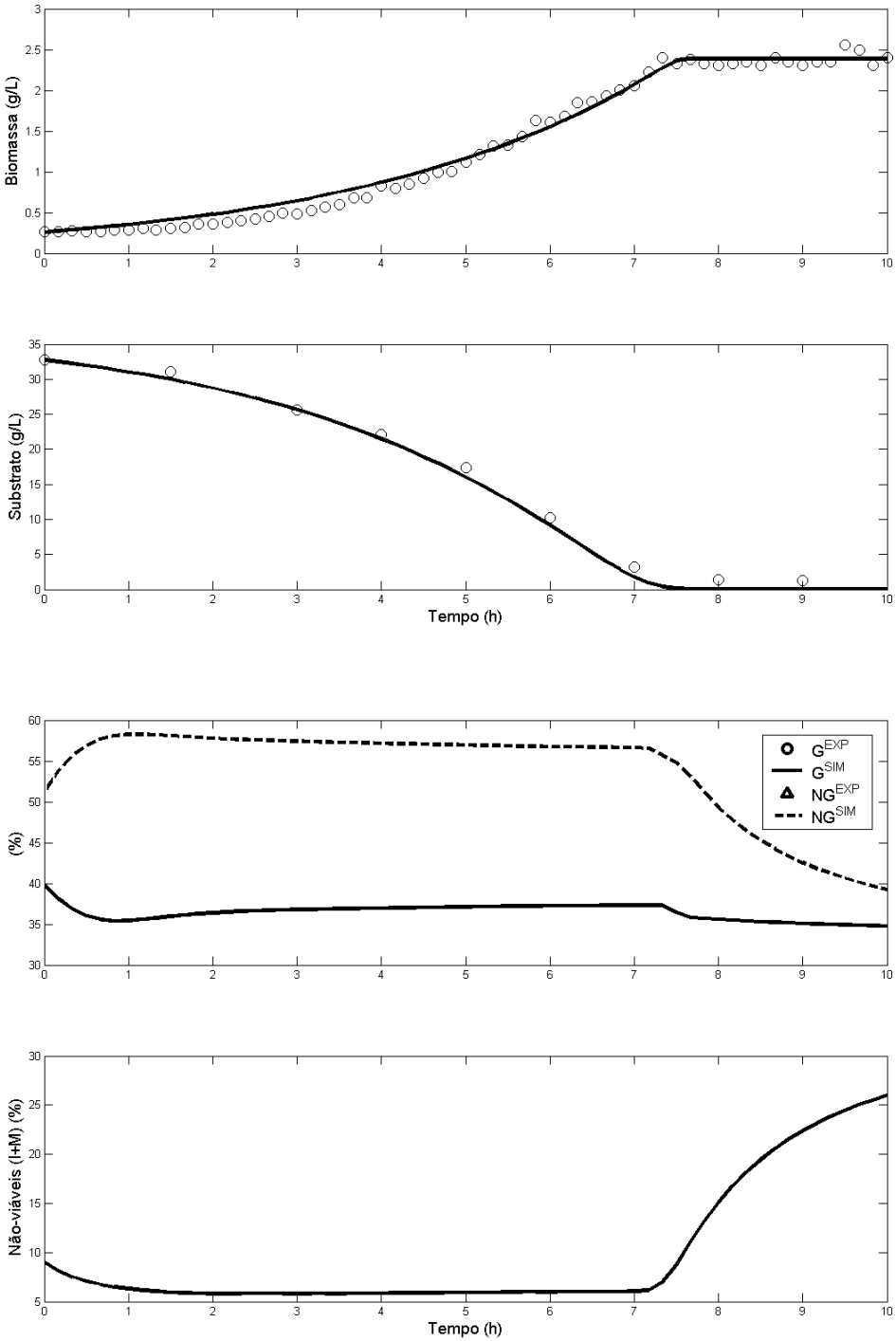

Figura 6.2 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-02: $ASPBM_A$

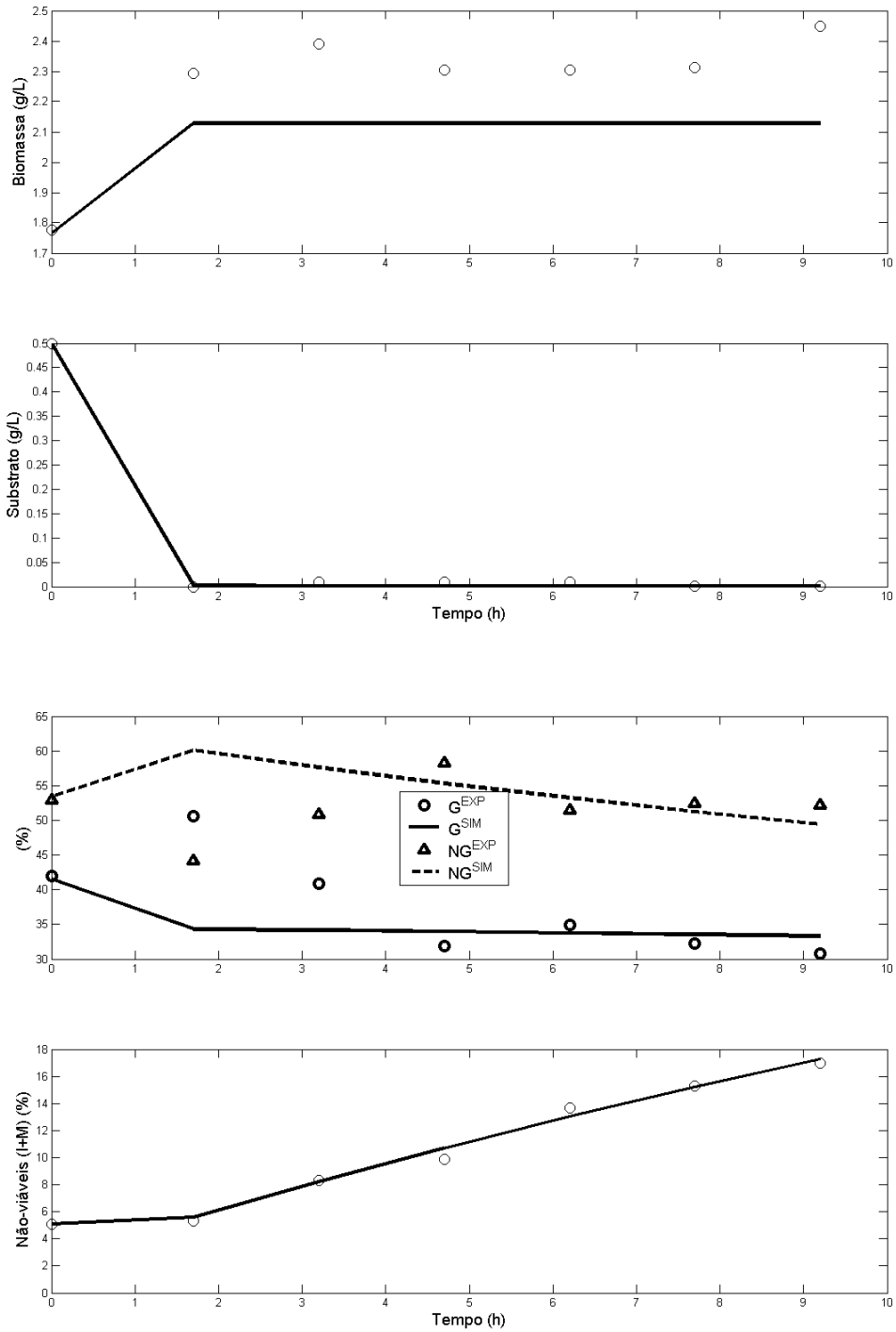

Figura 6.3 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-04: $ASPBM_A$

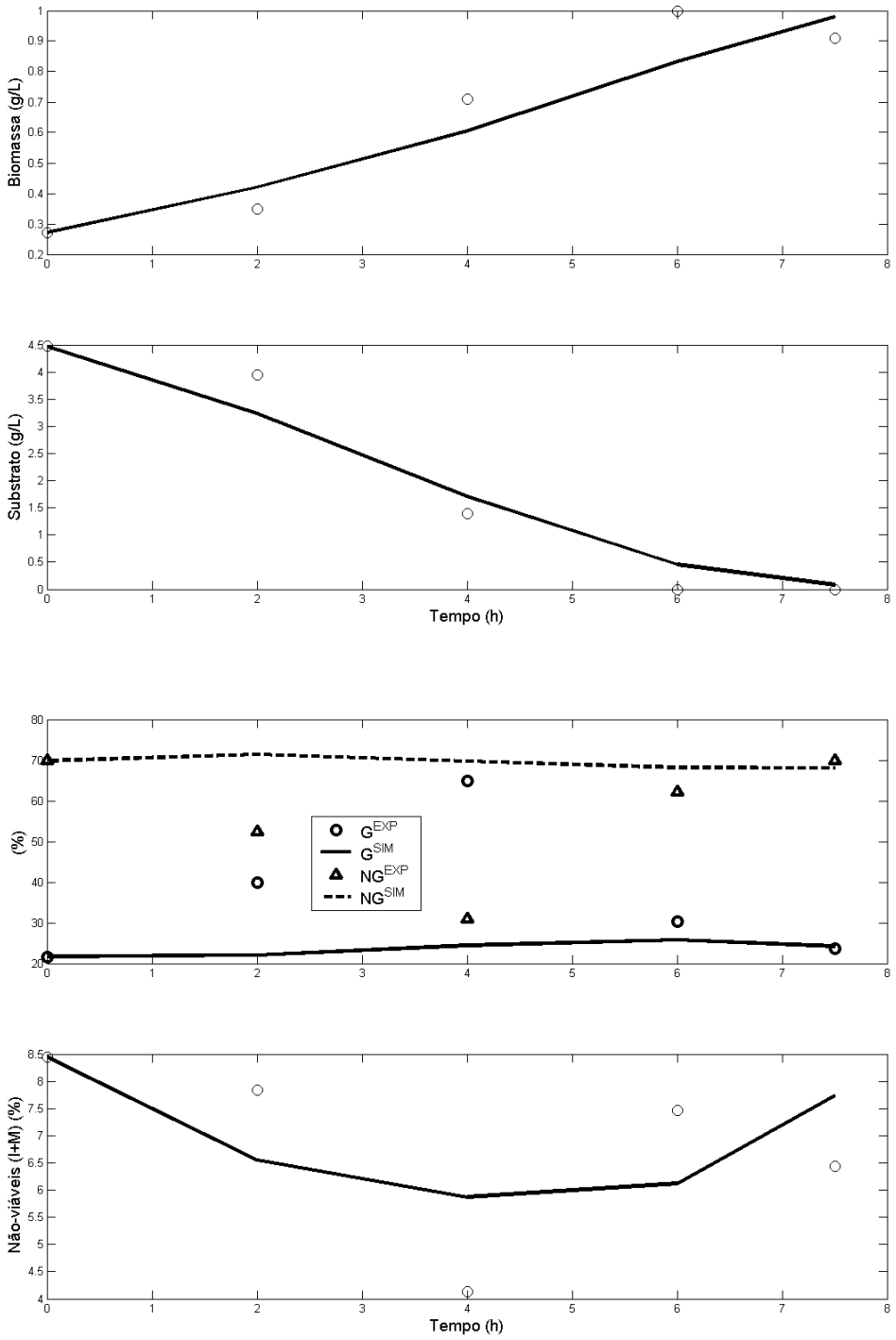

Figura 6.4 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-N1: $ASPBM_A$

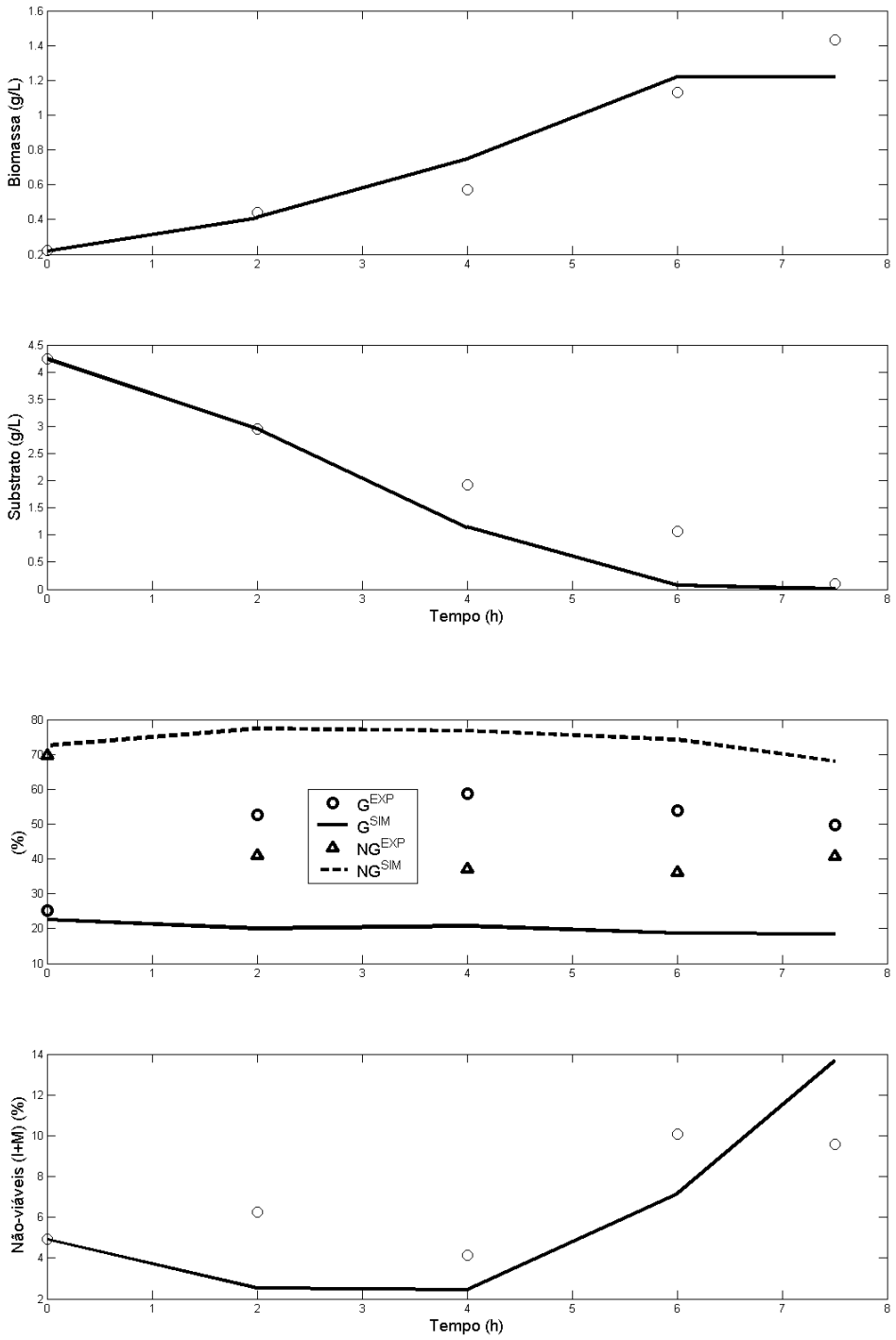

Figura 6.5 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A1: $ASPBM_A$

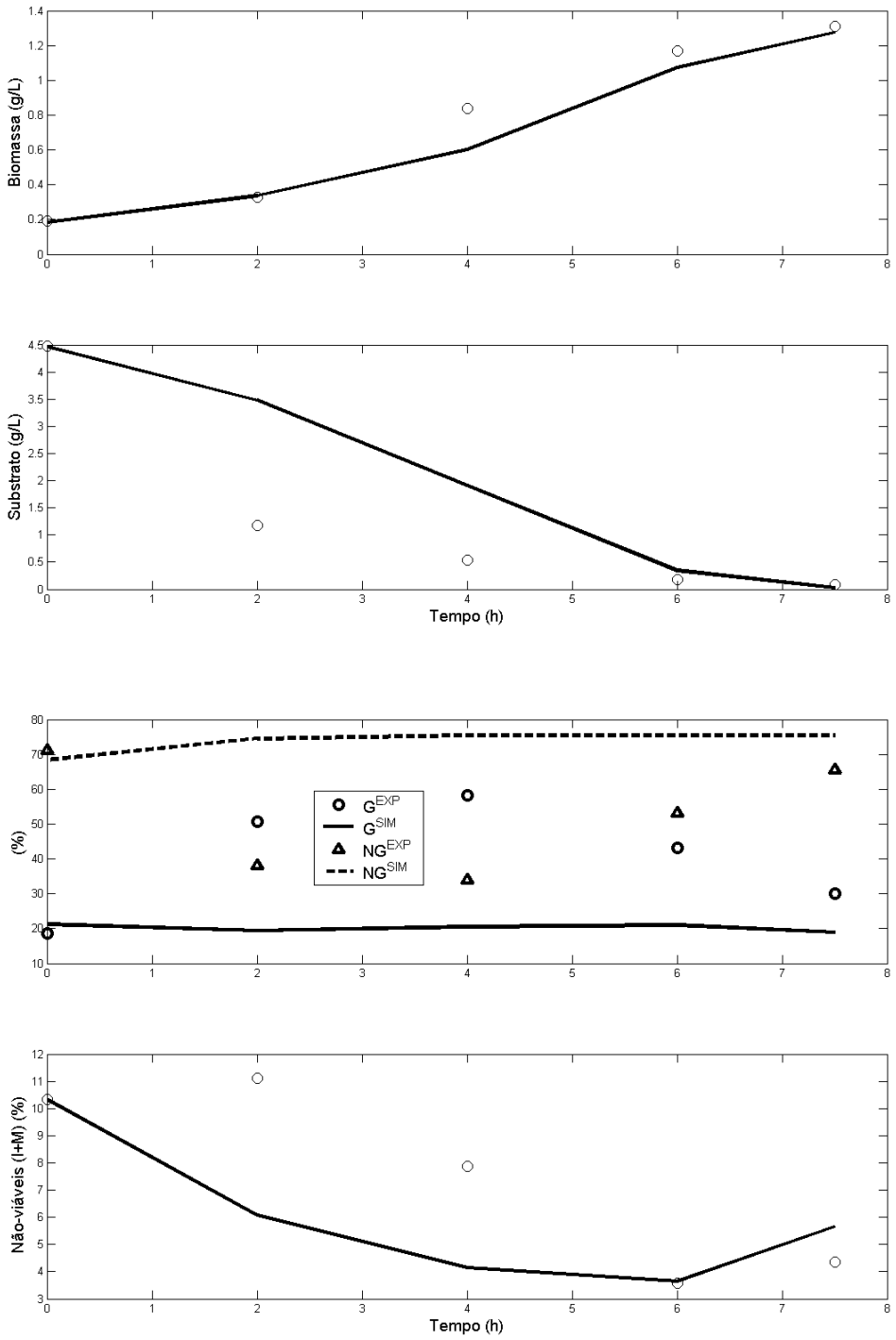

Figura 6.6 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A6: $ASPBM_A$

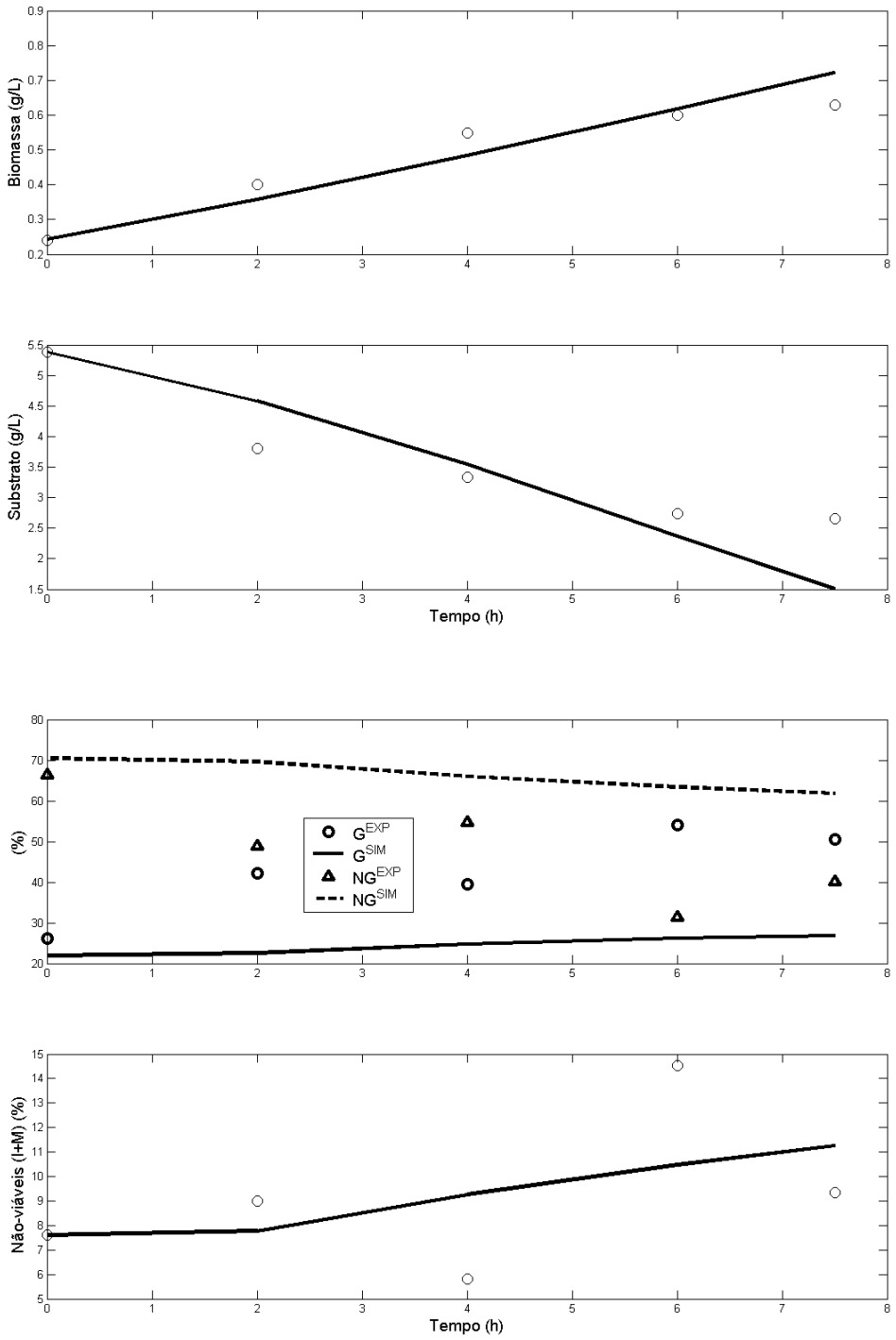

Figura 6.7 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-O3: $ASPBM_A$

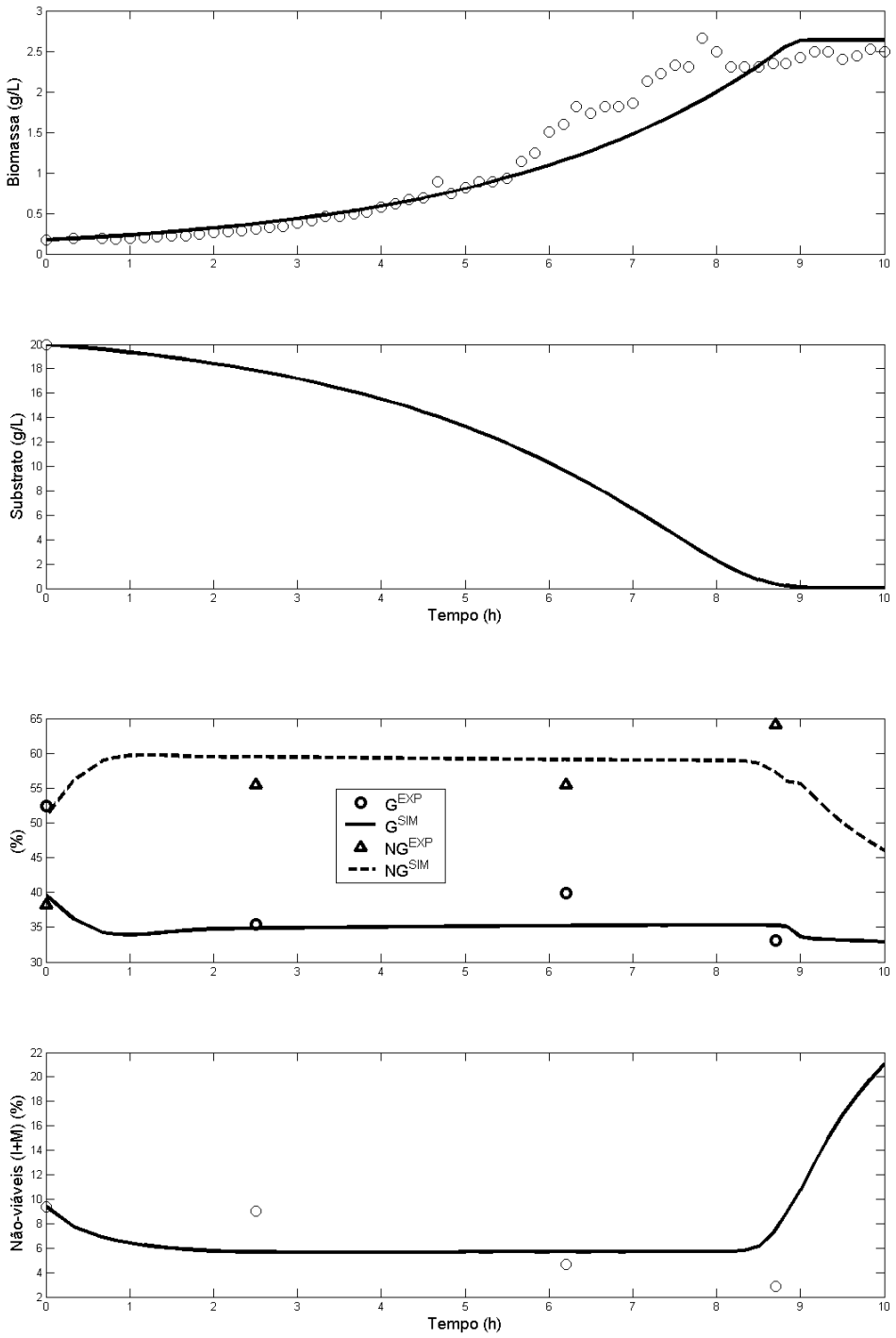

Figura 6.8 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-01: $ASPBM_B$

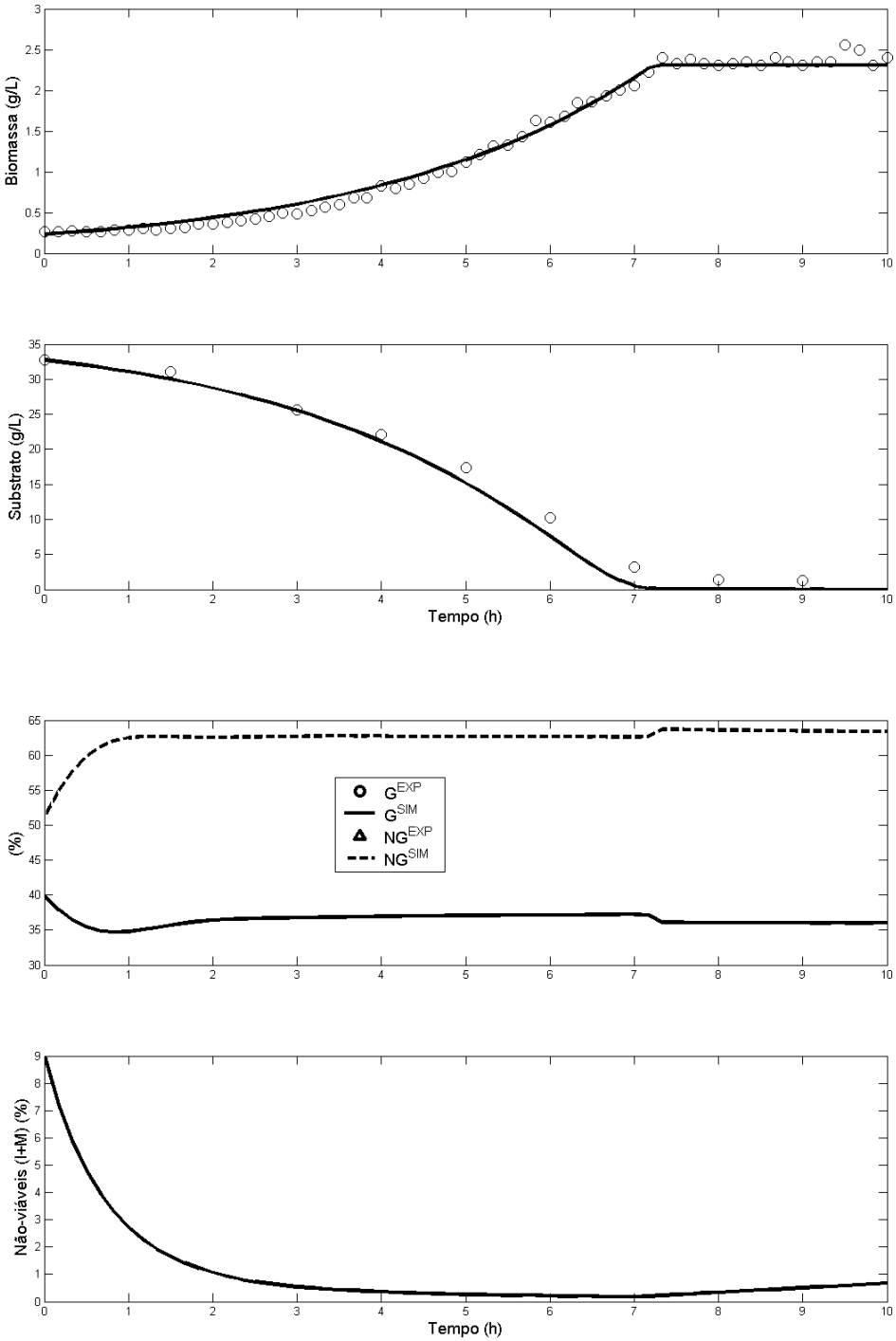

Figura 6.9 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-02: $ASPBM_B$

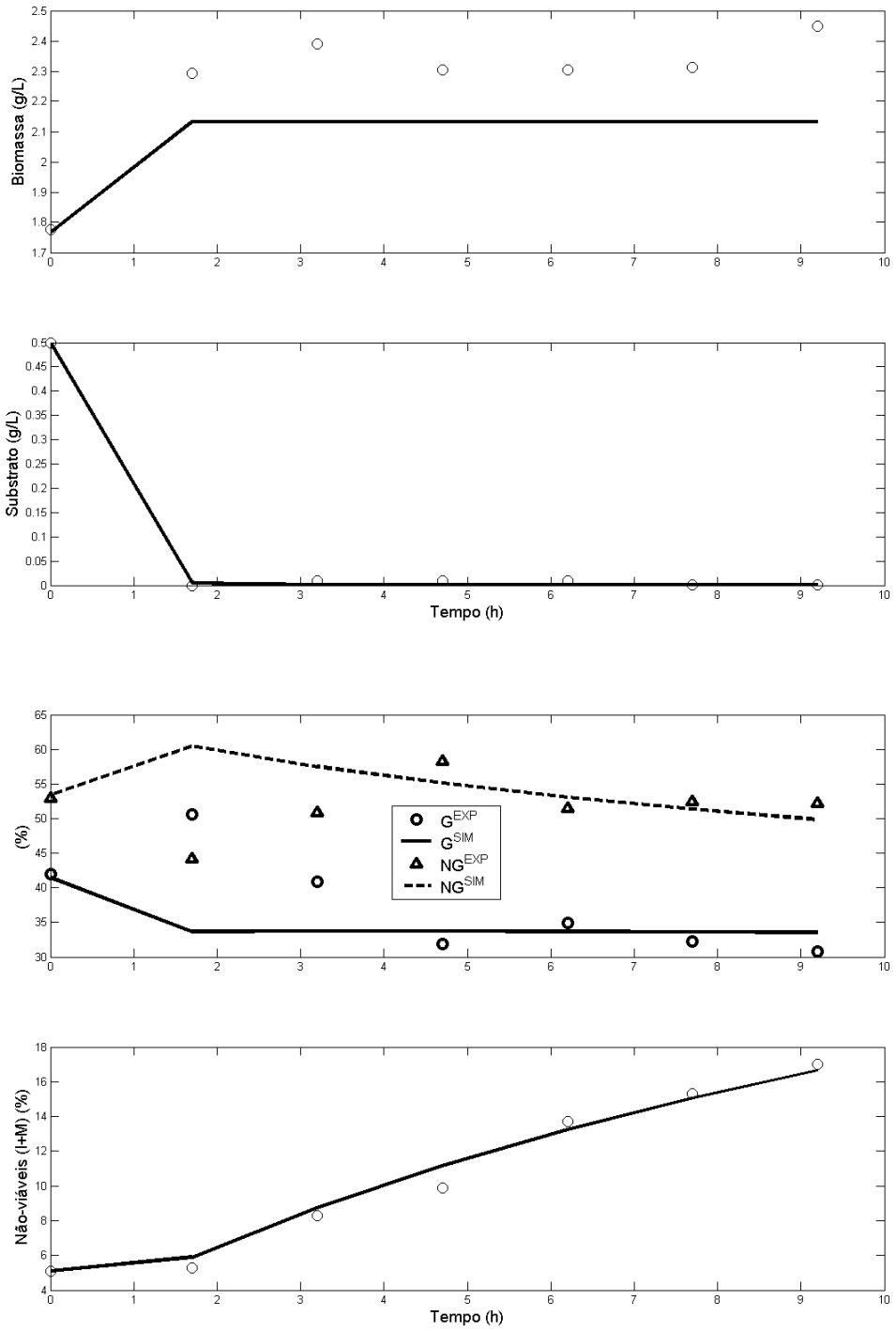

Figura 6.10 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento BR-04: $ASPBM_B$

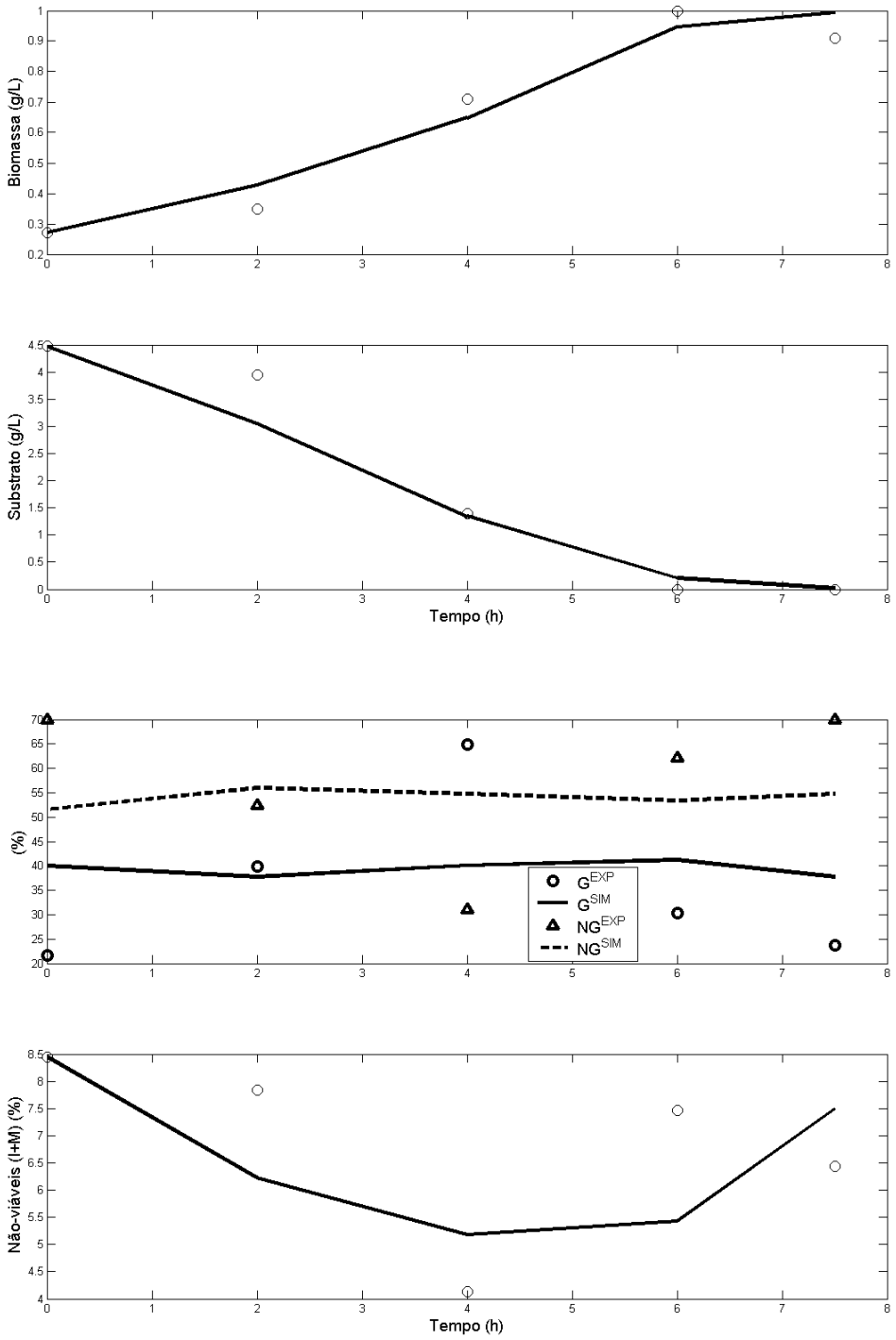

Figura 6.11 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-N1: $ASPBM_B$

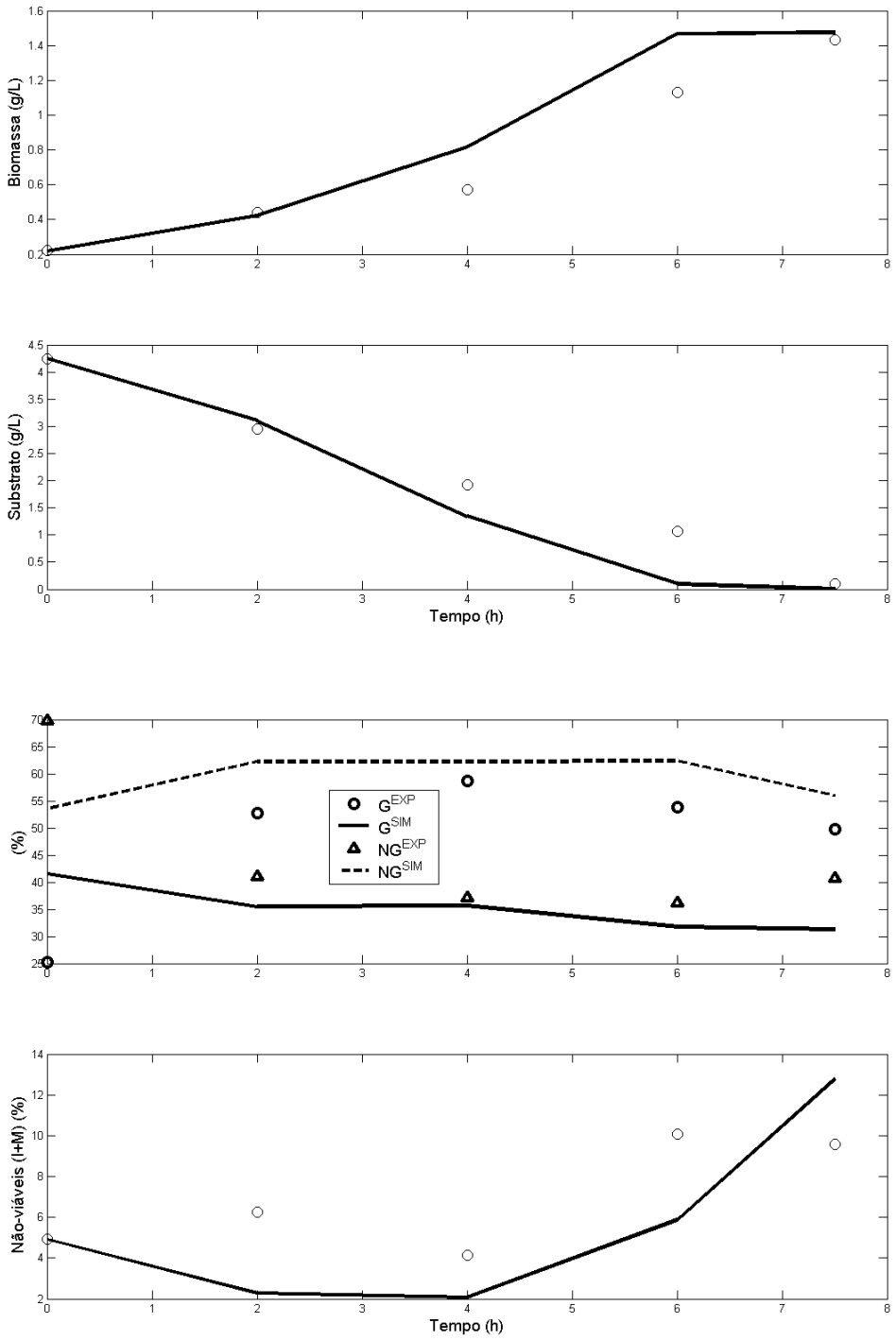

Figura 6.12 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A1: $ASPBM_B$

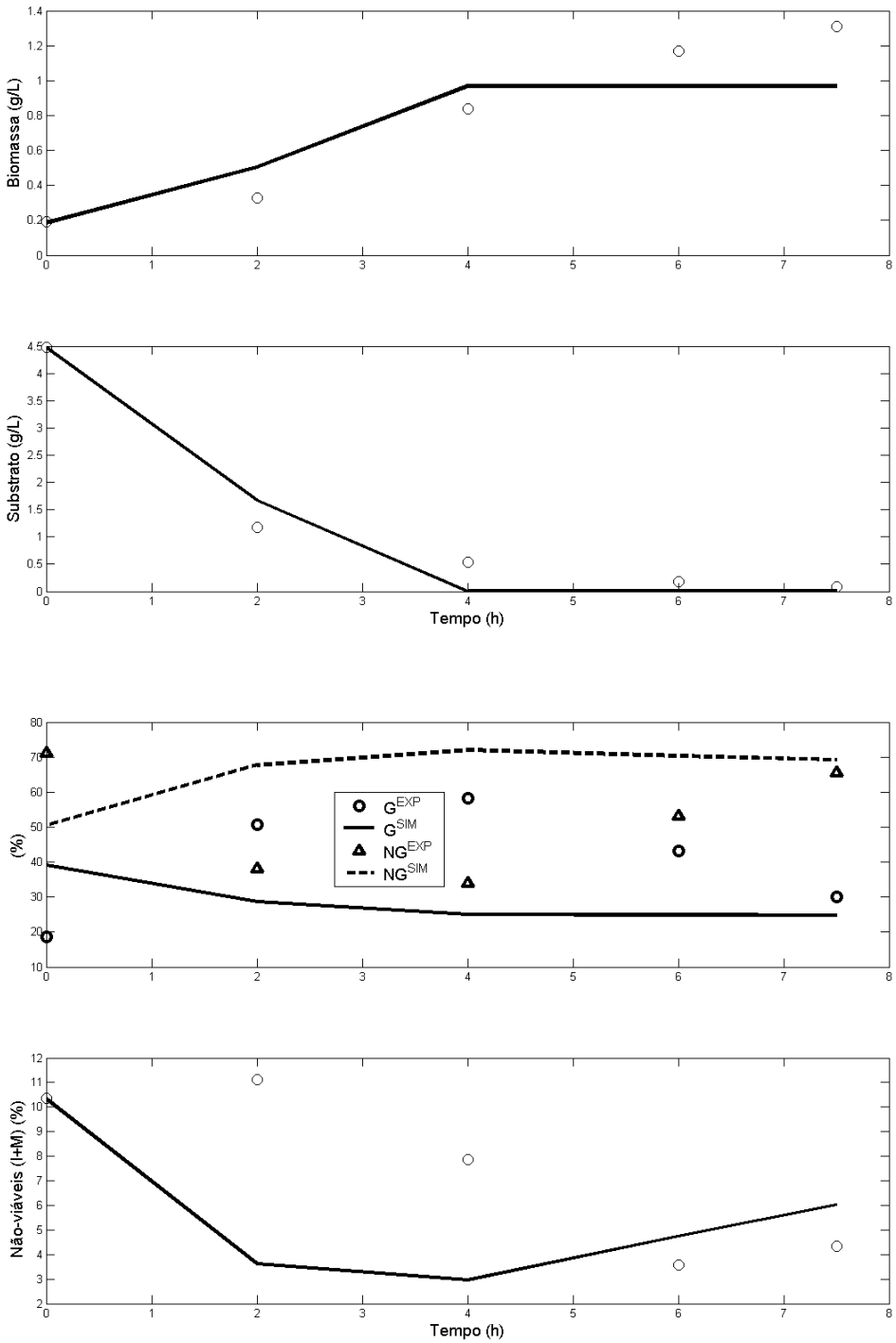

Figura 6.13 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-A6: $ASPBM_B$

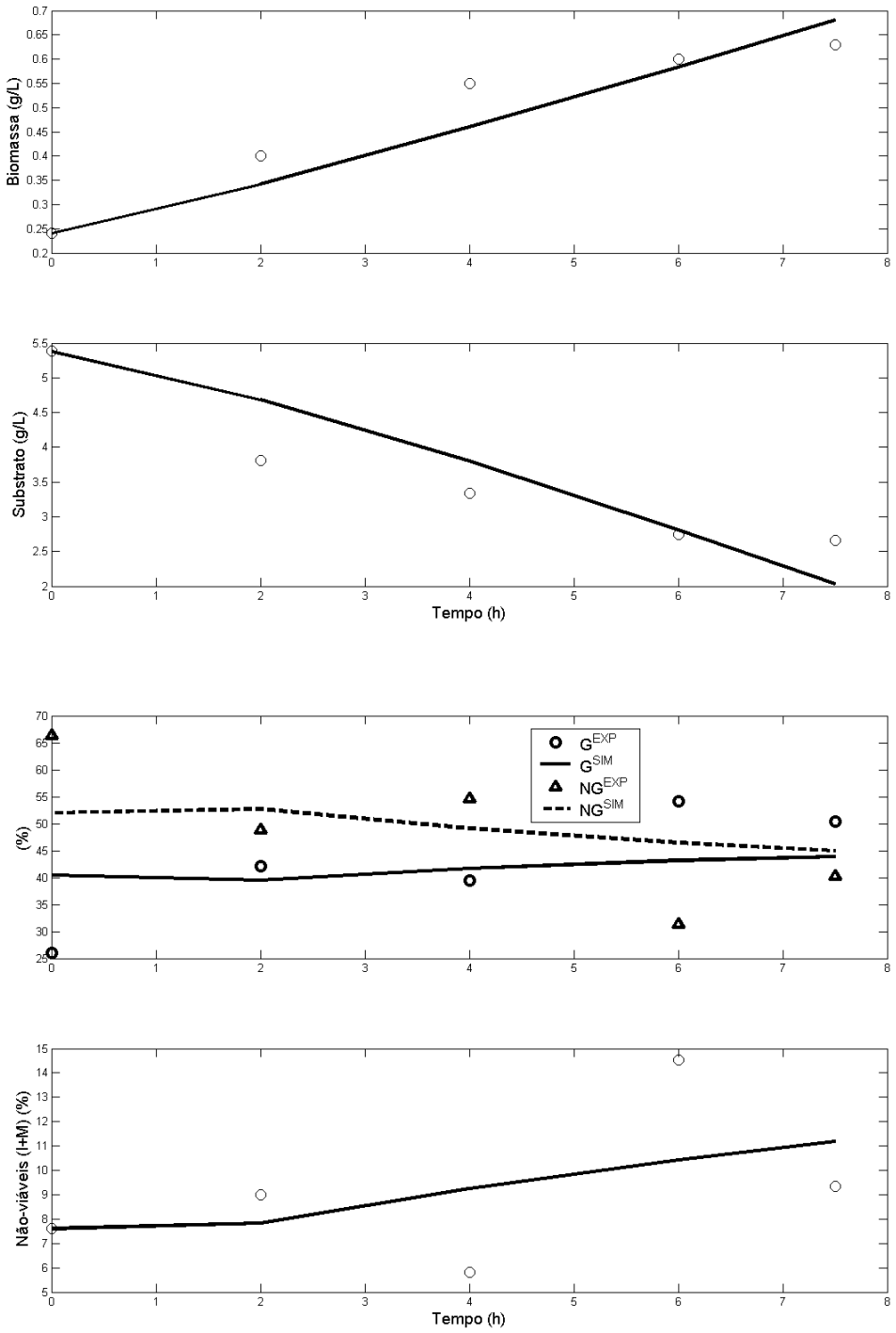

Figura 6.14 – Ajuste de parâmetros usando dados do experimento PT-O3: $ASPBM_B$

Para ilustrar as distribuições de células produzidas pelo modelo, com os parâmetros fixados (Tabela 5.1), são apresentados nas Figuras 6.15 a 6.20 os resultados de simulação do $ASPBM_B$ de uma batelada aerada (O = 1) com uma duração de 14 horas, usando os parâmetros ajustados para BR-04 (Tabela 6.2), sob as condições iniciais S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L. Devido à virtual ausência de células com idade superior a 10 ciclos, os resultados são mostrados para um espaço de idades $0 \leq a \leq 10$.

A Figura 6.15 mostra que, sob os parâmetros ajustados para BR-04, a depleção de substrato gera uma população de inativas muito superior à população de mortas, o que é um comportamento desejável do modelo. Na Figura 6.16, pode-se verificar a sincronia entre a depleção de substrato e a estabilização da biomassa (esta ocorre antes que S seja totalmente consumido, pois as células ativas continuarão consumindo o restante do substrato, apesar de impedirem a progressão do ciclo celular).

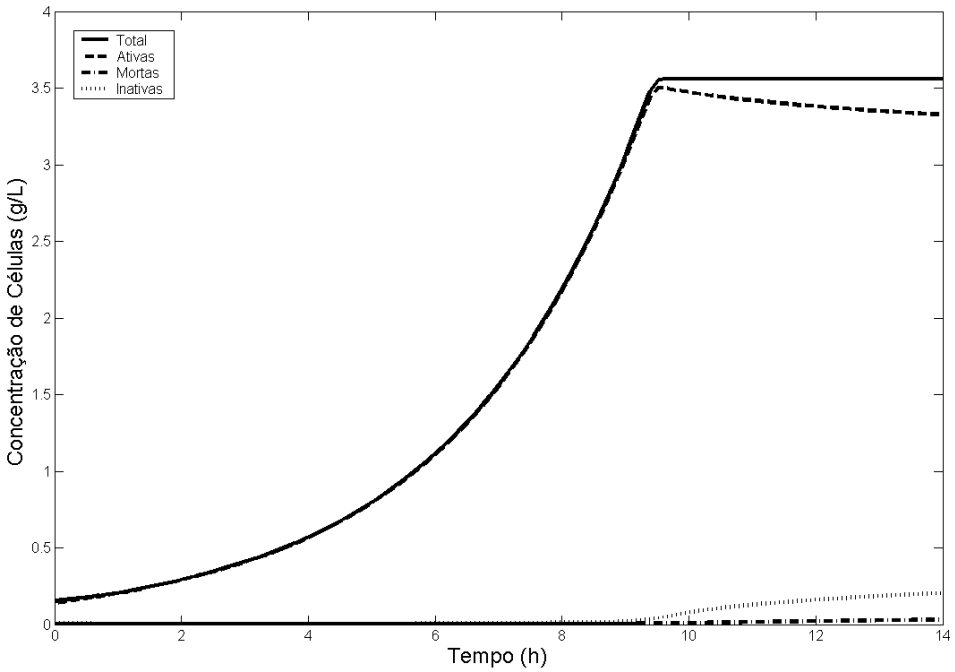

Figura 6.15 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Concentração das classes de células (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)

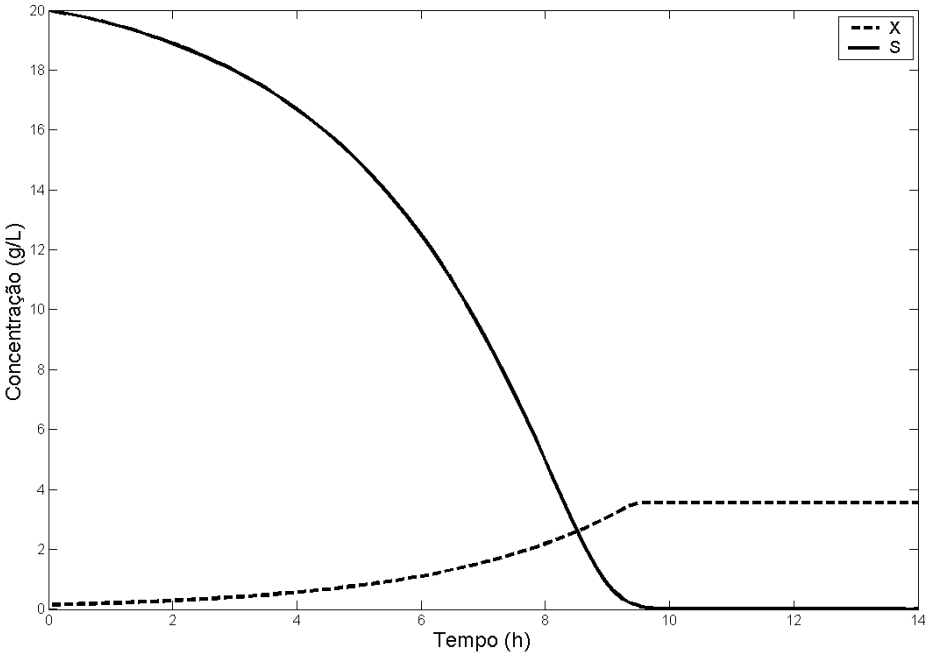

Figura 6.16 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Concentrações de biomassa e substrato (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)

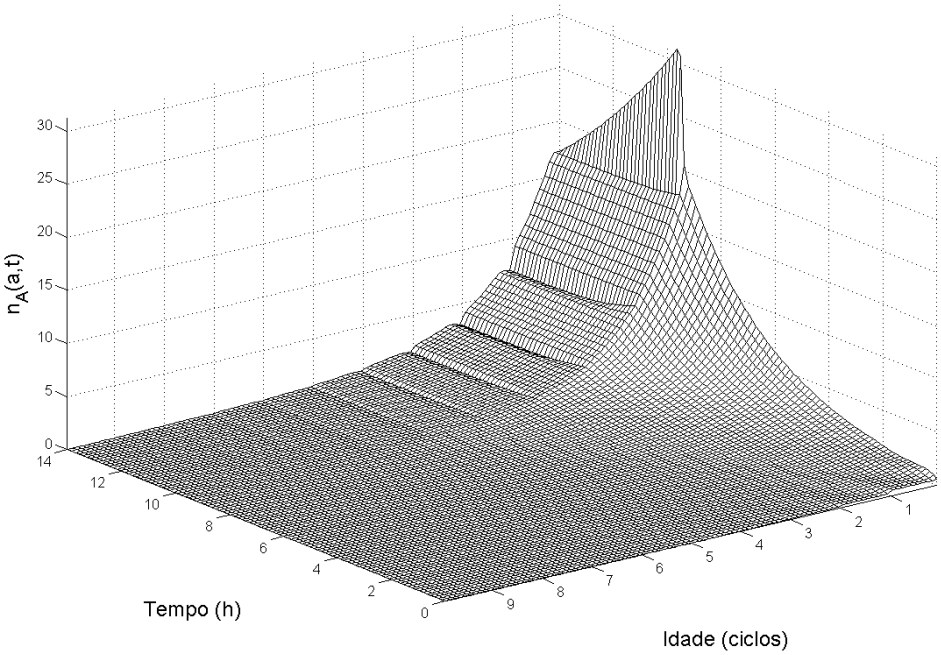

Figura 6.17 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição de células ativas (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)

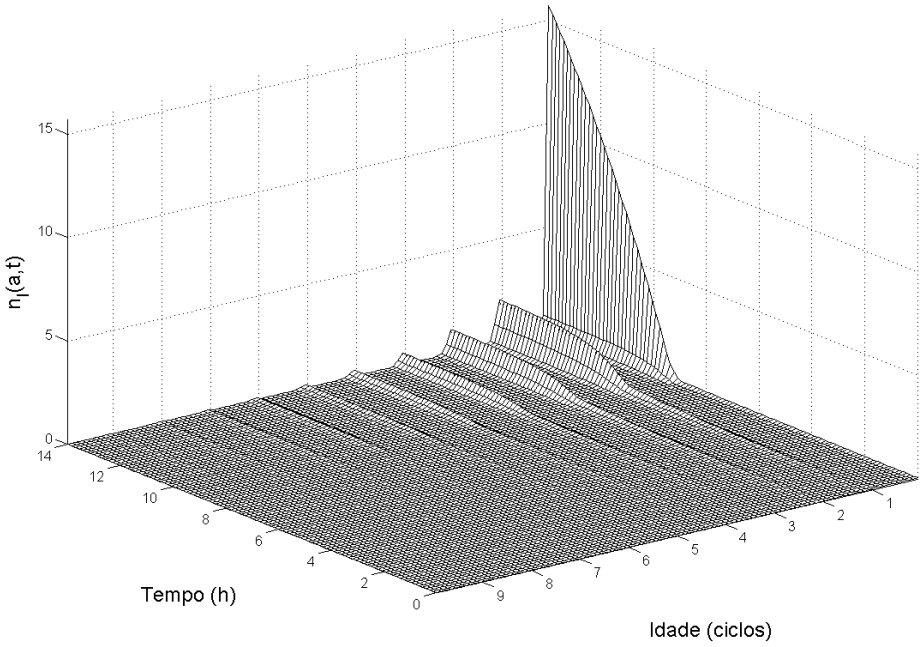

Figura 6.18 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição de células inativas (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)

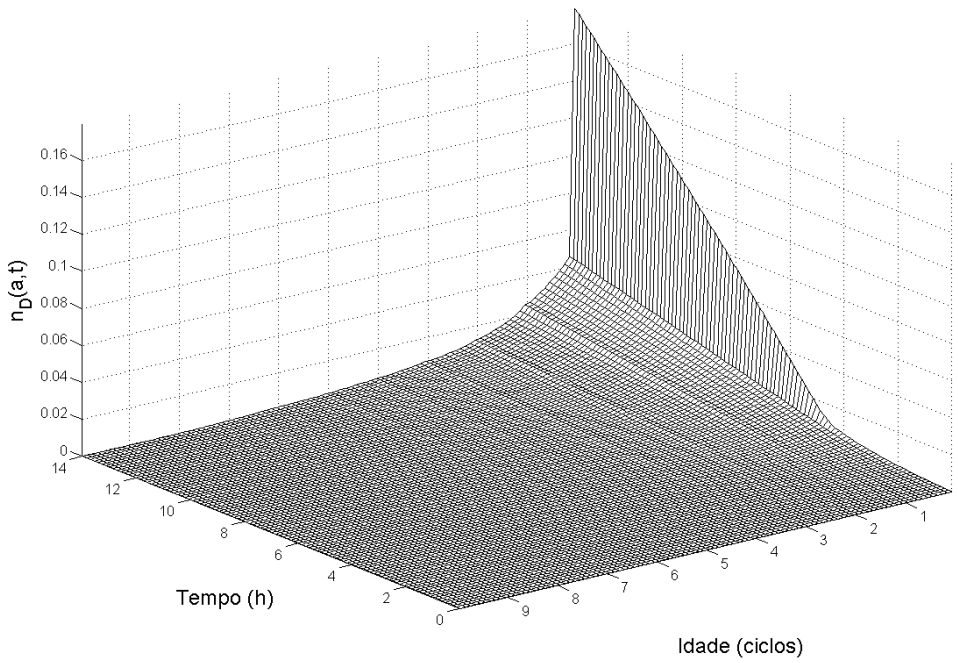

Figura 6.19 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição de células mortas (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)

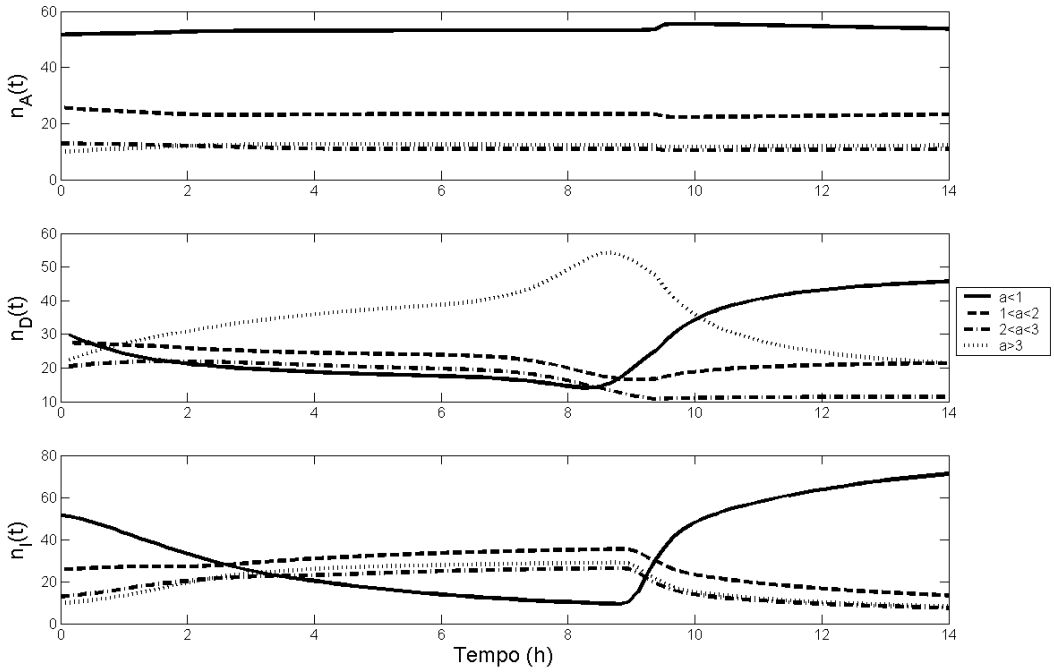

Figura 6.20 – Simulação de batelada $ASPBM_B$ + parâmetros BR-04: Distribuição idades (S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L, O = 1)

As distribuições de células inativas e mortas (Figuras 6.18 e 6.19) se concentram em células recém-nascidas, após a depleção do substrato, pois a população de células ativas é rica em recém-nascidas e as células não estão mais progredindo no ciclo celular (para valores de substrato $S < \gamma_S^L$). Este enriquecimento das populações inativa e morta em recém-nascidas pode ser verificado também na Figura 6.20.

O efeito da oferta de oxigênio sobre a dinâmica populacional de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser ilustrado através de simulações de culturas em batelada, mostradas na Figura 6.21. Até um certo valor de O, o efeito de uma oferta aumentada de oxigênio às células é positivo, aumentando as taxas de crescimento da biomassa e de consumo de substrato, como mostram as curvas para valores $0 \leq O \leq 5$. Para valores de $O \geq 10$, a taxa de crescimento é progressivamente reduzida, até tornar-se praticamente nula para $O = 30$.

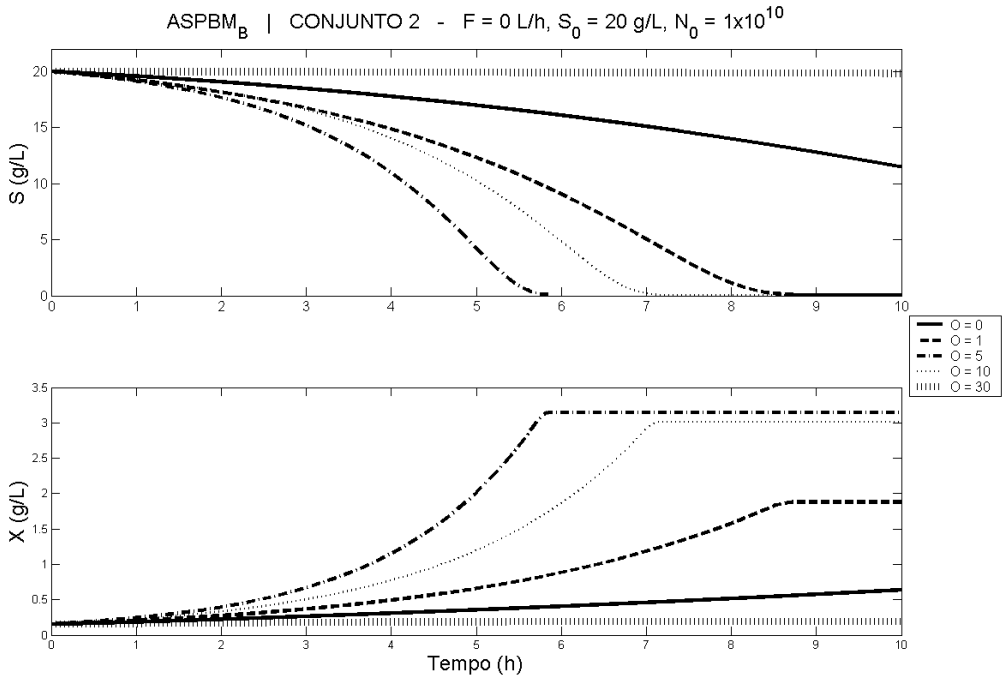

Figura 6.21 – Simulação ASPBM$_B$ + parâmetros CONJUNTO 2: Efeito da oferta de oxigênio sobre X e S (batelada, S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L)

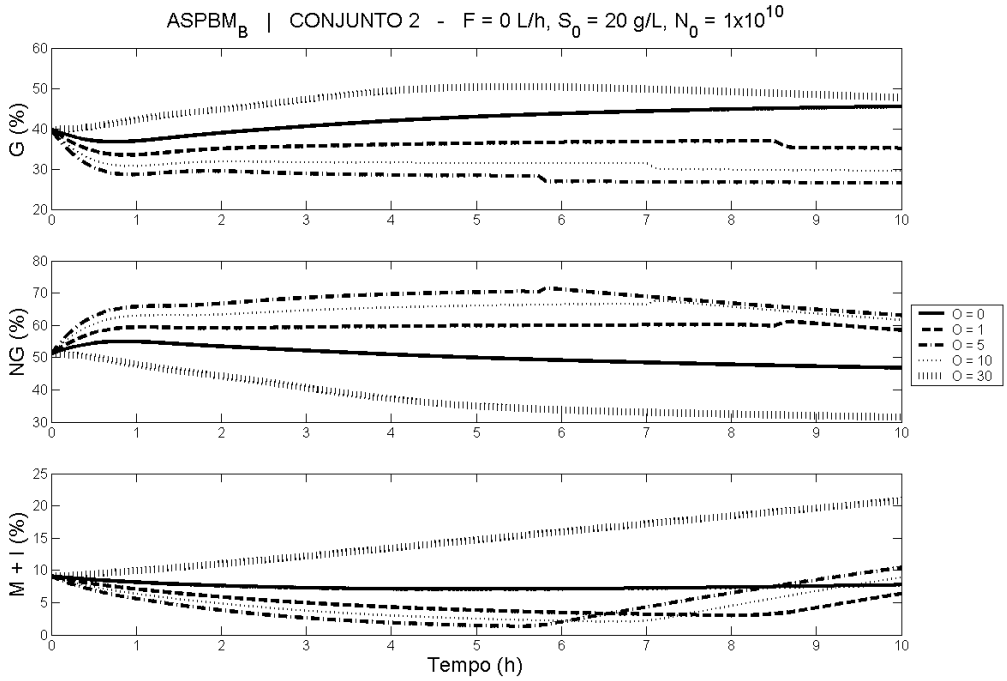

Figura 6.22 – Simulação ASPBM$_B$ + parâmetros CONJUNTO 2: Efeito da oferta de oxigênio sobre G, NG e viabilidade celular (batelada, S_0 = 20 g/L e N_0 = 1 x 10^{10} cél/L)

O modelo prevê frações de células gemulantes menores para a faixa de valores de *O* que aumenta a taxa de crescimento da biomassa, como é mostrado na Figura 6.22. Em um ambiente em que a taxa de divisão é acelerada, a população fica mais concentrada em recém-nascidas e as células que acabam de se dividir tornam-se não-gemulantes. O efeito inverso pode ser observado para os valores de *O* que diminuem muito a taxa de divisão.

A Figura 6.22 também apresenta o efeito da oferta de oxigênio sobre as taxas de inativação e morte. Ambas são reduzidas nas culturas em que a taxa de divisão é acelerada, até a exaustão do substrato. Um ambiente com alta oferta de oxigênio $O = 10$ apresenta taxa de crescimento diminuída, porém a taxa de morte ainda não é aumantada significativamente. Entretanto, um ambientes extremamente oxidativo caracterizado por um valor $O = 30$ provoca aceleração da taxa de morte celular, resultando em uma alta fração de mortas.

7 – RESULTADOS: TESTES DO MODELO

Em uma segunda etapa, foi avaliada a capacidade de extrapolação do modelo, através da obtenção de parâmetros em ajustes utilizando conjuntos de experimentos, e testando a qualidade das predições do modelo contra outros experimentos.

Para os ajustes, foram separados os experimentos usados para ajustes individuais no Capítulo 6 em dois conjuntos, de forma a agrupar os experimentos conduzidos em bases comparáveis (especialmente, garantindo que todos foram conduzidos com células de mesma cepa e condições de pré-cultivo). Os conjuntos são:

(i) *CONJUNTO 1:* experimentos BR-01, BR-02 e BR-04; e

(ii) *CONJUNTO 2:* experimentos PT-N1, PT-A1, PT-A6 e PT-O3.

7.1 – AJUSTE DE PARÂMETROS COM CONJUNTOS DE EXPERIMENTOS

Os ajustes foram realizados na forma já descrita na seção 5.4 e utilizada nos resultados mostrados no Capítulo 6. Os parâmetros ajustados estão mostrados nas Tabelas 7.1 e 7.2.

Tabela 7.1 – Valores ajustados usando dados grupos de experimentos: $ASPBM_A$

Parâmetro	**CONJUNTO 1** **BR-01 + BR-02 + BR-04**	**CONJUNTO 2** **PT-N1 + PT-A1 + PT-A6 + PT-O3**
ρ^B	10,7972	9,0573
ρ^{D_A}	0,003631	0,004426
ρ^I	0,1663	0,08955
ρ^{D_I}	0,002828	0,006586
ρ^A	0,8192	0,003963
$\mu_{ANAEROBIC}$	*3,5815*(*)	3,5815
$\mu_{AEROBIC}$	6,5867	4,4572

Tabela 7.2 – Valores ajustados usando dados grupos de experimentos: $ASPBM_B$

Parâmetro	**CONJUNTO 1** **BR-01 + BR-02 + BR-04**	**CONJUNTO 2** **PT-N1 + PT-A1 + PT-A6 + PT-O3**
ρ^B	11,7448	10,7684
ρ^{D_A}	0,001068	0,001628
ρ^I	0,1823	0,09695
ρ^{D_I}	0,001182	0,06605
ρ^A	0,9805	0,001886
$\mu_{ANAEROBIC}$	4,3255(*)	4,3255
$\mu_{AEROBIC}$	7,8015	7,2766

(*) Valor não-ajustado; para a simulação de outros conjuntos de dados, incluindo condições anóxicas (PT-N1 e PT-N6), valor de $\mu_{ANAEROBIC}$ foi igualado ao valor ajustado usando o grupo de dados PT-N1 + PTA1 + PTA6 + PT-O3

Como os parâmetros obtidos através dos ajustes realizados com o CONJUNTO 1 (todos os experimentos em condições aeradas) foram utilizados para simular posteriormente todos os demais experimentos, o valor de $\mu_{ANAEROBIC}$ utilizado com esses parâmetros foi copiado do valor obtido com o CONJUNTO 2 (que inclui um experimento em condições anóxicas, PT-N1).

Os *resultados gráficos dos ajustes* podem ser visualizados nas Figuras 7.1 a 7.14.

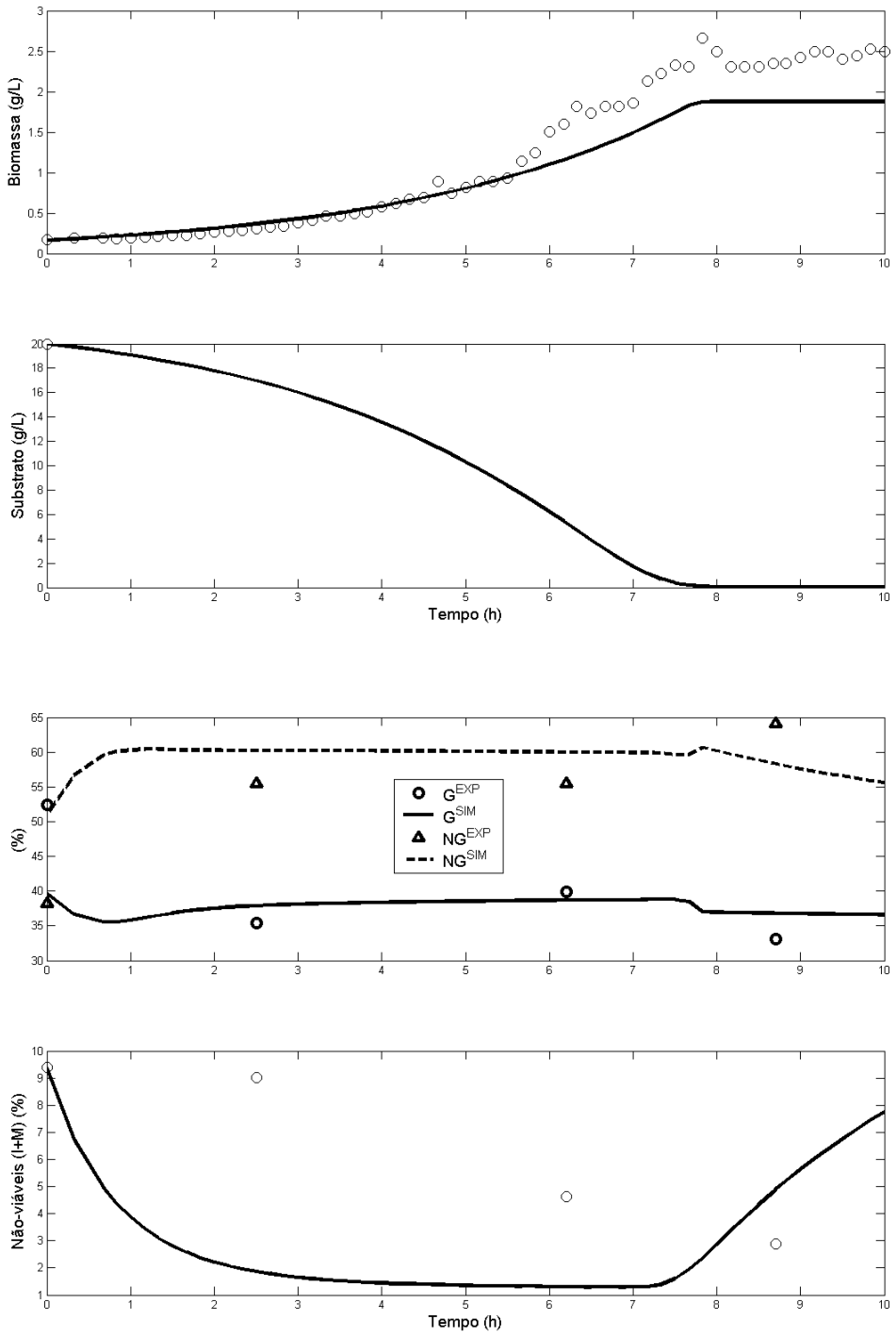

Figura 7.1 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-01: $ASPBM_A$

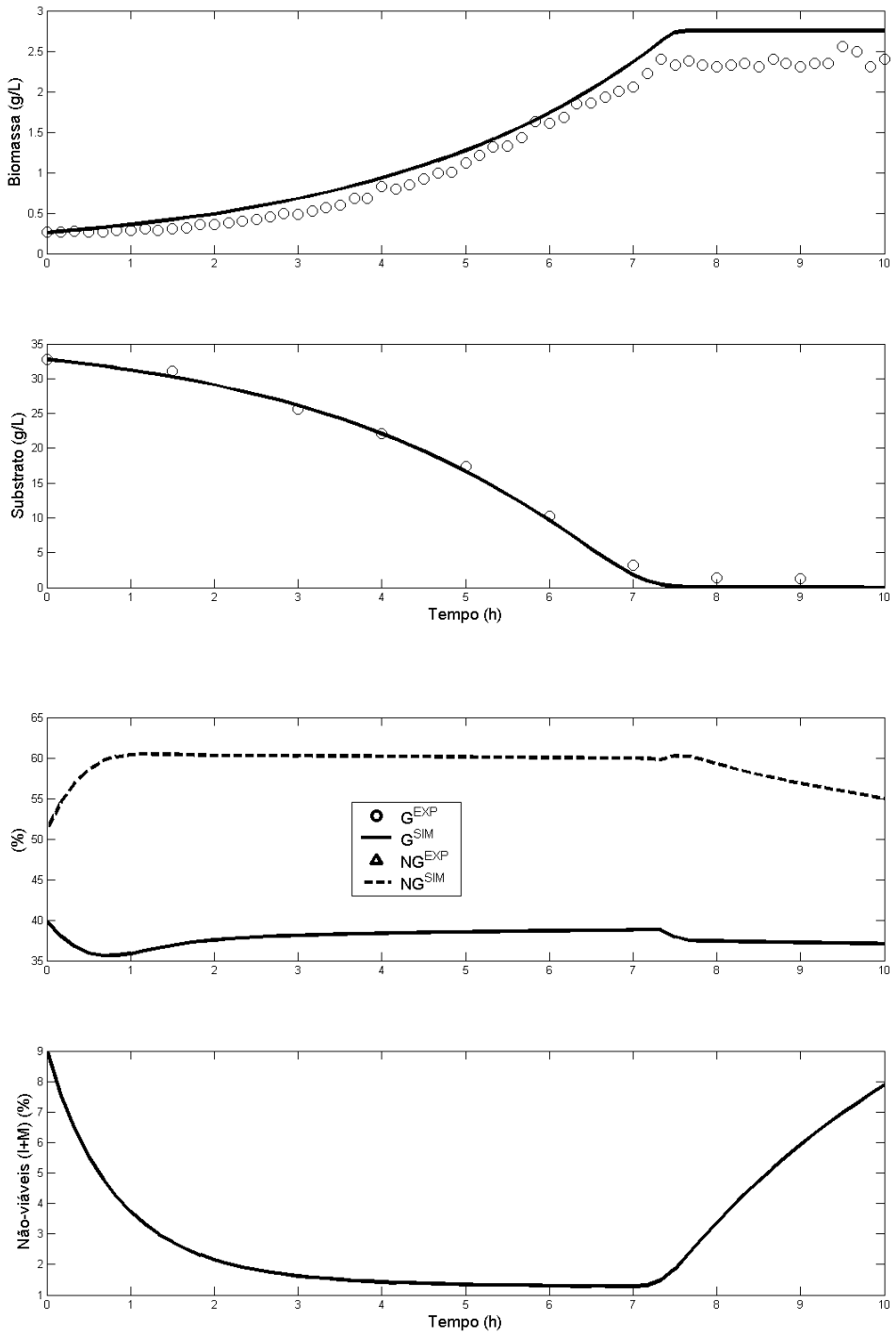

Figura 7.2 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-02: $ASPBM_A$

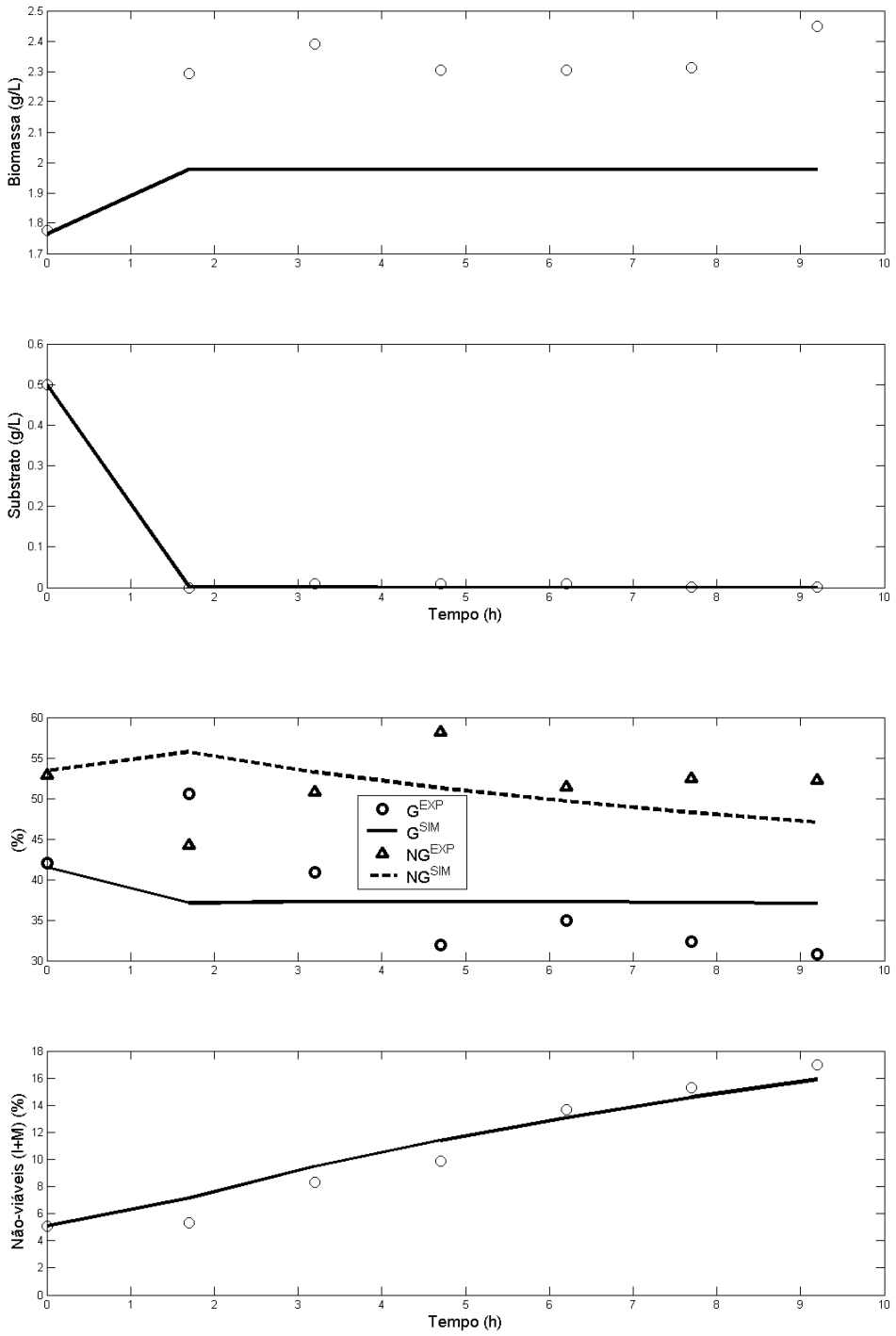

Figura 7.3 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-04: $ASPBM_A$

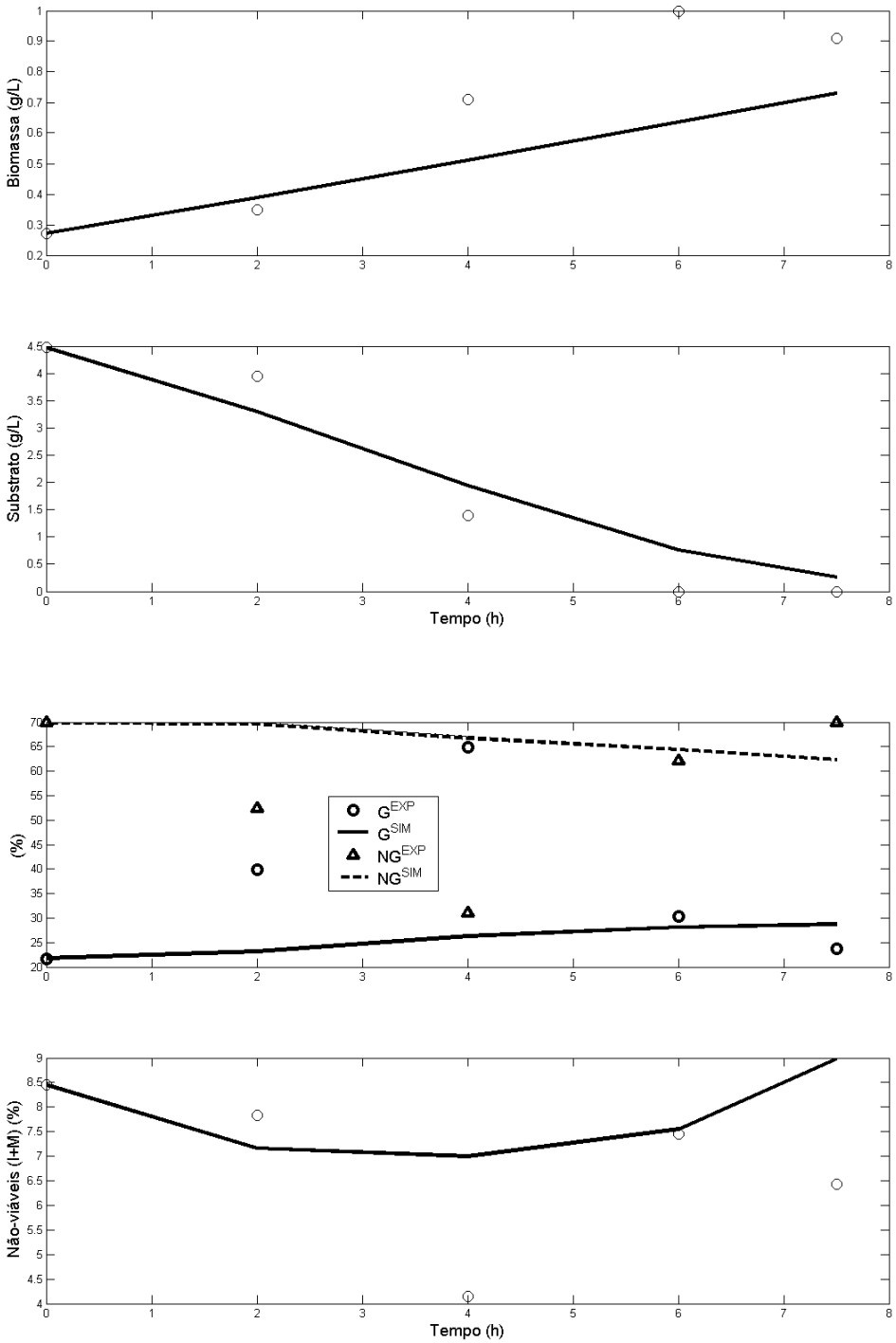

Figura 7.4 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-N1: $ASPBM_A$

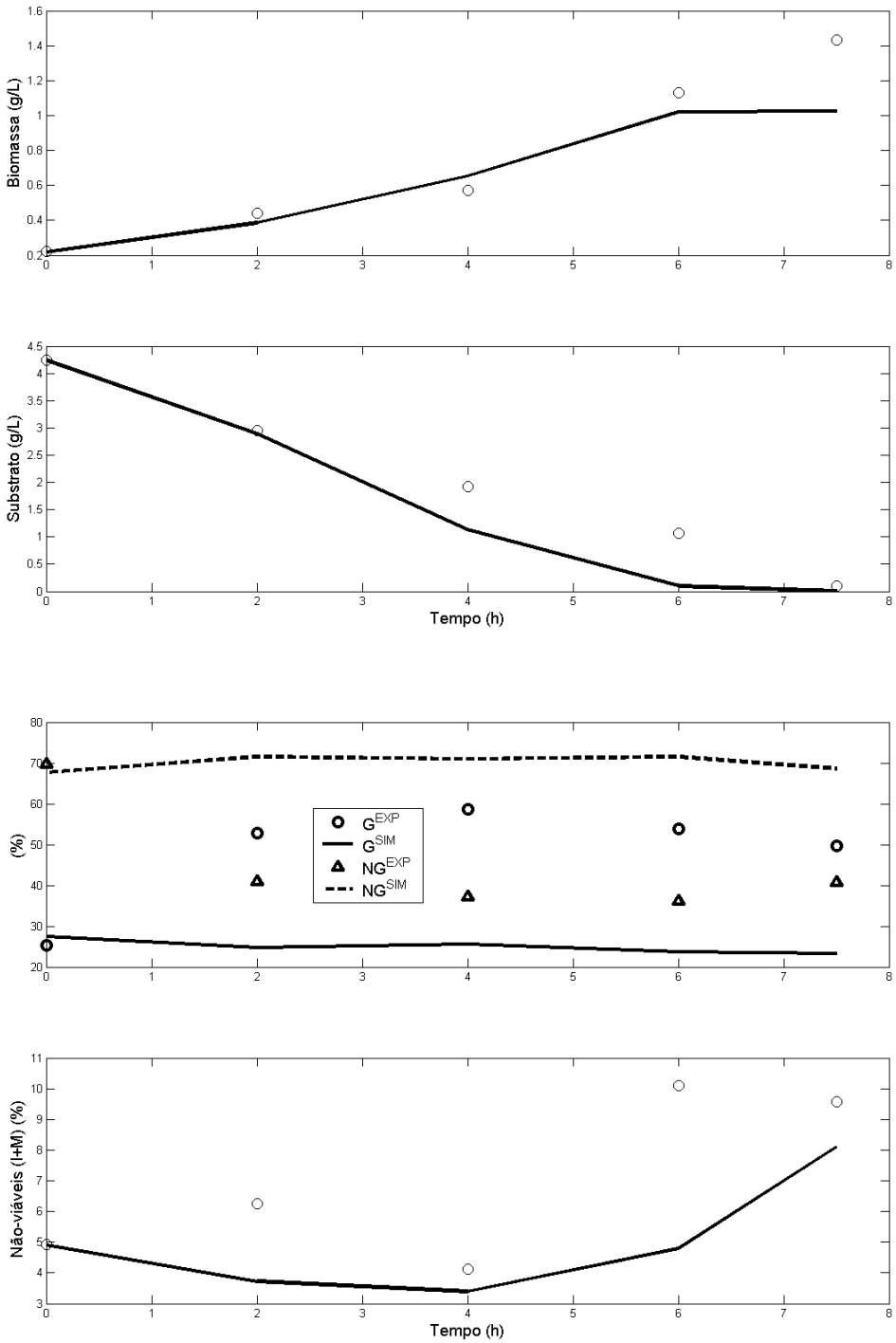

Figura 7.5 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A1: $ASPBM_A$

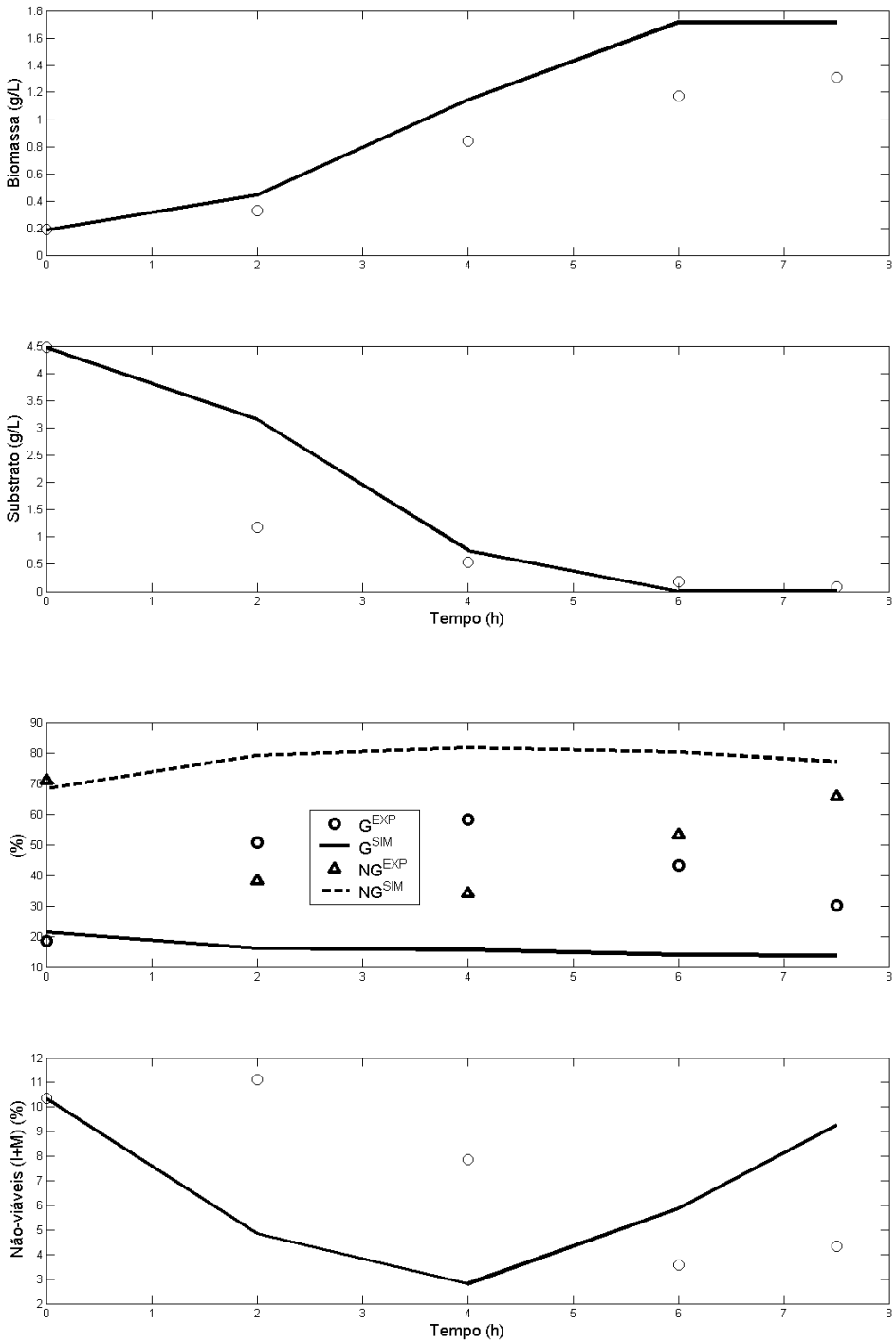

Figura 7.6 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A6: $ASPBM_A$

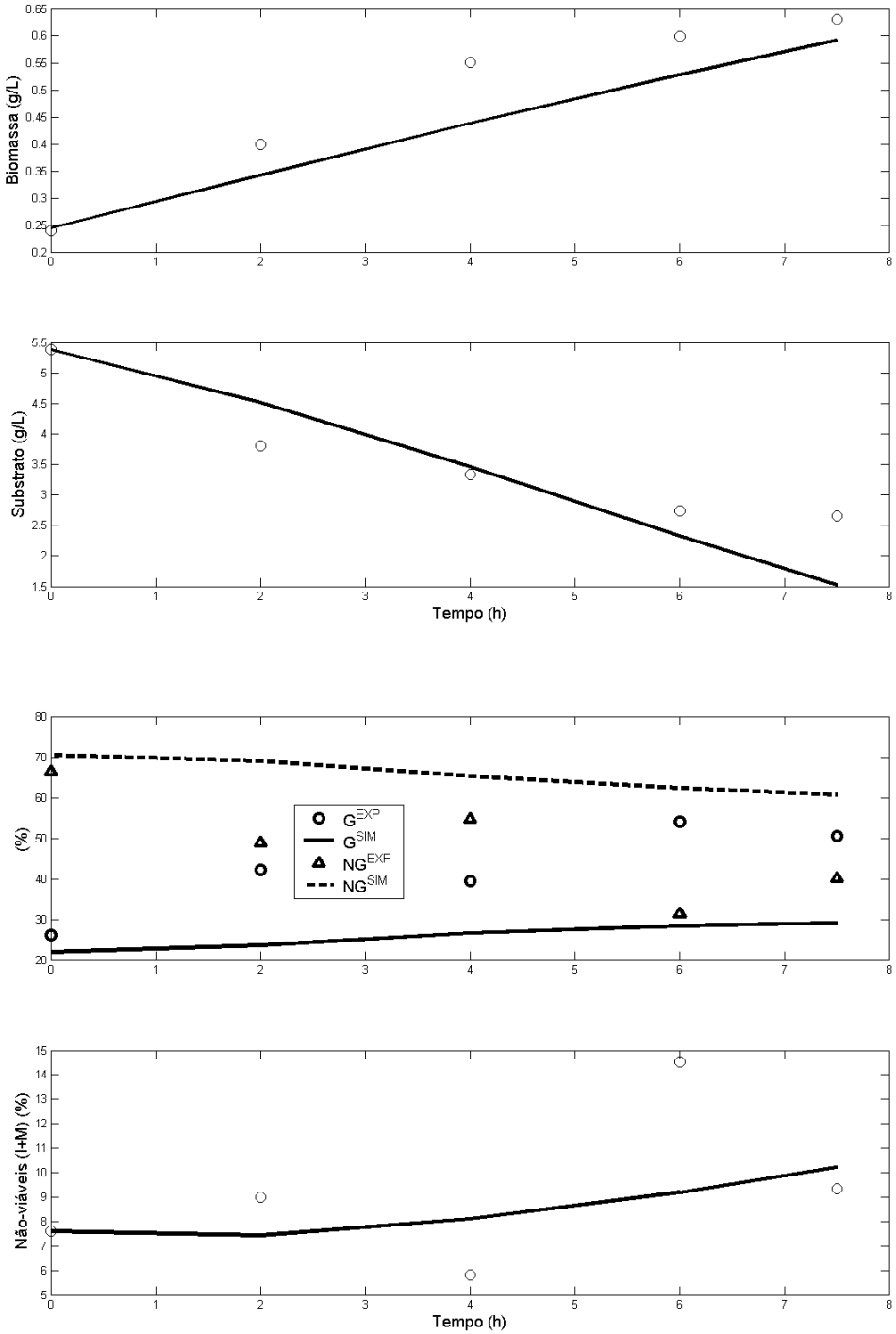

Figura 7.7 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-O3: $ASPBM_A$

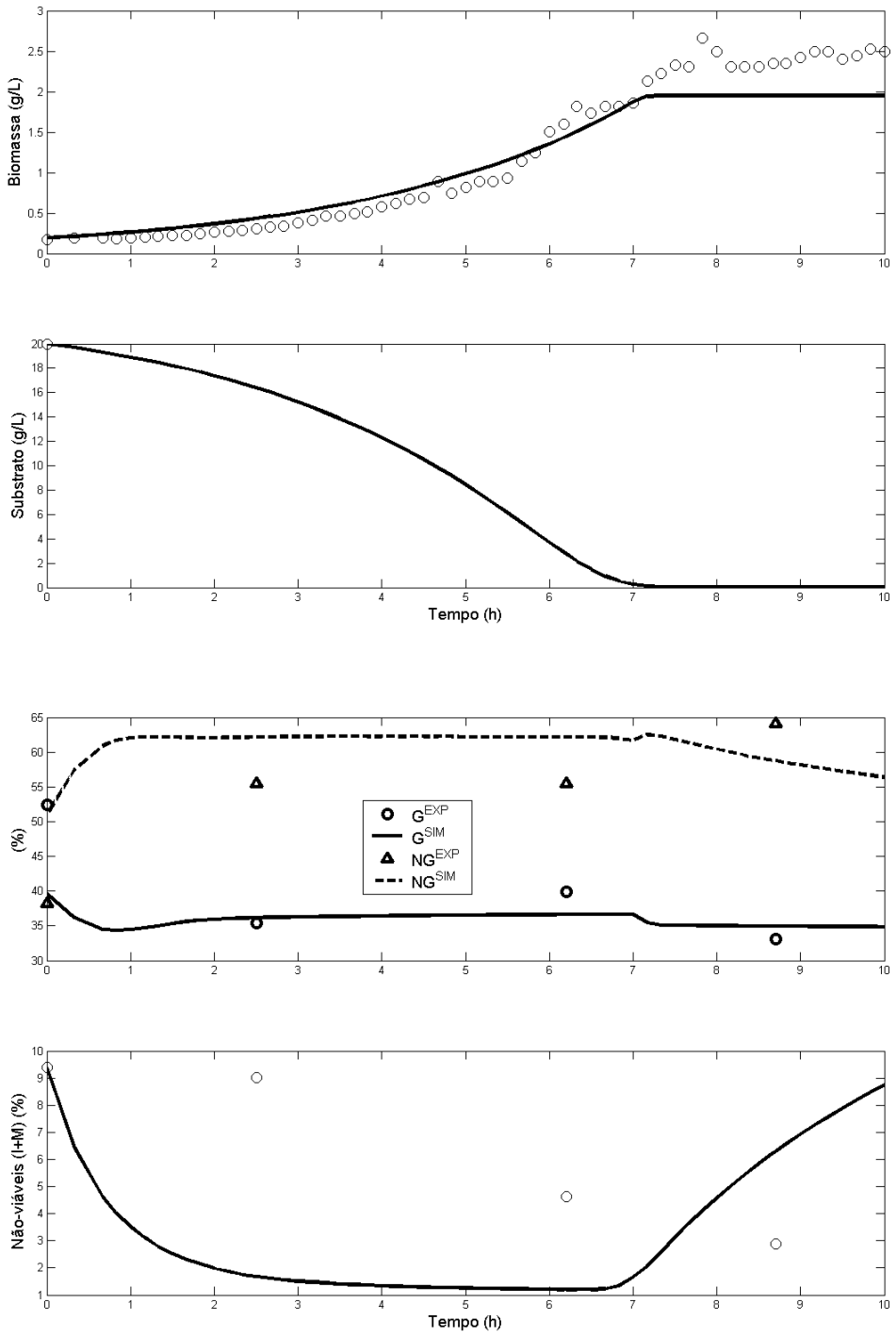

Figura 7.8 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-01: $ASPBM_B$

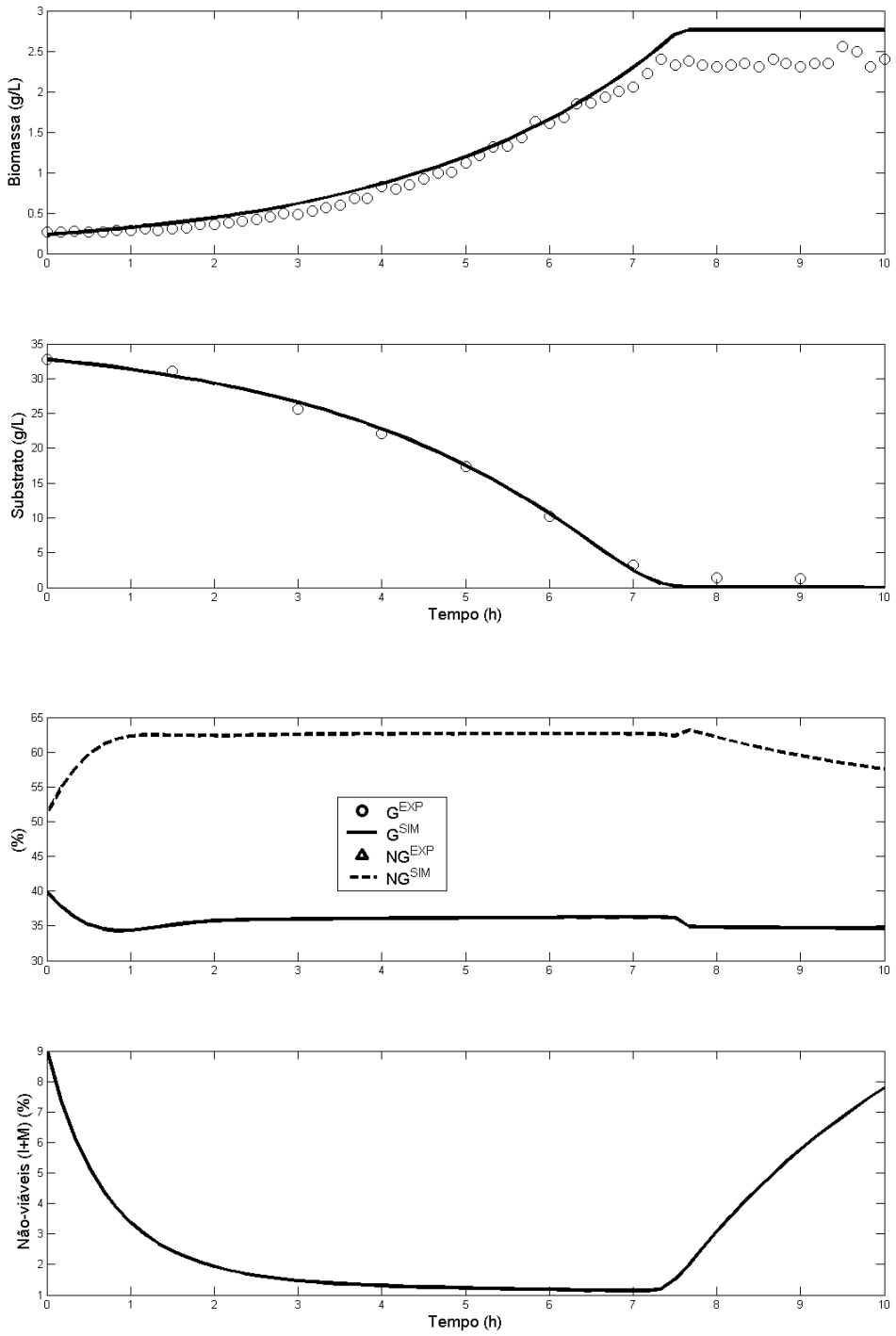

Figura 7.9 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-02: $ASPBM_B$

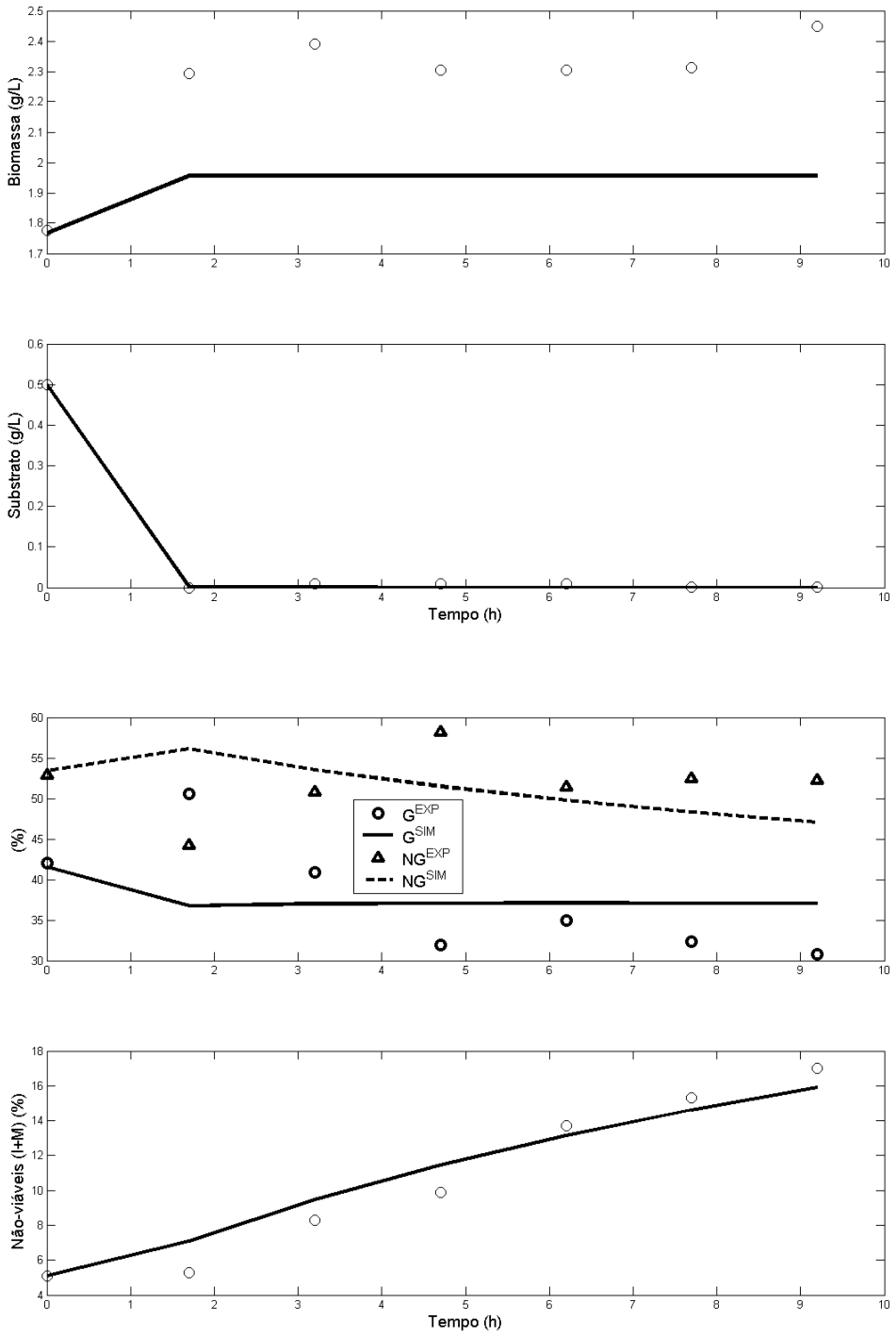

Figura 7.10 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 1, experimento BR-04: $ASPBM_B$

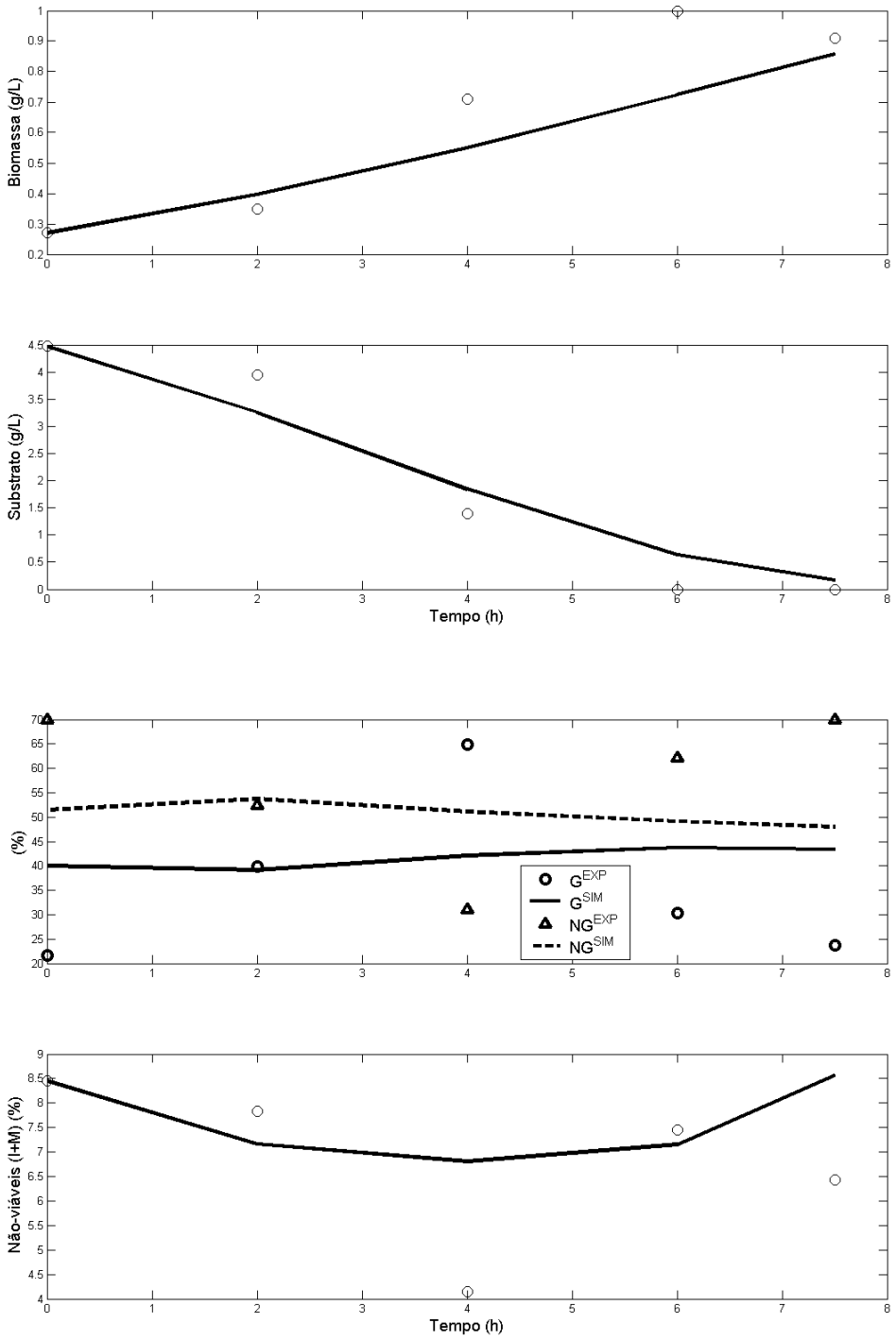

Figura 7.11 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-N1: $ASPBM_B$

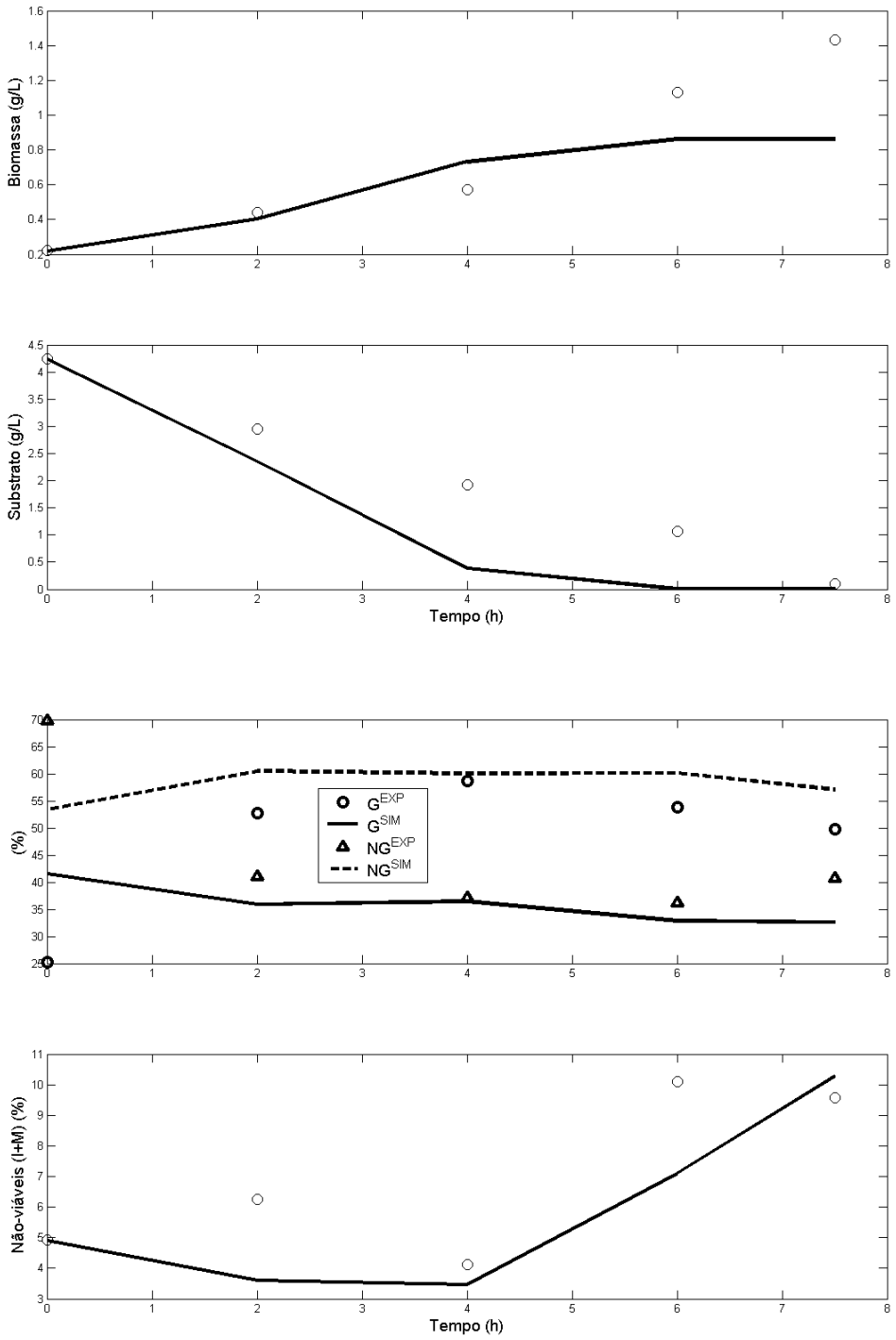

Figura 7.12 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A1: $ASPBM_B$

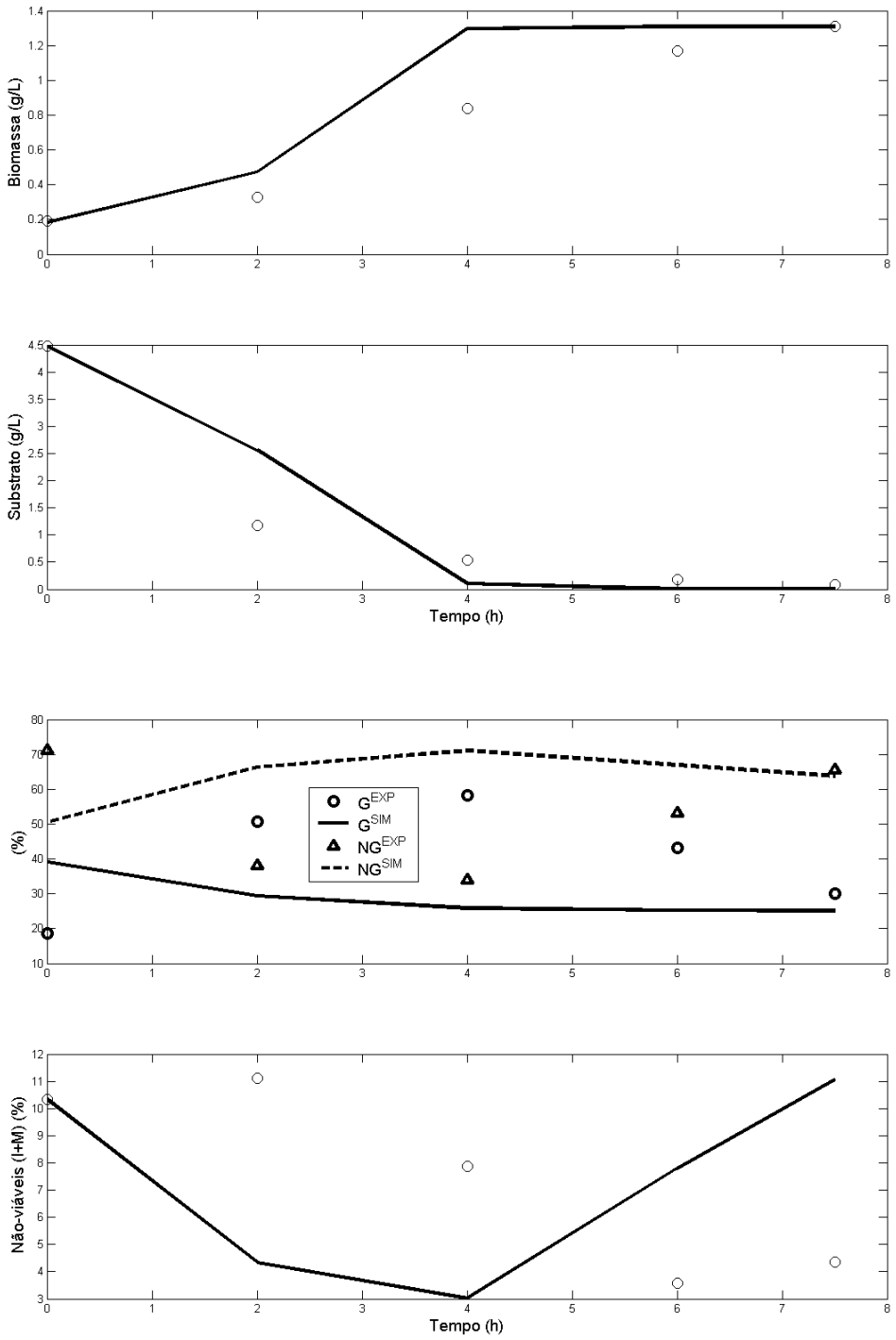

Figura 7.13 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-A6: $ASPBM_B$

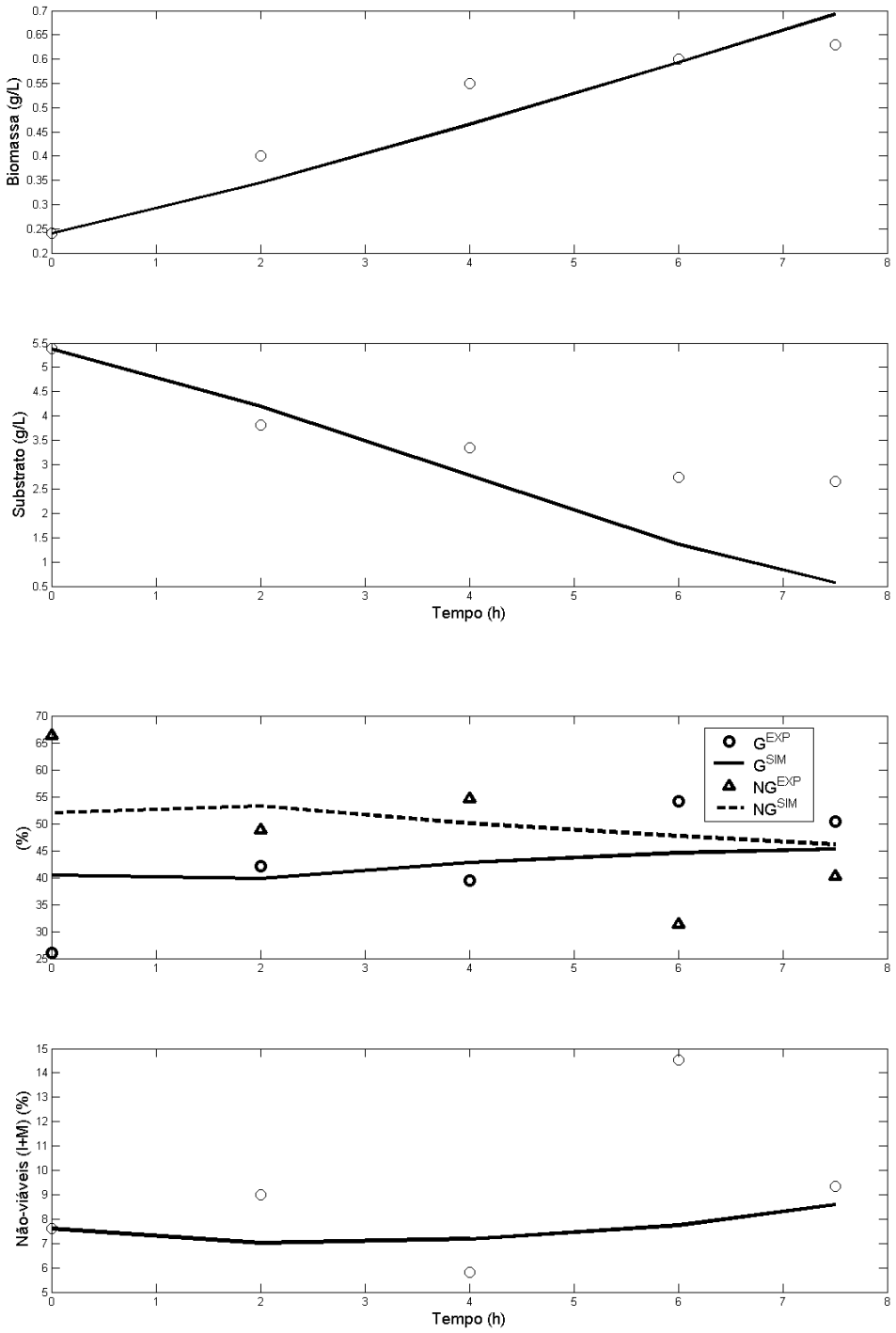

Figura 7.14 – Ajuste de parâmetros usando o CONJUNTO 2, experimento PT-O3: $ASPBM_B$

Em relação aos ajustes realizados com o CONJUNTO 1, é importante ressaltar o efeito de "calibração" da taxa de perda de viabilidade exercido pelo experimento BR-04, que acompanha a dinâmica populacional em ambiente ausente de substrato por um período de tempo relativamente prolongado. A comparação visual das respostas NV para os experimentos BR-01 e BR-02 mostradas nas Figuras 7.1, 7.2, 7.8 e 7.9 com as respostas obtidas anteriormente, mostradas nas Figuras 6.1, 6.2, 6.8 e 6.9 é bastante eloqüente. Percebe-se que, na ausência de dados que descrevam o aumento suave da perda de viabilidade de células com a depleção celular, os ajustes individuais para os experimentos BR-01 e BR-02 foram atraídos para um ponto em que uma maior taxa específica de consumo de substrato foi compensada por uma menor fração de células ativas na população, pois o modelo considera que as inativas não consomem substrato.

A diminuição das taxas de morte e inativação ocasiona o surgimento de um comportamento nas respostas de *G* e *NG* dos experimentos BR-01 e BR-02 (Figuras 7.1, 7.2, 7.8 e 7.9, 3ª sub-figura) que não é visível nas respostas do Capítulo 6 (Figuras 6.1, 6.2, 6.8 e 6.9, 3ª sub-figura). Após o consumo de praticamente todo o substrato, há uma pequena elevação na fração de células não-gemulantes *NG*, que rapidamente desaparece, com as diminuições tanto de *NG* quanto de *G* ocasionadas pela progressiva transição das células ativas em inativas e mortas. Esse comportamento é acompanhado por um comportamento contrário na fração de células gemulantes *G* (uma queda acelerada, curta, que rapidamente é suavizada). Essa súbita elevação em *NG* após a depleção de *S* deve-se ao seguinte mecanismo:

(i) em valores muito baixos de *S*, a probabilidade de divisão tende a zero;

(ii) nestes valores muito baixos de *S*, o termo sigmoidal modificador da função de duração do ciclo celular (Eq. 5.2) praticamente anula a taxa de envelhecimento, impedindo que as células transitem no espaço de idades;

(iii) entretanto, como o deslocador do termo que "desliga" a taxa de envelhecimento ($\lambda_S^L = 1000$) é maior que o deslocador do termo que "desliga" ($\lambda_S^B = 100$) a divisão ($\gamma_S^L = 0{,}2 > \gamma_S^B = 0{,}1$), quando S ultrapassa em trajetória descendente o valor de $\gamma_S^L = 0{,}2$ g/L, a taxa de transição no espaço de idades $L'^{-1}(a,S)$ diminui muito (as células "envelhecem" a uma taxa temporal menor);

(iv) para $S < \gamma_S^L$ =0,2 g/L, o "envelhecimento" é quase nulo ($L'^{-1}(a,S) \to 0$), mas as células que se encontram muito próximas à ocorrência da mitose ($a/trunc(a) \cong 1$) continuam dividindo, e cada célula que tem sucesso na mitose significa o desaparecimento de uma célula gemulante e o aparecimento de duas células não-gemulantes, o que ocasiona o aumento agudo em *NG* e a conseqüente diminuição de *G*;

(v) ultrapassado um valor S < γ_S^B =0,1 g/L, também a probabilidade de divisão é "desligada", e então não ocorre divisão nem progressão no ciclo celular;

(vi) a partir deste ponto, as células ativas vão progressivamente tornando-se inativas ou morrendo, o que causa uma diminuição tanto de G quanto de NG, porém em ritmo mais lento que o desaparecimento de células gemulantes observado no intervalo em que 0,1 g/L ≤ S ≤ 0,2 g/L

O mecanismo descrito acima pode ser associado à tentativa que as células gemulantes de *Saccharomyces cerevisiae* podem fazer para tentar concluir uma divisão quando o ambiente torna-se pobre em fonte de carbono, e pode ter sua resposta calibrada através da escolha de alguns parâmetros, especialmente $\gamma_S^L > \gamma_S^B$.

As Figuras 7.8 e 7.9 mostram claramente que o agrupamento de experimentos para ajuste resulta em uma solução de compromisso, uma vez que há uma diferença no rendimento de substrato em biomassa entre os experimentos BR-01 e BR-02, conforme discutido no Capítulo 6. Ainda, o ajuste da resposta de biomassa para o BR-04 perde qualidade, porém cabe ressaltar que, no caso do experimento BR-04, o crescimento da biomassa é muito pequeno em relação aos valores absolutos (em torno de 20% do valor médio final), aumentando a relação entre a variação observada e a incerteza das medidas. Neste caso, a diferença entre as predições do modelo e os valores de biomassa medidos do BR-04 é irrelevante.

Em relação aos ajustes realizados com o CONJUNTO 2, o modelo apresenta respostas em razoável concordância com as medidas para biomassa (grandeza para a qual o ajuste mais difícil aparenta ser o de PT-N1) e substrato (com uma certa dificuldade em capturar alguns pontos das trajetórias, mas capturando os pontos finais, com a exceção do caso PT-O3). As respostas para *G*, *NG* não são boas, possivelmente pelos mesmos motivos listados no Capítulo 6.

7.2 – TESTES DE EXTRAPOLAÇÃO

Para ilustrar as capacidades de extrapolação do modelo, serão mostradas nas Figuras 7.15 a 7.22 os testes do modelo $ASPBM_B$ com os parâmetros ajustados usando o CONJUNTO 2, em simulações nas condições dos demais experimentos (BR-01 a BR-06, PT-N6 e PT-O5). *Para não ser repetitivo,* os demais testes realizados não serão mostrados aqui ($ASPBM_B$ com parâmetros ajustados com o CONJUNTO 1 nas condições dos experimentos BR-03, BR-05, BR-06 e todos os PT-XY, e ambos os tipos de teste usando o $ASPBM_A$). Os testes escolhidos para apresentação neste Capítulo são os de melhor ajuste, de uma forma geral, e são representativos das qualidades e das dificuldades encontradas ao usar o modelo apresentado para simular os experimentos em questão.

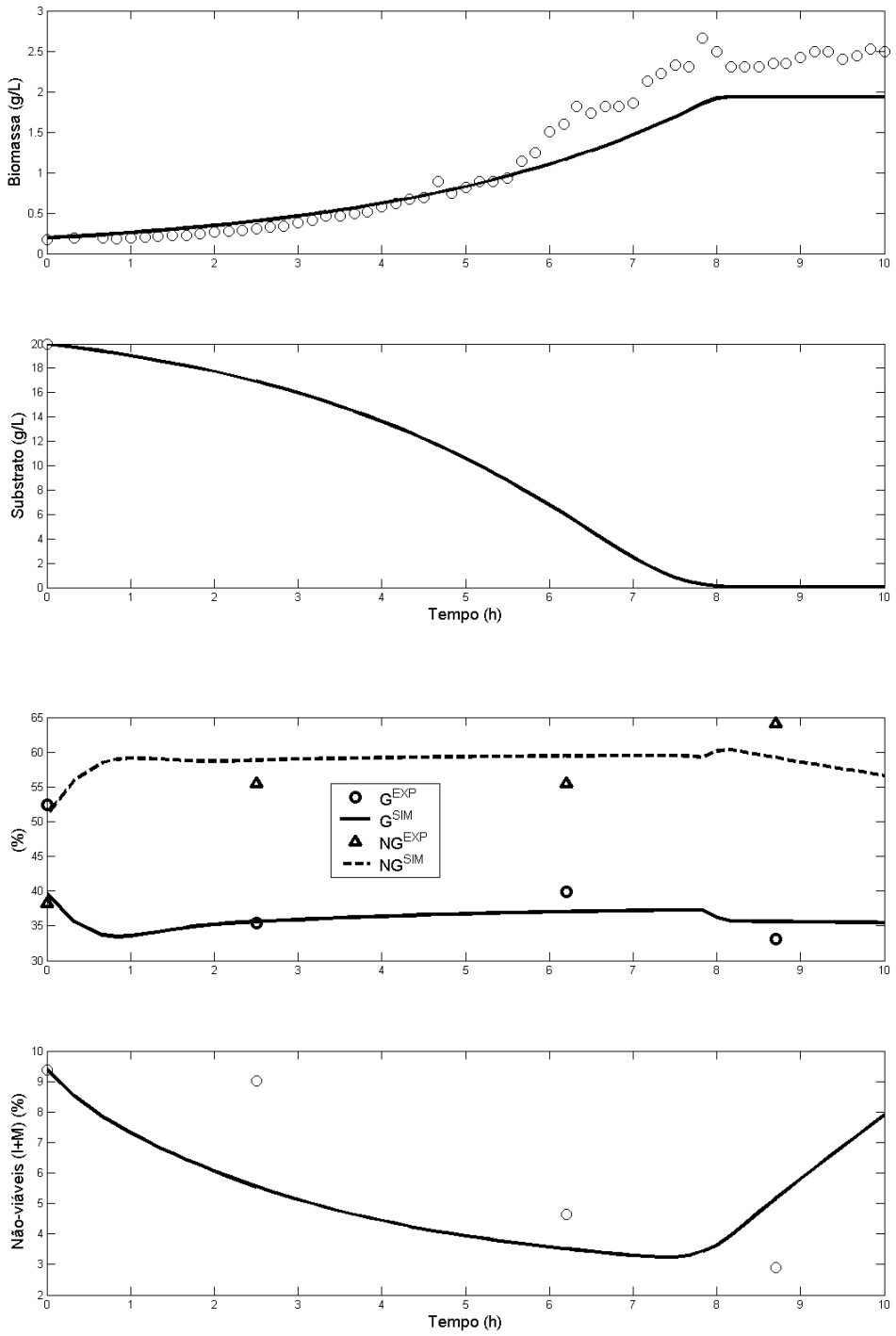

Figura 7.15 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-01

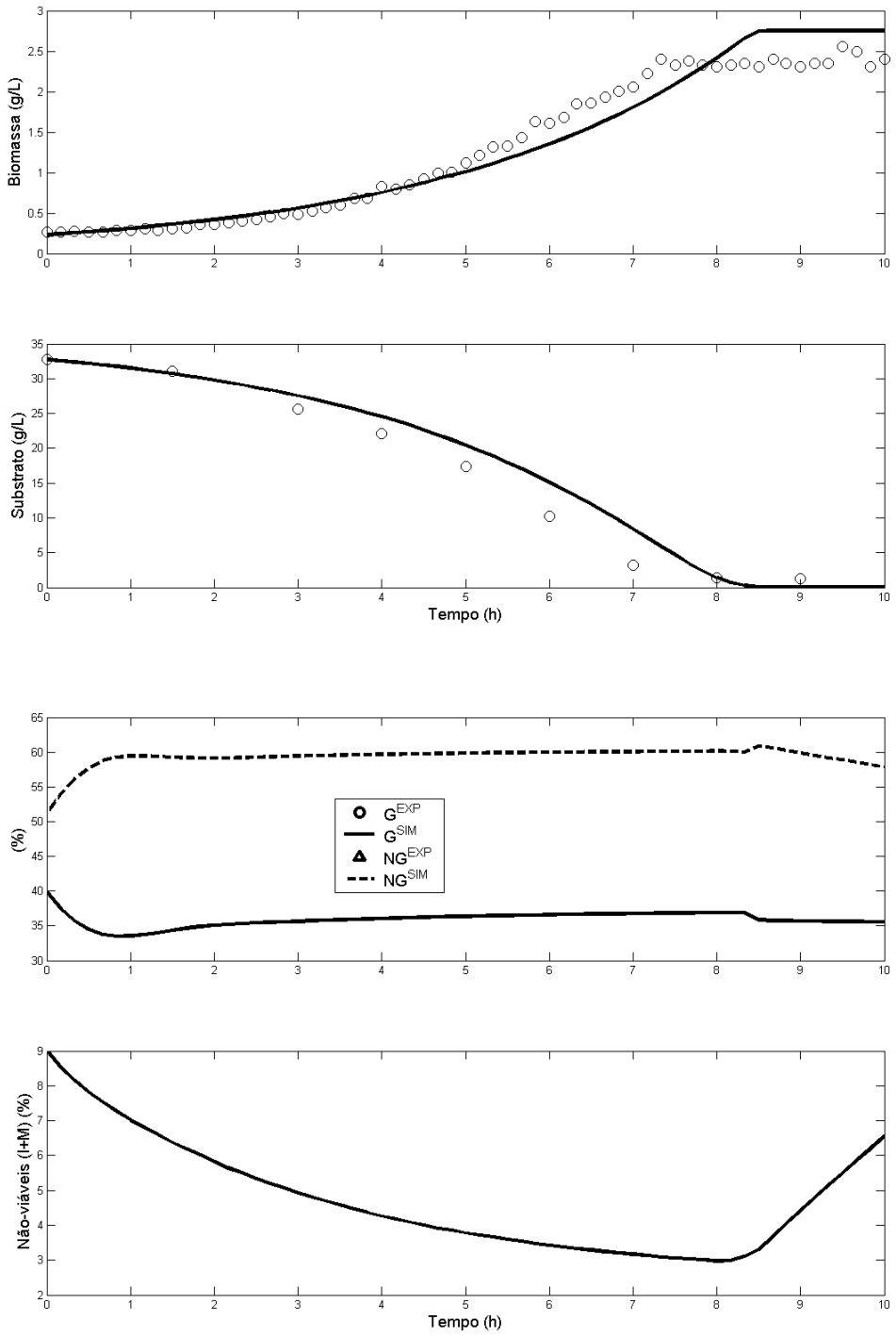

Figura 7.16 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-02

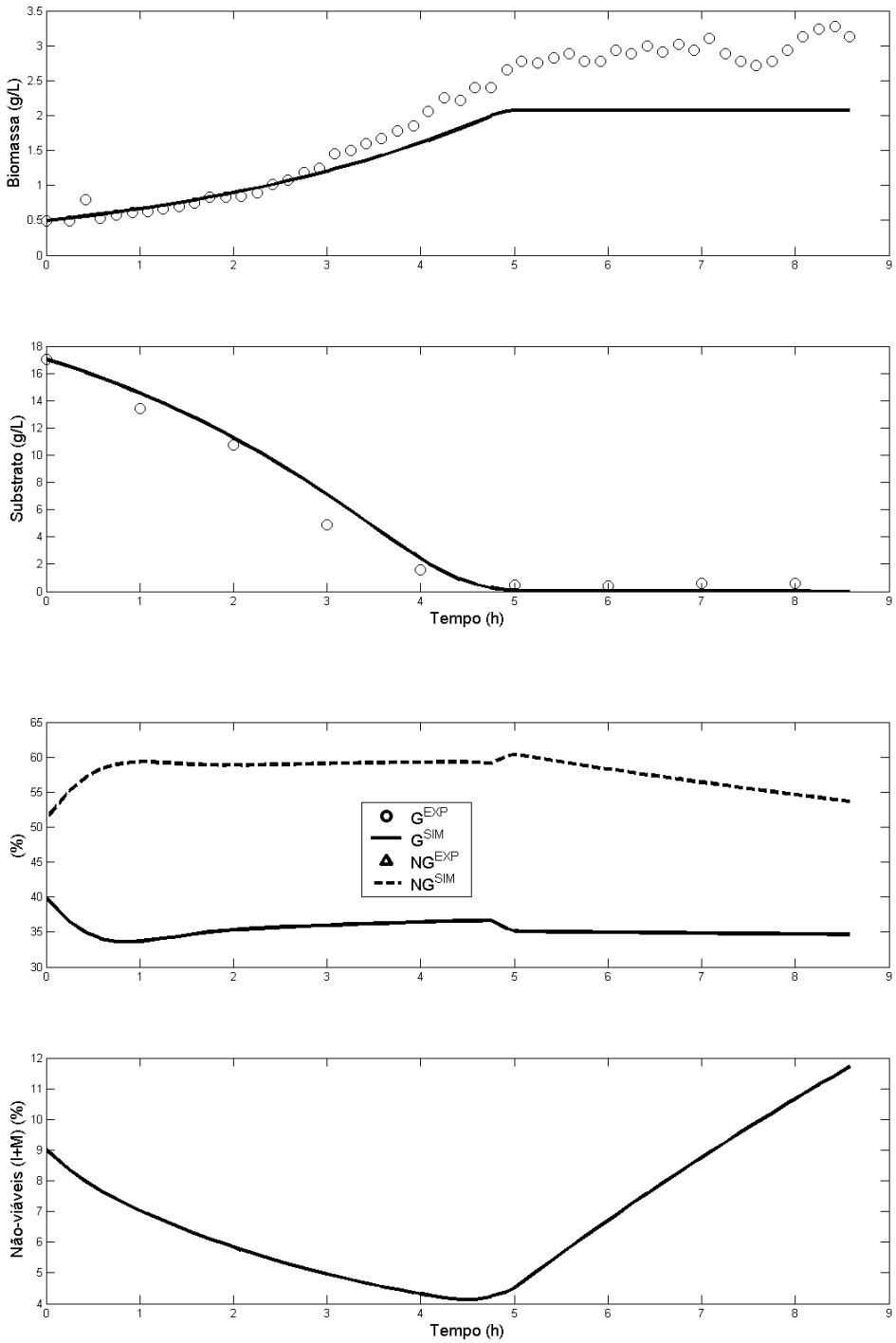

Figura 7.17 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-03

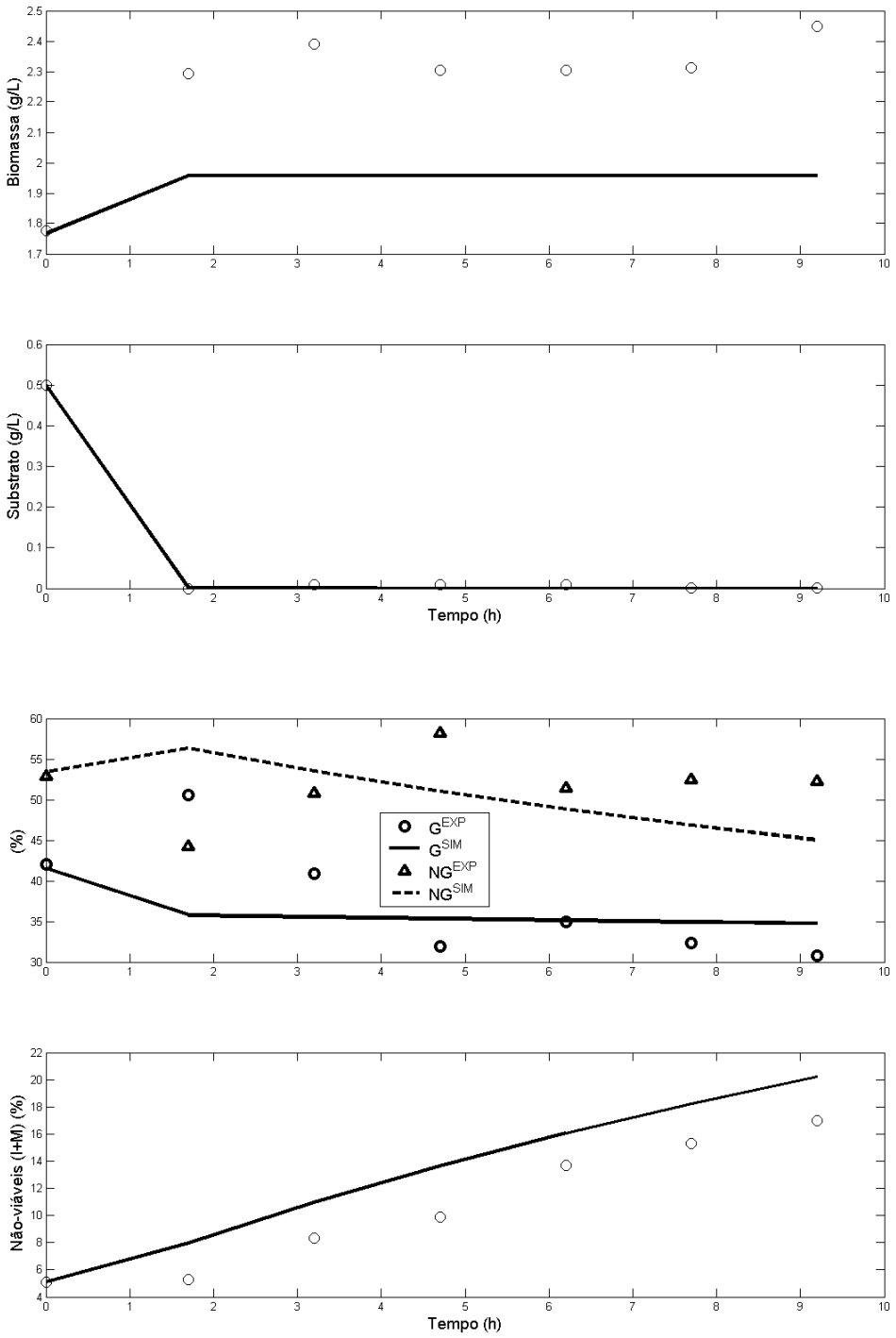

Figura 7.18 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-04

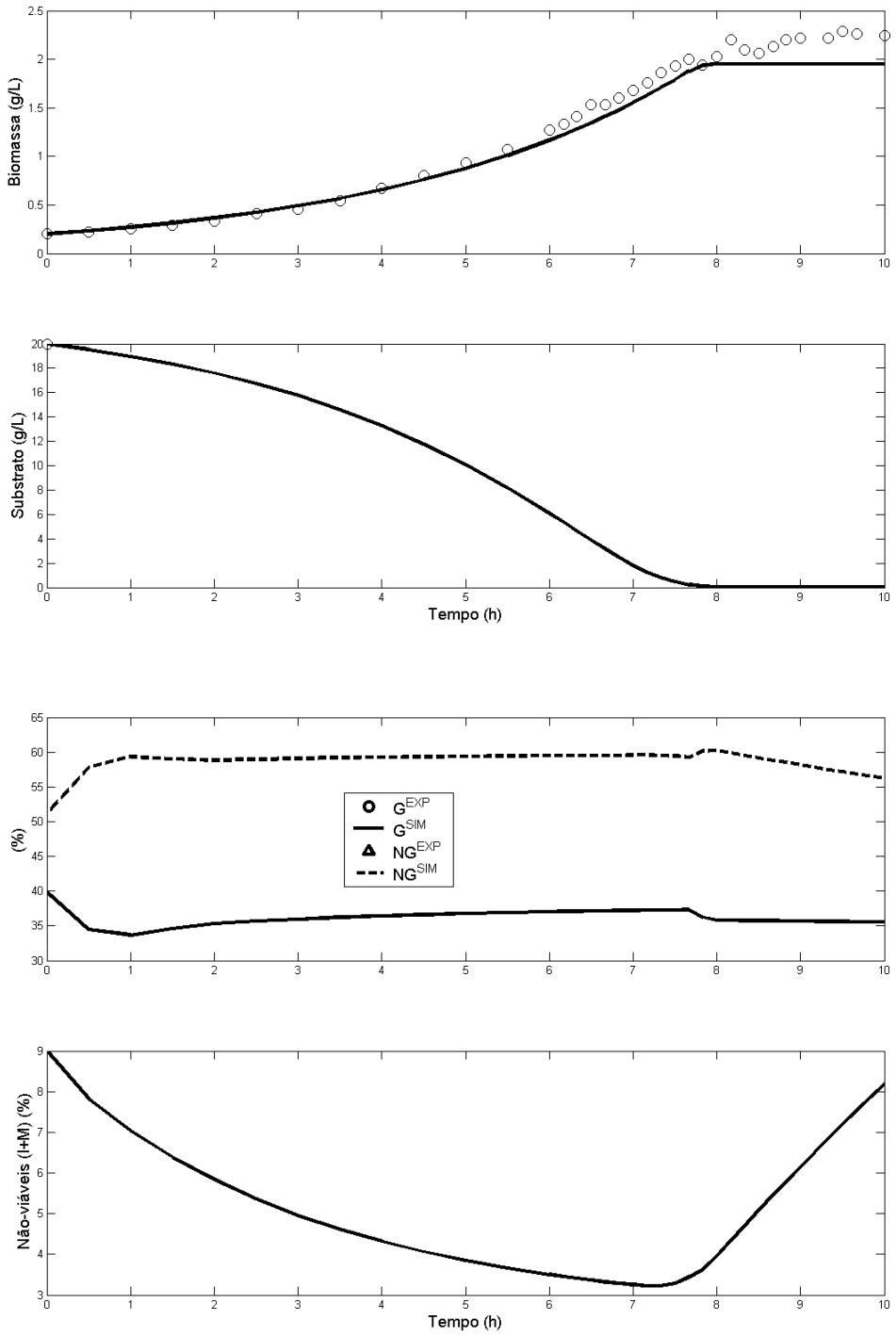

Figura 7.19 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-05

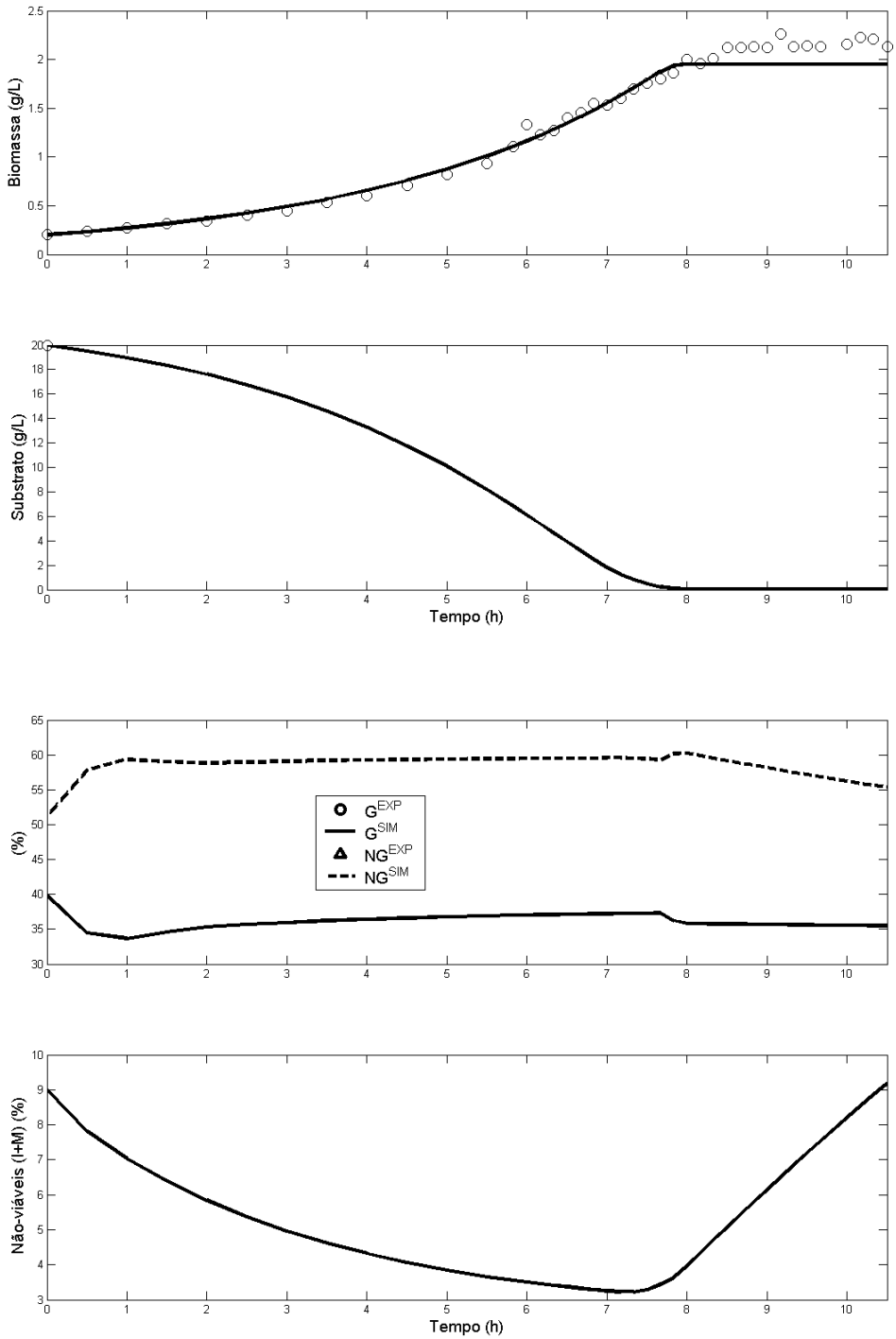

Figura 7.20 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento BR-06

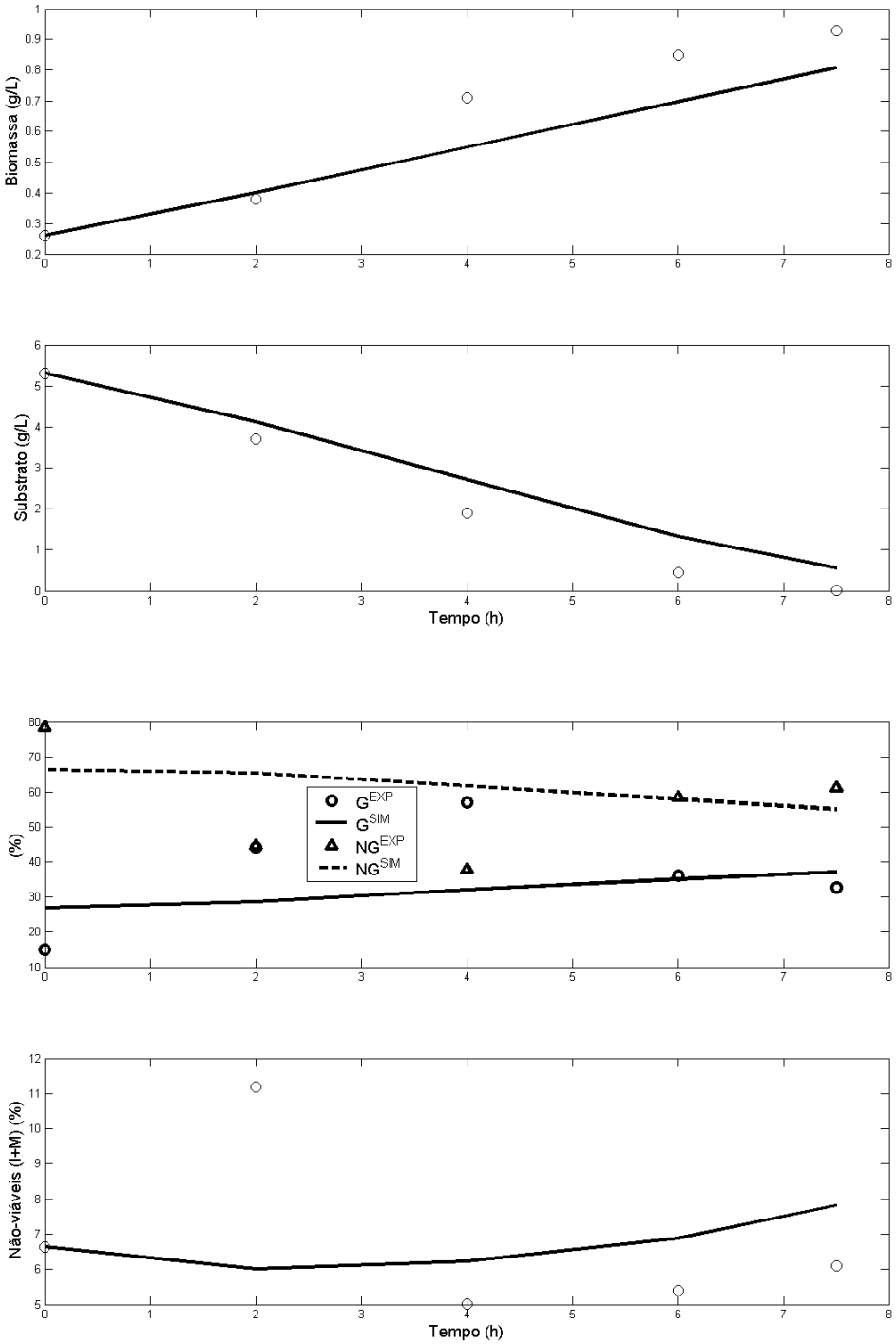

Figura 7.21 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento PT-N6

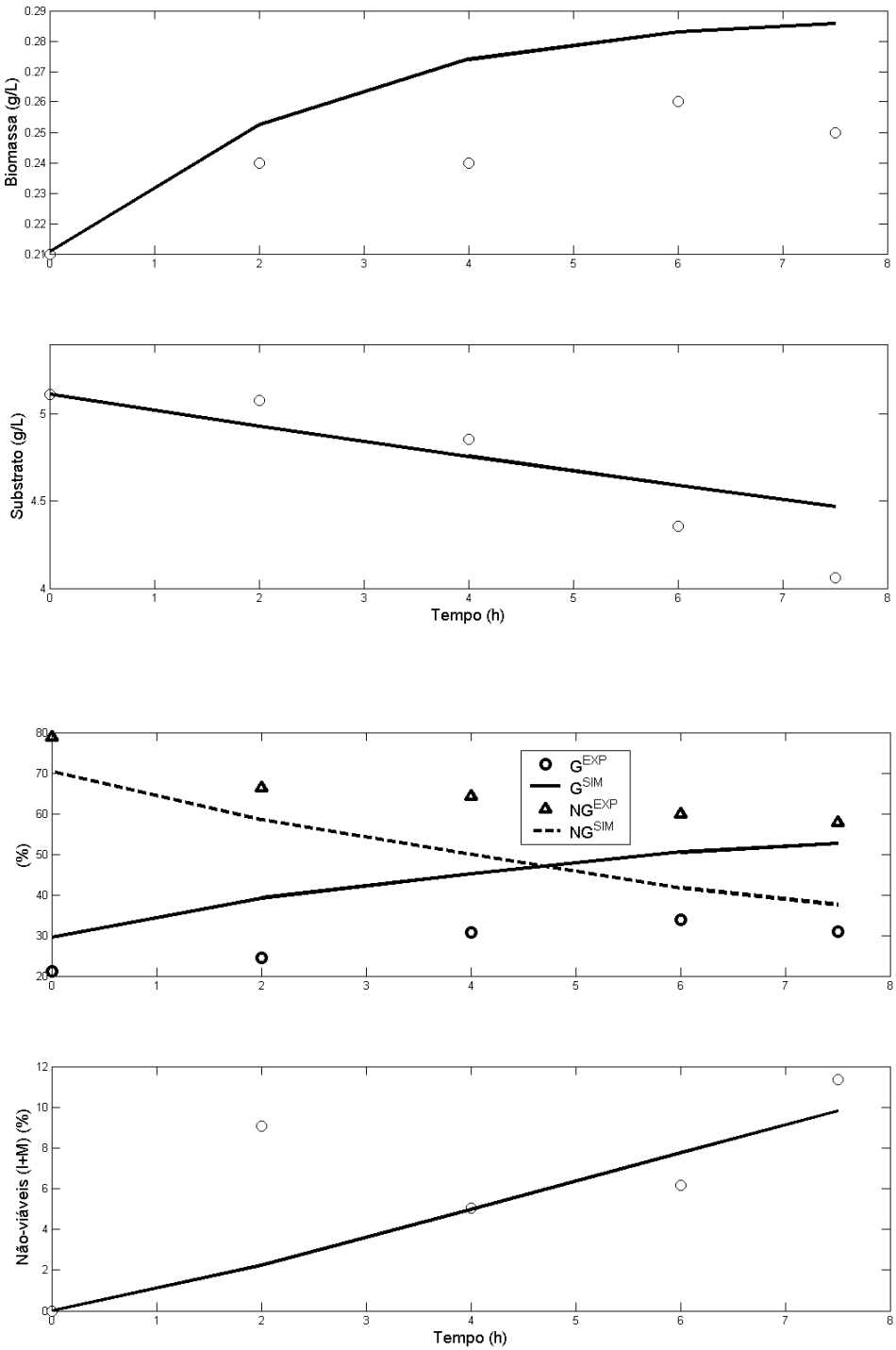

Figura 7.22 – Teste do $ASPBM_B$ com parâmetros do CONJUNTO 2, experimento PT-O5

Os resultados mostram boa extrapolação usando os parâmetros do CONJUNTO 2 para os demais experimentos, apesar das cepas distintas do microrganismo usado nos experimentos BR-01 a BR-06 e nos experimentos PT-XY, e do efeito de estresse hiperbárico presente em alguns experimentos inclusos no CONJUNTO 2. Repara-se que essa boa extrapolação é, em grande parte, devido aos valores de ρ^B e $\mu_{AEROBIC}$, compatíveis com os demais experimentos. Os parâmetros do CONJUNTO 2 também resultam em uma taxa moderada de perda de viabilidade, prevendo valores um pouco superiores aos esperados para o BR-04 (ver Figura 7.18, 4ª sub-figura).

Analisando os demais experimentos do conjunto PT-XY, sobressai a qualidade das predições de biomassa e substrato para o PT-N6 (Figura 7.21), enquanto as predições para o PT-O5 (Figura 7.22) não são boas, indicando a dificuldade do modelo em capturar o efeito deletério do ambiente superoxigenado sobre a dinâmica populacional (especialmente sobre a resposta de substrato).

8 – RESULTADOS: COMPORTAMENTOS PERIÓDICOS

Uma das características de culturas contínuas aeradas de *Saccharomyces cerevisiae* é a ocorrência de oscilações de diversos tipos: em variáveis internas, substrato e produtos excretados, biomassa, períodos curtos e longos, etc (Duboc e von Stockar, 2000; Henson *et al.*, 2002; Hjortso e Nielsen, 1994, 1995; Kompala, 1999; Kompala e Jones, 1999; Kuryiama *et al.*, 1992, 1996). De uma forma geral, os trabalhos da literatura dividem os tipos de oscilações apresentadas em duas classes: (i) as oscilações ligadas ao ciclo celular, e (ii) as oscilações ligadas ao metabolismo (em particular, à glicólise). Como o modelo aqui proposto não leva em consideração as rotas metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae*, deseja-se verificar a sua capacidade em prever comportamentos periódicos de culturas contínuas aeradas, dentro das faixas de condições operacionais nas quais tais oscilações são reportadas na literatura. Em particular, serão avaliadas culturas aeradas, com taxas de diluição $D = F/V$ na faixa de 0,01 a 0,2 h^{-1}.

Dentro desta faixa, ambas as implementações do modelo ($ASPBM_A$ e $ASPBM_B$) mostram comportamentos periódicos similares, como está mostrado nas Figuras 8.1 e 8.2. Cada uma destas figuras mostra uma simulação usando parâmetros ajustados para cada modelo com o CONJUNTO 1, sob as mesmas condições operacionais: D = 0,05 h^{-1}, S^{IN} = 10 g/L, S_0 = 1 g/L, O = 1. Nestas condições, o modelo prevê oscilações de biomassa e substrato, com períodos em torno de 20 horas (o período médio apresentado por $ASPBM_A$ é aproximadamente 1% inferior ao apresentado por $ASPBM_B$).

Devido à semelhança das respostas periódicas demonstradas por ambas as implementações, serão apresentados na continuação deste capítulo apenas os resultados obtidos com $ASPBM_B$, sempre em simulações usando os parâmetros ajustados com o CONJUNTO 1 (Tabela 7.2). *Exceto quando indicado*, as *condições-padrão* usadas nas simulações que serão apresentadas ao longo deste Capítulo são O = 1, N_0 = 3,55x10^{10}, S^{IN} = 10 g/L e S_0 = 1 g/L.

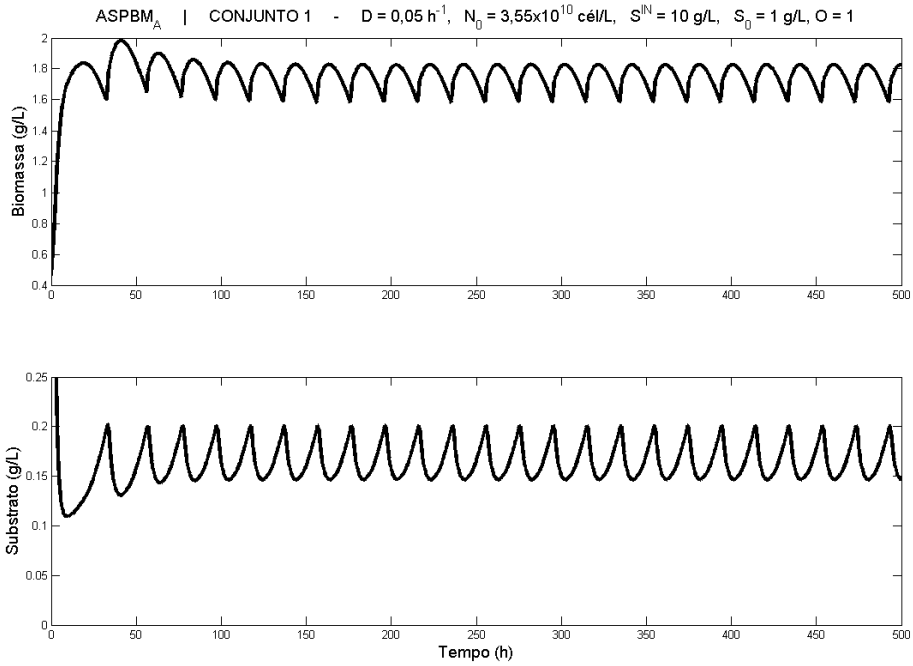

Figura 8.1 –ASPBM$_A$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações em *X* e *S* sob *D* = 0,05 h^{-1}

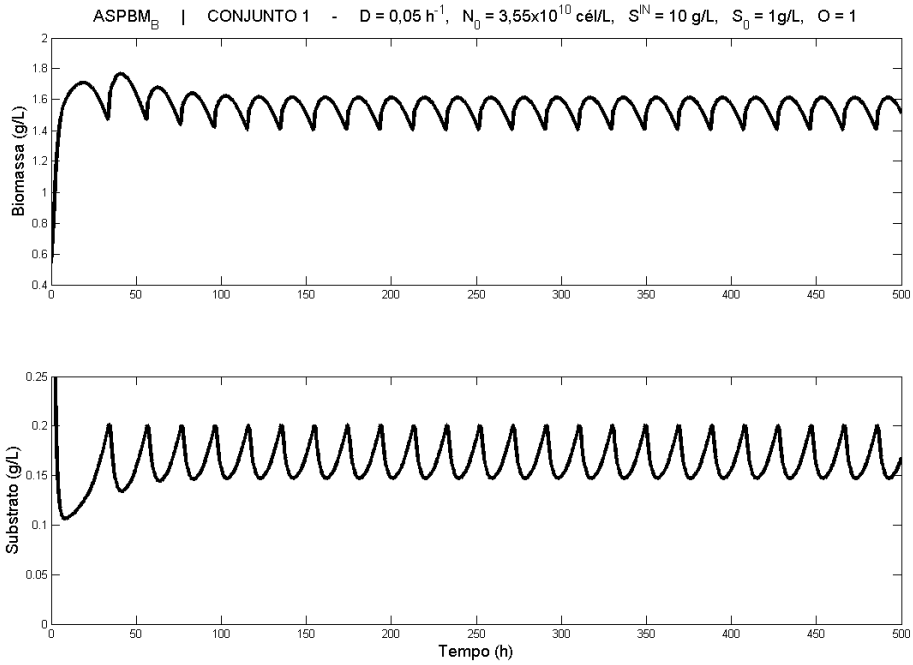

Figura 8.2 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações em *X* e *S* sob *D* = 0,05 h^{-1}

Uma das características das oscilações em culturas contínuas de levedura gemulante é a modulação de amplitude e freqüência através da taxa de diluição. Mantendo constante a concentração de substrato na corrente de alimentação, uma taxa de alimentação maior diminui ambos (Kompala e Jones, 1999). Para verificar a reprodução deste comportamento em culturas aeradas, observa-se a resposta de simulação submetida a uma seqüência de perturbações na taxa de diluição *D*. Na Figura 8.3 são apresentados as respostas periódicas de biomassa e substrato em resposta a uma seqüência de perturbações degrau na vazão *F*. A taxa de diluição inicial é D = 0,1 h^{-1}, que é diminuída para D = 0,05 h^{-1} em t = 150 h, e depois diminuída novamente para D = 0,01 h^{-1} em t = 500 h; em t = 1500 h aumenta para D = 0,05 h^{-1}, e esse valor é novamente aumentado em t = 1850 h até o valor inicial D = 0,1 h^{-1}.

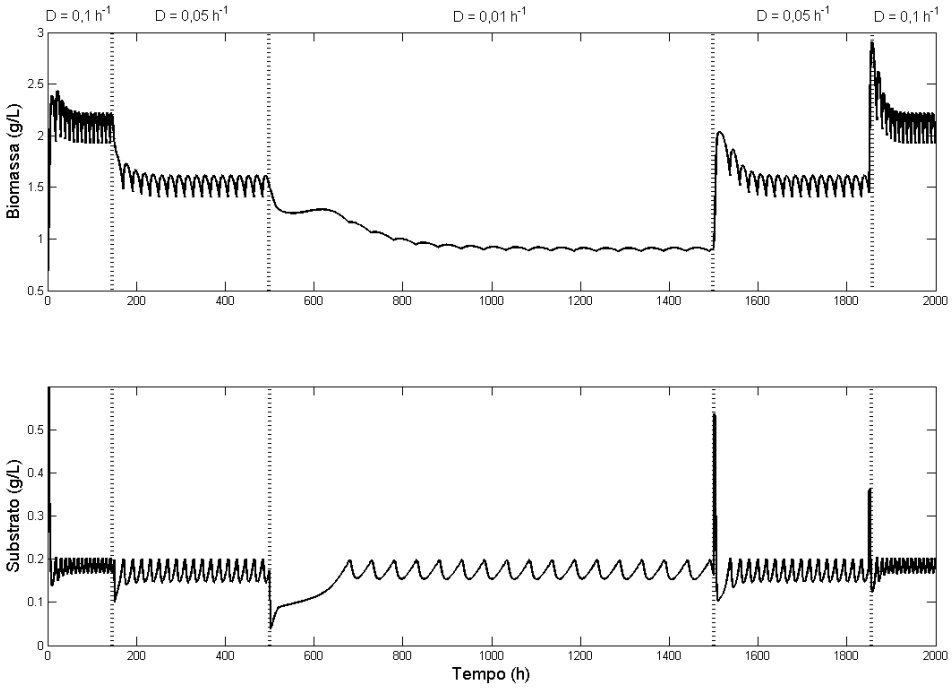

Figura 8.3 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações em *X* e *S* moduladas por *D*

Embora sejam perceptíveis na Figura 8.3 as alterações no período e na amplitude das oscilações de biomassa, o substrato tem seu período modulado sensivelmente, mas apresenta uma amplitude que praticamente não é alterada, e permanece oscilando em torno do valor de 0,2 g/L, idêntico ao valor de γ_S^L, o que se deve ao mecanismo pelo qual o modelo gera tais oscilações, através de interrupção da divisão e inativação e morte de células.

A Figura 8.4 mostra a dinâmica das populações de *Saccharomyces cerevisiae* modulada pela taxa de diluição *D* (mesma simulação da Figura 8.3). A cada diminuição da vazão, há uma súbita queda do substrato, acompanhado por um acréscimo acelerado de células mortas, e o comportamento reverso é observado em *t* = 1500 h e *t* = 1850 h, quando a taxa de diluição é aumentada (acréscimos súbitos na concentração de substrato).

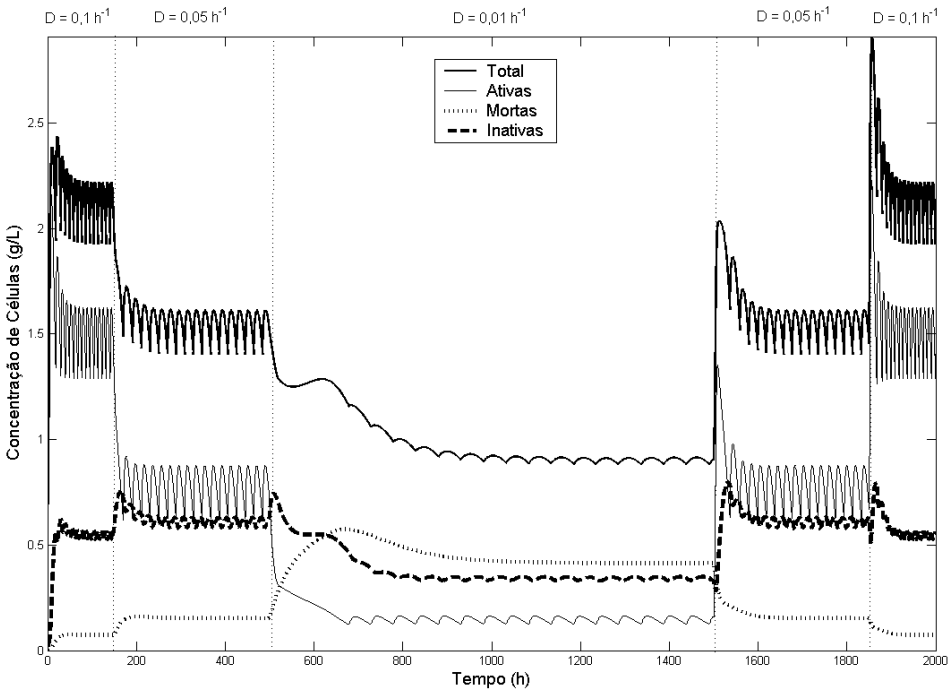

Figura 8.4 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações de populações moduladas por *D*

As oscilações de culturas de levedura gemulante devidas ao ciclo celular costumam ser observadas para valores de D abaixo de um dado valor de $D_{CRÍTICO}$, que para as condições-base apresentadas neste Capítulo, tem um valor em torno de $D_{CRÍTICO}$ = 0,31 h^{-1}.

Também há evidências na literatura de que, diminuindo ainda mais o valor de D, as oscilações desaparecem, e as causas para o desaparecimento do comportamento periódico estão associadas a uma mudança metabólica (Kompala e Jones, 1999). Entretanto, como o modelo formulado neste trabalho não incorpora qualquer informação a respeito da glicólise, torna-se incapaz de prever a cessação das oscilações em ambientes aerados com baixa concentração de substrato, como mostra a Figura 8.5, onde a redução da taxa de diluição até um valor muito baixo D = 0,005 h^{-1} aumenta muito o período das oscilações, diminuindo sua amplitude, mas não prevê estado estacionário.

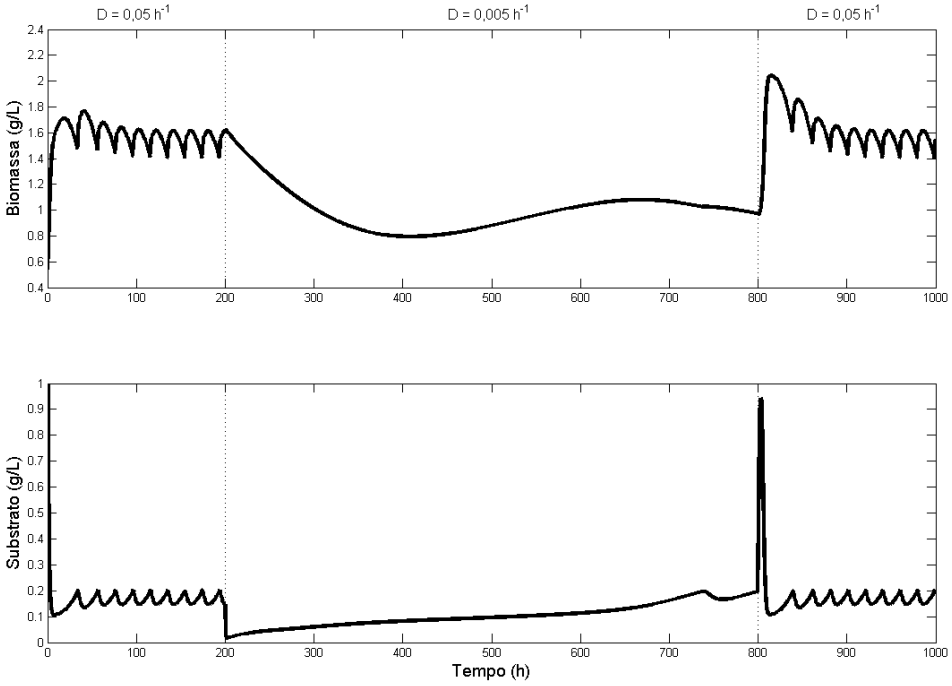

Figura 8.5 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, oscilações para D = 0,005 h^{-1}

Apesar de o modelo descrever qualitativamente comportamentos periódicos encontrados na literatura, as distribuições de células nas condições de oscilações de longo período apresentam um problema: como, para valores de substrato abaixo de γ_S^L = 0,2 g/L as células não "envelhecem", todas as células que nascem permanecem indefinidamente com idade em torno de 0. Desta forma, a população ativa fica extremamente concentrada em células recém-nascidas (aproximadamente 98%, para D = 0,01 h^{-1}), e as populações inativa e morta, que só podem surgir a partir das células ativas constituem-se exclusivamente de recém-nascidas. Este problema deve ser eliminado através de (i) uma escolha adequada de alguns dos parâmetros fixados na Tabela 5.1 (especialmente os deslocadores dos termos dependentes de substrato) e (ii) conhecimento sobre a dinâmica das funções de ciclo celular face a alterações na concentração de substrato.

A influência dos parâmetros λ_S^L e γ_S^L sobre as respostas periódicas do modelo podem ser visualizadas através das Figuras 8.6 e 8.7, respectivamente. A velocidade com que a duração do ciclo celular é "desligada" através de λ_S^L modula o período e a taxa de amortecimento das respostas. Valores baixos de λ_S^L levam ao desaparecimento das oscilações de biomassa e substrato após um pequeno número de períodos. O aumento do valor de λ_S^L resulta em períodos mais curtos e amortecimento praticamente nulo. Já o parâmetro γ_S^L não aparenta influir de forma significativa sobre o amortecimento das oscilações. Abaixo de um valor crítico de γ_S^L são observadas oscilações, com períodos inversamente relacionados a γ_S^L. A amplitude das oscilações aumenta com γ_S^L. Esses resultados reforçam a importância da escolha dos valores destes parâmetros, e a necessidade de conhecimento mais detalhado sobre a dependência das funções de ciclo celular em relação à concentração de substrato.

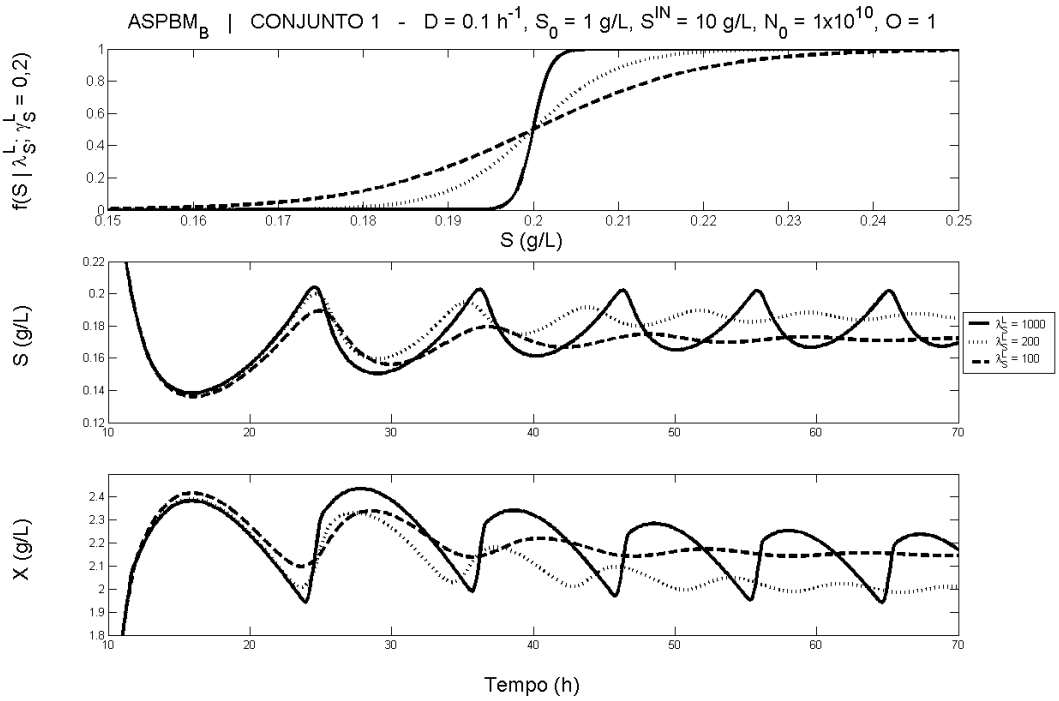

Figura 8.6 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, influência de λ_S^L sobre respostas periódicas

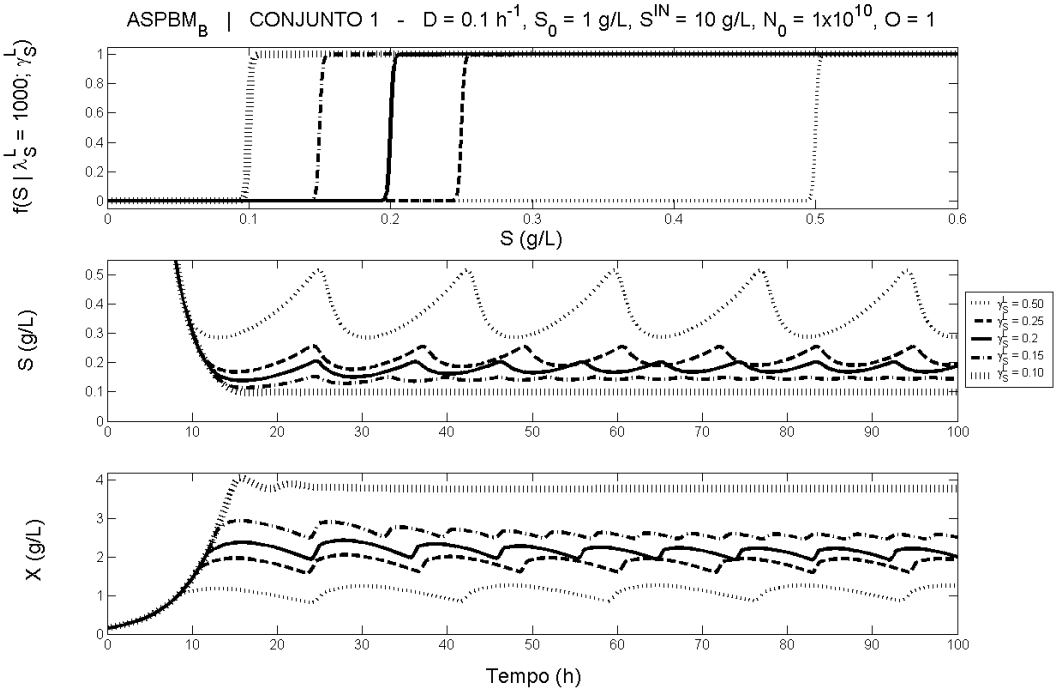

Figura 8.7 –ASPBM$_B$ com parâmetros do CONJUNTO 1, influência de γ_S^L sobre respostas periódicas

9 – CONCLUSÕES

O modelo de balanço populacional estruturado em idade apresentado neste trabalho é um arcabouço matemático capaz de descrever fenômenos de dinâmica populacional de *Saccharomyces cerevisiae*. Em relação à vasta literatura acerca de modelos de balanço populacional de bioprocessos, destacam-se como originais:

(i) *a definição da variável idade a, associada à idade genealógica e utilizada como segunda variável independente do modelo*. A maior parte dos modelos PBM encontrados na literatura são estruturados em massa (Villadsen e Nielsen, 1992), e os poucos modelos estruturados em idade definem tal variável como *idade cronológica*, ou seja, o tempo transcorrido desde o surgimento de uma célula (Hjortso e Nielsen, 1994; 1995), apesar de a contagem de cicatrizes seja efetuada há décadas para inferência da operação do ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell e Unger, 1977; Lord e Wheals, 1980; Alberghina, 1983). Outras abordagens utilizam subpopulações de células agrupadas sob diversos critérios (Hjortso e Nielsen, 1994; 1995; Duboc e von Stockar, 2000, Hatzis e Porro, 2006), mas nenhuma constitui uma abordagem segregada que evite a divisão da população em, no mínimo, “mães” e “filhas”. Na abordagem utilizada pelo modelo BPM aqui apresentado, as células filhas são aquelas com $a < 1$, e as informações obtidas sobre probabilidades de divisão e perda de viabilidade com o acúmulo de cicatrizes (divisões) podem ser incorporadas explicitamente através das funções de divisão e transições;

(ii) *a definição das subpopulações ativa, inativa e morta*. A literatura não é farta em modelos descrevendo o fenômeno de quiescência das leveduras, embora virtualmente todos os modelos BPM desenvolvidos pretendam descrever fenômenos periódicos, incluindo aqueles associados à operação

do ciclo celular. Tais comportamentos ocorrem em culturas com baixas concentrações de substrato no meio (Kompala e Jones, 1999), quando uma fração da população pode estar quiescente, apesar de tal fato raramente ser verificado experimentalmente. Desta forma, os modelos encontrados na literatura reproduzem comportamentos periódicos associados ao ciclo celular por mecanismos que ignoram a quiescência de uma fração da população (Hjortso e Nielsen, 1994; 1995; Hatzis e Porro, 2006). Destaca-se um trabalho (Duboc e von Stockar, 2000) no qual um modelo de dinâmica populacional considera três classes de células: (a) células na fase G_1 (crescendo), (b) células gemulantes e (c) células na fase G_1 que não crescem e estão aptas a iniciar a gemulação, mas não o fazem. Entretanto, em tal modelo, de todas as células que atingem a massa crítica para gemulação, considera-se que apenas a fração *p* efetivamente inicia a gemulação, e as demais constituem a terceira classe citada. Essa fração *p* é considerada constante, e independe das condições ambientais ou de qualquer estado interno das células. Desta forma, a classe (c) considerada neste modelo de Duboc e von Stockar não apresenta uma dinâmica em acordo com as observações acerca do fenômeno da quiescência de leveduras (Gray *et al.*, 1999)

A formulação das funções de probabilidade de divisão e transições foi realizada com base em dados de literatura e alguns dados experimentais macroscópicos e não-segregados. Apesar do elevado número de parâmetros do modelo, a maioria destes pode ter seus valores escolhidos de forma empírica, reservando a um número reduzido um procedimento matemático de estimação. No caso apresentado, apenas sete parâmetros foram ajustados através de procedimentos de minimização.

Os resultados de ajustes mostram que o modelo é flexível o suficiente para reproduzir os dados de bateladas disponíveis. No Capítulo 7, os testes do modelo, usando os parâmetros ajustados para o CONJUNTO 2, mostram boa capacidade de extrapolação na

comparação com os demais conjuntos de dados experimentais. A principal dificuldade em relação aos comportamentos previstos para estes conjuntos é a incorporação do efeito da oferta aumentada de oxigênio sobre a dinâmica populacional. Entretanto, para uma correta descrição de fenômenos tão complexos, seria necessária uma quantidade ampla de informações experimentais, para uma avaliação rigorosa das formas dos termos dependentes da oferta de oxigênio. Além disso, esta informação deveria incluir medições de oxigênio dissolvido, para evitar uma variável artificialmente definida, como a variável *O* usada neste trabalho.

Os resultados mostraram também a reprodução do fenômeno de elevação da fração de células não-gemulantes quando o substrato se esgota, embora o equacionamento do modelo não tenha sido explicitamente formulado com este fim. Da mesma forma, o modelo utiliza um artifício para prever a interrupção do ciclo celular (comumente referido na literatura como *cell cycle arrest*) quando o substrato está exaurido. Este mecanismo (ver seção 5.2) é fundamental tanto para a já citada elevação da fração *NG* após a depleção de fonte de carbono, quanto para a descrição de fenômenos populacionais periódicos ligados ao ciclo celular, apesar de não ser o ideal, pois é uma implementação empírica. O ajuste dos parâmetros relativos a este mecanismo precisa ser criterioso, pois afeta diretamente as respostas macroscópicas em ambientes pobres em substrato, e deve ser avaliado em conjunto com os parâmetros dos termos dependentes de substrato das funções de divisão e transições. Finalmente, mais conhecimento a respeito deste mecanismo irá corrigir as distribuições de células obtidas em concentrações baixas de substrato.

O modelo reproduz qualitativamente a modulação dos comportamentos periódicos relacionados ao ciclo celular através da taxa de diluição. Para uma comparação quantitativa, seria necessário um procedimento específico para ajuste de alguns parâmetros que foram fixados na Tabela 5.1 e a realização de experimentos nestas condições. Enquanto as oscilações ligadas à glicólise são de curta duração, as oscilações ligadas ao ciclo celular costumam apresentar períodos que variam entre um par de horas até cinqüenta ou sessenta horas. Estes períodos longos tornam difícil a realização de tais experimentos, já que essas

fermentações precisam ser conduzidas de forma rigorosamente controlada (para manter a constância de vazão, aeração, agitação, etc). É preciso também avaliar com critério os comportamentos periódicos observados, e identificar sobre quais deles as alterações metabólicas possuem influência significativa. É possível agregar ao modelo proposto algumas dinâmicas metabólicas, desde que não seja necessário acrescentar mais variáveis à descrição do estado interno das células, pois isto pode tornar o modelo complexo demais para eficaz solução numérica.

A utilização de uma sub-população de células inativas, que não "envelhece" nem consome substrato, e pode transitar de e para a sub-população de células ativas de acordo com as condições ambientais é também fundamental para a descrição destes fenômenos periódicos. Além disso, a inativação de células é um grau de liberdade importante também para a descrição dos experimentos em batelada realizados. Apesar de a identificação experimental destas células por métodos de coloração ser difícil e apresentar relativa incerteza, o desenvolvimento de novas técnicas de quantificação (como as técnicas de processamento de imagens) pode facilitar a medição e utilização destas informações.

Futuros aperfeiçoamentos e extensões do modelo podem ser implementados de diversas formas, mas três destacam-se:

(i) investigação da função de duração do ciclo celular em função da idade e da concentração de substrato $L(a,S)$, bem como de outros fatores ambientais (oferta de oxigênio, concentração de etanol);

(ii) acoplamento ao modelo de equações de balanço material de oxigênio dissolvido, outros substratos e produtos, que podem aprimorar quantitativamente as respostas do modelo sob diversas condições; e

(iii) o acoplamento ao modelo da influência da glicólise sobre a dinâmica populacional.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberghina, L., Mariani, L., Martegani, E., Vanoni, M. (1983), "Analysis of protein distribution in budding yeast", *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1295-1310

Alberghina, L., Smeraldi, C., Ranzi, B. M., Porro, D. (1998) "Control by nutrients of growth and cell cycle progression in budding yeast, analyzed by double-tag flow cytometry", *J. Bacteriol.*, **180** (15), 3864–3872

Alberghina, L., Porro, D., Brambilla, L., (2003) "Glucose metabolism and cell size in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", *FEMS Microbiol. Lett.* **229**, 165–171

BSCS – US (1970), "Biological science, intersection of experiments and ideas", 2ª edição, Prentice-Hall, Englewood Cliffs

Cazzador, L. e Mariani, L. (1988) "A simulation program based on a structured population model for biotechnological yeast processes", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 198–202

Chen, K. C., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, A., Val, J., Novak, B. e Tyson, J. (2000), "Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle", *Mol. Biol. Cell*, **11**, 369-391

Coelho, M. A. Z., *et al*. (2004) "Effect of hyperbaric stress on yeast morphology: study by automated image analysis", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 318–324

Coelho, M. A. Z., Coutinho, J. A. P., Belo, I., Ferreira, E. C. (2005) "Assessment of yeast viability under hyperbaric conditions through a modeling approach", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80**, 872–877

Creator, J., Joyne, J. (1993), in "The cell cycle – a practical approach" (ed. Fantes, P.

e Brooks R.), 69-92, IRL Press, USA

Duboc, P., von Stockar, U. (2000), "Modeling of oscillating cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of population structure and expansion kinetics based on on-line measurements", *Chem. Eng. Science*, **55**, 149–160

Ferrell, J. E., Pomerening, J. R., Sontag, E. D.(2003) "Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2" *Nat. Cell Biol.*, **5**, 346-351

Fletcher, C. A. J. (1984), "*Computational Galerkin Methods*", Springer-Verlag, New York

Fredrickson, A. G. e Tsuchiya, H. M. (1963), "Continuous propagation of microorganisms", *AIChE J.*, **9**, 459

Fredrickson, A. G., Ramkrishna, D. e Tsuchiya, H. M. (1967), "Statistical and dynamics of procaryotic cell populations", *Math. Biosci.*, **1**, 327

Futcher, B. (1993), in "The cell cycle – a practical approach" (ed. Fantes, P. e Brooks R.), 69-92, IRL Press, USA

Gray *et al.* (1999) "'Sleeping beauty': Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 187–206

Hartwell, L. H., Unger, M. W. (1977), "Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division", *J. Cell Biol.*, **75**, 422-435

Hatzis, C., Porro, D. (2006) "Morphologically-structured models of growing budding yeast populations", *J. Biotechnol., in press*

Henson, M. A., Müller, D., Reuss, M. (2002) "Cell population modelling of yeast

glycolitic oscillations" *Biochem. J.*, **368**, 433–446

Henson, M. A., Mhaskar, P., Hjortso, M. A. (2002) "Cell population modeling and parameter estimation for continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*" *Biotechnol. Prog.*, **18**, 1010–1026

Henson, M. A. (2003) "Dynamic modeling of microbial cell populations", *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 460–467

Henson, M. A., Zhang, Y., Kevrekidis, Y. G. (2003) "Nonlinear order reduction of discretized cell population models", *Proceedings of the American Control Conference*, Denver, USA

Henson, M. A. (2004) "Modeling the synchronization of yeast respiratory oscillations" *J. Theor. Biol.*, **231**, 443–458

Hjortso, M. A., Nielsen, J. (1994), "A conceptual model of autonomous oscillations in microbial cultures", *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 1083

Hjortso, M. A., Nielsen, J. (1995), "Population balance models of autonomous microbial oscillations", *J. Biotechnol.*, **42**, 255

Hynne, F., Dano, S., Sorenson, P. G. (2001) "Full-scale model of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*", *Biophys. Chem.*, **94**, 121–163

Koch, A.L. (1997), "Microbial physiology and ecology of slow growth", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Set., 305

Kompala, D. S., Jones, K. D. (1999), "Cybernetic modelling of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures", *J. Biotechnol.*, **71**, 105–131

Kompala, D. S. (1999), "Cybernetic modelling of spontaneous oscillations in

continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Biotechnol.*, **71**, 267-274

Kuryiama, H., Satroutdinov, A. D., Kobayashi, H. (1992) "Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture", *FEMS Microbiol. Lett.*, **98**, 261-267

Kuryiama, H., Keulers, M., Suzuki, T., Satroutdinov, A. D. (1996) "Autonomous metabolic oscillation in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol", *FEMS Microbiol. Lett.*, **142**, 253–258

Liou, J. J., Srienc, F. e Fredrickson, A. G. (1997), "Solutions of population balance models based on a successive generation approach", *Chem. Eng. Sci.*, **52**, 1529

Lord, P. G., Wheals, A. E. (1980), "Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*", *J. Bacteriol.*, **142**, 808-818

Maddox, J. (1994), "Cell-cycle regulation by numbers", *Science*, **369**, 437

Mantzaris, N. V., Daoutidis, P., Srienc, F. (2001a), "Numerical solution of multi-variable cell population balance models: I. Finite difference methods", *Comput. Chem. Eng.*, **25**, 1411–1440

Mantzaris, N. V., Daoutidis, P., Srienc, F. (2001b), "Numerical solution of multi-variable cell population balance models: II. Spectral methods", *Comput. Chem. Eng.*, **25**, 1441–1462

Mantzaris, N. V., Daoutidis, P., Srienc, F. (2001c), "Numerical solution of multi-variable cell population balance models: III. Finite element methods", *Comput. Chem. Eng.*, **25**, 1463–1481

Mantzaris, N. V., Srienc, F., Daoutidis, P. (2002), "Nonlinear productivity control using a multi-staged cell population balance model", *Chem. Eng. Sci.*, **57**, 1-14.

Martelli, H. Panek, D. (1968), “Bioquímica Experimental”, Ao Livro Técnico S.A, Rio de Janeiro, pág. 106

Matallana, E., Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V. (2002) “Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions” *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3339–3344

McKnight, S. L., Tu, B. P., Kudlicki, A., Rowicka, M. (2005) “Temporal compartmentalization of cellular processes” *Science*, **310**, 1152–1158

Miller, G. E. (1959) “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar” *Analytical Chemistry*, **31**(3), 426-428

Münch, T., Sonnleitner, B. e Fiechter, A. (1992a), “The decisive role of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle behaviour for dynamic growth characterization”, *J. Biotechnol.*, **22**, 329-352

Münch, T., Sonnleitner, B., Fiechter, A. (1992b), “New insights into synchronization mechanism with forced synchronous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biotechnol.*, **24**, 299

Murray, A. W., Kirschner, M. W. (1989), “Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle”, *Science*, **246**, 614-621

Murray, A. W., Ingolia, N. T. (2004) “The ups and downs of modeling the cell cycle” *Current Biology*, **14**, R771–R777

Nasmyth, K. (1996), “At the heart of the budding yeast cell cycle”, *Trends Genet.* **12**, 405–412

Patnaik, P. R. (2003) “Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: an

overview of mechanisms and models" *Biotechnology Advances*, **21**, 183–192

Ramkrishna, D. (1979), "Statistical models of cell populations", *Advances in Biochemical Engineering*, **11**, 1

Ramkrishna, D. (1985) "The status of population balances", *Rev. in Chem. Eng.*, **3**, 49-95

Ramkrishna, D., Mahoney, A. W. (2002), "Population balance modeling. Promise for the future", *Chem. Eng. Sci.*, **57**, 595.

Ramkrishna, D., (2003) "On modeling of bioreactors for control", *J. Proc. Control*, **13**, 1–9

Rey, D. A., Cooper, D. G. e Godin, F. B. (1999), "Numerical methods for a population-balance model of a periodic fermentation process", *AIChE J.*, **45**, 1359

Srienc, F. (1999), "Cytometric data as the basis for rigorous models of cell population dynamics", *J. Biotechnol.*, **71**, 233-238

Srienc, F., Daoutidis, P., Liou, J. J. e Mantzaris, N. (1999), "Numerical solution of a mass structured cell population balance model in an environment of changing substrate concentration", *J. Biotechnol.*, **71**, 157

Subramanian, G. e Ramkrishna, D. (1971), "On the solution of statistical models of cell populations", *Math. Biosci.*, **10**, 1

Tamaki, H. *et al.* (2005) "Glucose-dependent cell size is regulated by a G protein-coupled receptor system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Genes to Cells*, **10**, 193–206

Thompsom, P. W., Wheals, A. E. (1980), "Asymmetrical division of *Saccharomyces*

cerevisiae in glucose-limited chemostat culture", *J. Gen. Microbiol.*, **121**, 401-409

Thomsson, E., Gustafsson, L., Larsson, C. (2005) "Starvation response of *Saccharomyces cerevisiae* grown in anaerobic nitrogen- or carbon-limited chemostat cultures", *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3007–3013

Tsuchiya, H. M., Fredrickson A. G. e Aris, R. (1966), "Dynamics of microbial cell populations", *Advances in Chemical Engineering*, **6**, 125

Vanoni, M., Rossi, R. L., Querin, L., Zinzalla, V., Alberghina, L. (2005) "Glucose modulation of cell size in yeast", *Biochemical Society Transactions* **33**, 294–296

Val, J., Tyson, J. (1996), "A purely deterministic model for the population dynamics of budding yeast", *<http://home.hccnet.nl/j.val/biology/sizedist/sizedist.html>*, consultado em 2006

Van Dam, K. (1996), "Role of glucose in yeast metabolism", *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 151

Villadsen, J. (1999), "On the use of population balances", *J. Biotechnol.*, **71**, 251-253

Villadsen, J. e Nielsen, J. (1992), "Modelling of microbial kinetics", *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 4225

Westerhoff, H. V., Reijenga, K. A., Bakker, B. M., van der Wuijden, C. C. (2005) "Training of yeast cell dynamics", *FEBS Journal*, **272**, 1616–1624

Wolf, J., Heinrich, R. (2000) "Effect of cellular interaction on glycolytic oscillations in yeast – A theoretical investigation" *Biochem. J.*, **345**, 321–334

Wolf, J., Sohn, H.-Y., Heinrich., R., Kuriyama, H., (2001) "Mathematical analysis of a mechanism for autonomous metabolic oscillations in continuous culture of

Saccharomyces cerevisiae" *FEBS Lett.*, **499**, 230–234

Wu, W., Chang, H. Y, (2005) "Nonlinear PI controllers for continuous bioreactors using population balance models", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **28**, 63–70

Zhu, G. Y., Zamamiri, A., Henson, M. A., Hjortso, M. A. (2000), "Model predictive control of continuous yeast bioreactors using cell population balance models", *Chem. Eng. Sci.*, **55**, 6155-6167.

APÊNDICE I

A função sigmoidal logística (ou simplesmente sigmoidal) é expressa por

$$f(\zeta) = \frac{1}{1 + e^{-\lambda(\zeta - \gamma)}} \tag{AI.1}$$

e possui imagem em [0,1]. Esta função possui dois parâmetros: um *acelerador* λ e um *deslocador* γ. Quão maior o valor do acelerador, mais "rápida" é a transição entre os valores 0 e 1, como mostram as Figuras AI.1 – AI.3. O deslocador é o valor para o qual a função sigmoidal tem valor de 0,5, ou seja, $f(\gamma) = 0{,}5$ (Figuras AI.4 – AI.5). A Figura AI.6 mostra a obtenção de modalidade por soma de sigmoidais.

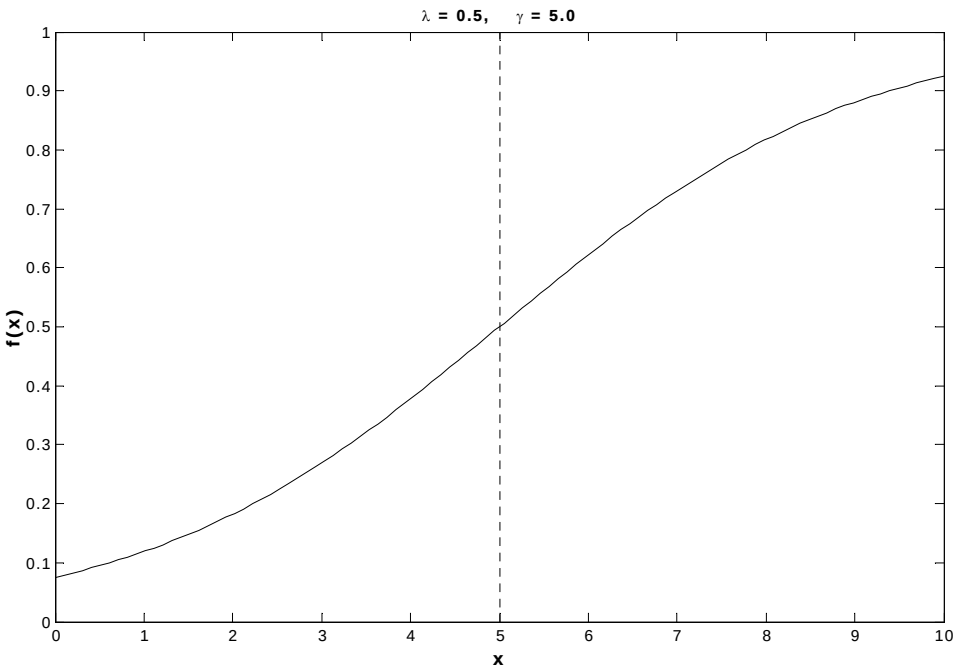

Figura AI.1 – Sigmoidal logística com aceleração baixa (λ = 0,5 e γ = 5)

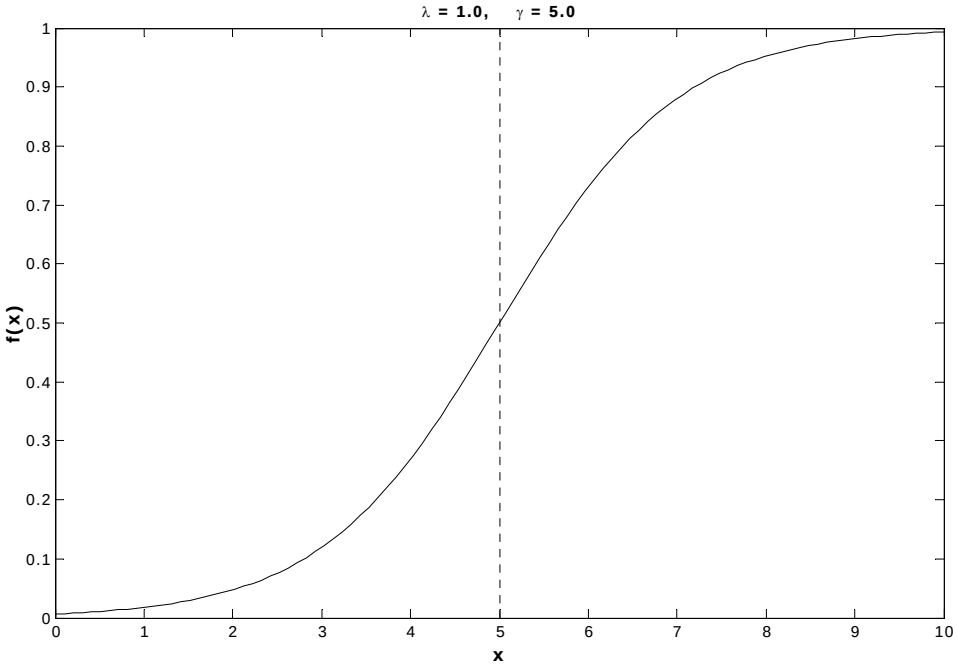

Figura AI.2 – Sigmoidal logística com aceleração unitária ($\lambda = 1$ e $\gamma = 5$)

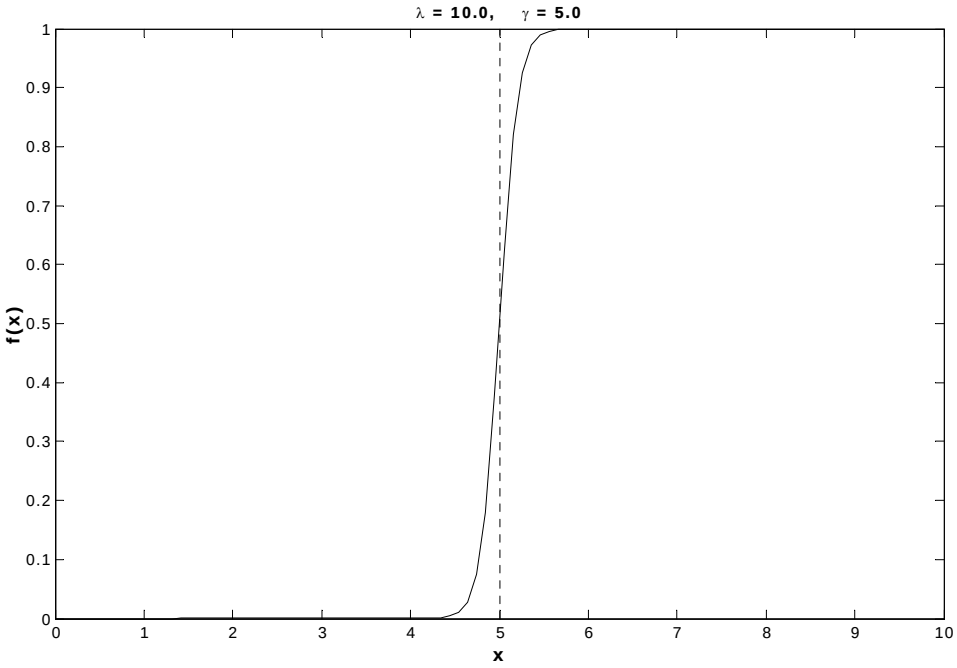

Figura AI.3 – Sigmoidal logística com aceleração alta ($\lambda = 10$ e $\gamma = 5$)

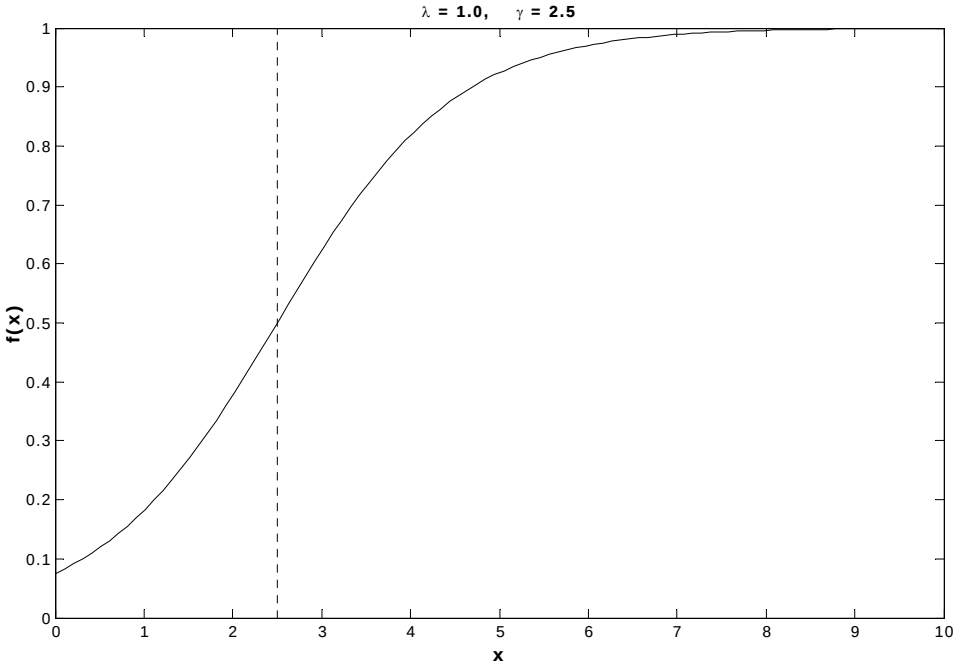

Figura AI.4 – Sigmoidal com aceleração unitária deslocada à esquerda (FDE, γ = 2,5)

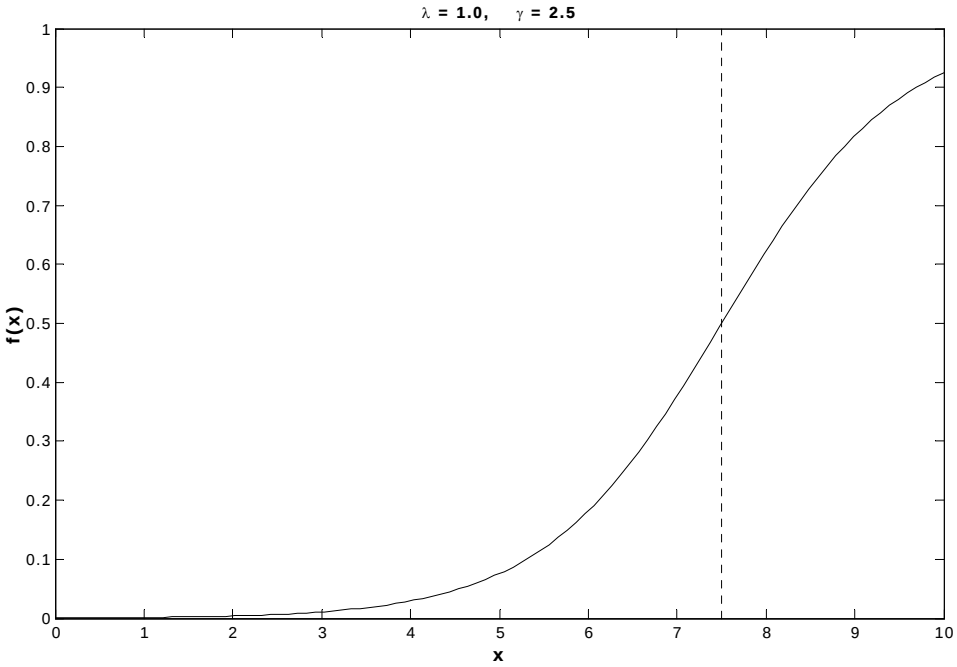

Figura AI.5 – Sigmoidal com aceleração unitária deslocada à direita (FDD, γ = 7,5)

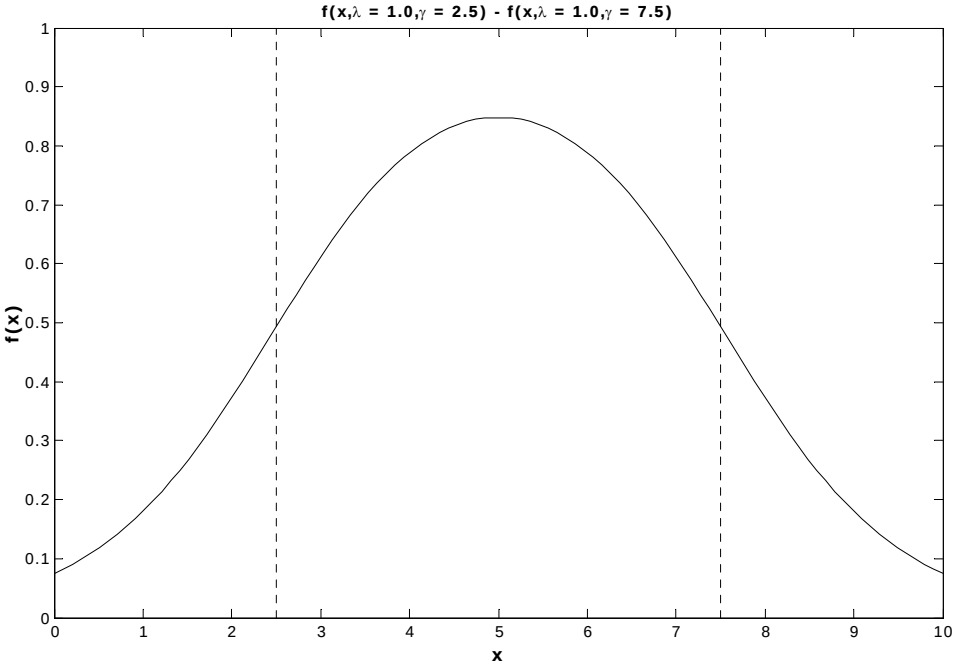

Figura AI.6 – Diferença entre FDE e FDD (obtenção de modalidade)

As funções de probabilidade de divisão e transições celulares apresentadas no Capítulo 3 são construídas com base na função sigmoidal e em alguns termos exponenciais. As Figuras AI.7 – AI.11 apresentam as superfícies formadas por combinações de duas funções sigmoidais, de forma a ilustrar o aspecto de algumas das funções formuladas no Capítulo 3.

A função de probabilidade de divisão possui um termo $g(z)$ (ver Eq. 3.41) definido por

$$g(z) = e^{-\left(\frac{Pc}{DP}\right)^2 \frac{(z-1)^2}{2}} \qquad \text{(AI.2)}$$

$$z = \frac{a}{\mathrm{P}_C} - trunc\left(\frac{a}{\mathrm{P}_C}\right)$$

A Figura AI.12 mostra a superfície formada por uma combinação de uma função sigmoidal *f*(*x*) e uma função *g*(*z*).

Por fim, a função de probabilidade de inativação possui um termo *h*(*z*) (ver Eq. 3.51) definido por

$$h(z) = e^{-\left(\frac{Pc}{DP}\right)^2 \frac{z^2}{2}} \qquad \text{(AI.2)}$$

$$z = \frac{a}{\mathrm{P}_C} - trunc\left(\frac{a}{\mathrm{P}_C}\right)$$

A Figura AI.13 mostra a superfície formada por uma combinação de uma função sigmoidal *f*(*x*) e uma função *h*(*z*).

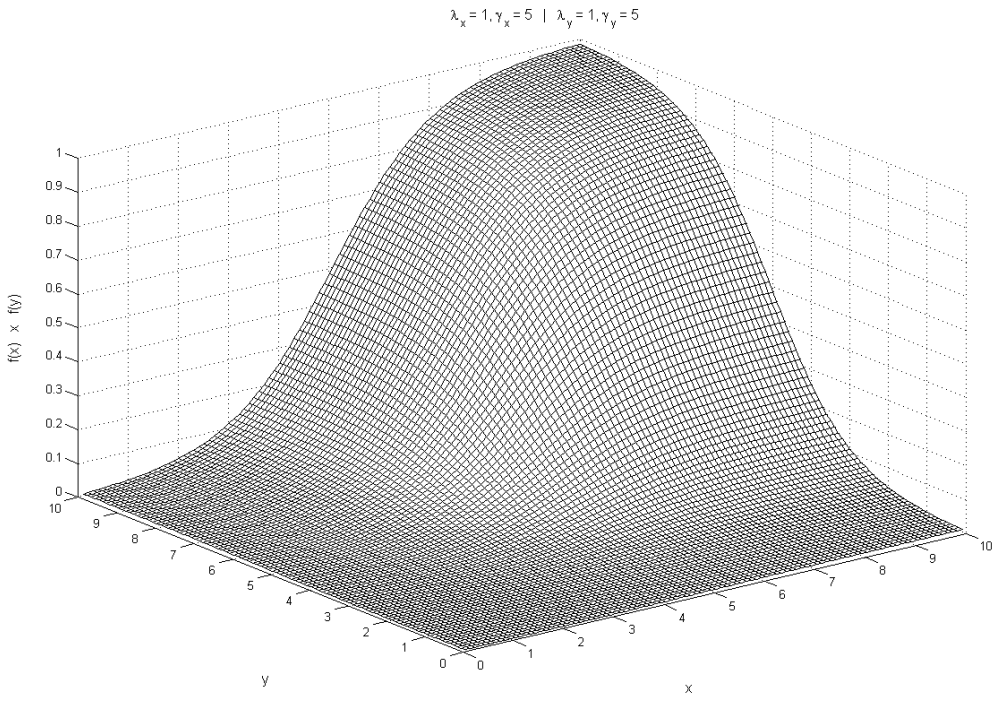

Figura AI.7 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*y*), com os mesmos parâmetros (baixa aceleração)

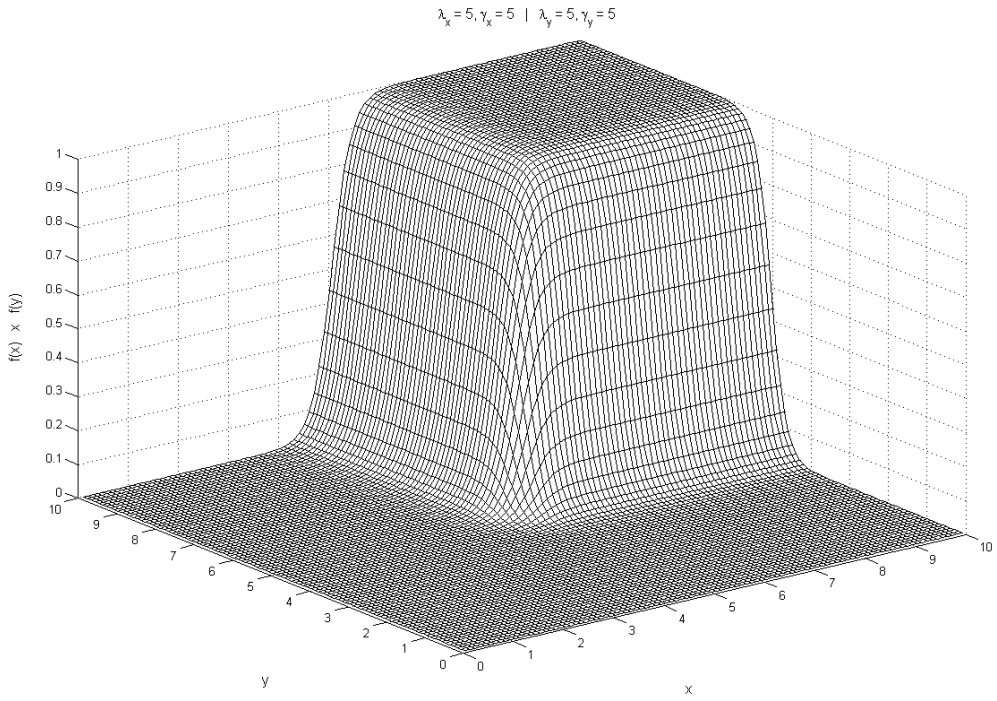

Figura AI.8 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*y*), com os mesmos parâmetros (alta aceleração)

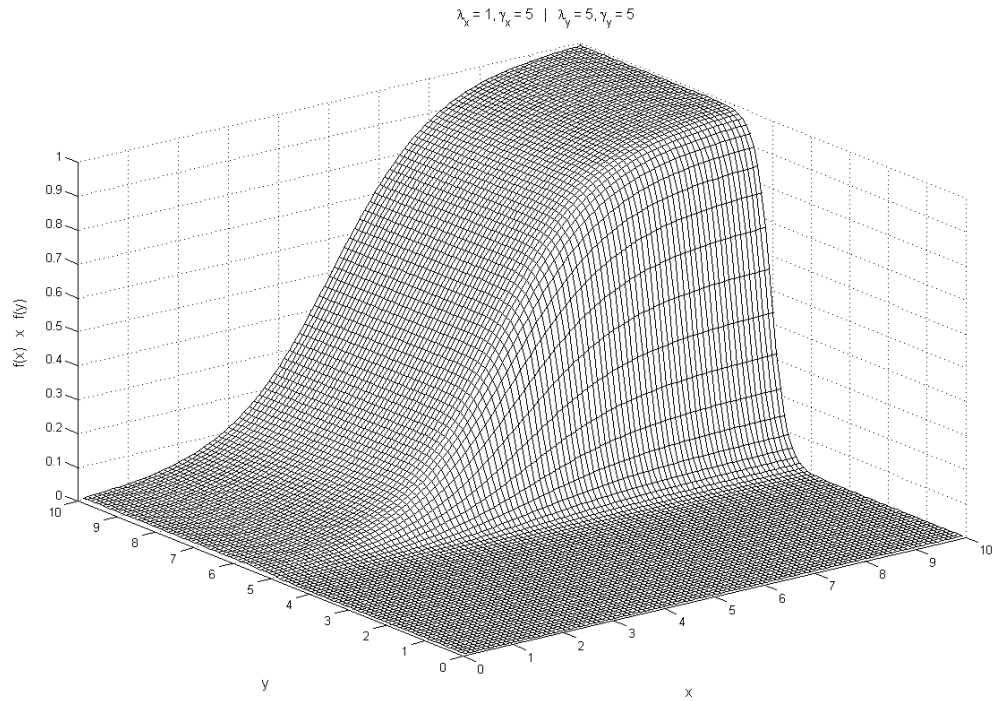

Figura AI.9 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*y*); baixa aceleração *x* alta aceleração

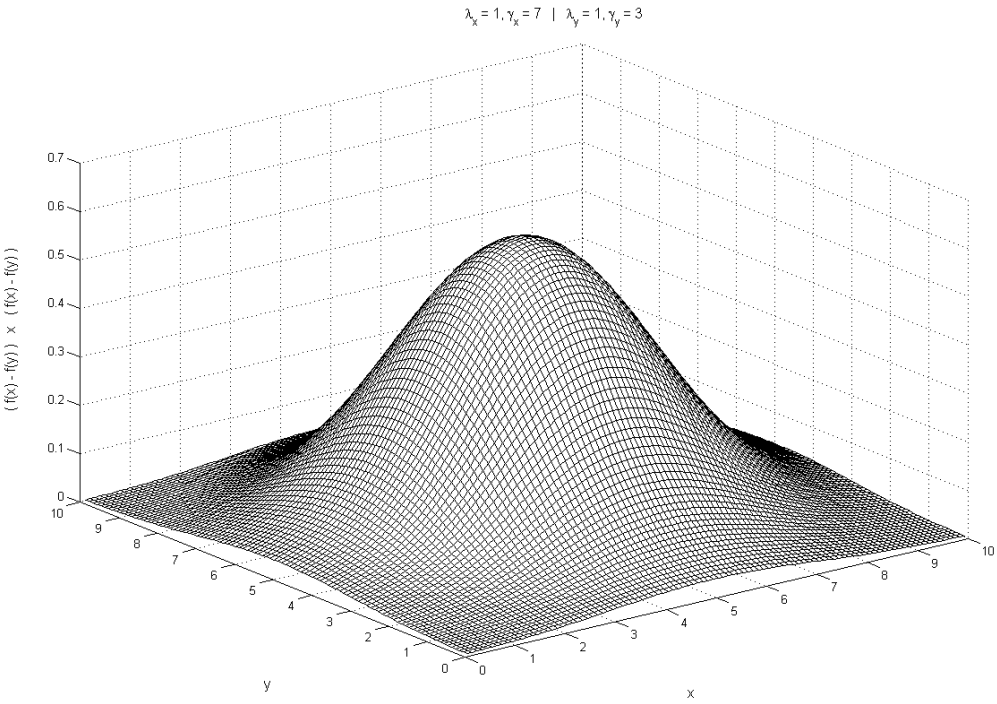

Figura AI.10 – Superfície *f*(*x*)- *f*(*y*) *x f*(*x*)-*f*(*y*), com os mesmos parâmetros (baixa aceleração)

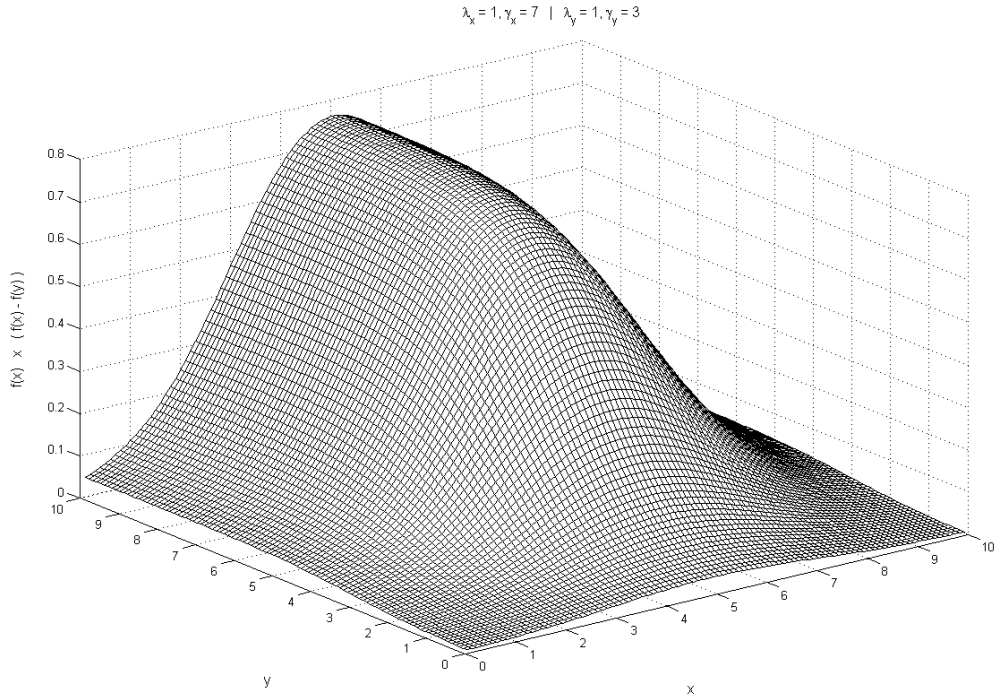

Figura AI.11 – Superfície *f*(*x*) *x f*(*x*)-*f*(*y*), com a mesma aceleração e deslocadores diferentes

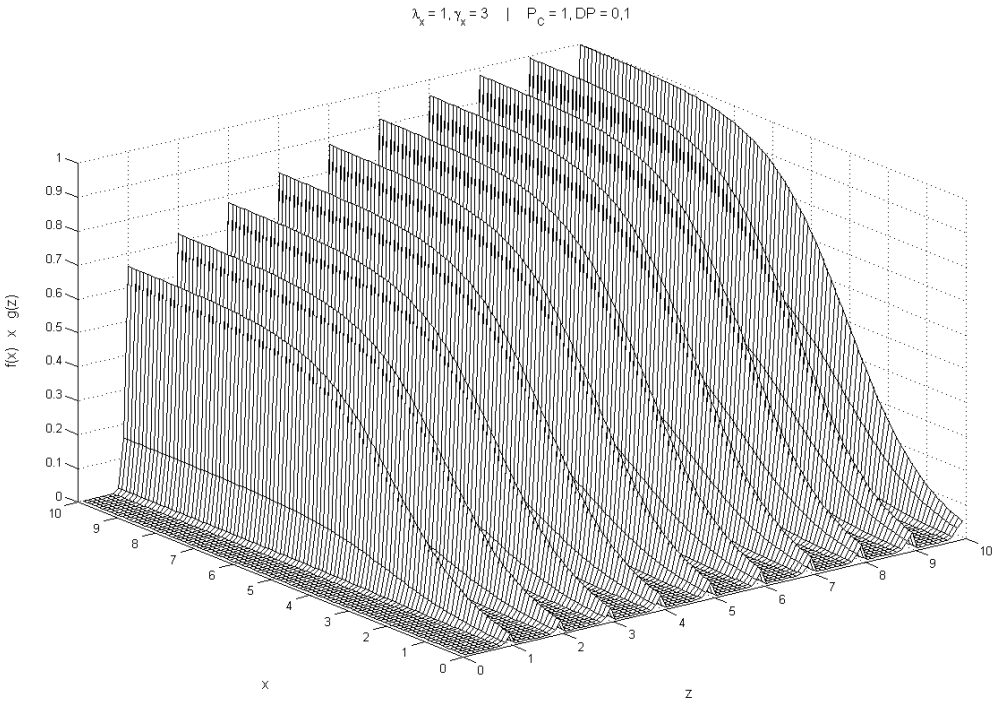

Figura AI.12 – Superfície *f*(*x*) *x g*(*z*)

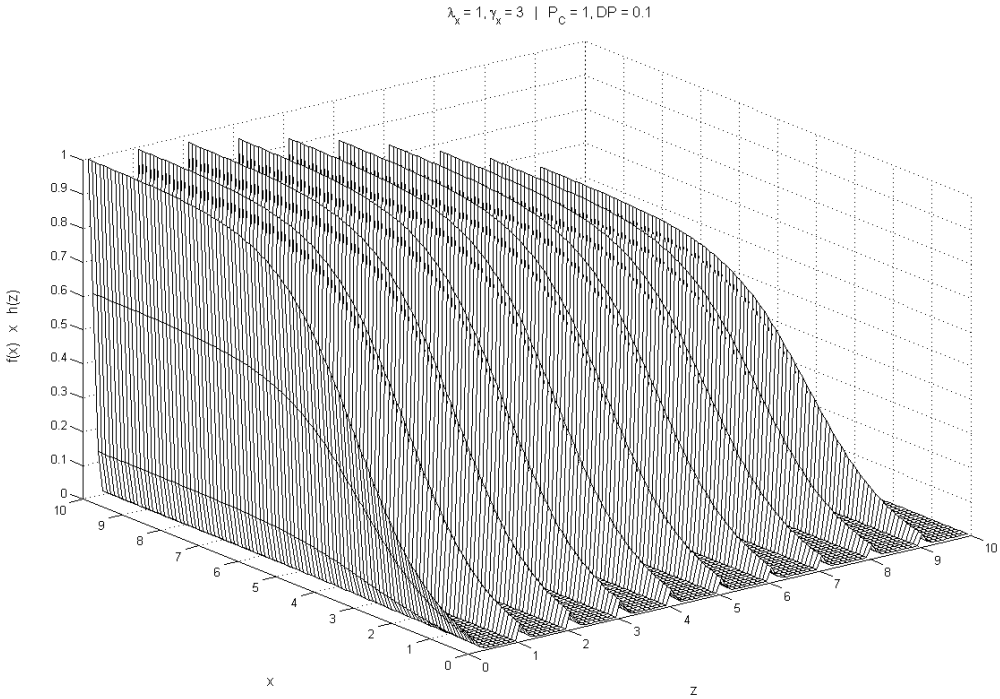

Figura AI.13 – Superfície *f*(*x*) *x h*(*z*)