JULIANA SILVA LOPES

**Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de
retamicina por microrganismo filamentoso *Streptomyces olindensis***

São Paulo
2007

JULIANA SILVA LOPES

**Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de
retamicina por microrganismo filamentoso *Streptomyces olindensis***

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

São Paulo
2007

JULIANA SILVA LOPES

**Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de
retamicina por microrganismo filamentoso *Streptomyces olindensis***

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientador:
Prof. Dr. Reinaldo Giudici

São Paulo
2007

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com anuência de seu orientador.

São Paulo, 03 de julho de 2007-07-03

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, Juliana Silva

Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de retamicina por microrganismo filamentoso *Streptomyces olidensis* / J.S. Lopes. -- São Paulo, 2007.

105 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Modelagem matemática 2.Fermentação 3.Análise estatística

I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por terem me apoiado
incondicionalmente em todos os
momentos da minha vida

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Dr. Reinaldo Giudici pela dedicação, orientação e apoio ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Galo Antonio Carrillo Le Roux pelos ensinamentos e pelas valiosas sugestões na elaboração dos algoritmos.

Aos Profs. Dr. Aldo Tonso e Dra. Maria Cândida Reginato Facciotti pelas correções e sugestões apresentadas durante a qualificação deste trabalho.

Aos professores da graduação e da pós-graduação pela orientação na trajetória do meu crescimento profissional e que, com paciência, me possibilitaram a visão de novos horizontes.

Aos amigos de pós-graduação, em especial, Rita, José Paulo, Mariana, Moisés, Marcelo e Nara que me incentivaram e ajudaram durante todo o curso do mestrado.

Às amigas de graduação que, mesmo estando longe, sempre me apoiaram e me incentivaram na conquista de mais um objetivo.

Às minhas irmãs, Cynthia e Vivianne, por todos os momentos que passamos juntas e pelos laços eternos que nos unem.

Aos meus pais que não mediram esforços em toda minha formação acadêmica.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a modelagem matemática de processo de produção do antitumoral retamicina produzido pelo microrganismo filamentoso *Streptomyces olindensis* em cultivos descontínuos, descontínuos alimentados e contínuos. Através da modelagem matemática é possível verificar o comportamento dos fatores que interferem na produção deste metabólito secundário, a fim de identificar as melhores condições de processo.

Foram estudados diferentes modelos: modelo morfolologicamente estruturado, modelo não estruturado e um modelo híbrido que combina equações de balanço material com redes neurais artificiais. O modelo morfolologicamente estruturado é um aperfeiçoamento de um modelo anterior e o modelo não estruturado, por sua vez, foi desenvolvido na tentativa de simplificar a descrição do processo ao considerar menos variáveis e possuir menor número de parâmetros ajustáveis. Nos modelos, as variáveis consideradas no ajuste foram as concentrações de biomassa, de glicose, de retamicina e de oxigênio dissolvido no meio.

Os resultados das simulações foram avaliados estatisticamente por comparação com os dados experimentais. Os modelos também foram comparados entre si através de uma análise estatística.

Observou-se que, dentre os modelos estudados, o modelo híbrido apresentou sensibilidade pronunciada às condições iniciais e qualidade de representação dos dados experimentais inferior à dos demais modelos. Os modelos morfolologicamente estruturado e não estruturado apresentaram capacidade similar de representação do comportamento dos dados experimentais dos ensaios descontínuos, descontínuo-alimentados e contínuos com baixas taxas de alimentação.

ABSTRACT

The mathematical modeling of retamycin production during batch, fed-batch and continuous cultivations of *Streptomyces olindensis* was studied. Through the mathematical modeling, it is possible to identify the best conditions to conduct the process. Different models considered were: a morphologically structured model, an unstructured model and a hybrid model that combines artificial neural networks with mass balances. The morphologically structured model included an enhancement in a model previously described. The unstructured model was developed as an attempt to simplify the description of the process by considering fewer variables and fewer parameters to be adjusted. The variables considered in the models were the concentrations of biomass, glucose, retamycin and dissolved oxygen.

Simulation results were submitted to statistical analysis such as model discrimination and test of adequacy to verify which of the models were suitable to describe the process and whether the results of the simulations fit the experimental data or not.

Results show that the hybrid model presented high sensitivity to the initial conditions and its capability of representing the experimental data was worse than that of the other developed models. Both the morphologically structured model and the unstructured model show similar suitability to represent the experimental data behavior for batch, fed-batch and low-dilution rate continuous runs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1: Processamento do sinal em um neurônio de uma rede feedforward (Pellicci, 2001).....	13
Figura 2.2: Rede de múltiplas camadas (Pellicci, 2001).....	14
Figura 2.3: Rede recursiva (Pellicci, 2001).....	14
Figura 4.1: Compartimentos apical (Z_a), subapical (Z_s) e hifal (Z_h) de um elemento hifal.....	37
Figura 4.2: Efeito do oxigênio dissolvido sobre a cinética de crescimento para $K_{ox} = 0.02489$ mmol/L	48
Figura 4.3: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos	50
Figura 4.4: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos	51
Figura 4.5: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação.....	52
Figura 4.6: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação.....	53
Figura 4.7: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios contínuos e respectivas vazões de alimentação	54

Figura 4.8: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u1} no ensaio D-1	57
Figura 4.9: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u1} no ensaio DA-1 e variação das frações celulares	58
Figura 4.10: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u2} no ensaio D-1 e variação das frações celulares	60
Figura 4.11: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u2} no ensaio DA-1 e variação das frações celulares	61
Figura 4.12: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u3} no ensaio D-1 e variação das frações celulares	63
Figura 4.13: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u3} no ensaio D-A1 e variação das frações celulares	64
Figura 4.14: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos	69
Figura 4.15: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos	70
Figura 4.16: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação	71
Figura 4.17: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação	72
Figura 4.18: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio	

dissolvido (OD) nos ensaios contínuos e respectivas vazões de alimentação	73
Figura 4.19: Diagrama do modelo híbrido	74
Figura 4.20: Ajuste da curva sigmoidal para os ensaios replicados	78
Figura 4.21: Ajuste da curva sigmoidal para o ensaio D-3+	78
Figura 4.22: Seleção do número de neurônios na rede RN 1	79
Figura 4.23: Seleção do número de neurônios na rede RN 2	79
Figura 4.24: Seleção do número de neurônios na rede RN 3	80
Figura 4.25: Comparação entre os valores experimentais e os calculados. (A) etapa de treinamento e (B) etapa de validação.....	81
Figura 4.26: : Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)	82
Figura 4.27: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)	83
Figura 4.28: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos alimentados (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)	84
Figura 4.29: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos alimentados (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)	85
Figura 4.30: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos	

ensaios D-1 e DA-1 (condições iniciais: $X_0 = 0,28$ g/L, $S_0 = 10,0$ g/L, $P_0 = 0,002$ g/L)	86
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição do meio de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados	25
Tabela 3.2: Resumo das condições dos ensaios descontínuos alimentados realizados (Pamboukian, 2003).....	27
Tabela 3.3: Resumo das condições dos ensaios contínuos (Pamobukian, 2003).	29
Tabela 4.1: Parâmetros do modelo de Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004)	43
Tabela 4.2: Parâmetros do modelo 1	47
Tabela 4.3: Matriz de correlação dos parâmetros estimados	55
Tabela 4.4: Parâmetros utilizados na análise de sensibilidade	55
Tabela 4.5: Parâmetros do modelo 2	68
Tabela 4.6: Estatística dos parâmetros estimados no modelo 2	68
Tabela 4.7: Cálculo do erro experimental médio de X.....	88
Tabela 4.8: Cálculo do erro experimental médio de S.....	88
Tabela 4.9: Cálculo do erro experimental médio de P	89
Tabela 4.10: Cálculo do erro experimental médio de OD.....	89
Tabela 4.11: Variâncias e graus de liberdade dos modelos	90
Tabela 4.12: Teste de discriminação entre modelo.....	90
Tabela 4.13: Variâncias dos modelos e do erro experimental.....	91
Tabela A.1: Equações dos modelos 0, 1 e 2	102

LISTA DE SÍMBOLOS

A_b, A_t e t_0	parâmetros ajustáveis da equação sigmoidal (eq. 4.34)
b_1, b_2, b_3	parâmetros da eq. 4.24
C_L	concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura (mmol O_2/L)
C_L^*	concentração de saturação oxigênio dissolvido no meio de cultura (mmol O_2/L)
C_{THAM}	concentração de tris(hidroxi)metilaminometano (g/L)
C_{ye}	concentração de extrato de levedura (g/L)
df	graus de liberdade
$f_s(s)$	função definida pela equação 4.2
f_h	fração de células hifais ativas (g Z_h ativo/g Z_h total)
F	vazão de alimentação (g/L)
F_{calc}	razão entra a variância do modelo e a variância do erro experimental
$F_{amostragem}$	vazão de amostragem (L/h)
k	constante cinética para o crescimento de células apicais, subapicais e hifais (h^{-1})
k_2	constante cinética para a produção de retamicina (h^{-1})
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})
ku_1	constante para a reação de “branching” (h^{-1})
ku_2	constante para a reação de “tip extension” (h^{-1})
ku_3	constante para a reação de diferenciação (h^{-1})
K_2	constante de saturação (g/L)
K_{ms}	constante de saturação de glicose para manutenção (g/L)

K_{U_3}	constante de saturação para reação de diferenciação (L/g glicose)
K_{Ox}	constante de saturação para o oxigênio.....(mmol O_2 /L)
K_N	constante de saturação para a fonte de nitrogênio (g NH_3 /L)
K_S	constante de saturação para a fonte de carbono (g glicose/L)
K_{S2}	constante de saturação (g/L)
m	número de modelos em competição
m_{O_2}	coeficiente de manutenção (consumo de oxigênio) (h^{-1})
m_s	coeficiente de consumo de glicose para manutenção celular (h^{-1})
n	número de pontos experimentais
N	concentração da fonte de nitrogênio (g NH_3 /L)
N_F	concentração da fonte de nitrogênio no meio de alimentação (g NH_3 /L)
OD	concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (%)
p	número de parâmetros do modelo “i”
p_i	número de replicações em cada ponto
P	concentração de retamicina (g retamicina/L)
r_x	velocidade instantânea de crescimento celular (g/L.h)
r_p	velocidade instantânea de produção de retamicina (g/L.h)
r_s	velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L.h)
s^{-2}	estimativa combinada da variância
s_i^2	estimativa da variância do modelo “i”
S	concentração de glicose (g/L)
S_F	concentração de glicose no meio de alimentação (g/L)
u_1	velocidade de reação de “branching” (h^{-1})
u_2	velocidade de reação de “tip extension” (h^{-1})

u_3	velocidade de reação de diferenciação (h^{-1})
v	número de variáveis
V	volume do reator (L)
X	concentração de biomassa (g/L)
$\hat{y}$	valor calculado pelo modelo
y_i	valor experimental do teste de Barlett
$\bar{y}_i$	valor médio da variável para os ensaios repetidos (é y barra)
y_{ij}	valor experimental da variável
$\hat{y}_{ij}$	valor calculado pelo modelo
Y_{O_2}	fator de conversão de oxigênio a células (g cel/mmol O_2)
Z_a	fração mássica do compartimento apical (g/g)
Z_h	fração mássica do compartimento hifal (g/g)
Z_s	fração mássica do compartimento subapical (g/g)

Letras gregas

α	nível de significância
α_1	coeficiente estequiométrico de consumo de glicose para formação da biomassa (g glicose/gcel)
α_2	coeficiente estequiométrico de consumo de glicose para formação de retamicina (g glicose/g retamicina)
α_3	coeficiente estequiométrico de consumo da fonte de nitrogênio para a formação da biomassa (g NH_3 /g cel)

α_4	coeficiente estequiométrico de consumo da fonte de nitrogênio para formação de retamicina (g NH_3 / g retamicina)
β_1	fator de conversão de extrato de levedura em NH_3 equivalente (g NH_3 /g extrato de levedura)
β_2	fator de conversão de tris(hidroxi)metilaminometano em NH_3 equivalente (g NH_3 /g THAM)
μ	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_a	velocidade específica de crescimento de células apicais (h^{-1})
μ_d	velocidade específica de degradação da biomassa (h^{-1})
$\mu_{\max}$	velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
μ_N	velocidade específica de consumo de nitrogênio (g NH_3 /(g cel.h))
μ_{O_2}	velocidade específica de consumo de oxigênio (mmol O_2 /(g cel.h))
μ_P	velocidade específica de produção de retamicina (g retamicina/(g cel.h))
μ_S	velocidade específica de consumo de glicose (g glicose/(g cel.h))
μ_{sa}	velocidade específica de crescimento de células subapicais (h^{-1})
χ^2_{calc}	teste de Bartlett

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica.....	3
2.1	Retamicina	3
2.2	Influência de fatores na produção de retamicina.....	3
2.2.1	Microrganismo	3
2.2.2	Meios de cultura e condições de cultivo	4
2.3	Modelagem Matemática.....	6
2.3.1	Modelos fenomenológicos para processos fermentativos envolvendo microrganismos filamentosos.....	9
2.3.2	Redes neurais artificiais.....	12
2.3.3	Modelos híbridos utilizados em processos bioquímicos	16
2.4	Análise estatística do modelo.....	18
2.4.1	Discriminação entre modelos.....	18
2.4.2	Adequação do modelo	21
3	Origem dos dados.....	23
3.1	Microrganismo.....	23
3.2	Meio de cultura.....	23
3.3	Ensaio realizados.....	24
3.3.1	Descrição dos ensaios descontínuos alimentados	26
3.3.2	Descrição dos ensaios contínuos	29
4	Modelagem Matemática	31
4.1	Modelos fenomenológicos	32

4.1.1	Modelo 0: modelo morfolologicamente estruturado proposto por Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004).....	32
4.1.2	Modelo 1: modelo morfolologicamente estruturado, considerando a concentração de oxigênio dissolvido e uma fração de células hifais ativas (f_h)..	44
4.1.3	Modelo 2: modelo não estruturado	65
4.2	Modelo 3: modelo híbrido.....	74
4.3	Análise estatística	87
4.3.1	Cálculo do erro experimental de cada variável de estado.....	87
4.3.2	Discriminação entre modelos.....	89
4.3.3	Teste de adequação do modelo.....	91
5	Conclusões e recomendações	93
	Referências Bibliográficas	95
	Apêndice A	102

1 Introdução

Os diversos tipos de câncer se caracterizam pelo crescimento de células anormais em qualquer tecido do corpo. Mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer a cada ano e estima-se que seja a causa da morte de 7 milhões de pessoas por ano, o que corresponde a 12,5% dos óbitos (OMS, 2006).

As antraciclina são antibióticos antitumorais usados no tratamento quimioterápico de diversos tipos de câncer. As mais empregadas atualmente são a doxorrubicina e a daunorrubicina, mas apresentam sérios problemas na sua utilização, principalmente uma elevada toxicidade e um elevado custo de produção (Pamboukian, 2003). Sendo assim, torna-se necessário buscar novas drogas menos tóxicas, como é o caso da retamicina.

A retamicina mostrou-se eficaz no tratamento de câncer, porém, ainda não chegou ao mercado devido à baixa produtividade do processo e a dificuldades na etapa de purificação, o que conduz a um alto custo do medicamento (Pamboukian, 2003). Nesse sentido, é necessário o melhoramento do processo de produção deste antitumoral, seja através da obtenção de cepas com maior capacidade de produção, seja através da otimização das condições empregadas nos cultivos em biorreatores ou ainda pelo melhoramento dos processos de purificação do antibiótico. Assim, a modelagem matemática do processo constitui uma importante ferramenta de otimização do processo de produção, pois permite a avaliação de condições não testadas experimentalmente através de simulação (Ohba, 1998). Se as expressões cinéticas forem corretamente definidas, é possível prever o curso da fermentação baseando-se nos valores iniciais de algumas variáveis, como, por exemplo, concentração de substratos. Isto leva a simulações que, no final, podem resultar em um desenho ótimo do equipamento ou em um modo ótimo de operação de um dado sistema (Nielsen; Villadsen, 1994).

O presente trabalho tem como objetivo geral o de contribuir no desenvolvimento de modelos matemáticos representativos do processo fermentativo de produção de retamicina. Diversos aspectos deste processo vêm sendo estudados experimentalmente em uma linha de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (DEQ-EPUSP) (Guimarães, 2000; Martins, 2001; Pamboukian, 2003; Guimarães, 2005; Inoue, 2006). Em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Simulação e Controle de Processos – Centro de Engenharia de Sistemas Químicos (LSCP-CESQ) do DEQ-EPUSP têm sido desenvolvidos modelos matemáticos para este processo fermentativo (Giudici; Pamboukian; Facciotti, 2004). O presente trabalho se insere neste esforço e tem como objetivos específicos continuar o desenvolvimento e aperfeiçoamento do modelo morfológicamente estruturado proposto por Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004), bem como elaborar outros modelos representativos do processo de produção de retamicina, que possam ser úteis para estudos de melhoria do processo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Retamicina

A retamicina é um antibiótico com atividade antitumoral que pode ser produzido por via fermentativa utilizando o microrganismo *Streptomyces olindensis*. O produto se apresenta na forma de um pó de coloração vermelha com baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos (Lima et al., 1969 apud Giudici, Pamboukian e Facciotti, 2004). A retamicina mostrou-se promissora como agente quimioterápico, devido à menor toxicidade quando comparado com os antitumorais mais usados nesse tipo de tratamento.

2.2 Influência de fatores na produção de retamicina

A partir da cepa mutante *Streptomyces olindensis* ICB20, muitos trabalhos têm sido realizados a fim de identificar os principais fatores que podem influenciar o processo, como, por exemplo, concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura, forma de operação do reator de fermentação, entre outros.

2.2.1 Microrganismo

A linhagem selvagem de *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 foi isolada na década de 1960 em Pernambuco e mostrou-se promissora na produção do

LIMA, O.G.; LYRA, F.D.A.; ALBUQUERQUE, M.M.F.; MACIEL, G.M.; COELHO, J.S.B. Primeiras observações sobre o complexo antibiótico e antitumoral – retamicina – produzido pelo *Streptomyces olindensis* nov. sp. IAUFPe. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 9, p. 27-37, 1969.

antibiótico antitumoral retamicina (Lyra et al., 1968 apud Pamboukian, 2003). A fim de se aumentar a produtividade em retamicina, foi obtida uma cepa mutante de *Streptomyces olindensis*, denominada ICB20, pelo Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), a qual apresentou uma produtividade em retamicina significativamente superior à da linhagem selvagem (Pamboukian, 2003).

2.2.2 Meios de cultura e condições de cultivo

Com a cepa mutante *Streptomyces olindensis* ICB20, foram realizados alguns trabalhos no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP (LEB/DEQ/EPUSP), a fim de se aumentar a produção de retamicina em biorreatores (Pamboukian, 2003).

Guimarães (2000) estudou a influência do preparo do inóculo e do pH na produção de retamicina por *Streptomyces olindensis*, linhagem mutante ICB20, em cultivos submersos. Os ensaios foram realizados em biorreatores de bancada, estabelecendo o processo de inoculação em duas etapas: um pré-cultivo de 16 horas e um cultivo de 24 horas, em incubador rotativo a 30°C e 200 rpm. O pH 7,0 foi o que conduziu a melhores resultados no processo de produção de retamicina.

Martins (2001) analisou a transferência de oxigênio e a respiração microbiana durante os cultivos de *Streptomyces olindensis* ICB20, concluindo que a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 100% da concentração de saturação durante a fase de crescimento do microrganismo favorece a produção do antibiótico por permitir a síntese dos precursores do metabolismo primário. A manutenção de oxigênio dissolvido em baixas concentrações durante a fase de produção do antibiótico não teve efeito negativo no processo.

Pamboukian (2003) estudou a produção do antitumoral retamicina em reatores de bancada, em processos descontínuo alimentado e contínuo, visando a obtenção de elevadas quantidades do antibiótico pelo controle da velocidade específica de crescimento em determinados períodos dos cultivos.

Guimarães (2005) examinou a influência de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na produção do antibiótico retamicina em cultivos descontínuos de *Streptomyces olindensis* ICB20 utilizando-se planejamento experimental para delineamento dos cultivos realizados. De acordo com os resultados obtidos e com base nas análises estatísticas efetuadas, os melhores pares de fontes escolhidos foram: glicose e extrato de levedura para o crescimento celular e amido e nitrato de sódio para a produção de retamicina. Foram também testados novos métodos para a determinação da retamicina, tais como, espectrofotometria de varredura e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, ainda, foram testados métodos para comprovar a atividade biológica da retamicina, como testes de atividade antimicrobiana e atividade antitumoral.

Inoue (2006) estudou a influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB 20 com o uso de um meio de cultura definido, em cultivos contínuos, empregando meios limitados em carbono, nitrogênio ou fosfato, variando-se a vazão específica de alimentação entre 0,025 e 0,075 h⁻¹. A análise dos dados dos cultivos mostrou que a produção de retamicina foi favorecida sob limitação por fosfato. Os dados relativos à análise de imagens indicaram uma relação entre a porcentagem em área de diferentes classes morfológicas e a produção de retamicina, sendo que aparentemente, a produção é maior quando a porcentagem de “clumps” é menor.

2.3 Modelagem Matemática

Bonomi e Schmidell (2001) definem a modelagem matemática de processos fermentativos como a tentativa de representar, através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente do biorreator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam. Voleski e Votruba (1992) mencionam que, devido à complexidade dos processos reais (que envolve leis físico-químicas, bioquímicas e genéticas), somada às limitações matemáticas, os modelos são baseados na idealidade, e em geral fornecem uma representação fiel de apenas algumas propriedades do processo. Segundo os autores, a formulação do modelo deve possuir um comprometimento entre grau de complexidade e solução economicamente desejável (esforço computacional).

Logicamente, a descrição completa de todas as vias e interações metabólicas que ocorrem em um processo biológico seria uma tarefa impossível (Ohba, 1998). Segundo Sinclair e Kristiansen (1987), em um modelo para fermentação devem ser considerados somente aspectos relevantes nos quais tem-se interesse. Dessa maneira, um modelo seria uma série de relações entre as variáveis de interesse de um sistema em estudo.

O objetivo da modelagem matemática de um processo fermentativo é, portanto, organizar informações desconexas sobre os eventos em um conjunto coerente, identificar quais sistemas e interações são relevantes em um sistema, descobrir novas estratégias que permitam descrever o comportamento do processo em determinadas condições e entender as características qualitativamente importantes para o processo (Bailey, 1998).

Os modelos matemáticos de processos fermentativos podem ser definidos em três grupos: modelos fenomenológicos, modelos entrada-saída (caixa-preta) e modelos híbridos (caixa-cinza).

Na abordagem fenomenológica, o desenvolvimento do modelo é conduzido pelos aspectos relevantes do processo e pelos chamados princípios fundamentais. Tais modelos tendem a apresentar boa capacidade de extrapolação. No entanto, o conhecimento necessário para um sistema específico muitas vezes não é disponível. Conseqüentemente, o esforço maior nesse tipo de abordagem é dedicado à identificação correta dos mecanismos relevantes ao processo, o que pode consumir muito tempo (Van Can et al., 1996).

Os modelos fenomenológicos para processos fermentativos são constituídos por equações de balanço ou de conservação (de massa, de energia ou de quantidade de movimento, ou seja, os chamados princípios fundamentais), equações de velocidade (como, por exemplo, expressões cinéticas que descrevem a geração ou consumo de espécies dentro do sistema) e equações termodinâmicas, que relacionam propriedades termodinâmicas do sistema (pressão, temperatura, densidade, concentração). As equações cinéticas são denominadas modelos cinéticos (Bonomi; Schmidell, 2001).

Os modelos cinéticos de processos fermentativos podem ser classificados quanto ao número de componentes usados na representação celular em dois tipos (Bonomi; Schmidell, 2001):

- Modelos não estruturados: o microrganismo é visto como uma espécie reagente simples, possivelmente com uma composição química fixa, sem considerar variações nos componentes intracelulares;
- Modelos estruturados: as células são descritas com maiores detalhes, considerando, por exemplo, componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos podem ser classificados em (Bonomi e Schmidell, 2001):

- Modelos não segregados: a população é considerada homogênea, isto é, todas células apresentam o mesmo comportamento;

- Modelos segregados: as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, de tamanho e de propriedades celulares.

Em relação à abordagem estruturada, Bizukoje e Ledakowicz (2003) descrevem dois tipos de modelos que podem ser aplicados para descrever o crescimento microbiano. São eles os modelos intracelularmente estruturados, onde se formulam expressões cinéticas para as reações intracelulares dos mecanismos metabólicos básicos e os modelos morfolologicamente estruturados, nos quais a biomassa é dividida em subseções ou compartimentos de variadas funções e propriedades bioquímicas. Nos modelos morfolologicamente estruturados, as dimensões das células podem ser consideradas.

Na abordagem caixa-preta, o desenvolvimento do modelo está relacionado com observações do comportamento dos dados medidos do sistema a ser modelado. A principal vantagem dessa estratégia é o fato de ser possível a obtenção, em um período curto de tempo, de um modelo matemático preciso sem que seja necessário um conhecimento detalhado do processo. No entanto, a principal desvantagem dessa abordagem é a impossibilidade de realizar extrapolações, sendo necessário que os experimentos cubram todo o domínio de aplicação do modelo para evitar tal problema. O principal exemplo de modelos do tipo entrada-saída são as redes neurais artificiais (Van Can et al., 1997) (ver item 2.3.2.). Resumidamente, as redes neurais artificiais são funções que estimam relações entrada – saída de um dado sistema. São, portanto, mais uma ferramenta a ser utilizada em modelagem de processos. Sua característica mais interessante é que não dependem de um modelo matemático que relacione as entradas e saídas de um processo. Elas “aprendem” essa relação a partir de um “treinamento” semelhante ao aprendizado de um cérebro humano. Em função de suas características, a rede neural pode ser aplicada em casos que apresentam fortes não-linearidades, situações nas quais em geral é mais difícil obter modelos fenomenológicos (Alves, 2003).

Na modelagem híbrida, há a combinação das equações de princípios fundamentais com uma ou mais redes neurais artificiais (RNA). Nesse caso, as RNAs atuam como estimadoras de parâmetros ou variáveis não conhecidas. Assim, a rede pode ser treinada para estimar parâmetros do modelo fenomenológico ou substituir equações deste como, por exemplo, equações de velocidade de reação e de velocidade de crescimento celular (Tonin, 2005).

2.3.1 Modelos fenomenológicos para processos fermentativos envolvendo microrganismos filamentosos

Bajpai e Reuss (1980) investigaram um modelo mecanístico para a produção de penicilina. O modelo não-estruturado foi validado com dados experimentais. Considerou-se a cinética de Contois para o consumo de glicose e de oxigênio e também a autólise de penicilina. Também levou-se em conta a inibição da formação de produto pelo excesso de substrato. O modelo foi utilizado para estudar os efeitos da vazão de alimentação, da concentração inicial de substratos e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio sobre o processo. Concluiu-se que o modelo foi capaz de descrever a tendência de comportamento da formação de produto.

Matsumura et al. (1981) propuseram um modelo morfolologicamente estruturado para a produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* em um cultivo descontínuo e, posteriormente, aplicaram com sucesso tal modelo em uma simulação de um cultivo descontínuo alimentado. Foram consideradas três formas morfológicas e também que a produção do antibiótico estava associada à diferenciação da célula. Inicialmente, o modelo não conseguia prever a formação de cefalosporina C em cultivos “fed-fatch” quando se utilizavam altas vazões de alimentação, devido à repressão da biossíntese do metabólito quando a

velocidade de crescimento celular diminuía, causando um acúmulo de glicose no meio. Após a inserção de um termo de inibição no modelo, foi possível descrever o comportamento do cultivo “fed-batch”, mesmo em altas vazões de alimentação.

Nielsen (1993) propôs um modelo morfolologicamente estruturado para descrever o crescimento de microrganismos filamentosos. Tal modelo considera que em um elemento hifal existem três formas morfológicas: células apicais, subapicais e hifais. O modelo assume que o consumo de substrato e formação de biomassa ocorre somente nos compartimentos apical e subapical. O compartimento hifal é inativo em termos de crescimento. O modelo foi então aplicado para descrever o crescimento de três espécies de microrganismos filamentosos. O modelo foi utilizado posteriormente por outros autores na formulação de modelos morfolologicamente estruturados para descrever a produção de metabólitos secundários por microrganismos filamentosos.

Menezes et al. (1994) desenvolveram um modelo não estruturado para a produção de penicilina G em cultivos descontínuos alimentados realizados em reatores de 1m³ de capacidade. O modelo adotou as equações de velocidades específicas propostas por Bajpai e Reuss (1980), negligenciando a repressão catabólica por glicose e incluindo a autólise da biomassa. O poder preditivo do modelo foi testado, obtendo-se sucesso para fermentações com diferentes perfis de alimentação de açúcar e outras matérias-primas.

Paul e Thomas (1996) reportaram um modelo estruturado para a produção de penicilina em fermentações submersas de *Penicillium chrysogenum*. Através de medidas feitas por análise de imagens, os autores conseguiram relacionar as transformações morfológicas à produção do antibiótico sob diferentes regimes de alimentação de glicose. Devido à sua capacidade preditiva, concluiu-se que o modelo pode ser usado em estratégias de controle, balancendo o suprimento de nutrientes e a demanda da cultura para atingir o efeito desejado.

Zangirolami et al. (1997) investigaram a aplicabilidade do modelo morfolologicamente estruturado de Nielsen (1993) para descrever a produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum* em cultivos descontínuos alimentados. O

modelo apresentou bons resultados nas predições de concentração de biomassa e produto, mas, em alguns casos, o modelo não apresentou bons resultados para a concentração de glicose. Os autores ressaltam que o pequeno número de parâmetros do modelo e a sua força preditiva o capacitam para ser utilizado em estratégias de controle.

Cruz et al. (1999) desenvolveram um modelo não-estruturado para representar a produção de cefalosporina C em cultivos descontínuos alimentados. O modelo foi aplicado em diferentes condições de operação, sendo possível determinar uma vazão de alimentação ótima que promove uma produção maior do antibiótico.

Birol et al. (2002) propuseram um modelo morfolologicamente estruturado para descrever a produção de penicilina em cultivos “fed-batch”. Tal modelo é uma variação do modelo de Nielsen (1993) e inclui os efeitos do oxigênio dissolvido no meio e as variações de volume nas fases abiótica e biótica devido à formação de biomassa. Vários regimes de alimentação foram testados, a fim de demonstrar a capacidade do modelo proposto. Concluiu-se que o modelo apresenta grande aplicabilidade em termos de condições operacionais, pois oferece larga flexibilidade ao simular o processo.

Bizukojc e Ledakowicz (2003) formularam um modelo morfolologicamente estruturado para a descrição do acúmulo de ácido cítrico em cultivos descontínuos de *Aspergillus niger*. As curvas simuladas mostraram-se consistentes com os dados experimentais.

Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004) também utilizaram o modelo morfolologicamente estruturado de Nielsen (1993) para avaliar as transformações morfológicas nos cultivos de *Streptomyces olindensis* para produção do antibiótico retamicina. O modelo forneceu uma boa descrição quantitativa para a produção de retamicina, crescimento de biomassa e consumo de glicose, tanto em cultivos descontínuos como em cultivos descontínuos alimentados.

Liu, Xing e Han (2005) formularam um modelo morfolologicamente estruturado considerando as funções específicas de diferentes compartimentos do elemento hifal combinado com um modelo populacional, no qual se descreve o crescimento

das hifas de acordo com suas idades e comprimentos. O modelo foi aplicado com sucesso na simulação de processos descontínuos de produção de estreptomicina.

2.3.2 Redes neurais artificiais

As redes neurais artificiais são uma descrição genérica para uma classe de modelos computacionais inspiradas na estrutura de neurônios biológicos. Elas podem reconhecer padrões, reorganizar dados e “aprender” comportamentos dinâmicos complexos de sistemas físicos (Silva et al, 2000).

Pellicci (2001) descreve brevemente o funcionamento do cérebro humano e posteriormente faz uma analogia com o neurônio computacional. O neurônio é a unidade biológica fundamental do cérebro. O cérebro humano possui cerca de 100 bilhões de neurônios interconectados através dos dendritos, que se comunicam com os demais pelas junções conhecidas como sinapses. A transmissão através desta junção é de natureza química e a quantidade de sinal transmitido depende da quantidade de substâncias químicas (neurotransmissores) circulando entre os dendritos e saindo dos neurônios pelos axônios (ramificações com os neurônios vizinhos). No mecanismo de aprendizagem do cérebro humano, o comprimento da ligação sináptica é modificado alterando-se a força interativa entre os neurônios. Cada neurônio possui cerca de 10.000 dendritos através dos quais os sinais são captados, processados e devolvidos ao meio na forma de um impulso nervoso.

O neurônio computacional funciona de maneira similar ao biológico, possuindo várias entradas e saídas, sendo que estas últimas são conectadas ao elemento adjacente através de conexões ponderadas de maneira similar às ramificações sinápticas. Cada conexão possui um peso correspondente que modifica os sinais de entrada. Os sinais ponderados são somados, modificados por uma função de ativação (sigmoideal, seno hiperbólico, tangente hiperbólica, etc.) e enviados da

saída para a entrada do próximo neurônio. O funcionamento do neurônio artificial pode ser resumido nos seguintes passos conforme ilustrado na figura 2.1: 1) os sinais são recebidos do neurônio anterior; 2) os sinais são multiplicados por pesos correspondentes a cada ligação; 3) os sinais ponderados são somados para caracterizar a combinação de efeitos de cada entrada; 4) a soma calculada é modificada por uma função de ativação ou transferência para compensar as inter-relações entre as entradas; 5) os sinais ativados seguem para o neurônio subsequente (Pellicci, 2001).

Figura 2.1: Processamento do sinal em um neurônio de uma rede feedforward (Pellicci, 2001)

Assim como o sistema nervoso organiza seus neurônios, os modelos de neurônios artificiais são arranjados ordenadamente, formando as redes neurais artificiais. Tais redes são formadas por uma camada de entrada, uma ou mais camadas ocultas e uma camada de saída.

No que se refere à estrutura da rede, duas classes são geralmente empregadas: redes de múltiplas camadas (*multilayer feedforward network*), conforme a Figura 2.2 e redes recursivas (Figura 2.3). Em redes *feedforward*, o fluxo de informações entre uma camada e outra é unidirecional, a partir da

entrada, passando pelas camadas ocultas e pela saída. Já nas redes recursivas, as informações de saída retornam à camada de entrada.

Figura 2.2: Rede de múltiplas camadas (Pellicci, 2001)

Figura 2.3: Rede recursiva (Pellicci, 2001)

A rede neural mais usada em modelagem e simulação de processos químicos é a rede *feedforward*. Os nós nas diferentes camadas da rede representam elementos de processamento do tipo neurônios. O número de neurônios nas camadas de entrada e saída depende dos respectivos números de dados de entrada e saída considerados. Por outro lado, o número de neurônios na camada interna pode variar e sua estrutura define a topologia da rede. Os neurônios de uma camada são conectados a todos os neurônios da camada seguinte. Cada interconexão tem associado um peso que modifica a força do sinal que flui através do caminho. Assim, a entrada de cada neurônio é a soma ponderada das saídas dos neurônios da camada anterior. Em outras palavras, cada informação que sai de um neurônio de uma camada i é ponderada por um dado peso W_{ij} e enviada a todos os neurônios da camada seguinte j . A saída de cada nó é obtida passando a soma ponderada através de um operador chamado função de ativação (Alves, 2003).

Uma vez que a topologia da rede foi definida, passa-se para a fase de treinamento da mesma, a fim de determinar os valores apropriados para os pesos de cada interconexão (Alves, 2003).

Para o treinamento da rede, existem dois tipos de algoritmos de aprendizagem: supervisionado ou não supervisionado. Quando os pesos são ajustados de acordo com a diferença entre a saída desejada com a obtida pela rede, esse tipo de algoritmo de aprendizagem é chamado de supervisionado. Este é o mais usado na Engenharia Química, também chamado de algoritmo de retropropagação ou *backpropagation*. Já o algoritmo não supervisionado não necessita de saída desejada conhecida, onde a própria rede neural artificial realiza automaticamente um mapa com dados de entrada apresentados para prever o conjunto de saída. Essas redes possuem maior aplicação em tarefas de classificação e agrupamento de dados (Tonin, 2005).

2.3.3 Modelos híbridos utilizados em processos bioquímicos

Na modelagem de processos biotecnológicos, há uma grande dificuldade na determinação de parâmetros confiáveis que descrevem o processo adequadamente. Isto ocorre por causa da complexa natureza do metabolismo microbiano e à não linearidade de sua cinética. Devido a essa dificuldade, muitas vezes modelos baseados em princípios fundamentais e estudos de cinética detalhados não estão prontamente disponíveis, sendo proveitoso encontrar um caminho rápido e simples de descrever os processos fermentativos de maneira acurada para estudos de otimização e controle. A modelagem híbrida se apresenta como uma forma alternativa e vantajosa de modelagem ao combinar conhecimentos prévios do processo, através de balanços materiais, com redes neurais artificiais que descrevem as cinéticas desconhecidas do processo.

Thompson e Kramer (1994) aplicaram uma estratégia de modelagem híbrida em um estudo de caso no qual previa-se a formação de biomassa e de penicilina em um cultivo descontínuo alimentado. A abordagem incluiu o cálculo das velocidades específicas de crescimento, o treinamento de uma rede neural e as equações de princípios fundamentais. As variáveis de entrada consideradas no modelo eram as concentrações de substrato, biomassa e produto (S, X e P), taxa de diluição, concentração de substrato na alimentação e variação de tempo. As variáveis de saída do modelo eram as variáveis de estado S, X e P no tempo $t+\Delta t$. Os autores concluíram que a modelagem híbrida é eficiente em predições acuradas e confiáveis.

Costa et al. (1999) utilizaram a metodologia de modelagem híbrida para representar as cinéticas de crescimento celular para os processos de produção de penicilina e etanol. O modelo era formado pelas equações de balanço material para as variáveis concentração de biomassa, substrato e produto e por redes neurais que estimavam os parâmetros cinéticos do processo. Mostrou-se que o modelo descreveu a dinâmica do processo de maneira precisa.

Silva et al. (2000) aplicaram um algoritmo do tipo redes neurais híbrido para descrever o processo de produção de cefalosporina C por *C. acremonium*. Equações de balanço material foram combinadas com uma rede neural do tipo *feedforward*. O modelo híbrido consistiu de duas redes neurais artificiais: a primeira estimou a velocidade específica de crescimento a partir das condições iniciais do processo e de algumas variáveis medidas *on-line* (frações molares de CO₂ e O₂ no gás de saída); a segunda rede foi empregada para estimar a velocidade específica de produção a partir da velocidade específica de crescimento prevista na rede anterior, pois, para metabólitos secundários como cefalosporina C, o crescimento celular inibe a produção. As saídas das redes foram incluídas nos balanços de massa para a estimação das concentrações de biomassa, substrato e produto. A rede foi usada na estimação das velocidades de crescimento celular e formação de produto, as quais foram inseridas nas equações de balanço material. O modelo híbrido apresentou bons resultados ao descrever satisfatoriamente a complexa dinâmica do processo.

Bravo, Diez e Shene (2004) propuseram um modelo híbrido para simular mudanças nas concentrações de substratos (glicose e frutose) durante a síntese de sorbitol. As variáveis de entrada da rede eram o tempo, concentrações dos substratos, pH e temperatura e a variável de saída era a velocidade de síntese de sorbitol, a qual foi calculada pela interpolação e derivação de funções *splines*. Algumas das variáveis de entrada da rede e a de saída foram usadas na integração das equações diferenciais. Concluiu-se que, para descrever o processo adequadamente, a rede neural deve possuir mais de 30 neurônios na camada oculta.

2.4 Análise estatística do modelo

O ajuste do(s) modelo(s) proposto(s) a um conjunto de ensaios experimentais é normalmente avaliado e considerado satisfatório ou não, por simples inspeção visual do comportamento da curva do modelo frente aos dados experimentais, além da análise do resíduo mínimo. Essa avaliação é tanto mais válida, na medida em que for levada em conta a falta de reprodutibilidade e o grande erro experimental inerente aos processos biológicos. Apesar dessa constatação, é importante submeter os ajustes obtidos a uma análise estatística específica, com dois objetivos básicos (Bonomi; Schmidell, 2001):

- Verificar se é possível discriminar um ou mais modelos propostos em relação aos outros;
- Verificar se o(s) modelo(s) remanescente(s) representa(m) adequadamente o conjunto de dados experimentais disponíveis.

2.4.1 Discriminação entre modelos

Dá-se o nome de discriminação entre modelos ao procedimento para identificar qual o melhor modelo formulado que representa o processo em estudo.

Supondo-se que um dado modelo proposto seja o modelo correto, o resíduo obtido pelo critério dos mínimos quadrados representaria uma estimativa não-tendenciosa da variância do erro experimental. Para um modelo rival, não-adequado, esta quantidade superestima a variância do erro experimental, uma vez que estima a verdadeira variância do erro mais o desvio sistemático entre o modelo e os dados experimentais. A este desvio dá-se o nome de “falta de ajuste”.

A “falta de ajuste” dos modelos não adequados pode ser suficientemente pronunciada de forma a ser identificada por algum teste estatístico. Três casos podem ser considerados, dependendo do grau de conhecimento da variância do erro experimental (Ohba, 1998):

- a variância do erro experimental é conhecida;
- a variância do erro experimental não é conhecida, porém é disponível uma estimativa independente desta variância;
- não é conhecida nenhuma informação sobre a variância do erro experimental.

No último caso, as estimativas da variância dos diferentes modelos em relação aos dados experimentais poderiam ser testadas utilizando-se o conceito de Igualdade Estatística ou Homogeneidade. Por ser freqüente este último caso, vários testes foram desenvolvidos para a discriminação entre modelos, como, por exemplo, o teste do χ^2 de Bartlett (Ohba, 1998).

Neste teste, avalia-se a homogeneidade das estimativas do erro experimental, ou seja, testa-se se o valor da variância de algum modelo é estatisticamente diferente dos demais. Isso é feito usando o teste do χ^2 de Bartlett, calculando o χ^2_{calc} através da fórmula (Bonomi; Schmidell, 2001; Froment; Bischoff, 1990):

$$\chi^2_{calc} = \frac{\ln(\bar{s}^{-2}) \cdot \sum_{i=1}^m (df)_i - \sum_{i=1}^m (df)_i \cdot \ln(s_i^2)}{1 + \frac{1}{3 \cdot (m-1)} \cdot \left[\sum_{i=1}^m \frac{1}{(df)_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^m (df)_i} \right]} \quad (1.1)$$

onde:

$\bar{s}^2$: estimativa combinada da variância

s_i^2 : estimativa da variância do modelo i ;

$$\bar{s}^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (df)_i \cdot s_i^2}{\sum_{i=1}^m (df)_i} \quad (1.2)$$

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_j - \hat{y}_j)^2}{(df)_i}; i = 1, 2, \dots, m \quad (1.3)$$

y_j : valor experimental no ponto j ;

$\hat{y}_j$: valor calculado pelo modelo i no ponto j ;

m : número de modelos em competição;

$(df)_i$: graus de liberdade para o modelo i $(n-p)_i$;

n : número de pontos experimentais;

p : número de parâmetros do modelo i .

Se $\chi_{calc}^2 > \chi_{tab}^2 (1-\alpha, m-1)$, o modelo ao qual corresponde o maior valor de s_i^2 é descartado, e assim sucessivamente, até restar apenas um modelo; o valor de $\chi_{tab}^2 (1-\alpha, m-1)$ é obtido em tabelas estatísticas, onde α é o nível de significância escolhido (geralmente 5%).

Se $\chi_{calc}^2 < \chi_{tab}^2 (1-\alpha, m-1)$, nenhum dos modelos pode ser descartado.

Observa-se que o valor numérico de χ^2_{calc} sozinho não aponta qual dos modelos em competição deve ser rejeitado, e sim um processo iterativo em que se descarta o modelo que apresenta maior variância. Os cálculos são repetidos até que reste apenas um único modelo ou que as estimativas das variâncias dos modelos remanescentes possam ser consideradas homogêneas e, conseqüentemente, os modelos serão considerados competitivos ou não discrimináveis.

2.4.2 Adequação do modelo

Para testar se um modelo é estatisticamente adequado aos pontos experimentais, é preciso ter uma avaliação do erro experimental e comparar se o desvio do modelo aos pontos pode ser explicado por este erro. Para isso deve ser feito um certo número de experimentos replicados, em ao menos uma condição experimental (Giudici, 1990).

Assim, define-se F_{calc} como a relação entre a variância do erro oriundo da falta de ajuste e a estimativa da variância do erro experimental:

$$F_{calc} = \frac{s_i^2}{s_e^2} \quad (1.4)$$

onde,

s_i^2 : estimativa da variância do modelo i ;

s_e^2 : estimativa da variância do erro experimental;

$$s_i^2 = \frac{\sum_{k=1}^v \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{p_i} (y_{ijk} - \hat{y}_{ik})^2}{v \sum_{i=1}^n p_i - p} \quad (1.5)$$

$$s_e^2 = \frac{\sum_{k=1}^v \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{p_i} (y_{ijk} - \bar{y}_{ik})^2}{v \sum_{i=1}^n p_i - nv} \quad (1.6)$$

n : número de pontos;

v : número de variáveis;

p_i : número de replicações em cada ponto;

y_{ij} : valor experimental da variável;

$\hat{y}_{ij}$: valor calculado pelo modelo;

$\bar{y}_i$: média da variável para os ensaios repetidos;

Assim, se $F_{\text{calc}} > F(1-\alpha, v \sum_{i=1}^n p_i - p, v \sum_{i=1}^n p_i - nv)$, o modelo é inadequado com uma probabilidade $(1-\alpha)$. Quando a relação calculada não excede o valor tabelado, não é detectada falta de ajuste e o modelo não é considerado inadequado. Como os valores de $v \sum_{i=1}^n p_i - p$ e $v \sum_{i=1}^n p_i - nv$ são normalmente elevados, considera-se que o modelo representa adequadamente os dados experimentais quando $F_{\text{calc}} < 1$.

3 Origem dos dados

Nesta seção, estão descritas as metodologias usadas no ajuste dos parâmetros, assim como alguns procedimentos seguidos nos ensaios de fermentação realizados por Pamboukian (2003), os quais são relevantes para o presente trabalho.

No presente trabalho não foram feitos ensaios experimentais. As informações referentes à obtenção de dados experimentais apresentadas a seguir referem-se aos ensaios experimentais realizados por Pamboukian (2003), cujos dados foram utilizados no presente trabalho para validação do modelo e estimação de parâmetros.

3.1 Microrganismo

Os ensaios utilizados neste trabalho foram realizados com uma linhagem mutante de *Streptomyces olindensis*, denominada ICB20, fornecida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

3.2 Meio de cultura

O meio utilizado nos ensaios (exceto no ensaio D-3+) foi o R5 modificado, empregado por Furlan (1997) em cultivos de *Streptomyces olindensis*, o qual possui a seguinte composição (Pamboukian, 2003): glicose (10,0 g/L), extrato de

levedura (5,0 g/L), tris(hidroximetil)-aminometano (3,09 g/L), casaminoácidos (0,10 g/L), K_2SO_4 (0,25 g/L) e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10,12 g/L). O pH era ajustado em 7.0. Após a esterilização do meio, as seguintes soluções estéreis eram adicionadas (para 250 mL de meio de cultura): KH_2PO_4 0.5 % p/v (2,5 mL), $CaCl_2$ 5M (1,0 mL) e 0,5 mL de solução de elementos traço (40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ em 1000 mL de água destilada).

Como citado anteriormente, o meio de cultura empregado no ensaio D-3+ foi diferente, pois neste foi usada uma concentração maior de glicose, a fim de se empregar a mesma quantidade total de nutrientes fornecida nos ensaios descontínuos alimentados DA-3, DA-4 e DA-5. Assim, na composição inicial do meio de cultura para o ensaio D-3+ a concentração de glicose foi de 16,7g/L e as concentrações dos demais nutrientes foram as mesmas descritas anteriormente.

3.3 Ensaios realizados

Pamboukian (2003) realizou 8 ensaios descontínuos alimentados, nos quais foram usadas vazões de alimentação exponenciais a fim de se manter a velocidade específica de crescimento fixa durante o período de alimentação. Em paralelo a cada ensaio descontínuo alimentado foi realizado um ensaio descontínuo padrão, para a comparação de resultados.

O primeiro conjunto de ensaios, DA-1 e DA-2, foi realizado com diferentes concentrações de glicose na alimentação, fixando-se a velocidade específica de crescimento em um valor baixo ($\mu_x = 0,03 \text{ h}^{-1}$). No ensaio DA-1, o meio de alimentação era composto por 1,0 L do meio R5 modificado, enquanto que no DA-2 utilizou-se 1,0L de meio R5 modificado com a concentração de todos os nutrientes duplicadas.

Da mesma maneira, foi realizado um segundo conjunto de ensaios, composto por DA-3, DA-4 e DA-5, no qual as velocidades específicas de crescimento foram fixadas em diferentes valores, durante a alimentação. O meio de alimentação desses ensaios era composto por 1,0 L do meio R5 modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada.

No terceiro conjunto de ensaios, composto por DA-3b, DA-4b e DA-5b, o meio de alimentação continha 1,0L de meio R5 modificado, com a concentração de todos os nutrientes quadruplicada. Nesses ensaios, a velocidade específica de crescimento foi fixada em diferentes valores. A composição dos meios de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados está descrita na Tabela 3.1.

Além disso, foram realizados 4 ensaios contínuos, os quais se iniciaram com uma etapa descontínua de 16 horas (correspondente ao final da fase exponencial de crescimento) e, a partir desse instante, promoveu-se a alimentação de meio de cultura e de retirada de caldo, a uma vazão constante, mantendo-se um volume útil de 4,0 L. O meio de cultura empregado foi o R5 modificado, descrito no item 3.2.

Tabela 3.1: Composição do meio de alimentação nos ensaios descontínuos alimentados

	DA-1	DA-2	DA-3 DA-4 DA-5	DA-3b DA-4b DA-5b
Glicose	10,0 g/L	20,0 g/L	40,0 g/L	40,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L	10,0 g/L	5,0 g/L	20,0 g/L
Casaminoácidos	0,1 g/L	0,2 g/L	0,1 g/L	0,4 g/L
Tris(hidroximetil)aminometano	3,09 g/L	6,18 g/L	3,09 g/L	12,36 g/L
K ₂ SO ₄	0,25 g/L	0,50 g/L	0,25 g/L	1,0 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	10,12 g/L	20,24 g/L	10,12 g/L	40,48 g/L

3.3.1 Descrição dos ensaios descontínuos alimentados

Todos os ensaios descontínuos alimentados utilizados na modelagem matemática foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/EPUSP, em reatores BIOFLO III (*New Brunswick Scientific Co.*), de 5 L de capacidade, nas seguintes condições: agitação de 500 rpm, vazão específica de ar de 1 vvm, temperatura de 30°C e pH 7,0, com volume inicial de 3,5 L (sendo 3,15 L de meio de cultura e 0,35 L de inóculo). A alimentação foi realizada transferindo-se 1,0 L de meio de cultura para o reator, com vazão exponencial. Portanto, o volume total nos ensaios descontínuos alimentados foi de 4,5 L. A Tabela 3.2 mostra o detalhamento das condições destes ensaios.

Paralelamente a cada ensaio descontínuo alimentado, foi realizado um ensaio descontínuo, nas mesmas condições descritas acima, com volume inicial de cultivo de 4 L, sendo 3,6 L de meio de cultura e 0,4 L de inóculo.

Tabela 3.2: Resumo das condições dos ensaios descontínuos alimentados realizados (Pamboukian, 2003)

Ensaio	Descrição
DA-1	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10% de $\mu_{x\text{max}}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,156.e^{0,03.(t-21)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 21 e 27 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-1</p>
DA-2	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes duplicadas</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10% de $\mu_{x\text{max}}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0585.e^{0,03.(t-21)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 21 e 32 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-2</p>
DA-3	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10% de $\mu_{x\text{max}}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0269.e^{0,03.(t-18)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 18 e 42 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-3</p>
DA-4	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,10 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 30% de $\mu_{x\text{max}}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0596.e^{0,10.(t-16)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 16 e 26 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-4</p>

DA-5	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com apenas a concentração de glicose quadruplicada</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,17 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 56% de $\mu_{x\max}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,1205.e^{0,17.(t-13)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 13 e 18 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-5</p>
DA-3b	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,03 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 10% de $\mu_{x\max}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0256.e^{0,03.(t-21)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 21 e 47 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-3b</p>
DA-4b	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,10 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 30% de $\mu_{x\max}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0596.e^{0,10.(t-14)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 14 e 24 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-4b</p>
DA-5b	<p>Composição da alimentação: meio R5 modificado, com as concentrações de todos os nutrientes quadruplicadas</p> <p>Vazão exponencial de alimentação</p> <p>Controle de μ_x em $0,17 \text{ h}^{-1}$ (cerca de 56% de $\mu_{x\max}$)</p> <p>Equação de alimentação: $\Phi = 0,0903.e^{0,17.(t-13)} \text{ L/h}$</p> <p>Período de alimentação: entre 13 e 19 horas de cultivo.</p> <p>Ensaio descontínuo alimentado executado em paralelo: D-5b</p>

3.3.2 Descrição dos ensaios contínuos

Os ensaios contínuos realizados foram conduzidos em reatores BIOFLO III (*New Brunswick Scientific Co.*) de 5 L de capacidade, nas seguintes condições: agitação de 500 rpm, vazão específica de ar de 1 vvm, 30°C e pH 7,0. Conforme mencionado anteriormente, foi realizada inicialmente uma etapa descontínua inicial de 16 horas (correspondente ao final da fase exponencial de crescimento) e, a partir desse instante, promoveu-se a alimentação de meio de cultura e de retirada de caldo, a uma vazão constante, mantendo-se um volume útil de 4,0 L. A Tabela 3.3 mostra o detalhamento das condições destes ensaios.

Tabela 3.3: Resumo das condições dos ensaios contínuos (Pamobukian, 2003)

Ensaio	Descrição
C-1	Volume Inicial = 4,0 L Início da alimentação = 16 horas Vazão de alimentação = 400 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 10 horas Tempo total de alimentação = 80 horas Composição do meio de alimentação: meio R5 modificado
C-2	Volume Inicial = 4,0 L Início da alimentação = 16 horas Vazão de alimentação = 800 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 5 horas Tempo total de alimentação = 36 horas Composição do meio de alimentação: meio R5 modificado

C-3a	Primeira etapa do ensaio contínuo C-3 Volume Inicial = 4,0 L Início da alimentação = 16 horas Vazão de alimentação = 200 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 20 horas Tempo total de alimentação = 80 horas Composição do meio de alimentação: meio R5 modificado
C-3b	Segunda etapa do ensaio contínuo C-3 Vazão de alimentação = 1000 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 4 horas Tempo total de alimentação = 24 horas Composição do meio de alimentação: meio R5 modificado
C-4a	Primeira etapa do ensaio contínuo C-4 Volume Inicial = 4,0 L Início da alimentação = 16 horas Vazão de alimentação = 120 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,03 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 33 horas Tempo total de alimentação = 152 horas Composição do meio de alimentação: meio R5 modificado
C-4b	Segunda etapa do ensaio contínuo C-4 Vazão de alimentação = 1200 mL/h Vazão específica de alimentação: $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ Tempo de residência = 3,3 horas Tempo total de alimentação = 32 horas Composição do meio de alimentação: meio R5 modificado

4 Modelagem Matemática

Neste capítulo, são apresentados os resultados da modelagem matemática. Os modelos serão expostos da seguinte maneira:

- Modelo 0: modelo desenvolvido por Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004). Tal modelo será apresentado aqui por ter servido de base para os outros modelos fenomenológicos;
- Modelo 1: derivação do modelo morfolologicamente estruturado de Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004) com a inclusão da variável de estado oxigênio dissolvido e de um termo f_h que representa a parcela de zona hifal ativa para crescimento celular (vide item 4.1.2.);
- Modelo 2: modelo não estruturado, no qual a biomassa é representada por uma única variável;
- Modelo híbrido: combinação das equações de balanço material com redes neurais artificiais, que funcionam como estimadoras das velocidades específicas de formação de biomassa e produto e consumo de substrato.

As equações de todos os modelos também estão apresentadas no Apêndice A.

Os modelos foram submetidos a uma análise estatística, a fim de avaliá-los quanto à sua adequação aos dados experimentais e também para discriminá-los entre si.

4.1 Modelos fenomenológicos

4.1.1 Modelo 0: modelo morfolologicamente estruturado proposto por Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004)

Na modelagem matemática do processo de produção de retamicina pelo microrganismo filamentoso *Streptomyces olindensis*, Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004) consideraram as seguintes hipóteses e fenômenos:

- a) Modelo morfolologicamente estruturado proposto por Nielsen (1993) para o crescimento celular;
- b) As principais fontes de nitrogênio consideradas foram extrato de levedura e tris(hidroximetil)aminometano;
- c) A principal fonte de carbono considerada foi a glicose;
- d) Os substratos considerados no crescimento celular foram as fontes de carbono e de nitrogênio;

- **Consumo de Substrato: glicose**

A velocidade específica de consumo de glicose inclui o consumo de glicose para crescimento celular, produção de retamicina e manutenção celular:

$$\mu_s = \alpha_1 \mu + \alpha_2 \mu_p + m_s f_s(S) \quad (4.1)$$

onde:

μ_s velocidade específica de consumo de glicose (g glicose/ (g cel.h))

μ_p velocidade específica de produção de retamicina (g retamicina/ (g cel.h))

α_1	coeficiente estequiométrico de consumo de glicose para formação da biomassa (g glicose/gcel)
α_2	coeficiente estequiométrico de consumo de glicose para formação de retamicina (g glicose/g retamicina)
m_s	coeficiente de consumo de glicose para manutenção celular (h^{-1})
$f_s(S)$	função definida pela eq. (4.2)

O consumo de glicose para manutenção da biomassa foi modelado como dependente da concentração de substrato, seguindo proposições apresentadas por Guardiola et al. (1995) e Paul et al. (1998). Somente enquanto houver glicose disponível no meio de cultura, as células podem consumi-la para a manutenção, porém a velocidade de consumo de glicose para manutenção diminui quando a concentração de glicose no meio de cultura é muito pequena. Essa dependência evita a previsão de situações irreais como concentrações negativas de substrato. É usada uma equação da forma de Monod para representar tal dependência com $f(S)$ dada por:

$$f_s(S) = \frac{S}{S + K_{ms}} \quad (4.2)$$

sendo que K_{ms} é a constante de saturação de glicose para manutenção.

O balanço material para a glicose é dado por:

$$\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - \mu_s X \quad (4.3)$$

onde:

S	concentração de glicose (g/L)
S_F	concentração de glicose na alimentação (g/L)
F	vazão de alimentação (L/h)
V	volume do reator (L)
X	concentração de biomassa (g/L)

- **Consumo de Substrato: fontes de nitrogênio**

Nos cultivos de *Streptomyces olindensis* utilizados, considerou-se que as principais fontes de nitrogênio são extrato de levedura e tris(hidroxi)metilaminometano (THAM), os quais foram expressos como um único componente, em termos de NH_3 equivalente.

$$N = \beta_1 C_{ye} + \beta_2 C_{THAM} \quad (4.4)$$

onde:

N	concentração da fonte de nitrogênio (g NH_3 /L)
C_{ye}	concentração de extrato de levedura (g/L)
C_{THAM}	concentração de tris(hidroxi)metilaminometano (g/L)
β_1	fator de conversão de extrato de levedura em NH_3 equivalente (g NH_3 /g extrato de levedura)
β_2	fator de conversão de tris(hidroxi)metilaminometano em NH_3 equivalente (g NH_3 /g THAM)

Considerou-se que a composição química do extrato de levedura é $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ (Nielsen; Villadsen, 1994), que resulta em $\beta_1 = 0.138 \text{ g NH}_3 / \text{g}$ extrato de levedura. A composição de THAM é $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}$, que resulta em $\beta_2 = 0.139 \text{ g NH}_3 / \text{g THAM}$.

A velocidade específica de consumo de nitrogênio inclui o consumo deste para o crescimento da biomassa e para produção de retamicina. Admite-se que a degradação da biomassa disponibiliza substrato nitrogenado:

$$\mu_N = \alpha_3(\mu - \mu_d) + \alpha_4\mu_p \quad (4.5)$$

onde:

μ_N	velocidade específica de consumo de nitrogênio ($\text{g NH}_3 / (\text{g cel.h})$)
μ	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_d	velocidade específica de degradação da biomassa (h^{-1})
μ_p	velocidade específica de produção de retamicina ($\text{g} / (\text{g cel.h})$)
α_3	coeficiente estequiométrico de consumo da fonte de nitrogênio para a formação da biomassa ($\text{g NH}_3/\text{g cel}$)
α_4	coeficiente estequiométrico de consumo da fonte de nitrogênio para formação de retamicina ($\text{g NH}_3 / \text{g retamicina}$)

O balanço material para a concentração da fonte de nitrogênio é dado por:

$$\frac{dN}{dt} = (N_F - N) \frac{F}{V} - \mu_N X \quad (4.6)$$

onde:

N concentração da fonte de nitrogênio ($\text{g NH}_3/\text{L}$)

N_F concentração da fonte de nitrogênio no meio de alimentação ($\text{g NH}_3/\text{L}$)

- **Crescimento celular**

O modelo para o crescimento celular é uma derivação do modelo proposto por Nielsen (1993).

Em microrganismos filamentosos há uma variação significativa no metabolismo das células individuais nas estruturas multicelulares que formam os filamentos. Para descrever essas culturas corretamente, é necessário considerar a variação morfológica das células (Nielsen; Villadsen, 1994).

Segundo Nielsen (1993), em um elemento hifal várias células atrás da ponta estão envolvidas no processo de extensão da mesma. Essas células dividem um citoplasma comum no qual está situado o núcleo de cada célula. A parte do elemento hifal localizada entre a ponta e o primeiro septo é chamada compartimento apical (Z_a). As células localizadas logo após o compartimento apical têm uma composição intracelular muito similar à das células apicais e formam o compartimento subapical (Z_s). As células mais afastadas da ponta possuem grandes vacúolos. Essas células não participam diretamente no processo de extensão da ponta, mas acredita-se que elas tenham importância por criar uma pressão intracelular que assegura transporte de material celular em direção à ponta. Essa parte do elemento hifal é denominada compartimento hifal (Z_h) (figura 4.1).

Figura 4.1: Compartimentos apical (Z_a), subapical (Z_s) e hifal (Z_h) de um elemento hifal

De acordo com o mesmo autor, quando uma nova ponta é formada, ela inicialmente cresce em tamanho, o que corresponde a um aumento do compartimento apical. Quando esta atinge um certo tamanho, um septo é formado após a ponta e algumas das antigas células apicais se tornam novas células subapicais. Esse processo é denominado extensão da ponta (“tip extension”). A formação de ramificação (“branching”) é o mecanismo no qual novas células apicais são formadas. Quando a célula envelhece, ela se torna cada vez mais vacuolizada, caracterizando o processo de diferenciação (“differentiation”). Essas células com vacúolos possuem um metabolismo completamente diferente das células apicais e subapicais e são denominadas células hifais. Não se considera que tais células contribuam para o crescimento celular.

As expressões cinéticas para “branching” e “tip extension” são consideradas como de primeira ordem na forma morfológica que desaparece. A expressão cinética para diferenciação também é de primeira ordem em Z_s e, além disso, considera-se que é inibida por altas concentrações de glicose.

As expressões cinéticas para as transformações morfológicas são:

$$\text{“branching”} \quad Z_s \rightarrow Z_a \quad u_1 = k_{u_1} Z_s \quad (4.7)$$

$$\text{"tip extension"} \quad Z_a \rightarrow Z_s \quad u_2 = k_{u2} Z_a \quad (4.8)$$

$$\text{"differentiation"} \quad Z_s \rightarrow Z_h \quad u_3 = \frac{k_{u3} Z_s}{SK_{u3} + 1} \quad (4.9)$$

Onde:

Z_a fração mássica do compartimento apical (g/g)

Z_s fração mássica do compartimento subapical (g/g)

Z_h fração mássica do compartimento hifal (g/g)

u_1 velocidade de reação de "branching" (h^{-1})

u_2 velocidade de reação de "tip extension" (h^{-1})

u_3 velocidade de reação de diferenciação (h^{-1})

k_{u1} constante cinética para a reação de "branching" (h^{-1})

k_{u2} constante cinética para a reação de "tip extension" (h^{-1})

k_{u3} constante cinética para a reação de diferenciação (h^{-1})

K_{u3} constante de saturação para reação de diferenciação (L/g glicose)

S concentração de glicose (g/L)

O crescimento de células apicais e subapicais é descrito pela cinética de Monod, incluindo os efeitos das fontes de carbono e de nitrogênio no meio de cultura:

$$\mu_a = \mu_{sa} = k \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{N}{N + K_N} \right) \quad (4.10)$$

onde:

- μ_a velocidade específica de crescimento das células apicais (g/(g . h))
- μ_{sa} velocidade específica de crescimento das células subapicais(g/(g . h))
- k constante cinética para o crescimento das células apicais, subapicais e hifais (h^{-1})
- S concentração de glicose (g glicose/L)
- N concentração da fonte de nitrogênio (gNH₃/L)
- K_s constante de saturação para a fonte de carbono (g glicose/L)
- K_N constante de saturação para a fonte de nitrogênio (gNH₃/L)

A velocidade específica de crescimento da biomassa é dada por:

$$\mu = \mu_a Z_a + \mu_{sa} Z_s \quad (4.11)$$

Além disso, em baixas concentrações de substrato, considera-se que a degradação da biomassa ocorre somente no compartimento hifal da célula. De acordo com o trabalho de Guardiola, Iborra e Cánovas(1995), da mesma maneira que diminui a velocidade de consumo de glicose para manutenção, o aumento da velocidade de degradação celular é favorecido. Esse comportamento é descrito da seguinte maneira:

$$\mu_d = k_d [1 - f_s(S)] Z_h \quad (4.12)$$

onde:

μ_d velocidade específica de degradação da biomassa (h^{-1})

k_d constante cinética para degradação da biomassa (h^{-1})

Os balanços materiais para as variáveis concentração celular (X) e frações mássicas dos compartimentos apical (Z_a), subapical (Z_s) e hifal (Z_h) são:

$$\frac{dZ_a}{dt} = u_1 - u_2 + \mu_a Z_a - (\mu - \mu_d) Z_a \quad (4.13)$$

$$\frac{dZ_s}{dt} = u_2 - u_1 - u_3 + \mu_s Z_s - (\mu - \mu_d) Z_s \quad (4.14)$$

$$\frac{dZ_h}{dt} = u_3 - (\mu - \mu_d) Z_h - \mu_d \quad (4.15)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \mu_d) X - \frac{F}{V} X \quad (4.16)$$

• Formação de produto

Pamboukian (2003) observou que a existência de limitações nutricionais é um fator importante na produção de retamicina. O início da produção de retamicina está ligado à limitação por nutrientes, provavelmente a fonte de nitrogênio. Martins (2001) cita que a grande disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo durante a fase de crescimento permite melhores desempenhos quanto à produção do complexo retamicina, ou seja, o oxigênio não está diretamente envolvido na biossíntese do antibiótico, mas um suprimento adequado durante a fase de crescimento celular é essencial no processo de produção do antitumoral. Dessa maneira, considerou-se que a produção do antitumoral ocorre no compartimento

subapical e é influenciada pelas concentrações de glicose e favorecida pela exaustão da fonte de nitrogênio no meio de cultura:

$$\mu_p = k_2 \left(\frac{S}{S + K_2} \right) \left(\frac{K_N}{N + K_N} \right) Z_s \quad (4.17)$$

onde:

k_2 constante cinética para produção de retamicina (h^{-1})

K_2 constante de saturação para formação de produto (g/L)

O balanço material para o produto é dado por:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p X - \frac{F}{V} P \quad (4.18)$$

onde:

P concentração de retamicina (g/L)

• Variação de volume

No modelo, também foi considerada a variação de volume no biorreator devido à adição de meio de cultura e retirada de amostras. Assim:

$$\frac{dV}{dt} = F - F_{amostragem} \quad (4.19)$$

onde:

F vazão de alimentação (L/h)

$F_{amostragem}$ vazão de amostragem (L/h)

Dos 18 parâmetros do modelo 0, somente 6 foram estimados por regressão não-linear utilizando o critério dos mínimos quadrados, ajustando as predições do modelo aos dados experimentais de concentração de glicose, biomassa e retamicina medidos por Pamboukian (2003). Alguns dos parâmetros restantes foram retirados da literatura, enquanto a outros foram atribuídos valores arbitrários. A minimização do critério foi feita pelo método de Marquardt (1963).

Os valores calculados foram obtidos pela resolução do sistema de equações diferenciais ordinárias pelo método de Runge-Kutta-Gill de quarta ordem com controle de erro e passo variável.

Assim, os valores dos parâmetros do modelo 0 encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros do modelo de Giudici, Pamboukian e Facciotti (2004)

Parâmetro	Valor	Unidade	Comentários
k_{u1}	2,3	h^{-1}	Nielsen (1993)
k_{u2}	0,7	h^{-1}	Nielsen (1993)
k_{u3}	0,85	h^{-1}	Nielsen (1993)
K_{u3}	4,0	L/g glicose	Nielsen (1993)
β_1	0,138	g NH_3 /g extrato de levedura	Composição de extrato de levedura
β_2	0,139	g NH_3 / g THAM	Composição of THAM
k	0,33	h^{-1}	atribuído
K_S	0,03	g glicose/L	Nielsen (1993)
k_2	$0,271 \pm 0,007$	h^{-1}	estimado por RNL*
K_{S2}	0,1	g glicose/L	atribuído
K_N	$0,713 \pm 0,027$	g NH_3 /L	estimado por RNL*
α_3	$0,211 \pm 0,003$	g NH_3 /g biomassa	estimado por RNL*
α_4	0,022	g NH_3 /g P	Bieber et al. (1989)
α_1	$1,117 \pm 0,046$	g glicose/g biomassa	estimado por RNL*
α_2	$0,808 \pm 0,151$	g glicose/g P	estimado por RNL*
m_s	$0,019 \pm 0,007$	h^{-1}	estimado por RNL*
K_{ms}	0,05	g glicose/L	atribuído
k_d	0,02	h^{-1}	atribuído
Z_a em $t=0$	0,70	g células apicais/g células	Nielsen (1993)
Z_s em $t=0$	0,20	g células subapicais/g células	Nielsen (1993)
Z_h em $t=0$	0,10	g células hifais /g células	Nielsen (1993)

*RNL: regressão não-linear

Os resultados da simulação não serão apresentados no presente trabalho, mas os autores mostraram que o modelo apresentou bom ajuste em cultivos descontínuos e contínuos para as variáveis X, S e P, com exceção de um cultivo descontínuo alimentado. Tal cultivo apresentou um rápido crescimento celular, causando um alto consumo de oxigênio, resultando na redução do oxigênio dissolvido no meio. O ensaio mencionado foi o único realizado por Pamboukian (2003) em que houve limitação por oxigênio. Tal fato motivou a inclusão da variável oxigênio dissolvido ao modelo (item 4.1.2).

As previsões para os ensaios contínuos apresentaram resultados qualitativamente inferiores em comparação aos ensaios descontínuos e descontínuos alimentados.

4.1.2 Modelo 1: modelo morfolologicamente estruturado, considerando a concentração de oxigênio dissolvido e uma fração de células hifais ativas (f_h)

O modelo 1 é uma variante do modelo 0, com a inclusão da variável de estado concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura e de uma fração de células hifais ativas para o crescimento e produção de antibiótico (f_h).

Ao estudar a transferência de oxigênio e respiração microbiana no meio de cultura, Martins (2001) observou uma baixa demanda de oxigênio durante a fase de produção de retamicina em relação à observada na fase de crescimento celular. Assim, a manutenção de grande disponibilidade de oxigênio durante a fase de produção do antibiótico é indiferente, o que justifica a inclusão da variável oxigênio dissolvido como substrato somente na cinética de crescimento celular.

Além disso, conforme Zangirolami et al. (1997), considerou-se que a transição de células subapicais ativas em células hifais completamente vacuolizadas ocorre gradualmente. Conseqüentemente, as células hifais localizadas na vizinhança do compartimento subapical pertencem a um estado transitório, apresentando a mesma atividade metabólica e habilidade de crescimento exibida no compartimento subapical. Dessa forma, uma fração f_h de células hifais são consideradas ativas para o crescimento celular e para produção de retamicina.

$$\mu_a = \mu_{sa} = \mu_h = k \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{N}{N + K_N} \right) \left(\frac{C_L}{K_{OX} + C_L} \right) \quad (4.20)$$

onde:

μ_h velocidade específica de crescimento das células hifais ativas(g/(g . h))

C_L concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura (mmolO₂/L)

K_{ox} constante de saturação de oxigênio (mmolO₂/L)

A velocidade específica de crescimento da biomassa é dada por:

$$\mu = \mu_a Z_a + \mu_{sa} Z_s + f_h \mu_h Z_h \quad (4.21)$$

sendo que f_h é a fração de células hifais ativas para o crescimento (células em estado transitório).

A equação da velocidade específica de produção foi alterada para incluir a fração ativa f_h como produtora de retamicina.

$$\mu_p = k_2 \left(\frac{S}{S + K_2} \right) \left(\frac{K_N}{N + K_N} \right) (Z_s + f_h Z_h) \quad (4.22)$$

A velocidade específica de respiração celular inclui o consumo de oxigênio para o crescimento da biomassa e para manutenção celular:

$$\mu_{O_2} = m_{O_2} + \frac{1}{Y_{O_2}} \mu \quad (4.23)$$

onde:

μ_{O_2} velocidade específica de consumo de oxigênio (mmol O₂/gcel.h)

m_{O_2} coeficiente de consumo de oxigênio para manutenção (consumo de oxigênio) (h⁻¹)

Y_{O_2} fator de conversão de oxigênio em células (gcel/mmol O₂)

A concentração de saturação de oxigênio no meio de cultivo (C_L^*) é dada pela seguinte expressão:

$$C_L^* = \frac{b_1}{10^{(b_2 + b_3 \cdot S)}} \quad (4.24)$$

A Eq. (4.24) é uma adaptação da expressão apresentada por Martins (2001), a qual considera que a presença de substâncias diluídas no meio de cultura influencia a solubilidade do oxigênio no mesmo. A expressão original leva em conta o efeito tanto da concentração de substrato (glicose) como das quantidades de ácido (HCl) e base (NaOH) adicionadas ao fermentador para controle de pH. A Eq. (4.24) considera apenas o efeito da concentração de glicose.

A porcentagem de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (OD) é dada por:

$$OD = \frac{C_L}{C_L^*} \quad (4.25)$$

onde:

C_L concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura (mmolO₂/L)

C_L^* concentração de saturação de oxigênio no meio de cultivo (mmol O₂/L)

O balanço de oxigênio no meio líquido é dado por:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) - \mu_{O_2} \cdot X - C_L \frac{F}{V} \quad (4.26)$$

onde:

k_La coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

Dessa maneira, houve a inclusão de 8 parâmetros no modelo: K_{ox} , f_h , m_o , Y_{O_2} , b_1 , b_2 , b_3 e k_La . Os demais parâmetros do modelo 0 foram mantidos. O valor de f_h foi extraído da literatura (Zangirolami et al., 1997). Os valores de b_1 , b_2 e b_3 foram determinados por Martins (2001). Os valores de m_o e Y_{O_2} foram determinados por Pamboukian (2003). Os parâmetros restantes K_{ox} e k_La foram estimados por regressão não-linear.

Os parâmetros foram estimados pelo ajuste das predições do modelo aos dados experimentais das concentrações de glicose (S), retamicina (P), biomassa (X) e oxigênio dissolvido (OD), usando o critério dos mínimos quadrados.

$$\min \phi = \sum_{j=1}^{N_{runs}} \sum_{i=1}^{N_{pro} \times \text{int } s} \left[(S_{i,j,\text{exp}} - S_{i,j,\text{calc}})^2 + (X_{i,j,\text{exp}} - X_{i,j,\text{calc}})^2 + (P_{i,j,\text{exp}} - P_{i,j,\text{calc}})^2 + (OD_{i,j,\text{exp}} - OD_{i,j,\text{calc}})^2 \right] \quad (4.27)$$

O sistema de equações diferenciais ordinárias foi resolvido numericamente pelo método de Gear com passo variável e controle de erro. A minimização da função foi executada segundo o Método de Marquardt (Marquardt, 1963). Os valores dos parâmetros adicionados ao modelo estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros do modelo 1

Parâmetro	Valor	Unidade	Comentários
f_h	0,13	g Z_h ativo/g Z_h total	Zangirolami et al. (1997)
K_{ox}	$0,024891 \pm 0,005$	mmol O_2 /L	estimado por RNL*
m_o	0,83	mmol/g.h	Pamboukian (2003)
$1/Y_{O_2}$	17,35	mmol/g	Pamboukian (2003)
k_La	$125,61 \pm 4,2$	h^{-1}	estimado por RNL*
b_1	0,2456	mmol O_2 /L	Martins (2001)
b_2	0,0114	-----	Martins (2001)
b_3	$6,78 \cdot 10^{-4}$	L/ g glicose	Martins (2001)

*RNL: regressão não-linear

Os parâmetros estimados K_{ox} e kla são significativos ao nível de 95% do intervalo de confiança.

As Figuras 4.3 a 4.7 mostram as simulações obtidas com o modelo ajustado aos ensaios descontínuos, descontínuos alimentados e contínuos. As curvas mostram um bom ajuste do modelo aos dados experimentais tanto em cultivos descontínuos como em descontínuos alimentados para as variáveis X , S , P e OD . Assim como no modelo 0, não houve bom ajuste no ensaio DA-5b. Nos ensaios contínuos, o modelo não apresenta bom ajuste quando o valor de D se aproxima do valor de μ_{max} (C-3 e C-4).

O valor estimado de K_{ox} é relativamente baixo, o que faz com que o efeito do oxigênio sobre a cinética de crescimento seja pequeno. Isto significa que, para $K_{ox}=0,024891$ mmol O_2/L , o termo que expressa a dependência da velocidade de crescimento em relação ao oxigênio dissolvido será praticamente igual a 1 para uma ampla faixa de valores de oxigênio dissolvido (Figura 4.2). De fato, com exceção do ensaio DA-5b, não houve medidas de oxigênio dissolvido em valores abaixo de 20%. Para uma estimativa precisa deste efeito, seria necessária a obtenção de dados experimentais realizados sob limitação por oxigênio.

Figura 4.2: Efeito do oxigênio dissolvido sobre a cinética de crescimento para $K_{ox} = 0.02489$ mmol/L

Martins (2001) reportou valores de k_{la} em torno de 150 h^{-1} em ensaios descontínuos de *Streptomyces olindensis*. O valor estimado de $125,61 \text{ h}^{-1}$ é condizente com a faixa reportada.

Figura 4.3: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos

Figura 4.4: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos

Figura 4.5: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação

Figura 4.6: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação

Figura 4.7: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios contínuos e respectivas vazões de alimentação

A matriz de correlação dos parâmetros estimados por regressão não-linear está apresentada na Tabela 4.3. O valor do coeficiente de correlação entre os parâmetros não é elevado, indicando que não há fortes interações entre eles.

Tabela 4.3: Matriz de correlação dos parâmetros estimados

	K_{ox}	K_{la}
K_{ox}	1	-0,25931
k_{la}	-0,25931	1

Como o modelo apresentou boa descrição qualitativa do processo, acredita-se que o desvio quantitativo ocorreu devido às transformações morfológicas que estão relacionadas com o crescimento celular nas equações do modelo, ou seja, as reações de “branching” e “tip extension” ocorrem mais lentamente que o previsto. Por isso, foi realizada uma análise de sensibilidade dos parâmetros das transformações morfológicas (k_{u1} , k_{u2} e k_{u3}).

Na Tabela 4.4 apresentam-se os casos estudados e as faixas de valores que foram aplicadas na análise de sensibilidade.

Tabela 4.4: Parâmetros utilizados na análise de sensibilidade

Parâmetros	Valores	Variação
k_{u1}	2,3	$\pm 50\%$
k_{u2}	0,7	$\pm 50\%$
k_{u3}	0,85	$\pm 50\%$

A análise foi feita para os parâmetros que afetam as transformações morfológicas da célula. A variação aplicada foi de $\pm 50\%$ sobre o valor dos parâmetros.

- Parâmetro k_{u1}

O parâmetro k_{u1} representa a constante para a reação de “branching”, que é a formação de novas células apicais a partir de células subapicais. Como o resultado da análise mostrou comportamento semelhante em todos os ensaios, serão apresentadas somente as curvas da simulação de um ensaio descontínuo (D-1) e de um descontínuo alimentado (DA-1).

Percebe-se pelas Figuras 4.8 e 4.9 que o modelo é pouco sensível ao parâmetro k_{u1} nas primeiras 15 horas do experimento. Mesmo com mudanças significativas nas frações dos compartimentos da célula, as curvas de simulação não apresentam grandes alterações. O aumento do parâmetro implica na formação de mais células apicais não produtoras do antibiótico, prejudicando a formação do mesmo. Seguindo o mesmo argumento, a diminuição do valor de k_{u1} causou aumento da produção de retamicina.

Figura 4.8: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u1} no ensaio D-1

Figura 4.9: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u1} no ensaio DA-1 e variação das frações celulares

- Parâmetro k_{u2}

O parâmetro k_{u2} representa a constante para a reação de “tip extension”, que é a formação de novas células subapicais a partir de células apicais. Da mesma maneira descrita acima, serão apresentadas somente as curvas da simulação de um ensaio descontínuo (D-1) e de um descontínuo alimentado (DA-1) (Figuras 4.10 e 4.11).

De maneira semelhante à apresentada na análise de sensibilidade do parâmetro k_{u1} , o modelo não sofreu alterações com a variação do parâmetro k_{u2} , principalmente no início do cultivo. Nota-se que o aumento do parâmetro afeta positivamente a produção de retamicina, por estimular a formação de células subapicais.

Figura 4.10: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u2} no ensaio D-1 e variação das frações celulares

Figura 4.11: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u2} no ensaio DA-1 e variação das frações celulares

- Parâmetros k_{u3}

O parâmetro k_{u3} representa a constante para a reação de diferenciação, que é a formação de células hifais a partir de células subapicais. Neste item, também serão apresentadas somente as curvas da simulação de um ensaio descontínuo (D-1) e de um descontínuo alimentado (DA-1).

Em relação ao parâmetro k_{u3} , o modelo não se mostrou sensível ao longo dos cultivos. Esse resultado é coerente, pois a maior parte do compartimento hifal é inativa em termos de consumo de substrato e produção de retamicina.

Pela análise das Figuras 4.8 a 4.13, as frações morfológicas não sofrem mudanças significativas ao longo dos cultivos, motivando, portanto, a elaboração de um modelo não estruturado, onde a biomassa pode ser representada por uma única variável. Ao dispensar a descrição das variações morfológicas, o modelo pode ser simplificado, sem perder a qualidade de representação das variáveis consideradas.

Figura 4.12: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u3} no ensaio D-1 e variação das frações celulares

Figura 4.13: Sensibilidade do modelo ao parâmetro k_{u3} no ensaio D-A1 e variação das frações celulares

4.1.3 Modelo 2: modelo não estruturado

No modelo não estruturado, a biomassa é representada por uma única variável, sem considerar as variações na morfologia da célula. Assim, no modelo 2 foram consideradas as proposições do modelo 1, com exceção daquelas referentes às transformações celulares.

As seguintes hipóteses e fenômenos foram considerados:

- a) A biomassa é representada por uma única variável;
- b) O substratos considerados para o crescimento celular foram as fontes de carbono (glicose), de nitrogênio (extrato de levedura e tris(hidroximetil)aminometano) e oxigênio.

As equações do modelo são:

- Consumo de glicose

$$\mu_s = \alpha_1 \mu + \alpha_2 \mu_p + m_s f_s(S) \quad (4.1)$$

$$f_s(S) = \frac{S}{S + K_{ms}} \quad (4.2)$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - \mu_s X \quad (4.3)$$

- Consumo da fonte de nitrogênio

$$N = \beta_1 C_{ye} + \beta_2 C_{THAM} \quad (4.4)$$

$$\mu_N = \alpha_3 (\mu - \mu_d) + \alpha_4 \mu_p \quad (4.5)$$

$$\frac{dN}{dt} = (N_F - N) \frac{F}{V} - \mu_N X \quad (4.6)$$

- Consumo de oxigênio

$$\mu_{O_2} = m_{O_2} + \frac{1}{Y_{O_2}} \mu \quad (4.23)$$

$$C_L^* = \frac{b_1}{10^{(b_2 + b_3 \cdot S)}} \quad (4.24)$$

$$OD = \frac{C_L}{C_L^*} \quad (4.25)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = k_l a (C_L^* - C_L) - r_{O_2} \cdot X - C_L \frac{F}{V} \quad (4.26)$$

- Crescimento celular

$$\mu = k \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \left(\frac{N}{N + K_N} \right) \left(\frac{C_L}{K_{OX} + C_L} \right) \quad (4.28)$$

$$\mu_d = k_d [1 - f_s(S)] \quad (4.29)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - \mu_d) X - \frac{F}{V} X \quad (4.16)$$

- Formação de produto

$$\mu_p = k_2 \left(\frac{S}{S + K_2} \right) \left(\frac{K_N}{N + K_N} \right) \quad (4.30)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p X - \frac{F}{V} P \quad (4.18)$$

- Variação de volume

$$\frac{dV}{dt} = F - F_{amostragem} \quad (4.19)$$

O ajuste dos parâmetros do modelo 2 seguiu a mesma sistemática adotada para o modelo 1. Verificou-se a necessidade de adequar o valor de alguns parâmetros para compensar a exclusão das frações referentes à morfologia celular. Os parâmetros k , k_2 e k_d que no modelo 1 multiplicavam frações dos compartimentos da célula foram reestimados no modelo 2 junto com os parâmetros K_{ox} e k_{ia} por regressão não-linear. As Tabelas 4.5 e 4.6 e as Figuras 4.14 a 4.18 mostram os resultados obtidos.

Pela análise visual das curvas simuladas, percebe-se que o modelo segue as tendências dos dados experimentais tanto qualitativa como quantitativamente, assim como o modelo 1. Novamente, as exceções se aplicam aos ensaios DA-5b e aos ensaios contínuos com vazões específicas de alimentação acima de $0,25h^{-1}$.

As discussões referentes ao efeito do oxigênio sobre o crescimento celular apresentadas no item anterior se aplicam igualmente ao modelo 2.

Tabela 4.5: Parâmetros do modelo 2

Parâmetro	Valor	Unidade	Comentários
β_1	0,138	g NH ₃ /g extrato de levedura	Composição de extrato de levedura
β_2	0,139	g NH ₃ / g THAM	Composição de THAM
k	0,2966 ± 0,00036	h ⁻¹	estimado por RNL*
K _S	0.03	g glicose/L	Nielsen (1993)
k ₂	0,0506 ± 0,0021	h ⁻¹	estimado por RNL*
K _{S2}	0,1	g glicose/L	atribuído
K _N	0,713	g NH ₃ /L	Giudici et al. (2004)
α_3	0,211	g NH ₃ /g biomassa	Giudici et al. (2004)
α_4	0,022	g NH ₃ /g P	Bieber et al. (1989)
α_1	1,117	g glicose/g biomassa	Giudici et al. (2004)
α_2	0,808	g glicose/g P	Giudici et al. (2004)
m _s	0,019	h ⁻¹	Giudici et al. (2004)
K _{ms}	0,05	g glicose/L	estimado por RNL*
k _d	0,0341 ± 0,00023	h ⁻¹	estimado por RNL*
K _{ox}	0,0132 ± 0,00022	mmol O ₂ /L	estimado por RNL*
m _o	0,83	mmol/g.h	Pamboukian (2003)
1/Y _{o2}	17,35	mmol/g	Pamboukian (2003)
kla	128,36 ± 0,024	h ⁻¹	estimado por RNL*
b ₁	0,2456	mmol O ₂ /L	Martins (2001)
b ₂	0,0114	-----	Martins (2001)
b ₃	6,78.10 ⁻⁴	L/ g glicose	Martins (2001)

*RNL: regressão não-linear

Tabela 4.6: Estatística dos parâmetros estimados no modelo 2

Parâmetro	Valor	Desvio padrão	Matriz de correlação				
K _{ox}	0,0132	0,00022	1				
kla	128,36	0,024	0,36	1			
k	0,2966	0,00036	0,42	0,0084	1		
k ₂	0,0506	0,0021	0,50	-0,054	0,45	1	
k _d	0,0341	0,00023	0,84	-0,37	0,59	0,49	1

Figura 4.14: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos

Figura 4.15: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontinuos

Figura 4.16: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação

Figura 4.17: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios descontínuos alimentados e respectivas vazões de alimentação

Figura 4.18: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S), de retamicina (P) e oxigênio dissolvido (OD) nos ensaios contínuos e respectivas vazões de alimentação

4.2 Modelo 3: modelo híbrido

No modelo híbrido, equações de balanço material foram combinadas com redes neurais do tipo feedforward (Figura 4.19) utilizando treinamento supervisionado (*backpropagation*). As redes neurais funcionaram como estimadores das cinéticas a partir das concentrações de X, S e P.

Assim, foram elaboradas três redes neurais: a primeira foi empregada para estimar os valores das velocidades instantâneas de crescimento celular r_x (RN1); a segunda, as velocidades instantâneas de consumo de substrato r_s (RN2); e a terceira, a velocidade instantânea de formação de produto r_p (RN3).

A entrada de todas as redes eram as concentrações de substrato (S), biomassa (X) e produto (P). As saídas das redes (r_x , r_s e r_p) foram utilizadas nos balanços de massa para calcular as concentrações de biomassa, substrato e produto nos tempos subseqüentes (X_{t+dt} , S_{t+dt} e P_{t+dt}).

Figura 4.19: Diagrama do modelo híbrido

As equações de balanço material foram integradas pelo método de Gear, utilizando a rotina ode15s do software Matlab:

$$\frac{dV}{dt} = F - F_{amostragem} \quad (4.19)$$

$$\frac{dX}{dt} = r_x - \frac{F}{V} X \quad (4.31)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p - \frac{F}{V} P \quad (4.32)$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - r_s \quad (4.33)$$

Como os valores das velocidades instantâneas não são conhecidos, foi necessário estimá-los a partir dos dados experimentais de X, S e P. Para tanto, ajustou-se para cada uma das variáveis uma curva sigmóide (eq. 4.34) aos dados experimentais dos ensaios descontínuos realizados por Pamboukian (2003) (Figuras 4.20 e 4.21). A escolha deste tipo de curva para suavizar as tendências dos dados experimentais ruidosos foi baseada no próprio comportamento qualitativo dos dados (Ratkowsky, 1983).

$$y = A_b + \frac{A_t - A_b}{1 + \exp\left[-\frac{(t - t_0)}{w}\right]} \quad (4.34)$$

onde A_b , A_t , t_0 e w são parâmetros ajustáveis.

Os ensaios D-1, D-2, D-3, D-4, D-5, D-3b, D-4b e D-5b são repetições do ensaio padrão, então se ajustou a mesma curva para todos. O ensaio D-3+ possui concentração inicial de nutrientes diferente, representando, portanto, um segundo conjunto de pontos experimentais. Tal ensaio foi representado por um segundo conjunto de parâmetros da Eq. (4.34). A curva de $S(t)$ do ensaio D-3+ apresenta duas inflexões e para o seu ajuste foi utilizada a soma de duas curvas sigmóides.

A partir das curvas ajustadas, foi feita a interpolação dos dados para geração de uma determinada quantidade de pontos (em intervalos de tempo de 0,1 min) a ser usada na etapa de treinamento da rede. Esta suavização serve de filtro das flutuações experimentais e se mostrou necessária para melhorar o ajuste (“treinamento”) das redes neurais. Os valores de r_x , r_s e r_p foram determinados ao derivar a Eq. 4.34.

$$\frac{dy}{dt} = \frac{(A_t - A_b) \exp\left(-\frac{(t - t_0)}{w}\right)}{w \left\{ 1 + \exp\left[-\frac{(t - t_0)}{w}\right] \right\}^2} \quad (4.35)$$

Pontos obtidos a partir da curva sigmoidal foram usados na etapa de treinamento das redes. Foi avaliado o número de neurônios na camada oculta (3, 6, 9, 12 e 15) nas três redes. Na etapa de validação das redes, foram utilizados os dados experimentais brutos (ruidosos) de X, S e P e os correspondentes valores de r_x , r_s e r_p obtidos da curva sigmoidal nos mesmos instantes t. As redes selecionadas foram as que apresentaram menor erro na etapa de validação (Figuras 4.22 a 4.24). Assim, as redes selecionadas RN1, RN2 e RN3 possuem 3, 6 e 12 neurônios na camada oculta, respectivamente.

A Figura 4.25 mostra os gráficos de comparação entre os valores de velocidade calculados pela rede e os “dados experimentais”, tanto na etapa de treinamento como na de validação. Apesar do bom ajuste obtido na etapa de treinamento, observa-se que a rede não é capaz de inferir com boa acuidade os dados na etapa de validação. Os dados utilizados em tal etapa são os determinados por Pamboukian (2003) e a falta de ajuste reflete a variabilidade natural dos dados experimentais observados nos diferentes ensaios padrão.

As Figuras 4.26 e 4.27 apresentam os resultados das concentrações de biomassa, glicose e retamicina fornecidos pelo modelo híbrido para os ensaios descontínuos. Percebe-se que o modelo híbrido apresentou um ajuste satisfatório nos ensaios descontínuos. Vale ressaltar que as curvas de simulação são as

mesmas em todos os ensaios replicados (D-1, D-2, D-3, D-4, D-5, D-3b, D-4b e D-5b), já que as condições iniciais consideradas na simulação foram iguais.

As Figuras 4.28 e 4.29 mostram os resultados das simulações para os ensaios descontínuos alimentados. Pela análise visual das curvas, verifica-se a falta de ajuste na maioria dos ensaios. Os desvios começam a se acentuar durante a etapa de alimentação, mantendo-se elevados até o fim das corridas, principalmente para a variável concentração de glicose. O modelo híbrido apresentou boa descrição qualitativa tanto para a concentração de biomassa quanto para a de retamicina. Assim como na modelagem fenomenológica, para os ensaios DA-4b e DA-5b, o modelo híbrido apresentou maiores desvios em relação aos dados experimentais.

Figura 4.20: Ajuste da curva sigmoideal para os ensaios replicados

Figura 4.21: Ajuste da curva sigmoideal para o ensaio D-3+

Figura 4.22: Seleção do número de neurônios na rede RN 1

Figura 4.23: Seleção do número de neurônios na rede RN 2

Figura 4.24: Seleção do número de neurônios na rede RN 3

Figura 4.25: Comparação entre os valores experimentais e os calculados. (A) etapa de treinamento e (B) etapa de validação

Figura 4.26: : Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)

Figura 4.27: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)

Figura 4.28: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos alimentados (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)

Figura 4.29: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios descontínuos alimentados (condições iniciais: $X_0 = 0,2415$ g/L, $S_0 = 10,8208$ g/L, $P_0 = 0,0017$ g/L)

Conforme mencionado anteriormente, as simulações foram efetuadas com as mesmas condições iniciais em todos os cultivos. Os valores utilizados foram aqueles determinados pelo ajuste da curva sigmoidal. Para verificar a sensibilidade do modelo híbrido à condição inicial, executou-se um segundo conjunto de simulações com os valores das condições iniciais ligeiramente perturbados. Percebe-se pelos resultados apresentados na figura 4.30 que houve uma piora na representação dos dados, evidenciando a sensibilidade do modelo híbrido às condições iniciais de cultivo. O modelo híbrido, portanto, apresenta uma capacidade limitada de predição, não podendo ser utilizado em simulações com condições que estejam fora da região coberta pelos dados usados na etapa de treinamento das redes (extrapolação). Dessa maneira, a abordagem híbrida apresentada no presente trabalho não é capaz de descrever o processo satisfatoriamente do ponto de vista quantitativo em condições de cultivo. Por esta razão, o modelo híbrido não será considerado no teste de adequação do modelo.

Figura 4.30: Comparação da simulação com os dados experimentais para as variáveis concentração celular (X), de glicose (S) e de retamicina (P) nos ensaios D-1 e DA-1 (condições iniciais: $X_0 = 0,28$ g/L, $S_0 = 10,0$ g/L, $P_0 = 0,002$ g/L)

4.3 Análise estatística

4.3.1 Cálculo do erro experimental de cada variável de estado

No cálculo do erro experimental para cada variável de estado foram considerados os ensaios descontínuos padrão.

Para cada variável (X, S, P e OD), calculou-se a média e o desvio padrão entre os ensaios, em cada tempo amostrado. O erro foi calculado pela divisão do desvio padrão pela média, em cada tempo amostrado. Por fim, determinou-se o erro médio para cada variável de estado, calculando-se a média de todos os erros. Nos casos em que alguma variável atingia um patamar no final do ensaio, foram considerados para o cálculo da média e erro globais apenas os pontos anteriores ao patamar para evitar a interferência de erros que se mostram praticamente constantes e muito pequenos, seguindo procedimento usado por Tavares (2005). As tabelas 4.7 a 4.10 mostram os resultados dos erros obtidos para cada variável de estado.

Nota-se que os erros podem variar apreciavelmente ao longo do tempo de cultivo, e que os erros médios das variáveis foram 15% para X, 12% para S, 11% para P e 4% para OD. Estes desvios são decorrentes não apenas das medições experimentais (técnicas analíticas empregadas) e das flutuações que ocorrem ao longo de um cultivo, mas principalmente da dificuldade de reprodutibilidade entre os ensaios, algo inerente aos processos biotecnológicos.

Tabela 4.7: Cálculo do erro experimental médio de X

Tempo (h)	Média de X	Desvio Padrão	Erro (%)
0	0,27	0,07	25
4	0,25	0,04	17
6	0,44	0,05	11
8	0,57	0,17	29
12	1,79	0,51	29
16	3,25	0,50	15
20	4,11	0,51	12
24	4,49	0,38	8
28	4,70	0,46	10
32	4,59	0,67	15
36	4,63	0,53	12
40	4,24	0,40	10
44	4,23	0,52	12
48	3,70	0,37	10
52	4,24	0,42	10
Erro médio			15

Tabela 4.8: Cálculo do erro experimental médio de S

Tempo (h)	Média de S	Desvio Padrão	Erro (%)
0	10,88	0,42	4
4	10,58	0,61	6
6	10,20	0,14	1
8	10,40	0,61	6
12	9,34	0,94	10
16	7,02	1,25	18
20	4,05	1,57	39
Erro médio			12

Tabela 4.9: Cálculo do erro experimental médio de P

Tempo (h)	Média de X	Desvio Padrão	Erro (%)
24	1,78	0,56	32
28	2,69	0,27	10
32	3,05	0,42	14
36	3,44	0,27	8
40	3,40	0,26	8
44	3,60	0,12	3
48	3,61	0,17	5
52	3,97	0,21	5
Erro médio			11

Tabela 4.10: Cálculo do erro experimental médio de OD

Tempo (h)	Média de X	Desvio Padrão	Erro (%)
4	1,00	0,00	0
8	0,99	0,01	1
12	0,91	0,02	3
16	0,75	0,05	6
20	0,73	0,05	7
24	0,83	0,05	6
28	0,90	0,06	6
32	0,95	0,05	5
36	0,97	0,04	4
40	0,98	0,03	3
44	0,98	0,03	3
48	0,98	0,02	2
Erro médio			4

4.3.2 Discriminação entre modelos

Conforme descrito no item 2.2.1, o teste do χ^2 de Bartlett avalia se as variâncias dos modelos diferem entre si, ou seja, se os modelos são estatisticamente equivalentes ou não para a descrição dos dados experimentais.

Os cálculos referentes a este teste apresentados nas Tabelas 4.11 e 4.12 foram feitos a partir das Eq. 1.1, 1.2 e 1.3.

Tabela 4.11: Variâncias e graus de liberdade dos modelos

Modelo	df_i	s_i^2	Variáveis dependentes
0	957	0,998	S, X, P
1	1217	0,898	S, X, P, OD
2	1214	0,887	S, X, P, OD
3	843	2,951	S, X, P

Tabela 4.12: Teste de discriminação entre modelo

Nº modelos (m)	modelos	$\bar{s}^2$	χ^2_{calc}	χ^2_{tab} (95 %, $m - 1$)	Resultados
4	0,1,2,3	1,327	518,1	7,815	Descarta-se o modelo 3
3	0,1,2	0,922	4,39	5,991	Nenhum modelo descartado

A comparação das variâncias dos quatro modelos indicou que o conjunto das quatro variâncias não é homogêneo. Isto indica que pelo menos um dos modelos apresenta uma variância estatisticamente diferente das dos demais. Neste caso, deve-se descartar o modelo que apresenta maior variância, no caso o modelo 3, de acordo com a Tabela 4.11. Esse resultado já era esperado frente às observações visuais das qualidades dos ajustes feitas anteriormente.

Prosseguiu-se então com o teste de discriminação entre os três modelos restantes (0, 1, 2). Os resultados indicaram que as variâncias destes três modelos não são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança. Portanto, do ponto de vista da qualidade do ajuste, os três modelos são equivalentes em termos de representação dos dados experimentais.

4.3.3 Teste de adequação do modelo

Esse teste é realizado para determinar se o modelo representa adequadamente o conjunto de dados fornecidos. Para tanto, a variância do erro do modelo é comparada com a variância do erro experimental estimado. Conforme descrito no item 2.2.2, o erro do modelo deve ser menor que o erro experimental.

No presente trabalho, os testes de adequação do modelo foram realizados para o modelo 0, modelo 1 e modelo 2 para cada variável de estado considerada no ajuste dos parâmetros, ou seja, X, S, P e OD.

Tabela 4.13: Variâncias dos modelos e do erro experimental

modelo	0	1	2	s_e^2
s_X^2	1,256	1,393	1,365	0,438
s_S^2	1,345	1,599	1,610	0,595
s_P^2	0,431	0,424	0,424	0,193
s_{OD}^2	----	0,011	0,012	0,173
s_{total}^2	0,998	0,898	0,887	0,294
F_{calc}	3,39	3,05	3,02	

Pela análise da Tabela 4.13, observa-se que as variâncias dos modelos são maiores que a variância do erro experimental avaliada a partir dos ensaios descontínuos padrão. Do ponto de vista estatístico, tal ocorrência implicaria na inadequação dos modelos frente aos dados experimentais. No entanto, é preciso considerar que rigorosamente os ensaios padrão não apresentaram boa reprodutibilidade, o que provoca um aumento dos erros entre os modelos e os dados experimentais, especialmente porque os modelos utilizam condições iniciais diferenciadas para os diferentes cultivos. Isto significa que as previsões dos modelos não serão as mesmas. Vale ressaltar ainda que os ensaios contínuos foram incluídos nos cálculos da variância dos modelos. A observação do ajuste para os ensaios contínuos mostra que os modelos apresentaram grandes desvios

em relação aos dados, especialmente nas condições de vazões específicas de alimentação acima de $0,25\text{h}^{-1}$ e essas medidas foram incluídas na análise das variâncias, impactando os valores das mesmas.

5 Conclusões e recomendações

Com base nos resultados do trabalho, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

- Os modelos 1 e 2 descreveram adequadamente as tendências dos dados experimentais;
- A incorporação da variável oxigênio dissolvido ao modelo 0 permitiu uma representação satisfatória desta variável ao longo dos cultivos. No entanto, a estimativa dos parâmetros relacionados ao efeito do oxigênio sobre a cinética de crescimento celular foi prejudicada, dada a faixa de concentração experimental. A influência do oxigênio dissolvido sobre a cinética do processo não pôde ser adequadamente percebida, porque a maioria dos ensaios não foi realizada sob limitação por oxigênio;
- O modelo 3 híbrido não apresentou a mesma qualidade de ajuste aos dados em comparação com os modelos fenomenológicos, além de ter se mostrado sensível às condições iniciais de cultivo. A análise estatística de discriminação entre modelos rivais indicou que o modelo híbrido desenvolvido não é adequado para descrever o processo;
- As previsões dos modelos 0, 1 e 2 não diferem estatisticamente entre si. Neste sentido, o modelo 2 tem a vantagem de ser mais simples (menor número de variáveis e de parâmetros) e apresentar a mesma capacidade preditiva dos outros modelos;
- Apesar dos modelos 1 e 2 apresentarem visualmente uma boa representação do processo, não foi possível afirmar estatisticamente que eles se adequam aos dados;
- Os ensaios contínuos não foram bem representados por nenhum dos modelos, principalmente aqueles conduzidos em altas vazões específicas de alimentação.

No que se refere a trabalhos futuros como continuação ao presente estudo, as seguintes recomendações podem ser feitas:

- Determinação da concentração de oxigênio dissolvido crítica para uma melhor estimação do parâmetro K_{ox} , bem como uma melhor avaliação do efeito do oxigênio dissolvido sobre o crescimento celular;
- Exploração de outras formas de modelos baseados em redes neurais diferentes da utilizada neste trabalho. Além disso, seria interessante o levantamento de uma faixa de dados, que incorporassem diferentes condições operacionais, para um melhor ajuste pelas redes;
- Desenvolvimento de um modelo capaz de representar a tendência dos dados em processo contínuo.

Referências Bibliográficas

ALVES, R. M. B. **Otimização de um Processo Industrial de Produção de Isopreno via Redes Neurais**. 2003, 283 p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BAILEY, J. E. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 8-20, 1998.

BAJPAI, R.K., REUSS, M. A mechanistic model for penicillin production. **J.Chem.Tech. Biochem**, v. 30, p. 332-344, 1980

BIEBER L.W., SILVA FILHO A.A., SILVA E.C., MELLO J.F., LYRA F.D.A. The anthracyclinic complex retamycin. 1. Structure determination of the major constituents. **J. Nat. Prod**, v. 52, p. 385-388, 1989.

BIROL, G.; ÜNDEY, C.; PARULEKAR, S. J.; ÇINAR, A. A morphologically structured model for penicillin production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 538-552, 2002.

BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. Morphologically structured model for growth and citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 268-281, 2003.

- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.) **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2. p. 123-178.
- BRAVO, S.; DIEZ, M. C.; SHENE, C. Hybrid neural network model for simulating sorbitol synthesis by glucose-fructose oxidoreductase in *Zymomonas mobilis* CP4. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 509 – 518, 2004.
- COSTA, A.C., HENRIQUES, A.S.W., ALVES, T.L.M., MACIEL FILHO, R. AND LIMA, E.L., A Hybrid Neural Model for the Optimization of Fed-Bath Fermentations, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 16, n. 1, 1999.
- CRUZ, A. J. G.; SILVA, A. S. ; ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. Modeling and Optimization of the Cephalosporin C Production Bioprocess in a Fed-Batch Bioreactor with Invert Sugar. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 3137-3142, 1999.
- FROMENT. G. F.; BISCHOFF, K. B. **Chemical Reactor Analysis and Design**. Singapura: John Wiley & Sons, 1990, 664 p.
- FURLAN, R.L. **Obtenção e Estudos de mutantes com produção alternada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622**. 1997. 76p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

GIUDICI, R. Modelagem e Simulação de Processos. São Paulo: Epusp, 1990. Apostila para disciplina de graduação do Departamento de Engenharia Química – Modelagem e Simulação de Processos.

GIUDICI, R.; PAMBOUKIAN, C. D. R.; FACCIOITTI, M. C. Morphologically structured model for antitumoral retamycin production during batch and fed-batch cultivations of *Streptomyces olindensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 4, p. 414-424, 2004.

GUARDIOLA, J., IBORRA, J.L., CÁNOVAS, M. A model that links growth and secondary metabolite production in plant cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, n.3, p. 291-297, 1995.

GUIMARÃES, L.M. **Influencia do preparo do inóculo e do pH na produção do antibiótico retamicina por *Streptomyces olindensis* So20**. 2000. 122p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GUIMARÃES, L.M. **Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20**. 2005. 207 p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

INOUE, O. O. **Influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LIU, G.; XING, M.; HAN, Q. A population-based morphologically structured model for hyphal growth and product formation in streptomycin fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p. 1329-1338, 2005.

MARQUARDT, D.W. An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.

MARTINS, R. A. **Transferência de oxigênio e respiração microbiana em cultivos de *Streptomyces olindensis* So20, visando à produção do antibiótico retamicina.** 2001. 157p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Modeling of cephalosporin C production and its application to fed-batch culture. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, n. 2, p. 115-123, 1981.

MENEZES, J.C., ALVES, S.S., LEMOS, J.M., AZEVEDO, S.F. Mathematical modelling of industrial pilot-plant penicillin-G fed-batch fermentations. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v. 61, p.123-138, 1994.

NIELSEN, J. A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 715-727, 1993.

NIELSEN, J., VILLADSEN, J. **Bioreaction Engineering Principles.** New York: Plenum Press, 1994. p. 163 – 269.

OHBA, M. S. **Modelagem matemática da produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. 1998. 213 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

OMS (Organização Mundial da Saúde): Cancer - World Health Organization cancer control programme. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 23 nov 2006.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis* em processos descontínuo alimentado e contínuo**. 2003, 163p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 558-572, 1996.

PAUL G.C., SYDDALL, M.T., KENT, C.A., THOMAS C.R. A structured model for penicillin production on mixed substrates. **Biochem. Eng. J.** v. 2, p. 11-21. 1998.

PELLICCI, R. L. **Modelagem e Simulação de Um Processo de Extração de Aromáticos Via Redes Neurais**. 2001, 130 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RATKOWSKY, D. A. **Nonlinear Regression Modeling: A Unified Practical Approach**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1983, 276 p.

SILVA, R.G.; CRUZ, A.J.G.; HOKKA, C. O.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R. C. A hybrid feedforward neural network model for the cephalosporin C production process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 17, n. 4-7, p. 587 – 597, 2000

SINCLAIR, C. G.; KRISTIANSEN, B. **Fermentation kinetics and modeling**. Grã-Bretanha: Open University Press, 1987. 113 p.

TAVARES, L. Z. **Otimização do processo de produção de etanol por levedura amilolítica recombinante utilizando técnicas de modelagem matemática**. 2005. 275 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

THOMPSON, M.L. AND KRAMER, M.A., Modeling Chemical Processes Using Prior Knowledge and Neural Networks, **AIChE Journal**, v. 40, n. 8, p. 1328-1340, 1994.

TONIN, F. C. **Avaliação de variáveis operacionais e aplicação de enfoque híbrido na modelagem do processo de produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium***. 2005. 73 P. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

VAN CAN, H.J.L., HELLINGA, C., LUYBEN, K.C.A.M., HEIJNEN, J.J. AND TE BRAAKE, H.A.B., Strategy for Dynamic Process Modelling Based on Neural Networks in Macroscopic Balances, **AIChE Journal**, v. 42, n. 12, p. 3403-3418, 1996.

VOLESKY, B.; VOTRUBA, J. **Modeling and optimization of fermentation processes**. Amsterdã: Elsevier, 1992. 266 p.

ZANGIROLAMI, T. C.; JOHANSEN, C .L.; NIELSEN, J.; JORGENSEN, S. B. Simulation of penicillin production in fed-batch cultivations using a morphologically structured model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 593-604, 1997.

Apêndice A

Equações dos modelos 0, 1 e 2

Tabela A.1: Equações dos modelos 0, 1 e 2

Modelo 0	Modelo 1	Modelo 2
<ul style="list-style-type: none"> Consumo de Glicose $\mu_s = \alpha_1 \mu + \alpha_2 \mu_p + m_s f_s(S) \quad (4.1)$ $f_s(S) = \frac{S}{S + K_{ms}} \quad (4.2)$ $\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - \mu_s X \quad (4.3)$	<ul style="list-style-type: none"> Consumo de Glicose $\mu_s = \alpha_1 \mu + \alpha_2 \mu_p + m_s f_s(S) \quad (4.1)$ $f_s(S) = \frac{S}{S + K_{ms}} \quad (4.2)$ $\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - \mu_s X \quad (4.3)$	<ul style="list-style-type: none"> Consumo de glicose $\mu_s = \alpha_1 \mu + \alpha_2 \mu_p + m_s f_s(S) \quad (4.1)$ $f_s(S) = \frac{S}{S + K_{ms}} \quad (4.2)$ $\frac{dS}{dt} = (S_F - S) \frac{F}{V} - \mu_s X \quad (4.3)$
<ul style="list-style-type: none"> Consumo da fonte de nitrogênio $\mu_N = \alpha_3(\mu - \mu_d) + \alpha_4 \mu_p \quad (4.5)$ $\frac{dN}{dt} = (N_F - N) \frac{F}{V} - \mu_N X \quad (4.6)$	<ul style="list-style-type: none"> Consumo da fonte de nitrogênio $\mu_N = \alpha_3(\mu - \mu_d) + \alpha_4 \mu_p \quad (4.5)$ $\frac{dN}{dt} = (N_F - N) \frac{F}{V} - \mu_N X \quad (4.6)$	<ul style="list-style-type: none"> Consumo da fonte de nitrogênio $\mu_N = \alpha_3(\mu - \mu_d) + \alpha_4 \mu_p \quad (4.5)$ $\frac{dN}{dt} = (N_F - N) \frac{F}{V} - \mu_N X \quad (4.6)$

Continuação da tabela A.1

• Crescimento celular	• Crescimento celular	• Crescimento celular
$u_1 = k_{u_1} Z_s \quad (4.7)$	$u_1 = k_{u_1} Z_s \quad (4.7)$	
$u_2 = k_{u_2} Z_a \quad (4.8)$	$u_2 = k_{u_2} Z_a \quad (4.8)$	
$u_3 = \frac{k_{u_3} Z_s}{SK_{u_3} + 1} \quad (4.9)$	$u_3 = \frac{k_{u_3} Z_s}{SK_{u_3} + 1} \quad (4.9)$	
$\mu_a = \mu_{sa} = k \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{N}{N + K_n} \right) \quad (4.10)$	$\mu_a = \mu_{sa} = \mu_h = k \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{N}{N + K_n} \right) \left(\frac{C_L}{K_{ox} + C_L} \right) \quad (4.20)$	$\mu = k \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{N}{N + K_n} \right) \left(\frac{C_L}{K_{ox} + C_L} \right) \quad (4.28)$
$\mu = \mu_a Z_a + \mu_{sa} Z_s \quad (4.11)$	$\mu = \mu_a Z_a + \mu_{sa} Z_s + f_h \mu_h Z_h \quad (4.21)$	
$\mu_d = k_d [1 - f_s(S)] Z_h \quad (4.12)$	$\mu_d = k_d [1 - f_s(S)] Z_h \quad (4.12)$	$\mu_d = k_d [1 - f_s(S)] \quad (4.29)$
$\frac{dZ_a}{dt} = u_1 - u_2 + \mu_a Z_a - (\mu - \mu_d) Z_a \quad (4.13)$	$\frac{dZ_a}{dt} = u_1 - u_2 + \mu_a Z_a - (\mu - \mu_d) Z_a \quad (4.13)$	
$\frac{dZ_s}{dt} = u_2 - u_1 - u_3 + \mu_s Z_s - (\mu - \mu_d) Z_s \quad (4.14)$	$\frac{dZ_s}{dt} = u_2 - u_1 - u_3 + \mu_s Z_s - (\mu - \mu_d) Z_s \quad (4.14)$	

Continuação da tabela A.1		
$\frac{dZ_h}{dt} = u_3 - (\mu - \mu_d)Z_h - \mu_d \quad (4.15)$	$\frac{dZ_h}{dt} = u_3 - (\mu - \mu_d)Z_h - \mu_d \quad (4.15)$	
$\frac{dX}{dt} = (\mu - \mu_d)X - \frac{F}{V}X \quad (4.16)$	$\frac{dX}{dt} = (\mu - \mu_d)X - \frac{F}{V}X \quad (4.16)$	$\frac{dX}{dt} = (\mu - \mu_d)X - \frac{F}{V}X \quad (4.16)$
<ul style="list-style-type: none"> Formação de produto 	<ul style="list-style-type: none"> Formação de produto 	<ul style="list-style-type: none"> Formação de produto
$\mu_p = k_2 \left(\frac{S}{S + K_2} \right) \left(\frac{K_N}{N + K_N} \right) Z_s \quad (4.17)$	$\mu_p = k_2 \left(\frac{S}{S + K_2} \right) \left(\frac{K_N}{N + K_N} \right) (Z_s + f_h Z_h) \quad (4.22)$	$\mu_p = k_2 \left(\frac{S}{S + K_2} \right) \left(\frac{K_N}{N + K_N} \right) \quad (4.30)$
$\frac{dP}{dt} = \mu_p X - \frac{F}{V}P \quad (4.18)$	$\frac{dP}{dt} = \mu_p X - \frac{F}{V}P \quad (4.18)$	$\frac{dP}{dt} = \mu_p X - \frac{F}{V}P \quad (4.18)$
	<ul style="list-style-type: none"> Consumo de oxigênio 	<ul style="list-style-type: none"> Consumo de oxigênio
	$\mu_{O_2} = m_{O_2} + \frac{1}{Y_{O_2}} \mu \quad (4.23)$	$\mu_{O_2} = m_{O_2} + \frac{1}{Y_{O_2}} \mu \quad (4.23)$
	$C_L^* = \frac{b_1}{10^{(b_2 + b_3 \cdot S)}} \quad (4.24)$	$C_L^* = \frac{b_1}{10^{(b_2 + b_3 \cdot S)}} \quad (4.24)$
Continuação da tabela A.1		

<ul style="list-style-type: none"> • Variação de volume $\frac{dV}{dt} = F - F_{amostragem} \quad (4.19)$	$\frac{dC_L}{dt} = k_l a (C_L^* - C_L) - r_{O_2} \cdot X - C_L \frac{F}{V} \quad (4.26)$ <ul style="list-style-type: none"> • Variação de volume $\frac{dV}{dt} = F - F_{amostragem} \quad (4.19)$	$\frac{dC_L}{dt} = k_l a (C_L^* - C_L) - r_{O_2} \cdot X - C_L \frac{F}{V} \quad (4.26)$ <ul style="list-style-type: none"> • Variação de volume $\frac{dV}{dt} = F - F_{amostragem} \quad (4.19)$
--	---	---