Manuel Filgueira Barral

Modelo cinético não-estruturado para
crescimento e produção de glicoproteína
recombinante do vírus da raiva em linhagem
S2 de células de *Drosophila melanogaster*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2010

Manuel Filgueira Barral

Modelo cinético não-estruturado para
crescimento e produção de glicoproteína
recombinante do vírus da raiva em linhagem
S2 de células de *Drosophila melanogaster*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elisabeth de Fatima Pires
Augusto

São Paulo
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Barral, Manuel Filgueira.

Modelo cinético não-estruturado para crescimento e produção de glicoproteína recombinante do vírus da raiva em linhagem S2 de células de *Drosophila melanogaster* / Manuel Filgueira Barral. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Elisabeth de Fátima Pires Augusto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Cultivo de células animais.

Versão do título para o inglês: Unstructured kinetic model for growth and production of the recombinant rabies virus glycoproteine in S2 cell strain from *Drosophila melanogaster*.

Descritores: 1. *Drosophila melanogaster* S2 2. Células de inseto 3. Modelagem matemática 4. Modelo cinético 5. Modelo não-estruturado 6. Glicoproteína do vírus rábico I. Augusto, Elisabeth de Fátima Pires II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0104/2010

À Rocilda, ao Heitor e à Marília pelo apoio, estímulo e pelo tempo privado ao nosso convívio.

In memoriam a meus pais, Faustino e Maria Luísa e aos meus queridos amigos de graduação, Nuno Álvaro Luz Lacerda e ao Luis Eduardo Tomazzini e ao Luis Carlos Urenha, amigo de escola e de trabalho, com quem gostaria de compartilhar este momento.

AGRADECIMENTOS

À Beth, pela orientação, estímulo e pela oportunidade de participar de um grupo pesquisa como este.

Ao Marcelo pelos dados, pela amizade, apesar da diferença de idade, e pelo apoio nos momentos de dificuldades com dispositivos eletrônicos e com as novas e velhas versões de certos aplicativos.

À Kamila, Adriana e Fabiana pelos dados e pela estimulante convivência neste projeto.

À Rosane pelo apoio nos momentos críticos e pela amizade permanente destes últimos anos.

Patrícia Léo e ao Aldo pelas contribuições nas discussões havidas durante o projeto.

Ao Renato pelo seu apoio técnico no projeto

Ao Fabrício Sensato, pela amizade, pelo estímulo à pesquisa e pelo exemplo de dedicação e seriedade na vida e no trabalho.

Aos meus queridos amigos Murilo, Ana, José Carlos e Carla, amigos certos de horas certas e incertas, por seu apoio e paciência comigo.

À equipe do projeto temático, em especial ao Renato e ao Ronaldo, pelo agradável e produtivo convívio no projeto.

Ao LBI e ao IPT pela possibilidade de realizar este trabalho.

*Our remedies oft in ourselves do lie
Which we ascribe to heaven: fated sky
Give us scope, only doth backward pull
Our slow designs when we ourselves are dull
(W. Shakespeare, All's well that ends well, act 1, scene 1)*

Nossos remédios vivem em nós mesmos,
Mas os atribuímos a Deus, nosso fado
Nos dá escolha livre, fracassamos
Se com preguiça à luta nós nos damos.
(W. Shakespeare, Bom é o que acaba bem, ato 1, cena 1, tradução de Bárbara Heliodora).

RESUMO

BARRAL, M. F. **Modelo cinético não-estruturado para crescimento e produção de glicoproteína recombinante do vírus da raiva em linhagem S2 de células de *Drosophila melanogaster***. 2010. 205p. (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Este trabalho propôs um modelo matemático não-estruturado para descrever o crescimento de uma linhagem recombinante de *Drosophila melanogaster* (S2AcGPV2) e a expressão da glicoproteína G do vírus da raiva (GPV). Para formular o modelo, foram considerados dez ensaios nos quais as células foram cultivadas em meio TC100 modificado e livre de soro fetal bovino, em bioreator isento de bolhas, operando em batelada, sob diferentes condições de controle do percentual de oxigênio dissolvido (pO_2) e concentrações iniciais de glicose (GLC) e glutamina (GLN). O modelo proposto considera oito variáveis de estado (células viáveis, X_v , células não-viáveis, X_d , GLC, GLN, alanina, ALA, glutamato, GLU, amônio, NH_4^+ , GPV) e vinte parâmetros cinéticos, descrevendo quatro situações metabólicas, com dinâmicas distintas, que são função de diferentes condições de limitação em GLC e/ou GLN. O equacionamento considera os seguintes fenômenos: a) a velocidade específica de crescimento é limitada por GLC ($k_{GLC} = 0,6$ g/L) e GLN ($k_{GLN} = 26$ mg/L) e inibida por NH_4^+ ($k_{NH_4} = 44$ mg/L); b) a velocidade específica de morte é uma cinética de ordem zero; c) a velocidade específica de produção de NH_4^+ é associada ao crescimento e estimulada pelo esgotamento de GLC, visto que nessa condição a célula não é mais capaz de formar ALA; d) a velocidade específica de formação de ALA é parcialmente associada ao crescimento; e) a velocidade específica de síntese de GPV é associada ao crescimento e inibida por NH_4^+ ($k_{dGPV/NH_4} = 35$ mg/L); f) há degradação de GPV na fase de crescimento estacionária; g) há síntese de GLN quando $GLN < 0,10$ g/L; h) há consumo de GLC para a formação de material celular e de ALA; i) há consumo de GLU em condições limitantes de GLN. A variabilidade metabólica foi ainda incorporada ao modelo mediante fatores que representam a influência das concentrações de pO_2 , GLC e GLN na velocidade específica de crescimento máxima (μ_{Xmax}) e nos fatores de conversão: $Y_{X/GLC}$, $Y_{X/GLN}$, $Y_{NH_4/X}$, $Y_{GPV/X}$, $Y_{ALA/GLC}$, $Y_{NH_4/GLN}$. Os parâmetros do modelo foram ajustados usando a técnica de otimização da busca de parâmetros por poliedros flexíveis, integração das equações diferenciais pelo método de Gear e considerando uma função objetivo definida como a somatória quadrática da diferença entre o valor previsto pelo modelo e o valor experimental da variável, normalizada pelo valor médio entre esses dois valores. Este estudo validou um modelo cinético aplicável à fase exponencial do cultivo e à toda a dinâmica do processo com níveis diferentes de significância de 95 % e 85 %, respectivamente.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*. S2. Células de inseto. Metabolismo. Modelagem matemática. Modelo não-estruturado. Proteína recombinante. Glicoproteína do vírus rábico..

ABSTRACT

BARRAL, M. F. **Unstructured kinetic modelling for growth and recombinant rabies virus glycoprotein production in a S2 strain cell line of *Drosophila melanogaster*. 205p.** Ph. D Thesis (Biotechnology). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A mathematical unstructured model for growth of a *Drosophila melanogaster* recombinant strain (S2AcGPV2) and the expression of glycoprotein G of rabies virus (GPV) was proposed. To formulate the model, ten experiments were considered in which cells were cultivated in a modified TC100 medium, fetal serum free, in a bubble free bench bioreactor, operating in batch mode, under different dissolved oxygen (pO_2) control and initial concentrations of glucose (GLC) and glutamine (GLN). The proposed model considers eight state variables (viable cells, X_v , non-viable cells, X_d , GLC, GLN, alanine, ALA, glutamate, GLU, ammonium, NH_4^+ and GPV) and twenty kinetic parameters, describing four metabolic situations, with different dynamics, which are function of different conditions of GLC or GLN limitations. The following phenomena were considered: a) the specific growth rate is limited by GLC ($k_{GLC} = 0.6$ g/L) and GLN ($k_{GLN} = 26$ mg/L) and inhibited by NH_4^+ ($k_{NH_4} = 44$ mg/L); b) the specific death rate is a zero order kinetic; c) the specific NH_4^+ production rate is growth associated and stimulated by exhaustion of GLC, since in this condition cells can no longer form ALA; d) specific ALA production rate is growth partially associated; e) the specific GPV synthesis rate is growth associated and inhibited by NH_4^+ ($k_{dGPV/NH_4} = 35$ mg/L); f) GPV degradation of GPV occurs at stationary growth phase; g) GLN synthesis occurs when $GLN < 0.10$ g / L; h) GLC is consumption for cell formation and ALA synthesis; i) GLU is consumed under GLN limitation. The cell metabolic versatility was also incorporated to the model as factors that represent the influence of pO_2 , GLC and GLN concentrations over maximum specific rate (μ_{Xmax}) and over the conversion factors ($Y_{X/GLC}$, $Y_{X/GLN}$, $Y_{NH_4/X}$, $Y_{GPV/X}$, $Y_{ALA/GLC}$, $Y_{NH_4/GLN}$). Model parameters were fitted to experimental data using the flexible geometric simplex optimization method and considering an objective function defined as the sum of squared difference between the value predicted by the model and the experimental value of the variable, normalized by the average between these two values. The integration of differential equations was made by the Gear method. Different kinetic models were applied to the exponential growth phase, and to the complete process dynamics, and were validated with distinguished significance levels of 95% and 85% respectively.

Keywords: *Drosophila melanogaster* S2. Insect cells. Metabolism. Mathematical modeling. Unstructured model. Recombinant protein. Rabies virus glycoprotein.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Pág.
Tabela 3.1 Caracterização de sistemas de expressão em uso.	9
Tabela 3.2. Exemplos de modelos para velocidades específicas de crescimento. FONTE: Augusto <i>et al.</i> (2008)	25
Tabela 3.3. Exemplos de modelos para velocidades específicas de morte celular. FONTE: Augusto <i>et al.</i> (2008).	27
Tabela 3.4. Exemplos de modelos para velocidades específicas de formação de produto. FONTE: Augusto <i>et al.</i> (2008)	28
Tabela 3.5. Classificação de biorreatores. FONTE: Chico, Rodríguez e Figueiredo (2008)	30
Tabela 4.1. Tratamento utilizado para extração de GPV de uma amostra celular. FONTE: Aguiar (2010)	41
Tabela 5.1. Variação dos parâmetros de cultivo das células S2AcGPV2 e S2AcGPV2-KTC100.	51
Tabela 5.2. Equações do Modelo 1	53
Tabela 5.3. Valores dos parâmetros para os diversos modelos.	57
Tabela 5.4. Equações do modelo 4.	67
Tabela 5.5. Equações do modelo 5	75
Tabela 5.6. Equações do modelo 6	119
Tabela 5.7. Valores dos parâmetros para o modelo 6. Ensaios considerados Ma-07 a Ma-12, Ma-15 e Ma-16. ($5\% < pO_2 < 80\%$; $1,1\text{ g/L} < GLC_0 < 10,0\text{ g/L}$; $0,6\text{ g/L} < GLN_0 < 3,5\text{ g/L}$). Célula S2AcGPV2.	128
Tabela 5.8. Intervalo adotado para ajuste dos parâmetros para o modelo 6a.	130
Tabela 5.9 Estimativa das variâncias experimentais	131
Tabela 5.10 Estimativa das variâncias experimentais	131
Tabela 5.11. Valores de F para o modelo 6a.	132
Tabela 5.12. Valores dos fatores de conversão utilizados no modelo 6b.	137
Tabela 5.13. Intervalo adotado para ajuste dos parâmetros para o modelo 6b.	137
Tabela 5.14. Valores de F para o modelo 6b.	138
Tabela 5.15. Intervalo adotado para ajuste dos parâmetros para o modelo 6c.	139
Tabela 5.16. Valores de F para o modelo 6c	143

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 3.1. Representação do vírion da raiva e do posicionamento da glicoproteína na sua estrutura. FONTE: Hammons e Narciso (2005)	10
Figura 3.2. Esquema simplificado das principais vias metabólicas identificadas em células de inseto. Os principais substratos com molduras em preto, principais subprodutos em azul, intermediários do anabolismo em vermelho, moldura em verde (a) indica vias metabólicas preferenciais quando há excesso de glicose e moldura roxo (b) indica vias metabólicas preferenciais com limitação de glicose. As enzimas mais relevantes estão indicadas: 1– DHAP desidrogenase, 2–Lactatodeidrogenase, 3– Piruvato decarboxilase e etanol desidrogenase, 4– Glutamato-piruvato transaminase, 5– Glutamato sintase (NADH-GOGAT), 6– Glutamina sintetase, 7– Glutaminase, 8– Glutamato desidrogenase. FONTE: baseada em Drews <i>et al.</i> (2000) e Ikononou, Schneider e Agathos (2003).	13
Figura 3.3. Reator de ondas.	31
Figura 3.4. Reator tipo agitado com células ancoradas em microcarregador (destaque para microcarregadores).	32
Figura 3.5. Biorreator de fibras ocas. FONTE: Fiber Cell System (2008)	34
Figura 3.6. Reator de leito fixo. FONTE: Meisenholder (1999)	35
Figura 3.7. Reator de leito Fluidizado. FONTE: Warnock, Merten e Al Rubeai (2006)	35
Figura 4.1. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{Xmax}), instante final da fase de crescimento lag (t_{lag}), instante final da fase de crescimento exponencial (t_{exp}). Ensaio RE-5, Quadro A.1, Anexo A)	42
Figura 4.2. Determinação do tempo transcorrido até o final do crescimento celular (t_{fim}) e do tempo transcorrido até início de morte celular (t_{morte}) (Ensaio Ma-05, Quadro A.1, Anexo A).	43
Figura 4.3. Determinação de tempo para que ocorra redução no teor de GPV por 10^7 células, ($t_{GPVEmax}$) e do tempo transcorrido até se atingir a concentração máxima de GPV (t_{GPVmax}). (Ensaio Ma-06, Anexo A, Quadro A.1).	43
Figura 4.4. Exemplo da determinação de fator de rendimento $Y_{GPV/X}$ (Ensaio Ma-06, Quadro A.1, Anexo A).	44
Figura 5.1. Principais etapas da modelagem matemática. FONTE: baseado em Bassanezi (2002)	48
Figura 5.2. Variação da concentração de GPV e do teor de GPV nas células S2AcGPV2 (Ensaio Ma-3, Quadro A.1, Anexo A). t_{EXP} - linha contínua azul; t_{FIM} - linha tracejada azul; t_{MORTE} - linha tracejada vermelha; $t_{GPVE,max}$ - linha contínua preta; t_{GPVmax} , - linha tracejada preta.	55
Figura 5.3. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1a para o ensaio Ma-02, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	56
Figura 5.4. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1a para o ensaio Ma-03, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	56
Figura 5.5. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-02, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	58
Figura 5.6. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o	59

ensaio Ma-03, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	
Figura 5.7. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-04, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	59
Figura 5.8. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-06, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	60
Figura 5.9. Influência do teor de oxigênio dissolvido na velocidade específica máxima de crescimento, Célula S2AcGPV2 para o conjunto de ensaios Ma-7 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	61
Figura 5.10. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-07, Célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	62
Figura 5.11. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2. $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	62
Figura 5.12. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-09, S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	63
Figura 5.13. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-10, S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	63
Figura 5.14. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-7, Célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	64
Figura 5.15. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-8, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	65
Figura 5.16. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-9, S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1. Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	65
Figura 5.17. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-10, S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	66
Figura 5.18. Fator de correção Fc_1 , $\mu_{X_{max,i}}/\max(\mu_{X_{max,i}})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .	68
Figura 5.19. Fator de correção Fc_2 , $Y_{X/GLC,i}/\max(Y_{X/GLC,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .	69
Figura 5.20. Fator de correção Fc_3 , $Y_{GPV/X,i}/\max(Y_{GPV/X,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .	69
Figura 5.21. Fator de correção Fc_4 , $Y_{GPV/GLC,i}/\max(Y_{GPV/GLC,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .	70
Figura 5.22. Fator de correção Fc_5 , $Y_{NH_4/X,i}/\max(Y_{NH_4/X,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2	70
Figura 5.23. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-07, Célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	71
Figura 5.24. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-8, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua,	72

previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.25. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-09, S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A), (linha contínua, previsões do modelo, símbolos azuis, dados experimentais). 72

Figura 5.26. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-10, S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais). 73

Figura 5.27. Consumo de glutamina e glutamato no ensaio Ma-02, célula S2AcGPV2-KTC100. A linha vertical indica o limiar de concentração de glutamina para início do consumo de glutamato. 74

Figura 5.28. Fator de conversão F_{c6} , $Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 76

Figura 5.29. Fator de conversão F_{c7} , $Y_{X/GLU,i}/\max(Y_{X/GLU,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 . 77

Figura 5.30. Fator de conversão F_{c8} , $Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 . 78

Figura 5.31. Fator de conversão F_{c9} , $Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 . 78

Figura 5.32. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 5 para o ensaio Ma-02, célula S2AcGPV2-KTC100, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais). 79

Figura 5.33. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 5 para o ensaio Ma-03, célula S2AcGPV2-KTC100, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais). 80

Figura 5.34. Evolução da concentração de glicose sob diferentes GLC_0 (Ensaio Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais indicam o final da fase exponencial em cada ensaio 82

Figura 5.35. Evolução da concentração de glutamina nos ensaios com diferentes GLC_0 (Ensaio Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase exponencial 83

Figura 5.36. Evolução da concentração de glicose nos ensaios com diferentes GLN_0 (Ensaio Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase exponencial. 83

Figura 5.37. Evolução da concentração de glutamina nos ensaios com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase exponencial. 84

Figura 5.38. Evolução da concentração de NH_4^+ . a) Ensaio com diferentes GLC_0 (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A); b) Ensaio com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase de crescimento exponencial. 84

Figura 5.39. Evolução na concentração de glutamato. a) Ensaio com diferentes GLC_0 (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A); b) Ensaio com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase de crescimento exponencial. 85

Figura 5.40. Evolução da concentração de lactato. a) Ensaio com diferentes GLC_0 (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A); b) Ensaio com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase de crescimento exponencial. 86

Figura 5.41. Influência da concentração de O_2 na velocidade específica de crescimento (μ_{Xmax}). Ensaio Ma-07 a Ma-10 (Quadro A1, Anexo A). 86

Figura 5.42. Influência da concentração de O ₂ no fator Y _{X/GLC} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	87
Figura 5.43. Influência da concentração de O ₂ no fator Y _{LAC/GLC} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	87
Figura 5.44. Influência de O ₂ no fator Y _{ALAC/GLC} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	88
Figura 5.45. Influência de O ₂ no fator Y _{X/GLN} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	88
Figura 5.46. Influência de O ₂ no fator Y _{NH4/GLN} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	89
Figura 5.47. Influência de O ₂ no fator Y _{NH4/GLN} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	89
Figura 5.48. Influência de O ₂ no fator Y _{ALA/GLN} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	90
Figura 5.49. Influência de O ₂ no fator Y _{GPV/X} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	90
Figura 5.50. Influência de O ₂ no fator Y _{GPV/GLC} . Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).	91
Figura 5.51. Influência da concentração inicial de GLC na velocidade específica de crescimento, (μ _{Xmax}). Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	92
Figura 5.52. Influência da concentração inicial de GLC no fator de conversão Y _{X/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-11,	92
Figura 5.53. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{LAC/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	93
Figura 5.54. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{ALA/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	93
Figura 5.55. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{X/GLN} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	94
Figura 5.56. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{NH4/X} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	94
Figura 5.57. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{NH4/GLN} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	95
Figura 5.58. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{ALA/GLN} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	95
Figura 5.59. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{GPV/X} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	96
Figura 5.60. Influência da concentração inicial de GLC no fator Y _{GPV/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).	96
Figura 5.61. Influência da concentração inicial de GLN na velocidade específica máxima de crescimento. (□ _{Xmax}). Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)	97
Figura 5.62. Influência da concentração inicial de GLN no fator de conversão Y _{X/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)	97
Figura 5.63. Influência da concentração inicial de GLN no fator Y _{LAC/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)	98
Figura 5.64. Influência da concentração inicial de GLN no fator Y _{ALAC/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)	98
Figura 5.65. Influência da concentração inicial de GLN no fator Y _{X/GLC} . Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).	99
Figura 5.66. Influência da concentração inicial de GLN no fator Y _{NH4/X} . Ensaios Ma-	99

10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).	
Figura 5.67. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{NH_4/GLN}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).	100
Figura 5.68. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{ALA/GLN}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).	101
Figura 5.69. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{GPV/X}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).	101
Figura 5.70. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{GPV/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).	102
Figura 5.71. Evolução da concentração de GLC (a) e GLN (b) durante os cultivos com diferentes concentrações iniciais de GLC (Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14). (Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final do crescimento.	102
Figura 5.72. Evolução das concentrações de GLC (a) e de GLN (b) nos ensaios com diferentes GLN_0 (Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). (Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final do crescimento.	104
Figura 5.73. Evolução da concentração de NH_4^+ em função da variação de: a) concentração inicial de GLC (Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-14); b) concentração inicial de GLN (Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). (Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final do crescimento.	104
Figura 5.74. Evolução da concentração de NH_4^+ e GLC (b) em função da variação da concentração inicial de GLC: a) $GLC_0 = 10$ g/L (Ensaio Ma-10); b) $GLC_0 = 1,0$ g/L (Ensaio Ma-11) (Quadro A.1, Anexo A).	105
Figura 5.75. Evolução da concentração de NH_4^+ e GLC em função da variação da concentração inicial de GLC: a) $GLC_0 = 5,0$ g/L (Ensaio Ma-12); b) $GLC_0 = 15,0$ g/L (Ensaio Ma-14) (Quadro A.1, Anexo A).	105
Figura 5.76 Evolução da concentração de ALA; a) Efeito de diferentes GLN_0 (Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16, Ma-17; Quadro A.1, Anexo A); b) Efeito de diferentes GLC_0 (Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-14; Quadro A.1, Anexo A).	106
Figura 5.77. Evolução da concentração de GLC e a viabilidade celular: a) $GLC_0 = 10,0$ g/L (Ensaio Ma-10, Quadro A.1, Anexo A); b) $GLC_0 = 5,0$ g/L (Ensaio Ma-1; Quadro A.1, Anexo A). Linha vertical, esgotamento de glicose.	107
Figura 5.78. Evolução da concentração de LAC e da viabilidade celular no ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 14$ g/L). Linha vertical, início de morte celular.	107
Figura 5.79. Evolução da concentração de GLN e da viabilidade celular no ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 14$ g/L). Linha vertical; início de morte celular	108
Figura 5.80. Evolução da concentração de NH_4^+ e da viabilidade celular no ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 14$ g/L). Linha vertical; início de morte celular.	108
Figura 5.81. Evolução da concentração de GLN e da viabilidade celular: a) Ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,5$ g/L); b) Ma-16 ($GLN_0 = 1,75$ g/L). Linha vertical, início de morte celular.	109
Figura 5.82. Evolução da concentração de GLC e da viabilidade celular no ensaio Ma-16 ($GLN_0 = 1,75$ g/L). Linha vertical, início de morte celular	109
Figura 5.83. Evolução da concentração de GLC e da viabilidade celular no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6$ g/L). Linha vertical, início de morte celular	110
Figura 5.84. Evolução da concentração de NH_4^+ e da viabilidade celular no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6$ g/L). Linha vertical, início de morte celular.	110
Figura 5.85. Evolução da concentração de LAC e da viabilidade celular no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6$ g/L). Linha vertical, início de morte celular. Linha vertical, início de morte celular	111
Figura 5.86. Evolução da concentração de GPV e do teor GPV_E no ensaio Ma-10	112

(GLC ₀ = 10,0 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	
Figura 5.87 Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-10 (GLC ₀ = 10,0 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	113
Figura 5.88. Evolução da concentração de GPV e GPVe no ensaio Ma-11 (GLC ₀ = 1,0 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	113
Figura 5.89. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-11 (GLC ₀ = 1,0 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	114
Figura 5.90. Evolução da concentração de GPV e GPVe no ensaio Ma-15 (GLN ₀ = 0,6 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	114
Figura 5.91. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-15 (GLN ₀ = 0,6 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	115
Figura 5.92. Evolução da concentração de GPV e GPV _E no ensaio Ma-17 (GLN ₀ = 7,0g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	115
Figura 5.93. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-17 (GLN ₀ = 7,0 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	116
Figura 5.94. Evolução da concentração de GPV e GPVe no ensaio Ma-07 (GLC ₀ = 10,0 g/L, GLN ₀ = 3,5 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	116
Figura 5.95. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-07 (GLC ₀ = 10,0 g/L, GLN ₀ = 3,5 g/L). Linhas verticais: t _{GPVmax} - linha tracejada; t _{GPVEmax} - linha contínua.	117
Figura 5.96. Diagrama de blocos da dinâmica do processo (subrotina FCN) com os IF lógicos para os diferentes blocos identificados no modelo	123
Figura 5.97 Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-07, célula S2AcGPV2, pO ₂ = 5% (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo, símbolos; dados experimentais).	124
Figura 5.98 Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, pO ₂ = 50% (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	124
Figura 5.99. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-09 célula S2AcGPV2, pO ₂ = 80% (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	125
Figura 5.100. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-10 célula S2AcGPV2, pO ₂ = 30% (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	125
Figura 5.101. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-11 célula S2AcGPV2, GLC ₀ = 1,0 g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	126
Figura 5.102. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-12, célula S2AcGPV2, GLC ₀ = 5,0 g/L. (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	126
Figura 5.103. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-15 célula S2AcGPV2, GLN ₀ = 0,6 g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	127
Figura 5.104. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-16, célula S2AcGPV2, GLN ₀ = 1,75 g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	127
Figura 5.105. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-07, célula S2AcGPV2, pO ₂ = 5% (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	133

Figura 5.106. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	133
Figura 5.107. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-09 célula S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	134
Figura 5.108. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-10 célula S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	134
Figura 5.109. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6 para o ensaio Ma-11 célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 1,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	135
Figura 5.110. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6 para o ensaio Ma-12, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 5,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	136
Figura 5.111. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-15 célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 0,6$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	136
Figura 5.112. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-16 célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 1,75$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	136
Figura 5.113. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-07, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	140
Figura 5.114. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	140
Figura 5.115. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-09, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	141
Figura 5.116. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-10, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo, símbolos, dados experimentais).	141
Figura 5.117. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-11, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 1,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	142
Figura 5.118. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-12, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 5,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).	142
Figura 5.119. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-16, célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 1,75$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experim	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Concentração de alanina
AlaTA	Alanina aminotransferase
Aprox.	Aproximadamente
ASP	Asparagina
AspTA	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAMPATH™	anticorpo monoclonal kappa IgG1
CD18 F	Fator do Crescimento do Tipo Insulina
CG	Complexo de Golgi
CHO	Células imortalizadas do ovário de hamster chinês
CYS	Cistina
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EMm	Enzima málica mitocondrial
EPO	Eritropoetina
Fc	Fator de correção para mudança de metabolismo
G3F	Gliceraldeído 3-fosfato
GDH	Glutamato desidrogenase
GLC	Concentração de glicose
GLN	Concentração de glutamina
GOGAT	Glutamina 2-oxoglutarato amido transferase
GPV	Glicoproteína G do vírus da raiva
GPV _E	Teor celular de GPV
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IGF-I	Hormônio do crescimento humano
IPL-41	Meio de cultura para células de inseto
k _{dALA}	Constante de decomposição de alanina
k _{dGPV}	Constante de decomposição de GPV
k _{GLC}	Constante de saturação da glicose no crescimento
k _{GLN}	Constante de saturação da glutamina no crescimento
k _{iNH4}	Constante de inibição do amônio no crescimento
k _{La} -	Coefficiente volumétrico de transferência de O ₂
k _m	Constante de morte
k _{mGLC}	Constante de inibição por glicose na morte celular
k _{mGLN}	Constante de inibição por glutamina na morte celular
k _{mNH4}	Constante de saturação do amônio no crescimento
k _{O2}	Constante de saturação do oxigênio no crescimento
k _{sinGLN}	Constante de síntese de glutamina
LAC	Concentração de lactato
m _s	constante de manutenção celular para glicose
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS	Solução-tampão de fosfato
pO ₂	Concentração de oxigênio dissolvido
PAG	Enzima glutaminase ativada por fosfato
PC	Piruvato carboxilase
PDH	Piruvato desidrogenase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PPP	Via das pentoses

PRO	Prolina
PYR	Piruvato
RER	Retículo endoplasmático rugoso
SER	Serina
Sf-9	Linhagem de células de <i>Spodoptera frugiperda</i>
S2	Linhagem de células de <i>Drosophila melanogaster</i>
S2AcGPV2	Linhagem de células de <i>Drosophila melanogaster</i> transfectada para a expressão da glicoproteína do vírus da raiva
TC100 AG	Meio TC100 suplementado
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Viab.	Viabilidade celular
W	Constante de inibição por oxigênio
Xd	Concentração de células mortas
Xv	Concentração de células viáveis
$Y_{ALA/GLC}$	Fator de conversão de glicose a alanina
$Y_{ALA/GLN}$	Fator de conversão de glutamina a alanina
$Y_{GLN/GLU}$	Fator de conversão de glutamina a glutamato
$Y_{GPV/GLC}$	Fator de conversão de glicose a GPV
Y_{NH4ALA}	Fator de alanina a amônio
$Y_{NH4/GLN}$	Fator de conversão de glutamina a amônio
$Y_{NH4/GLU}$	Fator de conversão de glutamato a amônio
$Y_{X/GLC}$	Fator de conversão de glicose a célula
$Y_{X/GLN}$	Fator de conversão de glutamina a células
$Y_{X/GLU}$	Fator de conversão de glutamato a células
α_{NH4}	Fator de conversão de amônio a células
α_{GPV}	Fator de conversão de GPV a células
β_{NH4}	Constante de proporcionalidade para síntese de alanina
$\mu_{X,max}$	Velocidade específica máxima de crescimento
Π_{GPV}	Produtividade em GPV

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>Expressão de proteínas heterólogas por micro-organismos e células animais</i>	5
3.2. <i>Metabolismo celular</i>	10
3.2.1 <i>Metabolismo de carboidratos</i>	11
3.2.2 <i>Metabolismo de aminoácidos</i>	14
3.2.3 <i>Formação de lactato</i>	18
3.2.4 <i>Formação de amônio</i>	20
3.3. <i>Cinética do crescimento, da morte celular e da formação de produtos em células animais</i>	21
3.3.1 <i>Influência de O₂ e pH</i>	24
3.3.2 <i>Morte celular</i>	25
3.3.3 <i>Formação de produtos</i>	27
3.4. <i>Biorreatores utilizados para o cultivo de células animais</i>	28
3.4.1 <i>Biorreatores Homogêneos</i>	30
3.4.2 <i>Biorreatores Heterogêneos</i>	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 <i>Células</i>	36
4.2 <i>Meios de cultura</i>	37
4.3 <i>Sistema de cultivo</i>	37
4.4 <i>Métodos analíticos</i>	38
4.5 <i>Estimativa inicial de parâmetros</i>	42
4.5.1 <i>Determinação preliminar da velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max}$), duração da fase lag (t_{lag}) e duração da fase exponencial (t_{exp})</i>	42
4.5.2 <i>Determinação do tempo transcorrido até o final do crescimento celular (t_{fim}) e do tempo transcorrido até início de morte celular (t_{morte})</i>	43

4.5.3 Determinação do tempo para que ocorra redução no teor de GPV por 10^7 células, $t_{\text{GPV_Emax}}$ ($\mu\text{g}/10^7\text{cel}$), e do tempo transcorrido até se atingir a concentração máxima de GPV, $t_{\text{GPV_max}}$, ($\mu\text{g/mL}$).....	43
4.5.4 Determinação preliminar dos fatores de conversão/formação, Y.....	44
4.6 Métodos numéricos.....	44
4.6.1 Função objetivo (FO).....	45
4.6.2 Avaliação do ajuste.....	45
5 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Modelos preliminares	50
5.1.1 Modelo 1. Hipóteses consideradas na modelagem.....	53
5.1.2 Modelo 2. Influência do Oxigênio sobre o crescimento.	61
5.1.3 Modelo 3. Influência do Oxigênio sobre o crescimento.....	64
5.2 Modelos que incorporam a influência do oxigênio dissolvido no metabolismo via fatores de conversão	66
5.2.1 Modelo 4. Influência do Oxigênio sobre o crescimento e metabolismo.....	67
5.2.2 Modelo 5. Consumo de glutamato.....	74
5.3 Modelos que incorporam a mudança de metabolismo em função das condições do cultivo (GLC, GLN e pO_2) via fatores de conversão.....	81
5.3.1. Análise de Fenômenos (Ensaio Ma-07 a Ma-17).....	81
5.3.2 Modelo 6. Inclusão de fatores para incorporar a influência de pO_2 , GLC e GLN.....	117
5.3.3 Modelo 6a Ajuste do modelo para a etapa inicial de crescimento (Bloco 1).....	122
5.3.4 Modelo 6b. Ajuste do modelo em todas as fases do processo (Bloco 1, Bloco 2, Bloco 3 e Bloco 4).....	132
5.3.5 Modelo 6c. Ajuste do modelo 6 em todas as fases do processo (Bloco 1, Bloco 2, Bloco 3 e Bloco 4), sem o ensaio Ma-15.....	138
6 CONCLUSÕES.....	148
REFERÊNCIAS.....	152
ANEXO A - TABELAS DE MEIOS E ENSAIOS.....	166
ANEXO B – PROGRAMA DESENVOLVIDO.....	171

1 INTRODUÇÃO

A expressão de genes em células animais permite a produção de proteínas em grande escala e com características qualitativas aceitáveis tanto para estudos de estrutura/função destas proteínas, como também com finalidades imunológicas e funcionais. Esse desenvolvimento tem gerado grandes avanços na biologia molecular e na medicina preventiva. Um dos aspectos desse desenvolvimento relaciona-se com a capacidade imunizante dessas proteínas e, conseqüentemente, o seu uso na preparação de vacinas. A incorporação da técnica do DNA recombinante constitui uma etapa inovadora na produção de vacinas e leva à eliminação de riscos de contaminação por resíduos virais e reações indesejáveis, além de permitir o aumento da imunogenicidade com menores custos de produção.

Entre as células animais que têm sido usadas para este fim, encontram-se as células de mamíferos, que embora tenham capacidade de incorporar, manter, expressar constitutivamente e processar convenientemente genes heterólogos, exigem condições de cultura delicadas e dispendiosas, em laboratório e em escala de produção. Células de insetos, como as células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), têm sido utilizadas principalmente por permitirem custos de produção menores, sistemas de cultivo mais simples e com maior capacidade de expressão, e, ainda, alta produtividade de proteínas recombinantes (CHA *et al.*, 2005). Contudo essas células apresentam alguns inconvenientes, como por exemplo, a alta sensibilidade das células ao cisalhamento e limitação nos perfis de glicosilação, quando se tem como referência o comportamento das células de mamíferos. Além disso, a expressão de proteína por células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) têm utilizado genes heterólogos de báculo vírus que apresentam o inconveniente de se constituir num sistema de expressão gênica transiente e não permanente e o fato de o pico de expressão ocorrer quando as células já entraram em estágio de morte ocasionado pela infecção viral. A expressão genética estável de proteínas heterólogas em células de dípteros (GALESI, 2007), células embrionárias de dípteros como a linhagem *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2), vêm sendo utilizadas para a produção de proteínas recombinantes como anticorpos (KIRKPATRICK *et al.*, 1995), enzimas (GIBSON *et al.*, 1993; BANKS, *et al.*, 2003) , inibidores tumorais (VALLE *et al.*, 2001; JEON *et al.*, 2003), fatores de crescimento (LEE *et al.*, 2000;) e antígenos virais (DEML *et al.*, 1999a, DEML *et al.*, 1999b, BACHMANN *et al.*, 2004).

Neste estudo utilizaram-se células de dípteros (*Drosophila melanogaster*), células S2, nas quais um sistema de expressão foi estabelecido com sucesso (YOKOMIZO *et al.*, 2007) para a expressão da glicoproteína de membrana do vírus rábico (GPV).

A GPV é o constituinte do vírus da raiva responsável pela resposta imune protetora durante vacinação de animais e humanos. As vacinas contra raiva atualmente em produção e uso são constituídas por partículas virais inativadas ou atenuadas e são produzidas por infecção viral de células de mamíferos.

Além da aplicação da GPV recombinante produzida como vacina, a sua expressão em células S2 também poderá ter uma importante aplicação na produção de componente de kits diagnósticos.

Potencialmente este sistema de expressão de GPV associa as vantagens observadas em células de mamíferos (expressão constitutiva/indutiva) com as vantagens observadas em células de insetos (facilidade de cultivo e baixo custo), sendo assim altamente desejável, sobretudo quando se visa à produção de um imunobiológico como a glicoproteína G do vírus da raiva (GPV).

Em geral, afirma-se que para produtos de alto valor agregado, como no caso de produtos originados de culturas de células de mamíferos, os custos operacionais do processo são uma parte relativamente pequena dos custos finais do produto devido às necessidades de investimento em pesquisa, desenvolvimento e aprovação do produto. Também em decorrência de características de mercado como a essencialidade do produto e do pequeno número de produtores e os preços praticados, avalia-se que qualquer processo de obtenção seja viável. Somente quando o produto perde essas características, vale dizer, quando a ênfase não é mais a velocidade da oferta do produto ao mercado, é que a forma de operar o processo de obtenção passa a ser vista como fator destacado para assegurar a viabilidade comercial do produto (ROYCE, 1993).

O caso em estudo, embora seja uma alternativa inovadora para a produção de vacina, não é um produto de alto valor agregado, tal como certas proteínas terapêuticas (citocinas, enzimas, fatores de crescimento e antitumorais, por exemplo). Assim, a viabilidade do processo depende de sua eficiente condução.

A modelagem matemática caracteriza-se por organizar as informações experimentais, prever diferentes situações reais através de simulações, diminuindo o número de ensaios experimentais e constitui a base para otimização do processo.

Quando se examina a evolução dos reatores químicos nos anos 50 e 60, especialmente o aumento da sua capacidade de produção de forma segura, destaca-se (FROMENT; BICHOFF, 1979) o papel importante desempenhado pela modelagem matemática no desenvolvimento desses equipamentos.

A otimização matemática de um equipamento ou processo só é possível quando existe modelo matemático validado e, ainda, uma função objetivo pertinente que define um critério de desempenho desejável para o processo. A determinação da trajetória ótima, resultado imediato da otimização em sistemas operando em modo descontínuo alimentado, ou do ponto ótimo de operação, em sistemas operando em modo contínuo, permite não só obter maiores produtividades de célula e/ou do produto, como assegurar a qualidade do produto, imprescindível nestes processos. Permite também a sua repetibilidade, além de fornecer todas as informações necessárias para o controle do processo.

Contudo a modelagem matemática e o controle de processos biotecnológicos esbarram em três características específicas desses sistemas: a falta de medidas, especialmente as medidas em linhas, a variabilidade (não-reprodutibilidade) de dados e a complexidade cinética dos processos.

Em resumo, a modelagem matemática do processo representa um esforço para identificar, sistematizar e quantificar os principais fenômenos que afetam o crescimento celular e a síntese do produto de interesse e, dessa maneira, racionalizar o processo e otimizar a sua produção, contribuindo para alcançar a sua viabilidade técnico-econômica.

Este estudo faz parte do projeto financiado pela FAPESP “Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: biologia molecular e engenharia de processos” que tem como objetivo geral a proposição de um bioprocessos para produção da GPV com células de inseto S2 geneticamente modificadas. Este trabalho insere-se em um subgrupo de trabalho que desenvolveu dois projetos: o estudo cinético de células de *Drosophila melanogaster* transfectadas para a produção da glicoproteína da raiva em biorreatores (AGUIAR, 2010) e este estudo, modelagem matemática desse processo, a partir dos dados obtidos no primeiro projeto que foi planejado e desenvolvido para essa finalidade.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é realizar a modelagem matemática do crescimento de células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2, células S2, transfectadas com o gene da glicoproteína do vírus da raiva, GPV, e estabelecer a dinâmica de crescimento e de formação dessa glicoproteína. Esta modelagem consiste na proposição de um modelo matemático fenomenológico constituído por um conjunto de equações diferenciais que descreva os principais fenômenos do processo e que permita prever a evolução dos principais componentes do sistema de cultivo (células, substratos e produtos) ao longo do tempo.

Neste trabalho são consideradas as seguintes variáveis de estado para descrever a dinâmica do processo:

Xv	concentração de células viáveis (1,0E+07 células/mL).
Xd	concentração de células não viáveis (1,0E+07 células /mL).
ALA	concentração de alanina (g/L).
GLC	concentração de glicose (g/L).
GLN	concentração de glutamina (g/L).
GLU	concentração de glutamato (g/L).
NH ₄ ⁺	concentração de amônio (g/L)
GPV	concentração da glicoproteína (µg/mL)

Ao longo do trabalho foram avaliados os resultados dos ajustes do modelo aos dados experimentais e, em função da qualidade dos ajustes obtidos, foram realizadas novas hipóteses de trabalho para modificar o modelo proposto até se alcançar um modelo validado estatisticamente aos dados experimentais. Os dados utilizados foram obtidos por pesquisadores do projeto temático apoiado pela FAPESP, “Expressão de genes heterólogos em células de dípteros: biologia molecular e engenharia de processos” e estão indicados no Quadro 1 do Anexo A.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Expressão de proteínas heterólogas por micro-organismos e células animais.*

A expressão de proteínas heterólogas por micro-organismos e células animais utilizando recombinação genética é um ponto fundamental no atual desenvolvimento da biotecnologia. Essa expressão permite a produção de proteínas bioativas a partir de meios relativamente baratos ao invés de utilizar extrações custosas, com uso intensivo de mão de obra e que resultam em produtos de qualidade variável. A seleção de um sistema de expressão recombinante ótimo é fundamental para definir um processo de produção de proteínas eficaz e viável. Um sistema de expressão ótimo depende, portanto, da sua produtividade, da bioatividade da proteína obtida, do uso previsto para a proteína e das suas características físico-químicas, juntamente com o custo, conveniência e segurança do próprio sistema de expressão. As células hospedeiras utilizadas para a expressão de genes heterólogos tanto podem ser procarióticas ou eucarióticas, sendo que ambas têm vantagens e desvantagens inerentes. Algumas recentes revisões de literatura publicadas por Demain e Vaishnav (2009), Yin *et al.* (2007), Ikonomou, Schneider e Agathos (2003), bem como os trabalhos de Mirzaei *et al.* (2009), Shishido *et al.* (2009), Liu *et al.* (2008), Cha *et al.* (2005) ajudam a formar um painel dos sistemas em uso, suas potencialidades e limitações e que estão sistematizados na Tabela 3.1.

Até o momento, *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizada para expressão de proteínas heterólogas devido à suas altas velocidades de crescimento e por apresentar custo relativamente baixo de produção. Como sistema de expressão procariótico, *E. coli*, não pode realizar as modificações pós-traducionais (por exemplo, glicosilação, acilação de ácidos graxos, fosforilação e formação de ligações dissulfídicas) que muitas vezes são necessárias para o enovelamento adequado das proteínas e pelas suas características funcionais de interesse. Obviamente, essas alterações podem afetar a bioatividade da proteína. A utilização da lise celular para liberação dessas proteínas citoplasmáticas pode resultar na liberação de ácidos nucleicos, endotoxinas ou lipopolissacarídeos que podem denaturar a proteína e limitar as aplicações médicas ou biológicas dos produtos expressos. As proteínas heterólogas obtidas em *E. coli* são amplamente utilizadas para fins laboratoriais e preparativos devido ao seu baixo custo e conveniência. Muitas proteínas podem ser produzidas rotineiramente e secretadas no meio, atingindo concentrações de gramas por litros. Alguns dos exemplos mais

destacados de alta expressão de proteínas secretadas incluem fatores de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), a produção do anti-CD18 e a síntese de fosfatase alcalina (YIN *et al.*, 2007).

Saccharomyces cerevisiae tem sido modificada para expressar diferentes genes heterólogos nos últimos 25 anos (HITZEMAN *et al.*, 1981). Por ser uma alternativa econômica e segura, *S. cerevisiae* tem sido utilizado para produzir medicamentos como a vacina contra hepatite B e pode ser uma alternativa para a produção de vacina para hantavírus (ANTONIUKAS *et al.*, 2006). Além das vantagens de simplicidade do cultivo, rápido crescimento e de baixo custo, que são semelhantes aos de *E. coli*, o sistema permite que algumas proteínas sintetizadas intracelularmente sejam secretadas para o meio extracelular. Como um eucarioto unicelular, leveduras podem produzir proteínas recombinantes solúveis, enoveladas e submetidas a modificações pós-traducionais essenciais às suas funções terapêuticas.

O uso de células de inseto para produção de proteínas iniciou-se nos anos 80 do século passado para a produção de inseticidas virais, produto que oferecia o atrativo de ser ambientalmente amigável e seguro. Desde então, o uso dessas células vem aumentando como decorrência do desenvolvimento de vetores de báculo vírus e linhagens de células de inseto com a capacidade de expressar altos níveis de proteínas heterólogas que, quando produzidas nessas células, sofrem modificações pós-transducionais e enovelamento apropriados para o seu uso como imunobiológicos. Muitos genes heterólogos podem ser eficientemente expressos por esses sistemas de expressão (BEVS-*Baculovirus expression vector system*) mediante infecção dos insetos ou de linhagens de células insetos (HUYNH e ZIELER, 1999, ZENG *et al.*, 1996). Uma das características mais atraentes do sistema células de inseto é a maior facilidade para ampliação de escala, por ser um sistema que utiliza células em suspensão. É um sistema que oferece segurança, pois os vetores de clonagem são preparados a partir do báculo vírus que não infectam vertebrados ou plantas. O sistema não é limitado pela dimensão da proteína, podendo expressar proteínas de qualquer tamanho e, ainda, permite a expressão simultânea de múltiplos genes. Este sistema, no entanto, tem algumas deficiências. Por exemplo, a lise celular não permite que o gene heterólogo seja expresso de forma contínua. Cada ciclo de síntese das proteínas de interesse exige a infecção de novas células de inseto. Assim, este sistema é inferior ao sistema com procarióticos e de levedura, em termos de sua capacidade contínua de produção. Além disso, células de inseto diferem das células de mamíferos nos padrões de glicosilação, por exemplo, nos comprimentos de oligossacarídeos

formados e no teor de manose de modo que a bioatividade e imunogenicidade dos produtos de expressão com inseto são um pouco diferentes do produto natural. Essas limitações têm sido superadas pelo estabelecimento de linhagens celulares que expressam constitutivamente genes de mamíferos. Essa abordagem tem levado a células de inseto transgênicas com crescimento normal que podem produzir glicoproteínas recombinantes humanizadas. As principais linhagens de células de inseto disponíveis para cultivo industrial são as derivadas de *Spodopera frugiperda*, conhecidas como Sf9 e Sf21, células-ovo da lagarta *Trichoplusia nii*, conhecidas como células Hight Five™ (BTI -Tn-BI-4) e células derivadas de *Drosophila melanogaster* D-S2 ou S2 (CASTRO *et al.*, 1999; MONTOR e SOGAYAR, 2003; LÉO *et al.*, 2008). Células de inseto derivadas de *Drosophila melanogaster*, células Schneider S2, têm sido utilizadas como sistema de expressão de um plasmídeo de transfecção. Neste sistema de expressão não-lítica do plasmídeo, um alto número de cópias de vetores plasmídicos recombinantes são inseridos no genoma da célula hospedeira com a vantagem de que as proteínas heterólogas são estavelmente expressas sem destruição das células produtoras da proteína. Dessa forma, estes sistemas são considerados como excelente ferramenta para a produção glicoproteínas recombinantes.

Sistemas de expressão com células de mamíferos têm várias vantagens sobre os outros sistemas apresentados anteriormente tanto na síntese como no processamento e na secreção de proteínas glicosiladas, especialmente de proteínas eucarióticas. Culturas celulares de células de mamíferos para produção de proteínas recombinantes são particularmente úteis, pois as proteínas frequentemente apresentam enovelamento e glicosilação adequados, eliminando a necessidade de sua renaturação. Essas células eucarióticas também são úteis para a adição de cadeias de ácidos graxos e fosforilação da tirosina, treonina e de grupos hidroxil da serina. A utilização de cultura de células de mamíferos, principalmente de células imortalizadas do ovário de hamster chinês (CHO), ganhou grande impulso a partir do desenvolvimento para a produção de eritropoetina (EPO) e do ativador plasminogênico de tecidos tissular (tPA), na década de 1980, uma vez que essas proteínas altamente glicosiladas não poderiam ser produzidas em sistemas microbianos. As células CHO constituem o sistema de expressão preferido para a produção de proteínas recombinantes. Em 1997, as vendas de bioterapêuticos produzidos por células de mamíferos atingiram 3,25 bilhões de dólares, enquanto que a produção de bioterapêuticos por *E. coli* atingiu a 2,85 bilhões (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Em 2006, a produção de proteínas terapêuticas obtidas com sistemas de células de mamíferos chegou a 20 bilhões de dólares e espera-se uma expansão dessa produção em

função do interesse por anticorpos terapêuticos e vacinas virais produzidas por células de mamíferos (GRIFFIN *et al.*, 2007). Os sistemas de células de mamíferos apresentam, contudo, alguns inconvenientes. Eles apresentam baixa expressão e os processos de produção são caros. Embora com custos relativamente elevados do sistema, tecnologia mais complexa e a possibilidade de contaminação por vírus animais, aspectos que tendem a limitar a sua utilização em larga escala de produção, o sistema de expressão com células de mamíferos é frequentemente utilizado para expressar muitas proteínas heterólogas incluindo proteínas de estruturas virais e peptídeos bioativos para análises funcionais específicas. A Tabela 3.1 sistematiza as principais características dos sistemas apresentados.

A proteína a ser produzida pelo sistema de expressão adotado neste trabalho é a glicoproteína do vírus rábico (GPV). Ela é uma glicoproteína trimérica (3x65 kDa) de membrana que forma espículas. A proteína é composta por 505 aminoácidos, contendo 2 segmentos hidrofóbicos típicos de sua natureza transmembranária. Sua sequência de aminoácidos indica que ela tem três pontos aceptores de oligossacarídeos (N-glicosilação) dos quais apenas um ou dois são efetivamente glicosilados (GAUDIN, 1997). A Figura 3.1 ilustra o vírion da raiva e o posicionamento da glicoproteína na sua estrutura. No vírion são encontradas 1200 moléculas de GPV formando 400 espículas que se projetam na superfície do capsídeo viral e são responsáveis pela ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira.

Em células de *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) contendo o gene de GPV, a proteína projeta-se na superfície das células na mesma conformação que no envelope viral. A síntese da GPV pela célula hospedeira começa pela tradução ribossomal, associada ao retículo endoplasmático rugoso (RER), sendo movida pelo retículo até o Complexo de Golgi (CG) e nesse processo ocorre a formação de trímeros e a glicosilação inicial da proteína. A GPV é transportada para o Complexo de Golgi (CG) através de vesículas transportadoras, onde ocorre a hidrólise parcial da fração glicídica da proteína e a adição de novos açúcares, processo denominado glicosilação terminal e que é responsável por parte da especificidade da proteína, pelo destino da GPV e conclui a moldagem da proteína tornando-a estruturalmente e funcionalmente completa. A GPV sofre também uma acetilação durante seu transporte para o CG e é palmitoilada em uma cisteína situada ao lado do carbono terminal da sua região de transmembranaral (GAUDIN *et al.*, 1992).

Tabela 3.1 Caracterização de sistemas de expressão em uso.

Sistema	Crescimento	Custo de produção	Nível expressão	Funcionalidade das proteínas	Disponibilidade dos sistemas de expressão	Pirogênio	Excreção	Modificações pós-tradução					
								N-glicosilação	O-glicosilação	Fosforilação	Acetilação	Acilação	γ -carboxilação
<i>E. coli</i>	Rápido t _g =30 min	Baixo	Alto	Pobre	Muito boa	Possível	Pobre	Nenhuma	Não	Não	Não	Não	Não
Levedura	Rápido t _g =90 min	Baixo	Alto	Boa	Boa	Não	Muito boa	Alta em manose	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Cél. de inseto	Lento t _g =18 - 24 h	Alto	Muito Alto	Muito boa	Razoável	Não	Muito boa	Simples, sem ácido siálico	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Cél. de mamífero	Lento t _g =24 h	Alto	Muito Baixo	Muito boa	Razoável	Não	Excelente	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

FONTE: baseado em Yin *et al.* (2009) e Cha *et al.* (2005)

Figura 3.1. Representação do vírion da raiva e do posicionamento da glicoproteína na sua estrutura. FONTE: Hammons e Narciso (2005)

3.2 Metabolismo celular

Inicialmente, deve-se destacar que existem poucos estudos específicos sobre o metabolismo de células de *Drosophila melanogaster* sejam elas selvagens ou recombinantes, células S2 ou rS2. Geralmente, os estudos de metabolismo de células de inseto focam mais especificamente células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) e *Trichoplusia ni* (Tn) (FERRANCE; GOEL; ATAAI, 1993; DREWS; PAALME; VILU, 1995; ÖHMAN; LJUNGGREN; HAGGSTROM, 1995; RHIEL; MITCHELLLOGEAN; MURHAMMER, 1997; DOVERSKOG *et al.*, 1997; DOVERSKOG; HAN; HÄGGSTRÖM, 1998; DREWS *et al.*, 2000; DOVERSKOG *et al.*, 2000; BENSLIMANE *et al.*, 2005; BERNAL *et al.*, 2009).

Resultados típicos do metabolismo celular de células recombinantes de *Drosophila melanogaster* expressando a glicoproteína do vírus da raiva (GPV), células rS2, (SWIECH, 2007; GALESI *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2008) indicam que essas células, assim como a maioria das células animais, utiliza glicose (GLC) e glutamina (GLN) como principais fontes de carbono e nitrogênio para suprir as necessidades nutricionais de seu catabolismo e anabolismo celular. Contudo, os estudos indicam um padrão de formação de metabólitos distinto do comumente observado para células Sf9, *Trichoplusia ni* (Tn) e células de mamíferos (BOVO *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2008; GALESI *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2008, 2009a, b) e sugerem para as células S2 um padrão intermediário entre as células de inseto como Sf9 e as células de mamíferos (ÖHMAN; LJUNGGREN; HÄGGSTRÖM, 1995; DOVERSKOG; LJUNGGREN; ÖHMAN, 1997; DREWS *et al.*, 2000; BENSLIMANE *et al.*, 2005; AMABLE; BUTLER, 2008). Células Sf9 cultivadas em excesso de GLC, GLN e oxigênio dissolvido não acumulam lactato ou amônio (ÖHMAN; LJUNGGREN;

HÄGGSTRÖM, 1995; DOVERSKOG; LJUNGGREN; ÖHMAN, 1997; DREWS *et al.*, 2000). Contudo, algumas linhagens de células Tn, especialmente a Tn-5 (*High 5*), apresentam um padrão metabólico muito similar ao de células de mamíferos, caracterizado pelo acúmulo de lactato e NH_4^+ em altos níveis (RHIEL; MITCHELL-LOGEAN; MURHAMMER, 1997; BENSLIMANE *et al.*, 2005; SUGIURA; AMANN, 1996). É precisamente devido a esse padrão distinto de formação de lactato e amônio que é possível caracterizar o comportamento de linhagens celulares S2 e rS2 como intermediárias entre células de mamíferos e células de inseto Sf9.

3.2.1. Metabolismo de carboidratos

Em células S2, assim como nas células de mamíferos, a glicose é a principal fonte de carbono e a principal fonte de energia. O seu catabolismo ocorre pela via glicolítica e pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Ambas as rotas catabólicas fornecem também precursores e produtos intermediários para as reações de biossíntese. Duas outras vias metabólicas importantes para a geração de produtos intermediários para a biossíntese são a via das pentoses (PPP) e a glutaminólise.

Assim como em outras linhagens de células animais, glicose é normalmente consumida até sua exaustão, representando o principal substrato no cultivo de células S2. A glicose fornece energia e esqueleto carbônico para a obtenção de componentes celulares e a falta desse substrato geralmente resulta em limitação no crescimento celular (BOVO *et al.*, 2008; GALESI *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2008). O esgotamento de glicose também tem sido relatado como causa de perda de viabilidade celular (BOVO *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009a).

Em estudos publicados utilizando células S2, GLC é somente esgotada ao final da fase estacionária quando outros componentes do meio podem estar limitando o crescimento celular. Em culturas de S2 e Sf9 em meio IPL-41 suplementado, observa-se esgotamento de GLC somente para células S2 (BATISTA *et al.*, 2009a, b). Esse resultado sugere um fluxo mais intenso de GLC pela via glicolítica em linhagens celulares de dípteros em comparação com linhagens de lepidópteros.

Exceto em estudos com meio de cultura TC-100 (BOVO *et al.*, 2008), no qual a concentração inicial de GLC é baixa (aproximadamente, 1.0 g/ L), todos os outros meios utilizados em cultura de células de inseto e indicados na Quadro A.1, Anexo A, mostram condição de

excesso de GLC que resulta em altas velocidades específicas de crescimento (VALLE *et al.*, 2001; SWIECH *et al.*, 2007; GALESI *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2008, 2009a).

Estudos com células Sf9 mostram que os carboidratos também são a principal fonte de carbono, sendo assimilados pelas células por transporte facilitado e metabolizados principalmente pela via glicolítica (BHATIA *et al.*, 1997). Usando substratos marcados e técnicas analíticas precisas (Nuclear Magnetic Ressonance), Drews *et al.* (2000) esclareceram a alta flexibilidade metabólica encontrada em células Sf9. Resumidamente, o piruvato gerado na glicólise pode desempenhar varias funções participando em várias reações: a) pode ser um agente de ligação entre a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), participando, dessa forma, do catabolismo celular; b) pode ser componente intermediário na síntese de alguns aminoácidos, incluindo a glutamina que, sob condições especiais, pode ser formada e liberada no meio de cultura; c) pode ser um acceptor de NH_4^+ , formando alanina (ALA), num processo de detoxificação, e, ainda; d) pode ser um acceptor de elétrons em etapas anaeróbias, para re-oxidar o excesso da coenzima NADH produzida na glicólise e não transportada à mitocôndria por meio do NADH *shunt*. Essa função leva à produção de glicerol, etanol ou lactato. As principais vias metabólicas apontadas e sua interligação estão indicadas na Figura 3.2.

Drews *et al.* (2000) mostram que, em havendo limitação por glicose, a glutamina é utilizada como fonte de carbono em células Sf9. Destaque-se, ainda, que a produção de alanina é também uma forma de se fazer a interligação entre a via glicolítica e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, pois como já afirmado, o piruvato, resultante da transformação da glicose, pode tanto ser dirigido ao ciclo TCA, como reagir com glutamato para formar alanina, via a reação catalisada pela alanina transaminase (ALTAMIRANO *et al.*, 2007).

Na ausência de glicose, a alanina pode se transformar em piruvato e glutamato (reação reversa) (BÉDARD *et al.*, 1993).

Oxigênio molecular (O_2) é essencial no metabolismo aeróbico das células, sendo utilizado como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Em condições de limitação de O_2 , a co-enzima NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida) produzida durante a oxidação dos substratos não pode ser regenerada, assim, as células utilizam outras formas para re-equilibrar o seu potencial redox, regenerando, por

exemplo, NADH do citosol, pela conversão de piruvato a lactato (Figura 3.2, enzima 2). Com excesso de substrato, as células animais demonstram certa incapacidade de regular o consumo de substratos, ativando vias metabólicas energeticamente menos eficientes e, ainda, liberando sub-produtos (lactato e NH_4^+) que são potencialmente tóxicos ao crescimento celular (AMABLE; BUTLER, 2008).

Figura 3.2. Esquema simplificado das principais vias metabólicas identificadas em células de inseto. Os principais substratos com molduras em preto; principais subprodutos em azul; intermediários do anabolismo em vermelho (as setas indicam que os produtos são encaminhados a outras vias metabólicas); moldura em verde (a) indica vias metabólicas preferenciais quando há excesso de glicose; e moldura roxo (b) indica vias metabólicas preferenciais com limitação de glicose. As enzimas mais relevantes estão indicadas: 1– DHAP desidrogenase, 2– Lactatodesidrogenase, 3– Piruvato decarboxilase e etanol desidrogenase, 4– Glutamato-piruvato transaminase, 5– Glutamato sintase (NADH-GOGAT), 6– Glutamina sintetase, 7– Glutaminase, 8– Glutamato desidrogenase. FONTE: baseada em Drews *et al.* (2000) e Ikonou, Schneider e Agathos (2003).

Como já mencionado, células Tn-5 apresentam um metabolismo similar ao de linhagens de células de mamíferos, caracterizado por alto nível de produção de LAC, como resposta da cultura às condições de excesso de GLC (RHIEL; MITCHELL-LOGEAN; MURHAMMER, 1997; BENSLIMANE *et al.*, 2005; SUGIURA; AMANN, 1996). Belimane *et al.* (2005)

também notaram uma maior proporção do fluxo de GLC a CO₂ pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (2,7%) para células Sf9, em comparação com a proporção encontrada para esse ciclo nas células Tn-5 células (0.6%), o que pode explicar a maior produção de LAC em células Tn. Em relação à proporção do fluxo de GLC pela via das pentoses (PPP), os mesmos autores mostraram que células Sf9 têm uma partição inferior do fluxo de carbono por essa via (14%), quando se compara com o fluxo da mesma via em células Tn (16%).

Amable e Butler (2008) reviram o metabolismo de células de mamíferos. Segundo esses autores, GLC é transportada às células com ajuda de uma proteína localizada na membrana celular, num processo classificado como transporte facilitado, saturável, bi-direcional e proporcional ao gradiente de concentração. Na glicólise, a enzima hexoquinase catalisa a fosforilação da GLC a glucose-6P, assegurando baixas concentrações de GLC no citoplasma e, consequentemente, permitindo um gradiente máximo e transporte de GLC do meio ambiente para as células.

O fator de rendimento energético obtido no consumo de glicose depende da via metabólica envolvida: a glicólise gera 2 moles de ATP (adenosina trifosfato) por mol de GLC, e no TCA mais de 25 moles de ATP por mol de GLC metabolizada. Já foi indicado como a glicose pode seguir várias vias metabólicas distintas e constata-se que em células de mamíferos a via PPP, que é mediada pela molécula de glucose-6P, é menos ativa que em células de inseto (BENSLIMANE *et al.*, 2005).

Em relação à utilização de outros açúcares por células S2, de forma similar à observada para células Sf9 (SWIECH *et al.*, 2008b, IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003; BEDARD; TOM; KAMEN, 1993), o consumo de GLC é preferencial em relação a outros açúcares, tais como maltose, sacarose e lactose (BATISTA *et al.*, 2009a). Bedard, Tom e Kamen (1993) indicam que o consumo de outros açúcares inicia-se após a concentração de GLC ter atingido valores baixos (inferiores a 2 g/L).

3.2.2. Metabolismo de aminoácidos

Considera-se que os aminoácidos participam na síntese de proteínas ou que são degradados para prover esqueletos carbônicos às reações catabólicas e anabólicas.

A glutamina é o mais importante substrato do catabolismo e anabolismo de células S2, assim como também o é para células de mamíferos. Estudos com o meio Sf-900 II indicam que a falta de GLN limita o crescimento cuja manifestação é caracterizada pela diminuição da duração da fase exponencial de crescimento (BOVO *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2008b) e do final da fase de crescimento (SWIECH *et al.*, 2008b). No entanto, estudos empregando outros meios de cultura (TC-100 suplementado e IPL-41 suplementado) (GALESI *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009) indicam resultados diferentes, reforçando a idéia de alta flexibilidade metabólica das células S2. O papel da GLN nas várias vias metabólicas e os fatores de rendimento observados dependem da linhagem celular empregada.

Em células de mamíferos, GLN é inicialmente convertida na mitocôndria em GLU e NH_4^+ pela via da glutaminólise (Figura 3.2, enzima 7) (AMABLE; BUTLER, 2008; PALOMARES; LOPEZ; RAMIREZ, 2004). O glutamato produzido pode ser metabolizado de duas maneiras e com diferentes rendimentos de ATP: a) via glutamato desidrogenase (Figura 3.2, enzima 8), formando uma molécula de NH_4^+ e uma molécula de α -cetoglutarato (α -KG), alimentando o ciclo TCA para prover compostos intermediários da biossíntese e para geração de energia na cadeia respiratória (até 27 mols de ATP por mol de GLN) e; b) via aminotransferases, pela qual o GLU transfere NH_4^+ estequiometricamente ao oxaloacetato, produzindo aspartato, ou ao piruvato, gerando ALA (Figura 3.2, enzima 4). Neste último caso, a reação leva à formação de 9 moles de ATP por mol de GLN. Em excesso de GLN, observa-se um consumo desregulado de GLN, caracterizado por elevadas velocidades específicas de crescimento e formação simultânea de ALA e NH_4^+ indicando através das duas vias (DREWS *et al.*, 2000; BENSLIMANE *et al.*, 2005; BERNAL *et al.*, 2009; AMABLE; BUTLER, 2008; ELIAS *et al.*, 2003; MENDONÇA; PALOMARES; RAMIREZ, 1999).

O metabolismo de GLN, e a consequente formação de NH_4^+ em células de inseto, mostra um padrão distinto em diferentes células, algumas vezes similar e outras vezes bastante diferente do observado em células de mamíferos. Em excesso de GLN e O_2 , células de inseto Sf9 não formam NH_4^+ (ÖHMAN; LJUNGGREN; HAGGSTROM, 1995; DOVERSKOG *et al.*, 1997; DREWS *et al.*, 2000). Por outro lado, sob as mesmas condições de cultivo, células Tn-5 caracterizam-se pela produção em altos níveis de NH_4^+ , produção esta comparável à observada em células de mamíferos (RHIEL; CHELLLOGEAN; MURHAMMER, 1997; BENSLIMANE *et al.*, 2005; SUGIURA; AMANN, 1996).

Estudos conduzidos por Haggstrom (2000) esclareceram grande parte do metabolismo de células de inseto (DREWS *et al.*, 2000; DOVERSKOG *et al.*, 2000). Esses estudos identificaram em células de lepidópteros (Sf9 entre elas), a presença da enzima NADH-dependente glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase, GOGAT, também conhecida como NADH-dependente glutamato sintetase (indicada na Figura 3.2, bloco “a”, enzima 5). Essa via permite a transferência de grupos amino da GLN para α -KG, formando GLU, sem liberação de NH_4^+ .

Pela recombinação de GLU e PYR, ALA e α -KG (Figura 3.2, enzima 4) são produzidos. Assim, α -KG entra no ciclo TCA e a detoxificação ocorre simultaneamente visto que não há liberação de NH_4^+ . A atividade da enzima GOGAT explica o metabolismo das células Sf9 e a sua capacidade de crescer na ausência de GLN ou GLU (ÖHMAN *et al.*, 1996), a não formação de NH_4^+ e a liberação de grandes quantidades de ALA sob condições de excesso de GLN ou GLU. Doverskog *et al.* (2000) identificaram também a presença de GDH (enzima 8 na Figuras 3.2) e glutaminase (enzima 7, na Figuras 3.2) em células Sf9. Contudo, o fluxo de GLN via glutaminase e GDH foi muito menor que o fluxo via a enzima GOGAT (11% e 55%, respectivamente). Cabe ainda destacar que a dependência da enzima GOGAT da coenzima NADH, ao invés de coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), o que sugere estar essa enzima está mais relacionada com o metabolismo de produção de energia do que com o de biossíntese.

Outra diferença importante entre células de mamíferos e células de inseto reside na maior flexibilidade das últimas quanto ao metabolismo de síntese de aminoácidos. Células de inseto são capazes de sintetizar um maior número de aminoácidos, tais como GLN, GLU e aspartato (ASP), (ÖHMAN *et al.*, 1996), embora esse fato seja pouco importante quando se empregam meios de cultura enriquecidos como o meio Sf-900 II (BERNAL *et al.*, 2009). Essa versatilidade na síntese de aminoácidos pode explicar a sua capacidade de crescer em meio livres de GLN e GLU, desde que suplementados com amônio (ÖHMAN *et al.*, 1996). Em culturas de células de mamíferos, o uso de meios livres de GLN exige suplementação de ASP e/ ou asparagina (ASN) (BEBBINGTON *et al.*, 1992; KEEN e HALE, 1996), para permitir a obtenção de precursores para a biossíntese de GLN. Observa-se ainda que células Sf9 podem crescer em meios sem cistina (CYS) desde que as células estejam no início da fase exponencial de crescimento (DOVERSKOG; HAN; HÄGGSTRÖM, 1998). Verifica-se dessa

forma, que o consumo de aminoácidos e sua biossíntese dependem do tipo de célula e das condições de cultivo, incluindo entre elas a idade do inóculo e a formulação do meio.

Em meios IPL-41 suplementados e em meio Sf-900 II, linhagens de células S2 mostram um alto consumo de prolina (PRO), CYS, serina (SER) e ASN, podendo ocorrer a sua completa exaustão (BATISTA *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2008a, b). Não está suficientemente esclarecido se esses aminoácidos podem limitar o crescimento, mas trabalhos que fizeram a suplementação do meio com PRO conseguiram um aumento significativo da velocidade específica de crescimento (μ_{Xmax}) (SWIECH *et al.*, 2008b). Além disso, deve ser destacado que GLU é consumido apenas depois que GLN tornar-se limitante (em concentrações inferiores a 400-600 mg/L) (BOVO *et al.*, 2008; SWIECH *et al.*, 2008a; GALESI *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009a). Em alguns casos, observa-se produção de GLU ao final do cultivo e um consumo dos demais aminoácidos presentes no meio de cultura muito inferior ao dos anteriormente citados (BOVO *et al.*, 2008).

Como já mencionado, a produção de ALA em células de inseto é uma consequência da oxidação parcial de GLN via alanina aminotransferase (enzima 4, Figura 3.2). A produção de ALA por células S2 é aproximadamente de 1,4 g/L em meio Sf-900 II e em meios IPL-41 suplementados (BATISTA *et al.*, 2009a). Aparentemente, o doador do grupo amino para a produção de ALA depende da formulação do meio de cultura empregado. Em meio Sf-900 II, parece haver uma dependência da disponibilidade PRO, de modo que o esgotamento PRO implica no reconsumo de ALA (SWIECH *et al.*, 2008b). Dada essa flexibilidade metabólica observada em células S2, deve-se considerar que outros fatores podem afetar a formação de ALA como, por exemplo, o nível de oxigênio dissolvido no meio, pois em condições limitantes de O₂ a formação de ALA é mais elevada (até 2,7 g/L) do que em situações que não implicam em limitação de O₂.

Em meio IPL-41 suplementado, a formação de ALA parece depender diretamente da disponibilidade de GLN (BATISTA *et al.*, 2009a). Apesar disto, quando a concentração GLN é mantida em torno de 2,5 g/L, em batelada alimentada, a produção de ALA é interrompida, o que indica que um outro aminoácido, que não GLN, pode estar limitando o crescimento. Diferentemente do observado em culturas em meio Sf-900 II, não se observa reconsumo de ALA em meio IPL-41 suplementado, apesar de GLN estar completamente esgotada. A fonte de nitrogênio para a produção de ALA em meio TC-100 suplementado com soro na

formulação é desconhecida, uma vez que ALA é produzida mesmo depois de GLN estar esgotada.

Muitos autores definem a geração de ALA como o destino mais importante para o PYR resultante do metabolismo da GLC pela via glicolítica. Dessa forma, quantidades menores de LAC e NH_4^+ são liberadas no ambiente, contribuindo para a destoxificação das células (RHIEL; MITCHELLLOGEAN; MURHAMMER, 1997; DREWS *et al.*, 2000; BERNAL *et al.*, 2009; IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). Como já mencionado, Drews *et al.* (2000) identificaram em células de inseto uma reação catalizada pela enzima GOGAT que permite a transferência de nitrogênio amídico e amínico da GLN para ALA. Eles também verificaram uma baixa geração de ALA em meios de cultura sem GLN, onde GLU age como um doador de nitrogênio. Segundo Drews *et al.* (2000), a maioria dos outros aminoácidos (como histidina, lisina, treonina, glicina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina e triptofano), apesar de serem incorporados como proteína celular, não são relevantes para fins de geração de energia.

3.2.3. Formação de lactato

Linhagens de células S2 apresentam diferentes padrões de formação de lactato como consequência da formulação do meio ou a condição inicial. Galesi *et al.* (2007) e Swiech *et al.* (2008b) no cultivo de células S2, observaram concentração muito baixa de lactato, mas este composto pode atingir valores de 0,6-3,0 g/L sob diferentes condições (BOVO *et al.*, 2008; SONDERGAARD, 1996; VALLE *et al.*, 2001; LIM; CHA, 2006; SWIECH *et al.*, 2008a; GALESI *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009a). Para Ikonomou, Schneider e Agathos (2003), a produção de LAC ocorre apenas em condições limitantes de O_2 . Apesar disto, Batista *et al.* (2009a), trabalhando com meio IPL-41 suplementado, observaram formação de LAC mesmo com pressão parcial de O_2 de 40%. Em meio Sf-900 II, com excesso de GLC, parece existir uma clara correlação entre o início da formação do LAC e limitação em GLN (BOVO *et al.*, 2008) ou incapacidade de produção de ALA (BATISTA *et al.*, 2009a).

Segundo Bovo *et al.* (2008), a produção LAC depende da velocidade específica de consumo de GLC, bem como da relação inicial GLN/GLC que assume valores de 1/5, em Sf-900 II ou em meio TC-100 suplementados e IPL-41, e de até 1/2 no meio TC -100 contendo soro. Se GLC está em alta concentração no sistema no momento da exaustão do aminoácido

forneecedor de nitrogênio, LAC é formado. Portanto, os dados apresentados por Batista *et al.* (2009a) indicam que a liberação de LAC não depende exclusivamente da disponibilidade de GLN, mas principalmente da incapacidade de produção de ALA como um meio de evitar a formação de LAC e NH_4^+ . De fato, neste estudo, o início da produção LAC ocorreu quando ALA atingiu uma concentração constante.

Como formação LAC também depende de excesso de GLC, a disponibilidade de açúcar é de extrema importância. Como GLC torna-se, em geral, limitante em concentrações baixas (1g/L a 2 g/L), menos LAC é formado, e até mesmo reconsumido. Pode-se, então, considerar o LAC como uma fonte de carbono alternativa para a manutenção das atividades metabólicas (BOVO *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2009a).

As culturas de células de mamíferos produzem grandes quantidades de LAC, como resposta ao excesso de GLC no meio, mesmo sob condições não-limitantes de O_2 (AMABLE; BUTLER, 2008; ALTAMIRANO *et al.*, 2006a,b; CRUZ *et al.*, 2000a). Algumas hipóteses relacionadas com a produção de LAC são: a) este composto é formado como uma forma de re-equilibrar o potencial redox das células e como um meio de regeneração de NADH no citosol; b) a alta atividade da lactato desidrogenase (Figura 3.2, enzima 2) concorre com piruvato desidrogenase para a conversão de piruvato a lactato no citosol; c) o sistema respiratório pode ser saturado por NADH gerado pela glutaminólise (Figura 3.2, enzimas 7 e 8) no interior da mitocôndria; d) pode haver uma deficiência na atividade enzima-chave que liga a via glicolítica com o ciclo de TCA, como as do complexo piruvato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase ou piruvato carboxilase. Lactato pode ser tóxico em concentrações superiores a 3,6 g/L, mas a situação mais comum a enfrentar diz respeito aos efeitos deletérios que a diminuição do pH médio pode causar ao cultivo, diminuição essa que pode ser facilmente corrigida através da adição de um álcali (AMABLE; BUTLER, 2008).

Nos sistemas de células de inseto, LAC também é um subproduto do metabolismo anaeróbio da GLC e depende diretamente a sua disponibilidade na cultura (DOVERSKOG *et al.*, 1997). É ainda uma maneira de regenerar NADH quando oxidação completa da GLC pelo ciclo do TCA e cadeia respiratória não é possível (DOVERSKOG *et al.*, 1997; DREWS *et al.*, 2000).

3.2.4. Formação de amônio

Diferentemente do que foi observado para a formação de LAC, a produção de ALA não garante um esgotamento completo do NH_4^+ gerado a partir do metabolismo de aminoácidos e, portanto, algum NH_4^+ sempre é observado no cultivo. Há uma liberação contínua de NH_4^+ , independente do tipo de meio de cultura utilizado. No entanto, a quantidade de NH_4^+ produzidas em cada condição é muito diferente. Em meio TC-100 suplementado, são observados concentrações de 0,080 g/L (GALESI *et al.*, 2008), enquanto valores elevados de 0,35 g/L (BATISTA *et al.*, 2009a) e 1,1 g/L (SWIECH *et al.*, 2008b) são encontrados em cultivos com meios IPL-41 suplementado e em SF II-900, respectivamente. Em meio TC-100 suplementado, observou-se que a taxa de formação de NH_4^+ diminui à medida que GLN torna-se limitante, demonstrando uma relação direta entre a geração do subproduto e o consumo desse aminoácido. Em outros meios (IPL- 41 suplementado e SF-900II) não há uma relação direta entre a formação de NH_4^+ e o consumo de GLN, sugerindo que o NH_4^+ poder ser formado a partir do metabolismo de outros aminoácidos (BATISTA *et al.*, 2009a).

O padrão de liberação de NH_4^+ por células S2 é muito semelhante ao observado em células de mamíferos, sugerindo vias metabólicas similares e/ou participação de fluxos entre as vias para ambas células. Em células de mamíferos, a formação de NH_4^+ decorre principalmente da assimilação de GLN pela via da glutaminólise, que produz também GLU (Figura 3.2, enzima 7). Este último pode ainda liberar uma outra molécula de NH_4^+ e originar uma molécula de α -KG (Figura 3.2, via 8) (AMABLE; BUTLER, 2008).

Em células de mamíferos, NH_4^+ é normalmente considerado mais deletério ao crescimento e síntese de produtos que o LAC, mesmo em baixas concentrações (36 mg/L) (AMABLE; BUTLER, 2008). Algumas explicações para essa toxicidade do NH_4^+ incluem perturbação do pH intracelular e de alteração na distribuição de enzimas intracelulares e a ativação de reações que inibem o crescimento celular.

Quanto à perturbação do pH intracelular, células são incapazes de transportar NH_4^+ através de suas membranas, de tal maneira que a formação de NH_4^+ altera o equilíbrio

Em contrapartida, amônia (NH_3) é uma molécula pequena, sem carga, lipofílica, que facilmente se difunde por membranas celulares, diminuindo o pH na matriz mitocondrial, já que um próton é deixado para trás. Da mesma forma, as moléculas de NH_3 também podem facilmente se difundir através da membrana citoplasmática. Este composto pode ser

transportado de volta como amônio por proteínas transportadoras específicas (AMABLE; BUTLER, 2008; MARTINELLE; WESTLUND; HAGGSTROM, 1998; MARTINELLE; HAGGSTROM, 1999).

A perturbação sobre reações enzimáticas, por outro lado, pode envolver inibição direta de enzimas chave da glicólise, do ciclo TCA e da via PPP, entre outras, bem como o deslocamento do equilíbrio de reações (AMABLE; BUTLER, 2008).

As células Tn-5 têm um padrão metabólico semelhante ao de células de mamíferos com formação de quantidades elevadas de NH_4^+ como uma resposta ao excesso de GLC (RHIEL; MITCHELLLOGEAN; MURHAMMER, 1997; BENSLIMANE *et al.*, 2005; SUGIURA; AMANN, 1996). Benslimane *et al.* (2005) relataram fluxo de carbono através da TCA cinco vezes maior em células Tn-5 que o observado em células Sf9, o que pode justificar a maior liberação de NH_4^+ em Tn-5. A linhagem celular Sf9 é caracterizada pela não formação de NH_4^+ mesmo sob excesso tanto de GLN como de GLC, como normalmente se verifica no início de qualquer cultivo descontínuo. Essas células, contudo, podem produzir quantidades significativas de NH_4^+ sob condições limitantes de GLC (ÖHMAN; LJUNGGREN; HAGGSTROM, 1995; DREWS *et al.*, 2000), embora, como mencionado antes, é possível observar que as variações metabólicas são dependentes da célula, mas podem também resultar de mudanças nas condições de cultivo.

3.3. Cinética do crescimento, da morte celular e da formação de produtos para células animais.

A literatura registra inúmeros trabalhos que buscam identificar os principais substratos e subprodutos que interferem no crescimento de células animais, bem como na síntese de produtos e na quantificação dessa influência na forma de modelos cinéticos.

Augusto *et al.* (2008), Sidoli *et al.* (2004) e Pörtner e Schäffer (1996) sistematizaram os principais modelos não-estruturados utilizados para representar o cultivo de células animais. A maioria dos trabalhos citados refere-se à modelagem de hibridomas do crescimento e de formação de anticorpos monoclonais, não se encontrando um grande número de formulações matemáticas para células de inseto.

Esses modelos cinéticos podem representar a dinâmica do processo, porém também tem limitações. Uma limitação importante dessa modelagem é que a sua capacidade preditiva decorre da incorporação de expressões matemáticas complexas que, normalmente, resultam em não-linearidades tanto em relação aos parâmetros como em relação às variáveis. Isso pode tornar trabalhosa a solução das equações representativas dos modelos. Eles também não são adequados para estudar a atividade relativa de certas vias metabólicas sob diferentes condições da cultura, situação caracterizada pela existência de mais de um estado estacionário fisiológico, situação também conhecida como de multiplicidade de estados estacionários. Para essa situação tem-se recorrido à modelagem metabólica (FOLLSTAD *et al.*, 1999; EUROPA *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 1997; LINZ *et al.*, 1997; PAREDES *et al.*, 1999).

A modelagem não necessariamente baseia-se em mecanismos cinéticos conhecidos ou propostos, mas pode utilizar funções matemáticas que melhor se adequam aos fenômenos observados. Isso gera um espectro amplo de modelos que vão desde os puramente inferidos empiricamente aos completamente baseados no conhecimento das etapas cinéticas. A maior parte dos modelos incorpora funções empíricas, pois muitos aspectos do comportamento de células ainda não foram elucidados. O desenvolvimento de modelos exige a incorporação e integração de aspectos particulares do sistema em estudo, enfim de modelos que descrevam cada um dos aspectos específicos envolvidos. A utilização precisa de sub-modelos que correspondam às partes do metabolismo celular é, portanto, de importância fundamental para a construção de um bom modelo cinético capaz de descrever a dinâmica do processo envolvido. Os principais modelos não-estruturados foram desenvolvidos por Batt e Kompala (1989), Bree *et al.* (1988), Glacken (1989), Dalili e Ollis (1989), Gaertner e Dhurjati (1993a,b), Frame e Hu (1991a,b), Linardos *et al.* (1991), de Tremblay *et al.* (1992), Kurokama *et al.* (1994), Pörtner e Schafer (1996) e Teixeira *et al.* (2005).

Alguns desses estudos avaliaram os efeitos dos principais componentes dos meios de cultura tais como o soro fetal bovino (THARANKAN; CHAU, 1986; VÉLEZ *et al.*, 1986; DALILI; OLLIS, 1989; KUNKEL *et al.*, 1998), glicose e glutamina, assim como os subprodutos do metabolismo celular, ácido láctico e amônia (REUVENY *et al.*, 1986; GLACKEN *et al.*, 1988; GLACKEN *et al.*, 1989; MILLER *et al.*, 1989a, b; JO *et al.*, 1990; GAERTNER; DHURJATI, 1993a, b; SUAREZ, 2002). Além da composição do meio, também tem sido estudada a influência do teor de oxigênio dissolvido no meio e de fatores ambientais como a temperatura

e o pH (REUVENY *et al.*, 1986; MCQUEEN; BAILEY, 1990; SURESHKUMAR, 1991; BIRCH *et al.*, 1985; MILLER *et al.*, 1987; GAERTNER; DHURJATI, 1993a).

No cultivo de células animais, a glicose é a principal fonte de carbono e a principal fonte de energia. Quando se fornece glicose ao meio verifica-se que a velocidade específica de crescimento celular é função da concentração da glicose, podendo ser descrita pelo modelo de Monod (MONOD, 1942). Alguns autores utilizam a idéia de um limiar de concentração e uma velocidade mínima de incorporação de glicose (FRAME; HU, 1991b). Quando se utiliza essa noção de limiar de glicose, afirma-se que, abaixo de certa concentração não se percebe crescimento celular, ou ainda, que pode existir crescimento nulo mesmo quando existe glicose no meio. Por outro lado, quando se afirma que há uma velocidade mínima de incorporação de glicose, isso equivale a afirmar que, para qualquer fase do crescimento celular, sempre haverá uma velocidade de consumo de glicose (AUGUSTO *et al.*, 2008).

Junto com glicose, glutamina é apontada como substrato necessário ao catabolismo e anabolismo de células animais (DALILI *et al.*, 1990; SCHNEIDER e LAVOIX, 1990; SCHNEIDER *et al.*, 1996; GAERTNER; DHURJATI, 1993a, b; HARIGAE *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1995; LINZ *et al.*, 1997; GUARDIA *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 1988; JANG e BARFORD, 2000).

Os modelos apresentados para o crescimento celular e síntese de produtos, normalmente obtidos a partir de cultivos contínuos, variam na identificação do substrato limitante. Alguns modelos incorporam glicose, glutamina ou ambos os substratos nas expressões (JANG; BARFORD, 2000), embora também seja apontado que o substrato limitante possa ser outro, ou seja, nem glicose nem glutamina. Miller *et al.* (1988), por exemplo, verificaram que a velocidade específica de crescimento era independente da concentração de glicose no intervalo de concentrações normalmente empregado nos cultivos celulares e, ainda, caracterizaram a produção de anticorpos monoclonais como não associada ao crescimento.

Além desses dois substratos, alguns modelos também incluem o soro fetal bovino enquanto substrato limitante ou como fator de crescimento, que melhora a velocidade específica máxima de crescimento (GAERTNER; DHURJATI, 1993a; GLACKEN *et al.*, 1989; DALILI; OLLIS, 1989; DALILI *et al.*, 1990). No entanto, a tendência atual é se evitar meios de cultura com soro fetal bovino (BUTLER, 2005).

Zeng *et al.* (1998a) estudaram a cinética de crescimento, de morte celular e de formação de anticorpos em seis linhagens de hibridomas, em cultivo contínuo e em perfusão. Os autores constataram que os principais modelos não-estruturados não se aplicavam bem aos cultivos estudados que consideram os substratos normalmente utilizados (glicose e glutamina), assim como os produtos típicos do cultivo (ácido láctico, amônia e anticorpos monoclonais). Eles sugerem a existência de fatores limitantes ou autoinibidores ao crescimento, não identificados nos cultivos com hibridomas.

Os modelos cinéticos comumente propostos incluem produtos metabólicos inibidores do crescimento como lactato e amônia. Butler e Jenkins (1989), Newland *et al.* (1990), Ozturk *et al.* (1992), Schneider *et al.* (1996) e Jang e Barford (2000) consideraram ácido láctico e amônia como os principais inibidores do crescimento de células animais quando a concentração de ácido láctico está acima de 40 a 50 mM e quando a concentração de amônia está acima de 2 mM.

Augusto *et al.* (2008) e Pörtner e Schäfer (1996) sistematizaram um conjunto de modelos não-estruturados para o crescimento de hibridomas e indicados na Tabela 3.2.

3.3.1. Influência de O₂ e pH.

A concentração celular final diminui quando a concentração de oxigênio dissolvido é reduzida como decorrência do metabolismo oxidativo, pois ocorre uma incompleta oxidação de glicose e um aumento na velocidade específica de produção de lactato (MILLER *et al.*, 1987; DEUTSCHMANN; JAGER, 1994).

Um crescimento ótimo da linhagem de células de inseto, *Spodoptera frugiperda*, foi encontrado para concentrações de oxigênio dissolvido de 70% da concentração de saturação (DEUTSCHMANN; JAGER, 1994). Para crescimento de hibridomas foram verificadas exigências distintas para o crescimento celular e para a formação de produtos (anticorpos). Autores identificaram uma concentração ótima de 0,5% da saturação oxigênio dissolvido para o crescimento celular e 50% da saturação para a formação de produto (MILLER *et al.*, 1987). Alterações metabólicas decorrentes da redução da concentração de oxigênio dissolvido foram constatadas no crescimento e na formação de produtos de células animais (KUNKEL *et al.*, 1998, 2000).

Tabela 3.2. Exemplos de modelos para velocidades específicas de crescimento.

Velocidade específica de crescimento	Referência
$\mu_X = \mu_{X\max} \frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \cdot \frac{GLN}{k_{GLN} + GLN}$	De Trembay <i>et al.</i> (1992).
$\mu_X = \mu_{\min} + \frac{(\mu_{\max} - \mu_{\min})(GLC - GLC_{\lim iar})}{k_{GLC} + (GLC - GLC_{\lim iar})}$	Frame e Hu (1991a).
$\mu_X = \mu_{X\max} \frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \frac{k_{NH3}}{k_{NH3} + NH3} \frac{k_{LAC}}{k_{LAC} + LAC}$	Bree <i>et al.</i> (1988).
$\mu_X = \mu_{X\max} \frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \cdot \frac{k_{LAC}}{k_{LAC} + LAC}$	Kurokawa <i>et al.</i> (1994).
$\mu_X = \mu_{X\max} \frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \frac{k_{NH3}}{k_{NH3} + NH3} \frac{k_{LAC}}{k_{LC} + LAC}$	Miller, Blanch e Wilke (1988)
$\mu_X = \mu_{X\max} (Soro) \frac{GLC}{k_{GLC} + GLC}$	Dalili; Sayles; Ollis (1990)
$\mu = \mu_{X\max} \frac{GLN}{k_{GLN} + GLN}$	Pörtner e Schafer (1996).

FONTE: Augusto *et al.* (2008)

Eventualmente a concentração de oxigênio dissolvido no meio é incorporada ao modelo, quando não se opera com concentração de oxigênio dissolvido constante ou quando se deseja avaliar sua influência na dinâmica do processo.

Como ocorre em culturas microbianas, também existe um pH ótimo para o cultivo. Para células animais recomenda-se um pH entre pH 7.1 e 7.4. Fora desse intervalo o número de células viáveis diminui acentuadamente (MILLER *et al.*, 1988).

3.3.2. Morte celular.

As células animais são frágeis e sensíveis ao efeito de cisalhamento que surge em decorrência da movimentação do fluido no biorreator. Segundo Nollert, Diamond e McIntire (1991), as células de mamíferos respondem às forças hidrodinâmicas em minutos, alterando seu metabolismo celular e a expressão gênica. Dependendo da intensidade dessas forças, as células alteram a velocidade de crescimento celular, a sua morfologia, o metabolismo e a

expressão genética de metabólitos (NOLLERT *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 1988). Essas forças surgem no meio em função da agitação e aeração imposta ao sistema de cultivo.

Como já foi comentado, na identificação dos fatores ambientais que afetam a viabilidade celular, busca-se determinar as condições de operação que minimizem esses efeitos. Contudo ocorrem determinadas condições na dinâmica do cultivo, inevitáveis, que afetam a viabilidade celular, sendo necessário que os modelos matemáticos considerem os efeitos da composição do meio de cultivo sobre a viabilidade celular. As condições da cultura podem disparar mecanismos de morte celular como necrose e apoptose. A necrose é caracterizada pelo aumento do volume da célula e seu subsequente rompimento. É causada principalmente por forças externas como tensão de cisalhamento, pelos mecanismos de “ruptura” das bolhas de ar e devido a alterações abruptas de pH e de pressão osmótica do meio, bem como devido à presença de substâncias tóxicas. A apoptose, também chamada de “morte programada” das células, é determinada pela própria célula, o que significa que esse processo está sob controle genético. Em um processo claro de autodestruição, as células fragmentam o DNA e empacotam o seu conteúdo interno em vesículas (corpos apoptóticos), eliminados para o ambiente, ocasionando a diminuição do volume celular (PELLEGRINI *et al.*, 2008). Novamente, são as condições ambientais que induzem os mecanismos apoptóticos, sendo a causa variável para cada linhagem celular. Em princípio, qualquer limitação nutricional ou inibição do metabolismo pode ativar esse mecanismo. A apoptose em células de inseto foi estudada recentemente por Meneses-Acosta *et al.* (2001) que caracterizam o fenômeno em cultura de células Sf9. Cowger *et al.* (1999), Zeng *et al.* (1998a, b), Deckwer e Hu (1998), Zeng; Hu; Deckwer (1998), Zeng e Deckwer (1999), Lee *et al.* (1995) desenvolveram modelos cinéticos que quantificam o desaparecimento celular e, dessa forma, incluem a apoptose e a necrose celular. Augusto *et al.* (2008) e Pörtner e Schäfer (1996) sistematizaram um conjunto de modelos não-estruturados para a velocidade de morte celular que estão indicados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Exemplos de modelos para velocidades específicas de morte celular.

Velocidade específica de morte celular	Referência
$\mu_d = \mu_{d,\max} \frac{NH_3}{k_{NH_3}^d + NH_3} \frac{LAC}{k_{Lac}^d + LAC}$	Batt e Kompala (1989)
$\mu_d = k_{d,\max} \frac{NH_3}{k_{NH_3}^d + NH_3} \frac{LAC}{k_{Lac}^d + LAC} \frac{k_{i, GLN}^d}{k_i^d + GLN}$	Bree <i>et al.</i> (1988)
$\mu_d = \left(\frac{k_{d,\max}}{\mu_{X,\max} - k_{LAC}^{d*} + LAC} \right) \left(\mu_{X,\max} - k_{NH_3}^{d*} NH_3 \right) \frac{k_{i, GLN}^d}{k_{i, GLN}^d + GLN}$	De Trembay <i>et al.</i> (1992)

FONTE: Augusto *et al.* (2008).

3.3.3 Formação de produtos

Modelar a formação de produtos obtidos no cultivo de células tem sido uma tarefa impulsionada pela necessidade de aumentar a produtividade dos cultivos, ou seja, pela necessidade de aumentar a produção desses produtos de interesse comercial com menores investimentos e custos de produção possível (SIDOLI *et al.*, 2004). Essa modelagem tem sido realizada especialmente no cultivo de hibridomas e na produção de anticorpos monoclonais. Pörtner e Schafer (1996) compararam um conjunto de modelos não estruturados propostos para a cinética de produção de anticorpos monoclonais. Alguns dos modelos utilizam o conceito proposto por Luedeking e Piret (2000) de produção associada e não-associada ao crescimento, ou seja, consideram a produção de anticorpos como uma função linear da velocidade específica de crescimento celular (associada ou parcialmente associada) ou como independente da velocidade da específica de crescimento. Os modelos ainda consideram a concentração de substratos e soro fetal como variáveis que afetam a velocidade específica de produção, como pode ser verificado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Exemplos de modelos para velocidades específicas de formação de produto.

Velocidade específica	Referência
$\mu_p = d_o e^{d_1/\mu_x}$	Linardos <i>et al.</i> (1991).
$\mu_p = \alpha$	Pörtner e Schafer (1996); Hiller <i>et al.</i> (1991).
$\mu_p = \alpha \cdot \mu_x + \beta$	Frame e Hu (1991b).
$\mu_p = \frac{\alpha o}{k_\mu + \mu_x} \mu_x + \beta$	De Tramblay <i>et al.</i> (1992).
$\mu_p = \beta(\text{soro}) \frac{\text{GLN}}{k_{\text{Gln}}^p + \text{GLN}}$	Dalili <i>et al.</i> (1990).
$\mu_p = \alpha \cdot k_d + \beta$	Linardos <i>et al.</i> (1991).

FONTE: Augusto *et al.* (2008)

3.4 Biorreatores utilizados para o cultivo células animais.

A partir da viabilização do cultivo de células animais *in vitro* e em larga escala, vêm sendo desenvolvidas técnicas e equipamentos capazes de manter as células nas melhores condições ambientais para a sua proliferação e para a obtenção de produtos imunobiológicos de interesse. Como indicado por Chico, Rodrigues e Figueiredo (2008), os biorreatores, principais equipamentos para o cultivo de células, devem assegurar:

- a) pH adequado, por meio do controle do equilíbrio ácido – base do meio de cultivo;
- b) temperatura adequada à propagação das células;
- c) troca de gases que permitam um suprimento adequado de O₂ e a eliminação de excesso de CO₂;
- d) suprimento adequado de nutrientes seja pela utilização do meios de cultivo próprios seja pela adição programada de nutrientes em função do tempo de cultivo;
- e) suporte para adesão celular, no caso de células aderentes;
- f) manutenção de assepsia durante o cultivo;
- g) tensões de cisalhamento e condições hidrodinâmicas que permitam a homogeneidade do meio cultivo sem causar danos às células.

Todo cultivo inicia-se com o descongelamento de células de uma ampola de crioconservação e, em seguida, sua propagação é feita em frascos especiais (frasco tipo T, frascos tipo *roller* e frascos agitados tipo *spinner* ou *Schott*).

Devido à necessidade ou não de suporte, exigência característica da linhagem celular empregada, os cultivos celulares podem ser classificados em duas classes fundamentais: cultivos em suspensão e cultivos em suportes. Essa exigência leva ao uso dos diferentes tipos de frascos para a propagação celular inicial e, assim, podem ser utilizadas garrafas tipo *roller* para células dependentes de suporte ou frascos agitados (*spinner* ou *Schott*) para células em suspensão. Os biorreatores são utilizados como última etapa dos cultivos e para se obter altas concentrações celulares e volumes de produção compatíveis com as demandas de mercado, enfim, para suprir as necessidades de produção estabelecidas para o processo.

A classificação dos biorreatores pode ser feita levando em conta várias características do equipamento. Neste trabalho será considerada a classificação proposta por Chico, Rodríguez e Figueiredo (2008), que agrupa os diversos biorreatores em duas categorias relativas às fases presentes nos cultivos, ou seja, os biorreatores são classificados como reatores homogêneos e heterogêneos. Embora todos os cultivos sejam no mínimo bifásicos, pois as células constituem uma fase distinta do meio de cultura, esses reatores podem ser considerados como homogêneos ou pseudo-homogêneos uma vez que as células estão homogeneamente distribuídas na fase líquida. Os reatores nos quais não se observa essa distribuição homogênea, ou ainda, quando as células exigem um suporte sólido para aderência, suporte que leva à formação de gradientes de concentração na sua interface com o meio líquido ou mesmo dentro do suporte, esses reatores são classificados como reatores heterogêneos. A Tabela 3.5 apresenta os principais tipos de reatores e sua classificação.

Todos esses tipos de biorreatores podem ser operados de diferentes formas, ou seja, a sua utilização pode ser feita operando-os em batelada, em batelada alimentada ou em contínuo. Para células animais o cultivo contínuo faz-se com reciclo e com retenção de células no biorreator e a essa forma de condução do processo é denominada de perfusão.

3.4.1. Biorreatores Homogêneos.

Os biorreatores do **tipo tanque agitado** são os reatores mais utilizados nos processos biotecnológicos em todo o mundo e são similares aos utilizados na fermentação submersa de microorganismos (JAIN; KUMAR, 2007). As razões para essa preferência estão na quantidade de estudos realizados para esse tipo de equipamento, na simplicidade de sua construção e nos vários recursos disponíveis para assegurar as melhores condições ambientais para o cultivo de células animais. Todos esses equipamentos dispõem de controle de pH, temperatura e são construídos para permitir condições de assepsia e homogeneidade das propriedades do meio. Essa homogeneidade é garantida por impelidores instalados no eixo rotatório central do biorreator, além disso, esses equipamentos ainda dispõem de sistema para fornecimento e remoção de gases, garantido a oxigenação e também o controle de pH. Todas essas características têm permitido a construção de biorreatores de até 20 000 L de volume útil (JAIN; KUMAR, 2007; CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008). Esses reatores podem ser utilizados tanto para o cultivo de células em suspensão ou para o cultivo de células dependentes de suporte. Nesse último caso, adicionam-se microcarregadores para a adesão das células. Os reatores homogêneos são projetados com bases na cinética homogênea do processo, ou seja, em todos os pontos do meio reacional a concentração dos reagentes e produtos é a mesma e, em decorrência, as velocidades do processo são a mesma.

Tabela 3.5. Classificação de biorreatores.

Biorreatores Homogêneos	Biorreatores Heterogêneos
Tanque agitado	Tanque agitado com microcarregadores
Air-lift	Leito empacotado ou leito fixo
De ondas	Leito fluidizado
	Com crescimento nas superfícies (<i>Roller</i> , Cell Cube®, etc.)
	Fibra oca

FONTE: Chico, Rodríguez e Figueiredo (2008)

Os **biorreatores tipo air-lift** tem sido usados para produção de anticorpos monoclonais de uso terapêutico ou diagnóstico. Eles proporcionam um meio hidrodinamicamente menos agressivo, pois os perfis de velocidade no fluido não permitem gradientes e velocidade tão elevados como nos tanques agitados e, além disso, dispensam agitação mecânica e, com isso,

economizam energia. Essas características decorrem da geometria do reator e da existência de um cilindro concêntrico no seu interior por onde é injeta uma corrente gasosa. O gás sob pressão forma bolhas que ascendem no tubo e fazem o líquido circular retornado para a região inferior do reator. A principal limitação desse equipamento está na limitação para ampliação de sua escala de trabalho, pois os maiores reatores descritos na literatura até de 2.000 L (JAIN; KUMAR, 2007), embora se cite um caso com escala de produção de 10.000 L (BIRCH *et al.*, 1993).

Biorreatores de ondas (*wave bioreactors*, *disposable bioreactors*), ilustrados na Figura 3.3 consistem de uma bolsa estável de plástico flexível descartável na qual se cultivam as células e uma plataforma móvel sobre a qual se apóia a bolsa. O movimento oscilatório da plataforma gera ondas na interface gás/líquido no interior da bolsa plástica que homogeneizam o meio de cultura. Por não necessitarem de esterilização *in house*, eles não exigem a validação do processo, pois essa garantia é dada pela empresa que fabrica e fornece as bolsas plásticas. A transferência de oxigênio neste tipo de biorreator e a consequente capacidade de atingir altas concentrações celulares são limitadas, o que restringe o cultivo de grandes volumes de meio, razão pela qual os volumes máximos de cultivo com este tipo de biorreator sejam de até 1 000 L (SINGH, 1999; JAIN e KUMAR, 2007; NEGRETE; KOTIN, 2007).

Figura 3.3. Reator de ondas.

3.4.2 Biorreatores Heterogêneos

Esses biorreatores caracterizam-se por utilizarem um suporte sólido para aderência de células e, em decorrência disso, por apresentarem gradientes de concentração no meio reacional. Os reatores do tipo tanque agitado podem ser utilizados nos cultivos (Figura 3.4) com células aderentes quando se incorporam ao meio reacional microcarregadores, partículas feitas de materiais como celulose, dextrana, colágeno, gelatina ou vidro. Esses microcarregadores apresentam características superficiais que permitem a adesão de células. Além dessas características de suas superfícies os microcarregadores podem ser porosos e, dependendo do tamanho dos poros, são classificados como microporosos ou “sólidos” e macro-porosos. Essa é uma qualificação que leva em conta o tamanho da célula e o do poro. Microcarregadores microporosos têm poros com diâmetros inferiores aos das células, o que não permite o seu crescimento no interior da partícula, sendo a fixação das células exclusivamente na sua superfície. Os microcarregadores macroporosos são fabricados com poros entre 10 μm e 400 μm , dimensões que permitem o crescimento de células no interior das partículas. Nos dois casos a cinética de reação é heterogênea, pois as reações estão sujeitas a etapas difusivas que normalmente controlam a velocidade global de reação a (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008; NILSANG *et al.*, 2008). A eficiência dessa combinação, projeto do reator e microcarregadores, depende da capacidade de fixação das células, da estabilidade dessa adesão ao suporte e, ainda, da preservação da viabilidade das células no tanque agitado.

Figura 3.4. Reator tipo agitado com células ancoradas em microcarregador (destaque para microcarregadores).

Biorreatores com crescimento em superfícies. A maioria das linhagens celulares utilizadas para produtos imunobiológicos é dependente de ancoragem e necessitam de superfícies para adesão. **Garrafas rotatórias** (*roller bottles*) e sistemas com **múltiplas camadas** (**CellCube®**, **Cell Factory**) têm sido os sistemas mais comumente utilizados para cultivo dessas células. A ampliação da escala de produção tem sido realizada pelo aumento do número de garrafas ou placas, o que não significa melhoramento da capacidade de produção por unidade do sistema de cultivo utilizado. Além disso, essa forma de cultivo requer mão de obra intensiva e apresenta maiores riscos de contaminação (CHICO; RODRÍGUEZ; FIGUEIREDO, 2008). Essas limitações levaram ao desenvolvimento de outros sistemas de cultivo que fornecem superfícies para ancoragem das células com maior produtividade. Os **biorreatores de fibras ocas** (*hollow fiber bioreactor*) são dispositivos que permitem a ancoragem de células dependentes de suporte e aumentam, significativamente, a produtividade dos cultivos e, ainda, permitem altas concentrações de certas proteínas no reator. Eles são constituídos de centenas de pequenos tubos semipermeáveis com diâmetros inferiores a 200 µm e com peso molecular de corte característico (*molecular weight cut off*, MWCO) dispostos em um módulo ou cartucho. As células são inoculadas no espaço externo às fibras (espaço extracapilar) e crescem nessa região. O meio é bombeado através do espaço interior das fibras (espaço intracapilar). A semipermeabilidade permite que os nutrientes e metabólitos de massa molar baixa (glicose, glutamina, amônia, lactato, proteínas, fatores de crescimento) que possam mover-se livremente através dos poros das fibras. Por outro lado, as proteínas com massa molar elevada, produzidas ou adicionadas ao espaço extracapilar no qual estão alojadas as células, que permanecem retidas no reator, o que aumenta significativamente a concentração do produto de interesse em relação aos outros sistemas e diminui os custos das etapas de concentração e purificação do produto. Além disso, uma vez que as células aderidas ao suporte poroso têm o fornecimento de nutrientes assegurado, a cultura pode ser mantida em atividade contínua por meses o que aumenta a produtividade do sistema (JAIN e KUMAR, 2007; FIBER CELL SYSTEM, 2008). Um esboço do biorreator está indicado na Figura 3.5.

Figura 3.5. Biorreator de fibras ocas. FONTE: Fiber Cell System (2008)

Reatores de leito fixo são normalmente empregados quando a reação envolvida é catalisada por sólidos ou partículas catalíticas. Recebem essa denominação por manterem as partículas fixas dentro do equipamento e também são conhecidos como reatores de leito empacotado. A configuração do leito e a movimentação do líquido através dele podem variar. A forma mais comum desse equipamento consiste de uma coluna cilíndrica recheada com partículas catalíticas constituindo um único leito catalítico embora também sejam encontrados leitos segmentados e com outras geometrias. Um exemplo de biorreator de leito fixo está indicado na Figura 3.6. Os biorreatores de leito fixo permitem a retenção das células aderidas ao suporte, diminuindo ou eliminando as etapas de separação e permitem altas concentrações celulares e, com isso, taxas de reação elevadas, aumentando a produtividade do reator e do processo. Contudo existem dificuldades inerentes a este tipo de biorreator, tais como a manutenção da concentração adequada de oxigênio dissolvido no leito catalítico e formação de caminhos preferenciais, o que limita a produtividade do reator e a sua ampliação de escala sendo que o volume máximo de trabalho para este tipo de biorreator está na faixa de 10 L a 30 L (MEUWLY *et al.*, 2007).

Biorreatores de leito fluidizado permitem manter as partículas e/ou células em suspensão numa determinada região do reator graças ao equilíbrio de forças dinâmicas (força de arrasto da corrente gasosa ou líquida reacional sobre a partícula e sua força peso). Essa fluidização prolonga a vida útil das partículas catalíticas e aumenta a produtividade do reator. Esses equipamentos (Figura 3.7) vêm sendo utilizados em bioprocessos com

microcarregadores para obtenção de retrovírus em volumes de trabalho de até 400 L (WARNOCK; MERTEN; AL RUBEAI, 2006; JAIN; KUMAR, 2007).

Figura 3.6. Reator de leito fixo. FONTE: Meisenholder (1999)

Figura 3.7. Reator de leito Fluidizado. FONTE: Warnock, Merten e Al Rubeai (2006)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados necessários para a formulação de modelo cinético do cultivo de células S2, *Drosophila melanogaster*, estavelmente transformadas com vetores plasmidiais contendo o gene da glicoproteína G do vírus da raiva (pAcGPV), foram obtidos por três alunos de doutorado e um de mestrado e estão descritos em Batista *et al.* (2006), Batista (2007), Batista *et al.* (2008), Batista *et al.* (2009a), Galesi (2007), Galesi; Pereira; Moraes (2007), Galesi *et al.* (2008), Swiech (2007), Swiech *et al.* (2008a,b,c) e Aguiar (2010), pesquisadores participantes do projeto temático “Expressão de genes heterólogos de células de dípteros: Biologia Molecular e Engenharia de Processos”, (FAPESP – 02/09482-3). Os ensaios utilizados estão indicados no Quadro A.1, ANEXO A do Anexo A.

4.1 Células

Todos os ensaios considerados utilizaram células S2 *Drosophila melanogaster* transfectadas com o vetor pAcGPVHygro para expressar de forma constitutiva a glicoproteína do vírus da raiva, GPV, segundo procedimento estabelecido por Yokomizo *et al.* (2007), aqui denominadas células S2AcGPV2. As células foram adaptadas aos vários meios empregados pelos vários pesquisadores - TC100-AG, SF900II[®] (Invitrogen, USA, Califórnia, Carlsbad) e IPL-FA - o que, em geral, gera subpopulações celulares. Durante o desenvolvimento dos trabalhos isolou-se uma subpopulação da linhagem que expressava maiores quantidades (2 a 3 vezes) da proteína GPV quando cultivada em meio Sf900 II[®] (Gibco, EUA). Essa linhagem foi denominada S2AcGPV2-KSf900. Para isolar esta população, o procedimento utilizado foi de repicar apenas as células mais aderentes ao frasco, descartando as outras. Esse foi um procedimento diferente daquele adotado até então, no qual se procura manter uma população homogênea (células com diferentes capacidades de adesão) durante todas as passagens.

Posteriormente, a subpopulação S2AcGPV2-KSf900 foi adaptada ao meio TC100-AG e recebeu a denominação S2AcGPV2-KTC100 (AGUIAR *et al.*, 2009; AGUIAR, 2010). Infelizmente essa linhagem foi perdida ao longo do trabalho, por problemas de instabilidade ou de preservação.

Todas as linhagens estudadas eram preservadas em nitrogênio líquido em meio de cultivo fresco, usando como crioprotetores 10% (v/v) de dimetilsulfoxido (Sigma, EUA) e 50% (v/v) de soro fetal bovino (Nutricel, Brasil).

4.2 Meios de cultura

Os ensaios considerados utilizaram os meios de cultura comumente empregados nos cultivos de células de inseto. O meio utilizado por Galesi (2007), Galesi, Pereira e Moraes (2007,2008) e Aguiar *et al.* (2009) e Aguiar (2010) foi o meio TC100 (Cultilab, Br) suplementado com glicose, glutamina e no qual se substitui o soro fetal bovino por emulsão lipídica (Invitrogen), pluronic F68 (Sigma) e hidrolisado de levedura (yeastolate) (Invitrogen). O meio SF900 II® utilizado por Swiech (2007), Swiech *et al.* (2008a,b,c) é também um meio de cultura livre de soro fetal bovino comercializado pela GIBCO (USA). O meio utilizado por Batista (2007) e Batista *et al.* (2006, 2008, 2009a) foi o meio IPL-41 suplementado com *yeastolate* (Invitrogen), carboidratos, aminoácidos, lipídios para também eliminar a necessidade de soro fetal bovino presente na formulação original. A Tabela A.2 do Anexo A indica a formulação dos meios empregados. Destaque-se que a composição do meio SF900II® não é informada de modo que a composição indicada é resultado de análises feitas por Swiech (2007).

4.3 Sistema de cultivo

Batista (2007) utilizou spinners de 1000 mL de volume total e 400 mL de volume útil, mantidos numa plataforma magnética, sistema Cellferm®-pro (DASGIP, Jülich, Alemanha), que permitiu o controle da temperatura em 28 °C, da agitação em 55 rpm e do pH em 6,3. O oxigênio dissolvido foi mantido, dependendo do ensaio, em 5%, 20%, 40%, 60%, e 95% da saturação em ar. Os frascos foram inoculados $7,5 \times 10^5$ cel/mL (viáveis) e as células foram cultivadas por 72 horas. O controle do oxigênio dissolvido foi feito aumentando-se a vazão de borbulhamento de mistura gasosa (O₂ e CO₂). Durante a fase exponencial de crescimento foi fornecido oxigênio puro. Os ensaios foram conduzidos em batelada.

Galesi (2007) realizou seus ensaios em biorreator Biostat MD/CPU (B. Braun) com capacidade de 3,0 L e volume útil de 1,5 L operado em batelada e equipado com duas turbinas Rushton ou Pitched blad. A aeração foi realizada com mangueira de silicone (Si-Schlauch, com diâmetro de 3,00 mm $\pm$ 0,20 mm e espessura de parede 0,30 mm $\pm$ 0,15 mm). O comprimento total da mangueira foi de 5 m e 3,5 m e estavam submersos no início do cultivo. A temperatura do reator foi controlada em 28 °C, a agitação foi mantida entre 50 rpm e 150 rpm e o oxigênio dissolvido, dependendo do ensaio, controlado em 30% ou 40%. A concentração do inóculo foi de $7,5 \times 10^5$ cel/mL, sendo as células transferidas na fase exponencial do cultivo.

Swiech (2007) utilizou o biorreator Bioflo 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA) com 1L de volume útil. Biorreator estava equipado com turbina de pás retas inclinadas (*pitched blade*), controle de pH, mantido em 6,20 pela adição de NaOH 0,5 M e H₂SO₄ (8%). O controle de oxigênio dissolvido foi mantido em 50% da saturação em ar e a aeração do reator foi realizada por difusão do ar através de tubo de silicone e a agitação do sistema variou de 100rpm até um máximo de 250 rpm. Todos os experimentos foram conduzidos a 28 °C e a concentração do inóculo foi de $5,0 \times 10^5$ cel/mL e as células transferidas na fase exponencial do cultivo.

Aguiar *et al.* (2009) e Aguiar (2010) utilizaram biorreator (Biostat MD/CPU, B. Braun) com dorna de 3 L (1,5 L de volume útil), agitado a 90 rpm por dois impelidores tipo *pitched blade* com duas pás e ângulo de 45°. A transferência de oxigênio foi feita por difusão através de membrana de silicone (Si-Schlauch, com diâmetro de 3,00 mm $\pm$ 0,20 mm e espessura de parede 0,30 mm $\pm$ 0,15 mm). O comprimento total da tubulação era de 5 m, sendo que estavam submersos no início do cultivo. O oxigênio dissolvido foi controlado através de um misturador de gases (Gas Mix Unit, B. Braun Biotech) em valores constantes de 5, 30, 50 e 80% da saturação em ar.

4.4 Métodos analíticos

a) Concentração celular: Determinada estatisticamente, por contagem em câmara de Neubauer e microscópio ótico (Axyovert, Zeiss) (FRESHNEY, 2005).

b) Viabilidade: Determinada pelo método de exclusão por corante azul de Trypan 0,025% (m/v) (modificado de FRESHNEY, 2005). Aguiar *et al.* (2009) e Aguiar (2010) também mediram a concentração de LDH, usando o princípio da redução de NAD^+ durante a conversão de lactato a piruvato (MCQUEEN *et al.*, 1987).

c) Concentração de glicose: Aguiar *et al.* (2009) e Aguiar (2010) e Galesi *et al.* (2008) utilizaram o método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) realizado em equipamento da marca Waters (MA) com detector de índice de refração (W410 ou W2414), injetor automático (W717), software Millenium 3.20, pré-coluna Shodex SC-G e coluna Shodex SC 1011. A temperatura do forno foi de 72°C e a fase móvel EDTA 0,01 N, com vazão de 0,6 mL/min. Para a desproteinização das amostras, utilizou-se TCA, 240 g/L, numa proporção de 4:1 (amostra: ácido tricloroacético). Batista (2007) também fez as determinações de glicose, frutose e lactose por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) usando a coluna Bio-Rad HPX-87H acoplada a uma bomba de fase móvel e gradiente (Waters 600 E), Autosampler (Waters 717plus) e refratômetro diferencial (Waters 410). Swiech *et al.* (2008b) fizeram a determinação de glicose enzimaticamente com Analisador Bioquímico YSI (modelo 2700).

d) Concentração de lactato: Aguiar *et al.* (2009) e Galesi *et al.* (2008) usaram a mesma metodologia de desproteinização e o mesmo sistema Waters indicado no item c), com pré-coluna Shodex SH-G e coluna Shodex SH1011, para determinar lactato. A temperatura do forno foi mantida em 60 °C e a do detector em 45 °C. A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 0,1 N, na vazão de 1,0 mL/min. Batista *et al.* (2008) e Swiech *et al.* (2008b) fizeram a determinação de lactato enzimaticamente com Analisador Bioquímico YSI (modelo 2700).

e) Concentração de amônio. Em todos os trabalhos utilizou-se um potenciômetro (Mettler) e um eletrodo específico (9512, Orion) (Aguiar, 2010).

f) Concentração de aminoácidos: Galesi *et al.* (2008) e Swiech *et al.* (2008b) fizeram a determinação de glutamina e glutamato enzimaticamente com Analisador Bioquímico YSI (modelo 2700). Os demais aminoácidos foram determinados por Batista *et al.* (2008) e Swiech *et al.* (2008b) pelo sistema Pico Tag™ que constitui um sistema de cromatografia de alta resolução com coluna de fase reversa (Waters).

Aguiar (2010) determinou a concentração de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em um equipamento com bomba modelo GP40 (Dionex,

EUA), detector de absorvância modelo AD20 (Dionex, Sunnyvale, C.A., EUA), injetor automático modelo SpectraSeries AS100 (ThermoSeparations Products, EUA) com *loop* de 50µL, forno para colunas, reator modelo PCX 3100 (Pickering Lab., Mountain View, C.A., EUA) e o programa de integração Peaknet v. 5.1 (Dionex, EUA). O sistema de colunas era composto de uma pré-coluna de lítio de 2x20mm (Pickering Lab., EUA) e de uma coluna *High Efficiency Lithium* 3x150mm (Pickering Lab., EUA).

A metodologia utilizada por Aguiar (2010) foi a de derivação pós-coluna a 130 °C, com ninidrina (Treone T200, Pickering Lab., EUA). A eluição foi realizada pela variação do pH com os tampões Li280 pH 2,8 e Li 750 pH 7,5 (Pickering Lab., EUA). Tanto a vazão da fase móvel, quanto a de ninidrina foram de 0,3 mL/min. A pré-coluna e a coluna eram mantidas a 45 °C.

Antes de aplicadas ao cromatógrafo, as amostras eram diluídas com água Milli-Q. Em seguida, tomava-se 1 mL da solução diluída e adicionava-se 0,6 mL do reagente Seraprep (Pickering Lab., EUA) e 0,4 mL de solução de padrão interno (D,L-Homocistina 0,25 g/L). A solução era homogeneizada e o pH, corrigido para a faixa de 1,9 a 2,1 com NaOH 4N (Merck, Brasil). As amostras eram, então, centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante era filtrado em filtro de porosidade 0,45 µm (Millipore, Brasil) antes da injeção na coluna cromatográfica.

Para cada rodada de análises uma nova curva de calibração era realizada, procedendo-se às diluições necessárias a partir de uma solução mãe contendo todos os aminoácidos de interesse (todos da marca Sigma, EUA). Feito isso, tomava-se 1mL de cada diluição e adicionava-se 0,6mL do reagente Lithium Diluent Li220 (Pickering Lab., EUA) e 0,4mL do padrão interno (D,L-Homocistina 0,25g/L). Cada padrão era então filtrado com membrana de porosidade 0,45µm (Millipore, Brasil). Os padrões obtidos tinham as seguintes concentrações (mg/L): 4,38 a 35 para Ácido Aspártico; 4,38 a 35 para L-Asparagina; 25 a 200 para L-Alanina; 8,5 a 67,5 para L-Arginina.HCl; 43,8 a 350 para L-Glutamina; 46,3 a 370 para L-Histidina; 0,625 a 5,0 para L-Isoleucina; 0,938 a 7,5 para L-Leucina; 7,81 a 62,5 para L-Lisina.HCl; 0,625 a 5,0 para L-Metionina; 1,88 a 15,0 para L-Fenilalanina; 4,38 a 35 para L-Prolina; 6,9 a 55 para L-Serina; 2,2 a 17,5 para L-Treonina; 1,25 a 10 para L-Triptofano; 1,25 a 10 para L-Valina; 0,375 a 3,0 para L-Cistina.2HCl; 0,938 a 7,5 para L-Tirosina.2Na.2H₂O; 37,5 a 300 para L-Ácido Glutâmico e 40,6 a 325 para Glicina.

g) Concentração da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) A detecção da glicoproteína do vírus da raiva (GPV) foi realizada por Aguiar (2010) utilizando o teste do tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) e que emprega o kit *Rabies Glycoprotein Enzyme Immunoassay* (Instituto Pasteur, França), conforme descrito por Astray *et al.* (2008)).

Amostras de células do biorreator eram tratadas e armazenadas segundo o tratamento indicado na Tabela 4.1. Para análise da proteína, as amostras contendo 10^6 células totais eram centrifugadas a 250 g, por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado e o *pellet*, rompido, utilizando-se um tampão de lise (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) a um pH de 7,4. Após a homogeneização, as amostras eram incubadas a 4 °C, durante 1 hora, com agitação periódica.

Tabela 4.1. Tratamento utilizado para extração de GPV de uma amostra celular.

TRATAMENTO	
Quantidade de Células	10^6 células
Centrifugação	250 g, 5 minutos, temperatura ambiente. (Subseqüente descarte do sobrenadante).
Ressuspensão de células	500 μ L de solução tampão com 25mM TRIS (Merck, Rio de Janeiro, R.J., Brasil), 25 mM NaCl (Sigma, EUA) e 5 mM $MgCl_2$ (Sigma, EUA), 20% de glicerol (Merck, EUA) e 1 mM de PMSF (Fluka, EUA)
Armazenamento	-20 °C

FONTE: Aguiar (2010)

Após o procedimento de lise, as amostras eram centrifugadas a 10,000 g durante 5 minutos, para a remoção de *debris* celulares e os sobrenadantes eram analisados com o kit.

A análise fornecia a quantidade de proteína presente em 10^6 células (GPV_E). A concentração de GPV era calculada de acordo com a seguinte equação:

$$GPV = (GPV_E)_t \cdot (X_T)_t \quad (4.1)$$

na qual GPV é a concentração de proteína (ng/mL), GPV_E é o teor celular de GPV (ng/ 10^7 células), X_T é a concentração total de células no cultivo e “t” é o instante de tempo considerado.

4.5 Estimativa inicial de parâmetros.

4.5.1 Determinação preliminar da velocidade específica de crescimento (μ_{max}), duração da fase lag (t_{lag}) e duração da fase exponencial (t_{exp})

Para a análise da ocorrência de limitação por substratos ou inibição por metabólitos é necessário uma análise preliminar da dinâmica do cultivo para identificar os principais fenômenos a serem considerados e que constituirão as hipóteses de trabalho para a construção do modelo cinético do processo. As três grandezas cinéticas indicadas auxiliam essa análise e são determinadas a partir da curva de crescimento como indica a Figura 4.1, μ_{max} , por regressão linear logarítmica e t_{lag} e t_{exp} , visualmente.

Figura 4.1. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{xmax}), instante final da fase de crescimento lag (t_{lag}), instante final da fase de crescimento exponencial (t_{exp}). RL- Regressão linear. Ensaio RE-5, Quadro A.1, Anexo A)

4.5.2. Determinação do tempo transcorrido até o final do crescimento celular (t_{fim}) e do tempo transcorrido até início de morte celular (t_{morte})

Esses dois instantes serão importantes para relacionar esgotamentos de substratos ou acúmulo de produtos com o fim do crescimento e com a morte celular. Essa determinação, assim como a de t_{lag} e t_{exp} , é visual como ilustra a Figura 4.2

Figura 4.2. Determinação do tempo transcorrido até o final do crescimento celular (t_{fim}) e do tempo transcorrido até início de morte celular (t_{morte}) (Ensaio Ma-05, Quadro A.1, Anexo A).

4.5.3. Determinação do tempo para que ocorra redução no teor de GPV por 10^7 células, $t_{GPVE_{max}}$ e do tempo transcorrido até se atingir a concentração máxima de GPV, $t_{GPV_{max}}$.

Como nos casos anteriores, essa determinação é visual, como indica a Figura 4.3

Figura 4.3. Determinação de tempo para que ocorra redução no teor de GPV por 10^7 células, ($t_{GPVE_{max}}$) e do tempo transcorrido até se atingir a concentração máxima de GPV ($t_{GPV_{max}}$). (Ensaio Ma-06, Anexo A, Quadro A.1).

4.5.4. Determinação preliminar dos fatores de conversão e de formação, Y

Os fatores de conversão $Y_{X/GLC}$, $Y_{X/GLN}$, $Y_{NH_4/X}$, $Y_{GPV/X}$, $Y_{NH_4/GLN}$, $Y_{GPV/GLC}$, $Y_{ALA/GLC}$, $Y_{ALA/GLN}$ caracterizam relações estequiométricas do processo em andamento. A estimativa preliminar desses parâmetros do modelo foi feita por regressão linear entre as variáveis envolvidas na fase exponencial do crescimento, como exemplificado na Figura 4.4 para o caso do $Y_{GPV/X}$.

Figura 4.4. Exemplo da determinação de fator de rendimento $Y_{GPV/X}$ (Ensaio Ma-06, Quadro A.1, Anexo A).

4.6 Métodos numéricos.

A resolução do conjunto de equações diferenciais não-lineares que representam a dinâmica do processo foi realizada com a sub-rotina SDRIVE que utiliza o método de GEAR para problemas de formulação rígida - *stiff problems* (KAHANER, 1989). O ajuste dos parâmetros das equações diferenciais foi realizado minimizando-se a diferença entre as previsões do modelo e os resultados experimentais, por meio de programa de otimização que utiliza uma subrotina baseada no algoritmo dos poliedros flexíveis proposta por e Nelder e Mead (1965), revisto por Himmelblau (1970) e implementado em linguagem FORTRAN por Bonomi *et al.*(1999).

4.6.1. Função objetivo (FO).

A função objetivo utilizada para o ajuste dos parâmetros foi a somatória quadrática dos desvios, diferença entre o valor previsto pelo modelo e o valor experimental da variável, normalizada pelo valor médio entre esses dois valores (Equação 4.2).

$$FO = SSR = \sum_{j=1}^{nv} \sum_{i=1}^n \sum_{t=1}^m \left(\frac{Y(t,i,j) - \hat{Y}(t,i,j)}{\frac{Y(t,i,j) + \hat{Y}(t,i,j)}{2}} \right)^2 \quad (4.2)$$

Na Equação 4.1 os símbolos utilizados têm os seguintes significados:

$Y(t,i,j)$: valor da variável j , no ensaio i e no instante t ,

$\hat{Y}(t,i,j)$: valor simulado da variável j , no ensaio i e no instante t ,

4.6.2. Avaliação do ajuste.

Os resultados da modelagem são avaliados num primeiro momento pela soma quadrática dos resíduos adimensionalizados, que é a função objetivo, Equação (4.2), e pela comparação dos gráficos das previsões do modelo com os dados experimentais.

Para cada ajuste, calculou-se o coeficiente angular (CA) e o coeficiente de correção (R^2) para a curva $Y(t,i,j)$ vs $\hat{Y}(t,i,j)$ construída com todos os pontos usados no ajuste. Os valores obtidos eram comparados com os valores ótimos (CA = 1 e $R^2 = 1$).

Contudo, a validação do modelo, ou seja, a avaliação criteriosa se o modelo ajusta-se adequadamente aos dados experimentais é realizada pela aplicação da metodologia estatística proposta por Froment e Hosten (1981) e Volestrky e Votruba (1992) e utilizada por Ferraz (1999) e Suárez (2002). O conceito básico utilizado nessa metodologia para o teste de adequação do modelo consiste em considerar que o resíduo quadrático mínimo, dividido pelo número de graus de liberdade do modelo, é uma estimativa não-viciada da variância do erro experimental. Um modelo não-adequado gera uma variância maior que a variância do erro experimental, uma vez que ela representa a estimativa da variância do erro experimental mais

o desvio sistemático do modelo aos dados, também chamado de falta de ajuste do modelo (*lack off fit*, LOF).

A soma quadrática dos resíduos do modelo SS_E é calculada pela Equação 4.3.

$$SS_E = s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{nv} \sum_{i=1}^n \sum_{t=1}^m \left(\frac{Y(t, i, j) - \hat{Y}(t, i, j)}{\frac{Y(t, i, j) + \hat{Y}(t, i, j)}{2}} \right)^2}{Np - p} \quad (4.3)$$

Na qual,

N_p : número de pontos experimentais,

$Y(t, i, j)$: valor da variável j , no ensaio i e no instante t ,

$\hat{Y}(t, i, j)$: valor simulado da variável j , no ensaio i e no instante t ,

p : número de parâmetros

A estimativa da variância experimental é feita realizando-se médias experimentais de ensaios padrão, ou seja, por medida das variáveis experimentais em replicatas de ensaios mantidos em condições de cultivo consideradas como padrão. A variância experimental é calculada pela Equação 4.4;

$$SS_{PE} = \frac{\sum_{t=0}^m \sum_{j=1}^n \left[\frac{Y(t, i, j) - \bar{Y}(i, j)}{\frac{Y(t, i, j) + \bar{Y}(i, j)}{2}} \right]^2}{N_p - N_m} \quad (4.4)$$

Nessa equação,

$Y(t, i, j)$: valor da variável j , no ensaio i e no instante t ,

$\bar{Y}(i, j)$: vetor das medias das variáveis medidas no instante t ,

N_p : número total de pontos experimentais,

N_m : número total de médias de réplicas.

A soma quadrática dos resíduos, SS_E , pode ser dividida em duas fontes de variação: a variação entre as repetições da variável Y nos pontos na qual foi medida, também chamada de erro puro, SS_{PE} , e a variação proveniente da falta de adequação do modelo aos dados experimentais, também denominada falta de ajuste (*lack off it*), SS_{LOF} . Assim, tem-se:

$$SS_E = SS_{PE} + SS_{LOF} \quad (4.5)$$

A variância devido à falta de ajuste é calculada rearranjando-se a Equação 4.5:

$$SS_{LOF} = SS_E - SS_{PE} \quad (4.6)$$

Obtendo-se a variância devido à falta adequação do modelo, SS_{LOF} , é possível obter a relação $F_i = SS_{LOF}/SS_{PE}$ que é uma variável aleatória com distribuição F com $N_p - p$ e $N_m - N_p$ graus de liberdade. A adequação do modelo é testada comparando-se os valores de F_i com valor correspondente valor da função F obtida com os correspondentes graus de liberdade e com grau de significância α . O modelo na qual F_i é maior que $F(N_p - p; N_p - N_m; 1 - \alpha)$ não representa adequadamente o processo (FROMENT; HOSTEN, 1981).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A modelagem matemática do crescimento das células S2AcGPV2 e a da formação da glicoproteína do vírus rábico (GPV) leva a um conjunto mínimo de relações matemáticas que representam a dinâmica do processo e, dessa forma, sintetizam o conhecimento experimental. Essa modelagem é um processo dinâmico e interativo, realizado com auxílio de dados experimentais e hipóteses de trabalho, estas últimas baseadas nas características de um problema real. A modelagem é sempre uma aproximação da realidade e, assim, os conteúdos, a linguagem e os recursos matemáticos necessários devem estar em equilíbrio com os objetivos que se espera do modelo. Baseado em Bassanezi (2002) é possível indicar as principais etapas na formulação de um modelo validado, conforme indica Figura 5.1.

Figura 5.1. Principais etapas da modelagem matemática. FONTE: baseado em Bassanezi (2002)

No estudo de uma situação-problema, como o crescimento celular e formação de uma proteína, é necessário transformar o problema original, problema não-matemático, em um problema matemático, ou seja, é necessário estabelecer relações matemáticas entre as variáveis características do processo. Essas relações decorrem da aplicação de balanços materiais e da utilização de certos modelos cinéticos, admitidos como válidos. O problema matemático resultante é constituído por um conjunto de equações que indicam como

substratos e produtos variam no tempo. Evidentemente existe uma interdependência entre hipóteses necessárias à formulação do problema matemático e a experimentação, pois esta última pode confirmar ou negar as hipóteses admitidas.

As hipóteses de trabalho constituem, por sua vez, a base fundamental da transformação de um problema não-matemático em um problema matemático. As hipóteses constituem expectativas fundamentadas sobre o problema em estudo e partem de um referencial teórico, ou de forma mais geral, de paradigmas estabelecidos no campo de estudo no qual o problema está enquadrado. As hipóteses constituem, portanto, um conjunto de pressupostos que permitem definir as variáveis relevantes e as relações entre elas que deverão ser avaliadas fazendo-se a comparação entre as previsões do modelo formulado e os resultados experimentais. A partir da avaliação dos resultados, ou de forma mais rigorosa, de testes estatísticos de validação do modelo, pode-se aceitar o modelo como uma descrição adequada dos fenômenos observados ou concluir pela inadequação do modelo proposto e pela necessidade de adotar novas hipóteses que modificarão o modelo proposto.

No caso em estudo, o problema matemático é constituído por um conjunto de equações diferenciais não-lineares que representam a dinâmica do processo. A solução do problema significa, portanto, a integração numérica do conjunto dessas equações. Os resultados da modelagem são avaliados, num primeiro momento, pela soma quadrática dos resíduos adimensionalizada, SSR, (ver item 4.6.2), e pela comparação gráfica das previsões do modelo com os dados experimentais.

No desenvolvimento deste trabalho houve uma sequência que levou à utilização de diferentes conjuntos de dados e formulações de modelos a ser destacada para auxiliar na compreensão da evolução deste trabalho.

O primeiro conjunto de dados utilizados foram os obtidos por Batista (2007), Galesi (2007) e Swiech (2007), pesquisadores do projeto temático que desenvolveram estudos de avaliação da influência dos meios de cultura no crescimento e fisiologia da célula S2AcGPV2. Esses dados permitiram uma primeira compreensão do problema, o equacionamento de modelos e, ainda, permitiram a análise preliminar de parâmetros e grandezas cinéticas.

Para o ajuste desses modelos foram utilizados os ensaios realizados por Aguiar *et al.* (2009) e Aguiar (2010), mais especificamente, os ensaios Ma-02 a Ma-06 com cultivos da célula

S2AcGPV2-KTC100 e Ma-07 a Ma-10 com a célula S2AcGPV2. Os modelos desta etapa serão aqui considerados **modelos** e ajustes **preliminares**.

Num outro momento, em função de novos ensaios realizados por Aguiar (2010), foram feitas alterações e novas proposições aos modelos que consideraram a influência das condições de cultivo em particular, da concentração de pO_2 . Os ensaios utilizados nessa etapa foram os ensaios Ma-02 e Ma-03 com a S2AcGPV2-KTC100 e os ensaios Ma-07 a Ma-10 com a célula S2AcGPV2 e correspondem aos modelos que incorporam essas influências nos **fatores de conversão influenciados pelo teor de oxigênio dissolvido**.

Finalmente, já dispondo de todo o conjunto de ensaios realizados por Aguiar (2010) com a célula S2AcGPV2 e, em especial, dispondo das análises de aminoácidos, foram estudados novos fenômenos do cultivo e ampliado o entendimento da influência das condições de cultivo, especialmente das concentrações de glicose e glutamina no metabolismo do processo. Os ensaios utilizados nesta etapa para formulação de modelo e ajuste de parâmetros foram os ensaios Ma-07 a Ma-17 com a célula S2AcGPV2. Os modelos formulados serão considerados os mais completos, pois, além das correções do fator de conversão por oxigênio, os modelos também incorporam a influência de glicose e glutamina nos fatores de conversão e incorporam na dinâmica do cultivo, ainda, alterações **de metabolismo em função das concentrações de glicose e glutamina**.

5.1 Modelos preliminares

O primeiro entendimento do projeto temático considerava que a modelagem matemática seria realizada a partir dos dados obtidos pelos outros grupos participantes do projeto cujos objetivos não eram a modelagem matemática do processo, mas estudar meios de cultura adequados (BATISTA, 2007; GALESI, 2007) ou aspectos do crescimento e fisiologia da célula (SWIECH, 2007). Esses dados permitiram uma primeira compreensão do problema e um primeiro equacionamento do modelo. Permitiram, ainda, a análise preliminar de grandezas cinéticas. Considerando os valores de algumas dessas grandezas características do cultivo das células S2AcGPV, tais como a velocidade específica de crescimento, a concentração máxima de GPV, o teor máximo de GPV (massa de GPV em 10^7 células máxima, $GPV_{E,max}$), valores indicados na Tabela 5.1, observava-se uma grande variação nos valores encontrados, especialmente nas grandezas relacionadas a GPV.

Tabela 5.1. Variação dos parâmetros de cultivo das células S2AcGPV2 e S2AcGPV2-KTC100.

Fonte, meio de cultura, célula, método GPV	Ensaio	$\mu_{X_{max}}$ (h ⁻¹)				GPV _{Max} (ng/mL)				GPV _{E,Max} (ng/mL)			
		Valor	Média	DP	CV (%)	Valor	Média	DP	CV (%)	Valor	Média	DP	CV (%)
Galesi (2007), TC100, S2AcGPV2, GPV ⁽¹⁾	RE-01	1,73E-02				98,2				359			
	RE-02	1,93E-02				199				397			
	RE-03	2,17E-02	2,26E-02	4,79E-03	21,1	44,5	118,3	57,6	48,6	88,3	331	1,37E+02	41,5
	RE-04	2,90E-02				105				406			
	RE-05	2,59E-02				145				406			
Swiech (2007), SF900 II, S2AcGPV2, GPV ⁽¹⁾	Bio_02	4,30E-02				13,4				80,2			
	Bio_03	4,43E-02	4,35E-02	5,54E-03	12,7	7,00	12,0	3,68	30,8	55,8	47,2	3,00E+01	63,6
	Bio_04	3,66E-02				15,7				8,13			
	Bio_05	5,01E-02				11,7				44,5			
Batista (2007), IPL 41, S2AcGPV2, GPV ⁽¹⁾	5%	2,89E-02				23,2				61,2			
	20%	2,00E-02				26,6				62,8			
	40%	1,94E-02	2,60E-02	6,18E-03	23,8	30,9	18,5	11,9	64,3	66,8	56,1	1,09E+01	19,4
	60%	3,39E-02				5,70				49,8			
	95%	2,76E-02				5,90				40,3			
Aguiar (2010), TC100, S2AcGPV2-KTC100, GPV ⁽²⁾	Ma-02	2,50E-02				1092				661			
	Ma-03	2,87E-02	2,44E-02	3,78E-03	15,5	1124	712	474	66,6	1180	895	2,79E+02	31,1
	Ma-04	2,43E-02				163				652			
	Ma-06	1,95E-02				469				1089			
Aguiar (2010), TC100, S2AcGPV2, GPV ⁽²⁾	Ma-07	2,63E-02				1108				2140			
	Ma-08	2,40E-02	2,00E-02	1,16E-02	57,7	1021	878	473	53,9	2800	2187	4,51E+02	20,6
	Ma-09	2,80E-03				177				2090			
	Ma-10	2,70E-02				1205				1716			

Obs. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação = 100* DP/Média ; GPV⁽¹⁾ = determinação de GPV inicial ; GPV⁽²⁾ determinação de GPV com alteração na preparação do pellet celular (ASTRAY *et al.*, 2008).

Essa variação dos valores pode ser explicada pela evolução na metodologia analítica havida ao longo dos trabalhos, por exemplo, na extração de GPV e preparação de pellet para quantificação da proteína, e que afetou os principalmente os primeiros resultados. Também podem ser explicados pela capacidade de ajuste metabólico da célula S2 às condições ambientais do cultivo.

Esse importante aspecto do cultivo das células S2 já foi indicado por Bovo *et al.* (2008) que justificaram essas variações das velocidades específicas, das concentrações máximas de GPV e dos fatores de conversão/formação como decorrência da adaptação do metabolismo das células *D. melanogaster*, S2, às condições ambientais dos cultivos em função de adaptação e seleção de subpopulações aos diferentes meios utilizados. A variação de resultados exige cuidados especiais na escolha dos dados a serem utilizados para definição e ajuste do modelo. Uma vez que o conjunto de ensaios apresentava as maiores concentrações de GPV, objetivo fundamental do processo e, ainda, por serem ensaios pensados e planejados para modelagem matemática do cultivo, evidentemente, optou-se por utilizar os dados de Aguiar (2010). Evidentemente os dados selecionados também apresentam uma variação importante, porém os dados utilizados apresentam algumas características fundamentais para a modelagem. Além de buscar uma padronização da célula e do preparo de inóculo, todo o planejamento experimental dos ensaios visa identificar os possíveis fatores que interferem no processo. Nos ensaios considerados, por exemplo, foram padronizadas as demais condições experimentais e testou-se a influência do oxigênio dissolvido. Assim, as alterações podem ser relacionadas com variáveis do processo controladas (neste caso, a concentração de oxigênio dissolvido) e podem ser incorporadas ao modelo.

Vale ressaltar que a flexibilidade metabólica da linhagem celular estudada, bem como o fato de que os dados usados nas construções dos modelos preliminares foram gerados por diferentes grupos, dificultou de maneira clara todo o processo de modelagem.

O primeiro conjunto de dados foi obtido com a célula S2AcGPV2-KTC100 e que passou a expressar nível significativamente maior de GPV, ensaios Ma-02, Ma-03, Ma-04 e Ma-06. O segundo conjunto de dados foi obtido com a célula S2AcGPV adaptada ao meio TC100 suplementado (GALESI, 2007), ensaios Ma-07 a Ma-17.

5.1.1 Modelo 1. Hipóteses consideradas na modelagem

Esse modelo é constituído por seis equações diferenciais e dezessete parâmetros que foram inicialmente ajustados aos dados de dois ensaios (Ma-02 e Ma-03) e, posteriormente, ao conjunto dos ensaios Ma-02, Ma-03, Ma-04 e Ma-06. Para a formulação do primeiro conjunto de equações que constituem o Modelo 1, foram consideradas as seguintes hipóteses que estão incorporadas no conjunto de equações da Tabela 5.2.

a) Cinética homogênea.

Como indicado no item 3.1 da revisão, as células de inseto não são dependentes de ancoragem e são cultivadas em suspensão, em tanques agitados. As condições de agitação e de aeração permitem considerar esta hipótese como perfeitamente adequada para modelagem do processo.

Tabela 5.2. Equações do Modelo 1a e 1b

Equação	Nº.
$\mu_x = \mu_{X\max} \cdot \left[\frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \right] \cdot \left[\frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \right] \cdot \left[\frac{k_{iNH4}}{k_{iNH4} + NH_4} \right]$	[5.1.1]
$\mu_m = k_m \cdot \left[\frac{k_{mGLC}}{k_{mGLC} + GLC} \right] \cdot \left[\frac{k_{mGLN}}{k_{mGLN} + GLN} \right] \cdot \left[\frac{NH_4}{k_{mNH4} + NH_4} \right]$	[5.1.2]
$\mu_{NH4} = \alpha_{NH4} \cdot \mu_x$	[5.1.3]
$\mu_{GPV} = \alpha_{GPV} \cdot \mu_x$	[5.1.4]
$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_x - \mu_m) \cdot X_v$	[5.1.5]
$\frac{dX_d}{dt} = \mu_m \cdot X_v$	[5.1.6]
$\frac{dGLC}{dt} = \frac{-\mu_x \cdot X_v}{Y_{Xv/GLC}} - \left[\frac{\mu_{GPV} \cdot X_v}{Y_{GPV/GLC}} \right] - m_S \cdot X_v$	[5.1.7]
$\frac{dGLN}{dt} = \frac{-\mu_x \cdot X_v}{Y_{Xv/GLN}} - \left[\frac{\beta \cdot \mu_x \cdot X_v}{Y_{NH4/GLN}} \right]$	[5.1.8]
$\frac{dNH_4}{dt} = -\mu_{NH4} \cdot X_v$	[5.1.9]
$\frac{dGPV}{dt} = \mu_{GPV} \cdot X_v - k_{dGPV} \cdot GPV$	[5.1.10]

b) A velocidade específica de crescimento é limitada por glicose e glutamina e inibida por amônio (Equação 5.1.1). A limitação do crescimento por glicose e glutamina são referências comuns na literatura consultada (De TREMBAY et al, 1992; MILLER; BLANCH ;WILKE, 1988; DALILI; SAYLES; OLLIS, 1990; PÖRTNER; SCHAFER, 1996). A limitação por glicose foi verificada experimentalmente, especialmente, por Batista (2007) que utilizou meio IPL 41 modificado. A limitação por glutamina também foi constatada experimentalmente por Batista (2007) e Swiech (2007) que utilizaram os meios Tc100 e Sf900, respectivamente, embora Galesi *et al.* (2008) afirmem que nas condições estudadas este aminoácido não foi um fator limitante na cultura de células S2AcGPV2. Nesse último caso, há indicação de uma possível inibição do crescimento pela formação de amônio no meio de cultura. Lactato, outro inibidor comumente identificado em cultura de células animais, não foi considerado, pois os níveis observados foram muito baixos (inferiores a 0,55 g/L).

c) A velocidade específica de morte celular é inibida por glicose e glutamina e limitada por amônio (Equação 5.1.2). A revisão indica que as presenças de lactato e amônio no meio de cultura estimulam a morte celular. A glutamina e a glicose, ao contrário, são fatores que inibem a morte. Foi proposta uma expressão para a velocidade específica de morte celular que incorpora, de forma simples, a influência da glicose, glutamina e amônio na morte celular, ou seja, inibição hiperbólica de glicose e glutamina e limitação à morte celular, tipo Monod, para o amônio.

d) O consumo de glicose foi considerado para três finalidades do metabolismo celular: crescimento, formação de GPV e manutenção celular (Equação 5.1.7). Neste caso não se considera a formação de outros subprodutos do cultivo como a formação, por exemplo, de lactato ou de alanina. Como já apontado anteriormente, a formação de lactato foi desprezada, pois a concentração máxima encontrada para esse subproduto foi de 0,55 g/L. A alanina não foi considerada nesta etapa, pois os dados ainda não estavam disponíveis. Como indicado por Galesi *et al.* (2008) e Ikonomou *et al.* (2003), a formação de alanina é importante quando glicose e aminoácidos estão em excesso no meio de cultura, o que pode ser o caso do presente estudo. Posteriormente essas análises relativas à formação de alanina foram realizadas e os dados obtidos em Aguiar *et al.* (2009) e Aguiar (2010).

e) O consumo de glutamina foi considerado para duas finalidades: formação de células viáveis e consumo de glutamina para formação de amônio (Equação 5.1.8).

f) A formação de NH_4^+ é associada ao crescimento celular (Equação 5.1.3). Os dados disponíveis indicam formação de amônio ao longo de todo o cultivo, embora também se verifique a formação de amônio durante as fases estacionária e de declínio. Esta hipótese, embora em desacordo com os dados experimentais, foi adotada como uma primeira aproximação do problema.

g) A formação de GPV é associada ao crescimento celular (Equação 5.1.4). Como a GPV é uma proteína constitutiva, expressa na membrana celular, faz sentido que a sua síntese esteja associada à velocidade específica de crescimento.

h) Ocorre degradação de GPV (Equação 5.1.10). Como indica a Figura 5.2 e os dados experimentais obtidos por Batista (2007), Galesi (2007), Swiech (2007) e Aguiar (2010), ocorrem diminuições da concentração e do teor de GPV nas células. Essa diminuição, no caso indicado na Figura 5.2, ocorre desde início da fase estacionária do cultivo e o fenômeno foi incorporado como uma degradação com cinética de primeira ordem (proporcional à concentração da proteína).

Figura 5.2. Variação da concentração de GPV e do teor de GPV nas células S2AcGPV2 (Ensaio Ma-3, Quadro A.1, Anexo A). t_{EXP} - linha contínua azul; t_{FIM} - linha tracejada azul; t_{MORTE} - linha tracejada vermelha; $t_{\text{GPVE,max}}$ - linha contínua preta; $t_{\text{GPV,max}}$ - linha tracejada preta.

Os parâmetros ajustados e os resultados do ajuste estão indicados nas Figuras 5.3 e 5.4, e na Tabela 5.3 (Modelo 1a).

A partir das Figuras 5.3 e 5.4, constata-se que o modelo não se ajusta adequadamente aos dados experimentais sendo que as previsões do modelo para o crescimento em um ensaio aproximam-se do observado e, em outro ensaio, subestimam o crescimento.

Figura 5.3. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1a para o ensaio Ma-02, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.4. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1a para o ensaio Ma-03, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Tabela 5.3. Valores dos parâmetros para os diversos modelos.

	Modelo 1a (Ma-02 e Ma-03)	Modelo 1b (Ma-02; Ma-03; Ma-04; Ma-06)	Modelo 2 (Ma-07 a Ma-10)	Modelo 3 (Ma-07 a Ma-10)	Modelo 4 (Ma-07 a Ma-10)	Modelo 5 (Ma-02 a M3)
Célula	S2AcGPV2-KTC100	S2AcGPV2-KTC100	S2AcGPV2	S2AcGPV2	S2AcGPV2	S2AcGPV2-KTC100
pO₂(%)	(5, 30)	(5,30,50,80)	(5,30,50,80)	(5,30,50,80)	(5,30,50,80)	(5, 30)
Parâmetro	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
μ_{Xmax} (1/h)	0,778E-01	0,995E-01	0,776E-01	0,999E-01	0,500E-01	0,258E-01
k_{GLC} (g/L)	0,291E-01	0,178E-02	0,202E+00	0,120E+00	0,218E-02	0,411E+00
k_{GLN} (g/L)	0,779E+00	0,156E+01	0,200E+01	0,762E+00	0,666E+00	0,456E+00
k_{iNH_4} (g/L)	0,268E-01	0,149E-01	0,492E-01	0,188E-02	0,498E-01	0,132E+00
k_m (1/h)	0,315E-01	0,156E+00	0,179E-01	0,313E-03	0,103E-01	0,308E-01
k_{mGLC} (g/L)	0,380E+01	0,883E+01	0,887E+01	0,318E+02	0,412E+01	0,337E+01
k_{mGLN} (g/L)	0,433E+02	0,770E+02	0,993E+02	0,997E+02	0,999E+01	0,964E+01
k_{mNH_4} (g/L)	0,403E+01	0,951E+01	0,303E+01	0,323E-01	0,703E+00	0,432E+00
α_{GPV} ($\mu\text{g}/10^7\text{cel}$)	0,628E+01	0,103E+01	0,262E+01	0,101E+01	0,107E+02	0,496E+01
Y_{XGLC} (10^7cel/g)	0,274E+03	0,579E+03	0,308E+03	0,412E+03	0,635E+03	0,133E+03
$Y_{GPV/GLC}$ ($\mu\text{g/g}$)	0,635E+04	0,254E+04	0,515E+03	0,746E+03	0,393E+05	0,825E+05
m_s (1/h)	0,104E-07	0,471E-04	0,328E-05	0,283E-05	0,326E-04	0,157E-05
$Y_{X/GLN}$ (10^7cel/g)	0,935E+03	0,369E+03	0,803E+03	0,152E+04	0,326E+04	0,761E+03
β_{NH_4} ($\text{mg}/10^7\text{cel}$)	0,402E-03	0,194E-03	0,272E-03	0,622E-02		
α_{NH_4} ($\text{g}/10^7\text{cel}$)	0,622E-04	0,327E-04	0,635E-04	0,575E-04	0,999E+00	0,428E-04
$Y_{NH_4/GLN}$ (g/g)	0,998E+03	0,576E+03	0,175E+03	0,963E+03	0,467E+03	0,206E+01
k_{dGPV} (1/h)	0,835E-01	0,833E-02	0,148E-01	0,654E-03	0,122E-01	0,278E-01
k_{O_2} (mg/L)			0,219E-01	0,226E-01		
W (mg/L)			0,818E+02	0,559E+02 ^(*)		
n				0,139E+01		
$Y_{X/GLU}$ (10^7cel/g)						0,238E+04
$Y_{NH_4/GLU}$ (mg/g)						0,142E+04
Ensaios	2	4	4	4	4	2
SSR	89,8	125	156	217	707	107
SSE	0,544	0,480	0,564	0,788	0,258	0,692

$$(*) \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right)^{\left(\frac{n-1}{n} \right)}$$

O consumo de glutamina é subestimado nos dois ensaios. O modelo também prevê concentrações de NH_4^+ menores que as determinadas experimentalmente e uma degradação intensa da GPV, não suficientemente caracterizada pelos dados utilizados. Observa-se no ensaio Ma-02 um crescimento bem superior ao do ensaio Ma-03. Nos dois ensaios foram mantidas as mesmas condições experimentais, com exceção do nível de oxigênio dissolvido (5% no ensaio Ma-02 e 30 % no ensaio Ma-03). Uma possível razão para a inadequação do ajuste pode estar no fato de que o modelo não leva em conta o efeito do oxigênio no metabolismo celular. Após esta tentativa, o modelo foi ajustado aos ensaios Ma-02, Ma-03, Ma-04 e Ma-06 (Quadro A.1, Anexo A). Os parâmetros ajustados e os resultados do ajuste estão indicados nas Figuras 5.5 a 5.8 e na Tabela 5.3, Modelo 1b.

Figura 5.5. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-02, $\text{pO}_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.6. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-03, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.7. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-04, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.8. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 1b para o ensaio Ma-06, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Analisando as Figuras 5.5 a 5.8, constata-se que o modelo 1b apresenta um ajuste pior aos dados experimentais em comparação ao ajuste indicado nas Figuras 5.3 e 5.4 (Modelo 1a). A falta de ajuste é mais evidente para altas concentrações de células viáveis, ou seja, o modelo prevê crescimento baixo, tendência que se observa em três dos quatro ensaios considerados. Como a medida de glutamina não estava disponível para todos os ensaios, o seu ajuste e as previsões do modelo ficaram comprometidos. O modelo também subestima as taxas de formação de NH_4^+ , especialmente após a fase estacionária de crescimento. Como não se caracterizou um padrão na formação de GPV nos diversos ensaios considerados, as previsões do modelo proposto não parecem adequadas, pois não reproduzem as diversas tendências observadas. Destaque-se, ainda, que os dados já indicavam uma influência do teor de oxigênio dissolvido no crescimento e na formação de GPV, fator não considerado no Modelo 1 (a e b).

5.1.2 Modelo 2. Influência do oxigênio dissolvido sobre o crescimento.

Por problemas de preservação, a célula S2AcGPV2-KTC100 foi perdida e isso obrigou Aguiar (2010) a repetir os experimentos de estudo da influência do pO₂ com a linhagem S2AcGPV2.

Realizou-se o ajuste do modelo ao conjunto de dados disponíveis, ensaios Ma-7 a Ma-10, nos quais também se variou a concentração de oxigênio dissolvido. A avaliação preliminar dos parâmetros indicou inibição do crescimento, marcado pela redução da velocidade específica de crescimento à medida que aumentou a disponibilidade de oxigênio dissolvido, como indica a Figura 5.9.

Figura 5.9. Influência do teor de oxigênio dissolvido na velocidade específica máxima de crescimento, Célula S2AcGPV2 para o conjunto de ensaios Ma-7 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

Para incorporar esse efeito inibitório, foi realizado um novo equacionamento para velocidade específica de crescimento, introduzindo a forma de inibição proposta por Andrews (1968) e mantendo as demais hipóteses do modelo 1 e as equações correspondentes (5.1.1 a 5.1.10, Tabela 5.1). A alteração proposta está indicada na Equação 5.2.1 e os resultados podem ser visualizados nas Figuras 5.10 a 5.13. Os valores encontrados para os parâmetros estão indicados na Tabela 5.3 (Modelo 2).

$$\mu_X = \mu_{X_{\max}} \cdot \left[\frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \right] \cdot \left[\frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \right] \cdot \left[\frac{k_{iNH_4}}{k_{iNH_4} + NH_4} \right] \cdot \left[\frac{O_2}{k_{O_2} + O_2 + \frac{O_2^2}{W}} \right] \quad (5.2.1)$$

Figura 5.10. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-07, Célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.11. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.12. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-09, S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.13. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 2 para o ensaio Ma-10, S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Analisando-se as Figuras 5.10 a 5.13 constata-se que a alteração proposta, modelo 2, não foi suficiente para explicar as variações do comportamento cinético encontradas nos ensaios nos quais se verifica uma forte inibição do crescimento por níveis elevados de oxigênio dissolvido. Em consequência, os ensaios MA-07 e Ma-10, sem inibição por oxigênio, ajustam-se ao modelo.

5.1.3 Modelo 3. Influência do Oxigênio sobre o crescimento

Foram admitidas as mesmas hipóteses do modelo 1 (mesmas equações 5.1.1 a 5.1.10) e, neste caso, inclui-se a inibição do O_2 na velocidade específica de crescimento segundo o modelo de Wu (1988) e utilizando os mesmo ensaios do caso anterior (Ma-07 a Ma-10). A alteração proposta está indicada pela Equação 5.3.1 e os resultados podem ser visualizados nas Figuras 5.14 a 5.18. Os valores encontrados para os parâmetros estão indicados na Tabela 5.3 (Modelo 3).

$$\mu_X = \mu_{X\max} \cdot \left[\frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \right] \cdot \left[\frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \right] \cdot \left[\frac{k_{iNH_4}}{k_{iNH_4} + NH_4} \right] \cdot \left[\frac{O_2}{1 + \frac{k_{O_2}}{O_2} + \left(\frac{O_2}{W} \right)^n} \right] \quad (5.3.1)$$

Figura 5.14. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-7, Célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.15. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-8, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.16. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-9, S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.17. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 3 para o ensaio Ma-10, S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Analisando as Figuras e resíduo do ajuste constata-se que a alteração proposta no modelo 3 é ainda pior que o ajuste anterior, pois a somatória quadrática dos desvios adimensionalizada é maior (Tabela 5.3). O modelo tende a superestimar a inibição pelo oxigênio e os melhores ajustes ocorrem nos ensaios com forte inibição por oxigênio (ensaios Ma-08 e Ma-10). Aguiar (2010) lembra que a literatura indica alta sensibilidade das células de *Drosophila melanogaster* a altas concentrações de oxigênio dissolvido, especialmente na fase larval do seu desenvolvimento e que as células S2 são células da larva do inseto.

5.2 Modelos que incorporam a influência do oxigênio dissolvido no metabolismo via fatores de conversão.

Aguiar (2010) também observou a influência do teor de oxigênio dissolvido no metabolismo celular. Com base nessas observações, buscou-se incorporar a influência do oxigênio dissolvido no metabolismo das células S2 e, dessa forma, incorporar a variabilidade metabólica observada nos cultivos. Isso foi realizado por meio da utilização de fatores de correção sobre algumas grandezas cinéticas como a velocidade específica de crescimento e

fatores de conversão. Essa tentativa levou à formulação dos modelos caracterizados por incorporar mudanças metabólicas e que são apresentados a seguir.

5.2.1. Modelo 4. Influência do oxigênio sobre o crescimento e metabolismo.

Foram admitidas as mesmas hipóteses a) até h) do modelo 1 (Equações 5.1.1 a 5.10) e foram incorporados fatores de correção (Fci) para indicar o efeito do oxigênio sobre as grandezas cinética avaliadas (ver Tabela 5.4 e comentários a seguir).

Tabela 5.4. Equações do modelo 4.

Equação	Nº.
$\mu_X = Fc_1 * \mu_{Xmax} * \left[\frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \right] \left[\frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \right] \left[\frac{k_{iNH4}}{k_{iNH4} + NH_4} \right]$	[5.4.1]
$Fc_1 = (\mu_{Xmax,i}) / \max(\mu_{Xmax,i})$	
$\mu_m = k_m \cdot \left[\frac{k_{mGLC}}{k_{mGLC} + GLC} \right] \left[\frac{k_{mGLN}}{k_{mGLN} + GLN} \right] \left[\frac{NH_4}{k_{mNH4} + NH_4} \right]$	[5.4.2]
$\mu_{NH4} = Fc_5 * \alpha_{NH4} \cdot \mu_X$	[5.4.3]
$Fc_5 = Y_{NH4/X,i} / \max(Y_{NH4/X,i})$	
$\mu_{GPV} = Fc_3 * \alpha_{GPV} \cdot \mu_X$	[5.4.4]
$Fc_3 = Y_{GPV/X,i} / \max(Y_{GPV/X,i})$	
$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_X - \mu_m) \cdot X_v$	[5.4.5]
$\frac{dX_d}{dt} = \mu_m \cdot X_v$	[5.4.6]
$\frac{dGLC}{dt} = \left[\frac{-\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLC} \cdot Fc_2} \right] - \left[\frac{\mu_{GPV} \cdot X_v}{Y_{GPV/GLC} \cdot Fc_4} \right] - m_S \cdot X_v$	[5.4.7]
$Fc_2 = Y_{X/GLC,i} / \max(Y_{X/GLC,i})$	
$Fc_4 = Y_{GPV/GLC,i} / \max(Y_{GPV/GLC,i})$	
$\frac{dGLN}{dt} = \left[\frac{-\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLN}} \right] - \left[\alpha_{NH4} \frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{NH4/GLN}} \right]$	[5.4.8]
$\frac{dNH_4}{dt} = \mu_{NH4} \cdot X_v$	[5.4.9]
$\frac{dGPV}{dt} = \mu_{GPV} \cdot X_v - k_{dGPV} \cdot GPV$	[5.4.10]
$\frac{dO_2}{dt} = 0$	[5.4.11]

As alterações descritas na Tabela 5.4 são:

a) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido na velocidade específica de crescimento, μ , por meio do fator de correção Fc_1 , calculado como relação entre $\mu_{X_{max}}$ do ensaio e o valor

máximo entre os vários $\mu_{X_{max}}$ determinados, $Fc_1 = \frac{\mu_{X_{max},i}}{\max(\mu_{X_{max},i})}$, indicado na Figura 5.18 (Equação 5.4.1, Tabela 5.4).

b) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator de global conversão de glicose em células, $Y_{X/GLC}$, por meio do fator de correção Fc_2 , calculado como a relação entre $Y_{X/GLC}$

do ensaio i e o valor máximo entre os vários $Y_{X/GLC}$ determinados $Fc_2 = \frac{Y_{X/GLC,i}}{\max(Y_{X/GLC,i})}$, indicado na Figura 5.19 (Equação 5.4.7, Tabela 5.4).

Figura 5.18. Fator de correção Fc_1 , $\mu_{X_{max},i}/\max(\mu_{X_{max},i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

c) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator global de formação de GPV pelas células, $Y_{GPV/X}$, por meio do fator de correção, Fc_3 , calculado como relação entre $Y_{GPV/X}$ do ensaio i e o valor máximo entre os vários $Y_{GPV/X}$ determinados,

$Fc_3 = \frac{Y_{GPV/X,i}}{\max(Y_{GPV/X,i})}$, indicado na Figura 5.20 (Equação 5.4.4, Tabela 5.4).

Figura 5.19. Fator de correção F_{c2} , $Y_{X/GLC,i}/\max(Y_{X/GLC,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

Figura 5.20. Fator de correção F_{c3} , $Y_{GPV/X,i}/\max(Y_{GPV/X,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

d) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator global de conversão glicose em GPV, $Y_{GPV/GLC}$, por meio do fator de correção F_{c4} , calculado como relação entre $Y_{GPV/GLC}$ do ensaio e o valor máximo entre os vários $Y_{GPV/GLC}$ determinados,

$$F_{c4} = \frac{Y_{GPV/GLC,i}}{\max(Y_{GPV/GLC,i})}, \text{ indicado na Figura 5.21 (Equação 5.4.7, Tabela 5.4).}$$

Figura 5.21. Fator de correção Fc_4 , $Y_{\text{GPV/GLC},i}/\max(Y_{\text{GPV/GLC},i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

f) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator global de formação de NH_4^+ pelas células, $Y_{\text{NH}_4/\text{X}}$, por meio do fator de correção Fc_5 , calculado como a relação entre $Y_{\text{NH}_4/\text{X}}$ do ensaio i e o valor máximo entre os vários $Y_{\text{NH}_4/\text{X}}$ determinados,

$$Fc_5 = \frac{Y_{\text{NH}_4/\text{X},i}}{\max(Y_{\text{NH}_4/\text{X},i})}, \text{ indicado na Figura 5.22 (Equação 5.4.3, Tabela 5.4).}$$

Figura 5.22. Fator de correção Fc_5 , $Y_{\text{NH}_4/\text{X},i}/\max(Y_{\text{NH}_4/\text{X},i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2

Dessa forma, incorpora-se a influência do oxigênio dissolvido no modelo, não apenas na velocidade específica de crescimento, mas também sobre os parâmetros relacionados ao metabolismo celular ($Y_{X/GLC}$, $Y_{GPV/X}$, $Y_{GPV/GLC}$, $Y_{NH4/X}$). Além dos fatores de correção, foram ainda feitas outras duas modificações em relação aos modelos anteriores. Como todos os fatores são funções do oxigênio dissolvido - mantido constante, mas distinto em cada ensaio - essa variável foi incorporada como variável de estado do modelo com dinâmica nula (Equação [5.4.11], Tabela 5.4). Além disso, adotou-se um único parâmetro para modelar a velocidade de formação de NH_4^+ , α_{NH4} , indicado na Equação [5.4.8] e que nos modelos anteriores formulada pela Equações [5.1.8] com dois parâmetros α_{NH4} e β_{NH4} .

Esse novo modelo é constituído por onze equações diferenciais e dezesseis parâmetros que foram ajustados ao conjunto de dados dos ensaios Ma-07, Ma-08, Ma-09 e Ma-10, (Quadro A1, Anexo A).

Os resultados do ajuste do modelo 4 estão indicados nas Figuras 5.23 a 5.26 e na Tabela 5.3 (Modelo 4).

Figura 5.23. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-07, Célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.24. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-8, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.25. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-09, S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A), (linha contínua, previsões do modelo, símbolos azuis, dados experimentais).

Figura 5.26. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 4 para o ensaio Ma-10, S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Analisando as Figuras 5.23 a 5.26, constata-se um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Contudo podem ser destacadas algumas previsões do modelo, não observadas experimentalmente. No ensaio Ma-07, Figura 5.23, o modelo prevê um esgotamento da glutamina, após 150 horas de cultivo, que determina uma antecipação da fase estacionária do crescimento. O modelo indica uma destacada degradação da proteína formada que, diante da flutuação das medidas de GPV, especialmente no ensaio Ma-07, deve ser ainda conferida. Verifica-se, portanto, que a incorporação dos fatores de correção dependentes da concentração de oxigênio dissolvido auxilia a modelagem do cultivo e prevê um conjunto de relações importantes entre as variáveis do processo. Por outro lado, existem os aspectos ainda não adequadamente equacionados e a incorporação de fatores de correção traz consigo os riscos de uma solução particular, embora adequada, a um conjunto particular de dados, ou seja, traz o risco de uma solução *ad hoc* com perda de generalidade a que todo o modelo se propõe. Contudo, face às tentativas anteriores, verifica-se que é uma forma para incorporar mudanças metabólicas identificadas no cultivo.

5.2.2 Modelo 5. Consumo de glutamato

Nos ensaios Ma-02 e Ma-03, realizados com célula S2AcGPV-KTC100, foram feitas análises de glutamina e glutamato. Isso permitiu que fossem avaliadas as concentrações desses dois compostos, que se orientasse o ajuste com esses novos dados, que se avaliasse a influência da concentração de oxigênio dissolvido nos fatores de consumo e, ainda, que se identificasse se houve consumo simultâneo ou preferencial desses substratos. Os dados obtidos permitiram identificar consumo preferencial de glutamina em relação a glutamato como indica a Figura 5.27.

Figura 5.27. Consumo de glutamina e glutamato no ensaio Ma-02, célula S2AcGPV2-KTC100. A linha vertical indica o limiar de concentração de glutamina para início do consumo de glutamato.

Foi também foi identificada a influência do oxigênio dissolvido nos fatores de rendimento desses mesmos substratos. Assim, para a nova proposta de modelo, foram incorporadas as hipóteses propostas anteriores para o Modelo 4, assim como a adição de novos fatores de correção. O novo conjunto de equações que representa o Modelo 5 está indicado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Equações do modelo 5

Equação	Nº
$\mu_X = Fc_1 * \mu_{X_{max}} * \left[\frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \right] \left[\frac{S_{NT}}{k_{NT} + S_{NT}} \right] \left[\frac{k_{iNH4}}{k_{iNH4} + NH_4} \right]$ $S_{NT} = GLN + GLU$ $Fc_1 = (\mu_{X_{max},i}) / \max(\mu_{X_{max},i})$	[5.5.1]
$\mu_m = k_m \cdot \left[\frac{k_{mGLC}}{k_{mGLC} + GLC} \right] \left[\frac{k_{mGLN}}{k_{mGLN} + GLN} \right] \left[\frac{NH_4}{k_{mNH4} + NH_4} \right]$	[5.5.2]
$\mu_{NH4} = Fc_5 * \alpha_{NH4} \cdot \mu_X$ $Fc_5 = Y_{NH4X,i} / \max(Y_{NH4X,i})$	[5.5.3]
$\mu_{GPV} = Fc_3 * \alpha_{GPV} \cdot \mu_X$ $Fc_3 = Y_{GPVX,i} / \max(Y_{GPVX,i})$	[5.5.4]
$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_X - \mu_m) \cdot X_v$	[5.5.5]
$\frac{dX_d}{dt} = \mu_m \cdot X_v$	[5.5.6]
$\frac{dGLC}{dt} = \left[\frac{-\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLC} \cdot Fc_2} \right] - \left[\frac{\mu_{GPV} \cdot X_v}{Y_{GPV/GLC} \cdot Fc_4} \right] - m_S \cdot X_v$ $Fc_2 = Y_{X/GLC,i} / \max(Y_{X/GLC,i})$ $Fc_4 = Y_{GPV/GLC,i} / \max(Y_{GPV/GLC,i})$	[5.5.7]
$\frac{dGLN}{dt} = \left[\frac{-\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLN} * Fc_6} \right] - \left[\alpha_{NH4} \frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{NH4/GLN} * Fc_8} \right]$ $Fc_6 = Y_{X/GLN,i} / \max(Y_{X/GLN,i})$ $Fc_8 = Y_{NH4/GLN,i} / \max(Y_{NH4/GLN,i})$	[5.5.8]
<p>Se $GLN \geq 1,0$</p> $\frac{dGLU}{dt} = 0$	[5.5.9]
<p>Se $GLN < 1,0$</p> $\frac{dGLU}{dt} = - \left[\frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLU} * Fc_7} \right] - \left[\alpha_{NH4} \frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{NH4/GLU} * Fc_9} \right]$	[5.5.10]

Continua:

Tabela 5.5. Equações do modelo 5 (continuação)

Equação	Nº
$Fc_7 = Y_{X/GLU,i} / \max(Y_{X/GLU,i})$	
$Fc_9 = Y_{NH_4/GLU,i} / \max(Y_{NH_4/GLU,i})$	
$\frac{dNH_4}{dt} = \mu_{NH_4} \cdot X_v$	[5.5.11]
$\frac{dGPV}{dt} = \mu_{GPV} \cdot X_v - k_{dGPV} \cdot GPV$	[5.5.12]
$\frac{dO_2}{dt} = 0$	[5.5.13]

As alterações descritas na Tabela 5.5 são:

- a) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator de conversão glutamina em células, $Y_{X/GLN}$, por meio do fator de correção Fc_6 , calculado como relação entre $Y_{X/GLN}$ do ensaio e o valor máximo entre os vários $Y_{X/GLN}$ determinados, $Fc_6 = \frac{Y_{X/GLN,i}}{\max(Y_{X/GLN,i})}$, indicado na Figura 5.28 (Equação 5.5.8, Tabela 5.5).

Figura 5.28. Fator de conversão Fc_6 , $Y_{X/GLN,i} / \max(Y_{X/GLN,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2

b) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator de conversão glutamato em células, $Y_{X/GLU}$, por meio do fator de correção Fc_7 , calculado como relação entre $Y_{X/GLU}$ do ensaio i e o valor máximo entre os vários $Y_{X/GLU}$ determinados, $Fc_7 = \frac{Y_{X/GLU,i}}{\max(Y_{X/GLU,i})}$, indicado na Figura 5.29 (Equação 5.5.10, Tabela 5.5).

Figura 5.29. Fator de conversão Fc_7 , $Y_{X/GLU,i}/\max(Y_{X/GLU,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

c) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator de conversão glutamina em NH_4^+ , $Y_{NH4/GLN}$, por meio do fator de correção Fc_8 , calculado como relação entre $Y_{NH4/GLN}$ do ensaio i e o valor máximo entre os vários $Y_{NH4/GLN}$ determinados, $Fc_8 = \frac{Y_{NH4/GLN,i}}{\max(Y_{NH4/GLN,i})}$, indicado na Figura 30 (Equação 5.5.8, Tabela 5.5).

Figura 5.30. Fator de conversão F_{c8} , $Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

d) incorporou-se a influência do oxigênio dissolvido no fator de conversão glutamato em NH_4^+ , $Y_{NH_4/GLU}$, por meio do fator de correção, F_{c8} , calculado como relação entre $Y_{NH_4/GLU}$ do

ensaio i e o valor máximo entre os vários $Y_{NH_4/GLU}$ determinados, $F_{c9} = \frac{Y_{NH_4/GLU,i}}{\max(Y_{NH_4/GLU,i})}$,

indicado na Figura 5.31 (Equação 5.5.9, Tabela 5.5).

Figura 5.31. Fator de conversão F_{c9} , $Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, em função da concentração de oxigênio dissolvido, pO_2 .

e) foi proposto um limiar de concentração de glutamina, abaixo do qual inicia-se o consumo de glutamato a partir da análise de dados dos ensaios Ma 02 e Ma-03. A determinação desse

limiar está indicada na Figura 5.27, formulado como condição para ativar o consumo de glutamato, Equação 5.5.10.

f) foi incorporado o balanço material de glutamato, cujo consumo é ativado quando a glutamina atinge concentrações inferiores ao limiar definido (1 g/L), que está indicado na Figura 5.27.

Os resultados do ajuste estão ilustrados nas Figuras 5.32 e 5.33 e na Tabela 5.3,

Figura 5.32. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 5 para o ensaio Ma-02, célula S2AcGPV2-KTC100, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

As previsões do modelo indicam para o ensaio Ma-02 (Figura 5.32) que o esgotamento de glicose e de glutamina interrompe, quase simultaneamente, o crescimento e determinam a concentração máxima do cultivo, característica coerente com os dados obtidos, embora a concentração celular máxima seja significativamente inferior à observada. Na tabela 5.3 observa-se que o valor de $\mu_{X_{max}}$ ajustado neste modelo é três vezes inferior ao obtido com o modelo 1.

Figura 5.33. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 5 para o ensaio Ma-03, célula S2AcGPV2-KTC100, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Para o mesmo ensaio, o modelo não reproduz o decréscimo da concentração de células viáveis observado após 300 h, embora a concentração de células não-viáveis prevista seja superior à observada. Isso sugere a existência de um mecanismo de lise significativo, não previsto no modelo. Como a produção de NH_4^+ está associada exclusivamente ao crescimento celular, o modelo não reproduz o aumento significativo desse metabólito após o fim da fase exponencial. Finalmente, o modelo prevê uma forte degradação da proteína na fase estacionária. As diferenças entre as previsões para as concentrações de GPV e as determinadas experimentalmente podem ser explicadas pelos diferentes perfis de velocidades específicas de crescimento encontradas para esses dois ensaios. Como neste modelo a velocidade específica de formação de GPV é exclusivamente proporcional à velocidade específica de crescimento, o ensaio que permite perfis de velocidade específica com maiores valores também permitirá maiores concentrações celulares e maiores concentrações de GPV. Isso explica os valores maiores previstos para a concentração de células viáveis e GPV no ensaio Ma-3 (Figura 5.33). De forma geral, quando se compara o ajuste para o mesmo conjunto de dados (Ma-02 e Ma-03) com o Modelo 1a, ainda não é possível afirmar que a incorporação dos fatores que levam em conta a influência do oxigênio dissolvido no

metabolismo celular permitiu alcançar um ajuste e nível previsões significativamente diferentes. É também verdade essa comparação não pode ficar restrita a esses dois ensaios, o que comprometeria a importância e a utilidade dos modelos considerados.

5.3 Modelos que incorporam a mudança de metabolismo em função das condições do cultivo (GLC_0 , GLN_0 e pO_2) via fatores de conversão.

Neste estágio do trabalho, foram utilizadas todas as análises de todos os ensaios realizados com a célula S2AcGPV2 (ensaios Ma-07 a Ma-17) obtidos por Aguiar (2010) o que permitiu a análise da influência da concentração inicial de glicose e glutamina nos fatores de conversão, análise também realizada por Aguiar (2010) e que permite incorporar a influência da glicose e glutamina no metabolismo celular. A partir dos dados dos ensaios, buscou-se identificar os principais fenômenos do processo que ocorrem nas fases exponencial, estacionária e de declínio a serem incorporados no modelo. A análise dos fenômenos presentes nas diferentes fases do cultivo está indicada a seguir.

5.3.1. Análise de Fenômenos (Ensaio Ma-07 a Ma-17)

a) Duração da fase exponencial.

Dada a complexidade da modelagem da fase lag do cultivo, optou-se por não modelar esta fase caracterizando a sua duração da fase e realizando o ajuste a partir do fim da fase.

b) Influência da concentração inicial de GLC na fase exponencial. Nos ensaios nos quais se variou a concentração inicial de GLC, ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14, os dados indicados na Figura 5.34 sugerem limitação por glicose apenas quando as concentrações iniciais de GLC são de 1 g/L e 5 g/L (ensaios Ma-11 e Ma-12). Nesses ensaios, o fim da fase exponencial, aparentemente, ocorre quando GLC_0 é inferior a 1,5 g/L. Os valores de μ_{Xmax} observado nesses ensaios ($0,019\text{ h}^{-1}$ e $0,009\text{ h}^{-1}$) são significativamente menores que $0,027\text{ h}^{-1}$, valor encontrado no ensaio Ma-10, considerado com referência para os cultivos estudados. A fase exponencial do ensaio Ma-11 está bem caracterizada com 11 pontos e um coeficiente de correlação quadrático (r^2) de 0,98 e para o ensaio Ma-12 a correção é caracterizada por 12

pontos e um coeficiente de correlação quadrático de 0,99. Aparentemente, há limitação em GLC e as células estão utilizando uma via metabólica alternativa, que apresenta um baixo valor de $\mu_{X_{max}}$ e, assim, o término dessa fase exponencial não se deve ao esgotamento de GLC. Isso já parece um indício claro de limitação do crescimento por GLC e pode orientar uma estimativa inicial da constante de saturação da glicose k_{GLC} (Tabela 5.4).

Figura 5.34. Evolução da concentração de glicose sob diferentes GLC_0 (Ensaio Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais indicam o final da fase exponencial em cada ensaio

Nesses ensaios, $GLC_0 = 1$ g/L (Ma-11) e $GLC_0 = 5$ g/L (Ma-12), também é possível afirmar que não se observa limitação do crescimento por esgotamento de GLN, como indica a Figura 5.35.

c) Influência da concentração inicial de GLN na fase exponencial. Quando se varia GLN_0 mantendo-se a GLC_0 em 10,0 g/L (ensaio Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17), os dados sugerem não haver limitação por GLC em nenhum dos ensaios como indica a Figura 5.36. Por outro lado, os dados seguem limitação por GLN nos ensaios com concentrações iniciais de GLN de 1,75 g/L e 0,6 g/L, como indica a Figura 5.36. Nesses casos, o fim da fase exponencial ocorre quando a GLN, aparentemente, se esgotou. No entanto, nos ensaios com concentrações iniciais de GLN de 7,0 g/L e 3,5 g/L, no final da fase exponencial, (linhas verticais), não se observa esgotamento de GLN e de GLC. Isso sugere a existência de outro fator que leva ao fim da fase exponencial, alguma outra limitação por substrato, algum aminoácido, por exemplo, ou a existência de inibição que interrompe a fase exponencial do crescimento pelo acúmulo de algum metabólito inibitório no meio.

Figura 5.35. Evolução da concentração de glutamina nos ensaios com diferentes GLC_0 (Ensaio Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase exponencial

Figura 5.36. Evolução da concentração de glicose nos ensaios com diferentes GLN_0 (Ensaio Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase exponencial.

O ensaio Ma-10, ($GLC_0 = 10 \text{ g/L}$ e $GLN_0 = 3,5 \text{ g/L}$), indicado na Figura 5.37, num primeiro momento, sugere limitação por GLN, pois ao final da fase exponencial a concentração de GLN é cerca de $1,0 \text{ g/L}$. Contudo, ao se observar a influência da concentração inicial de GLN na fase exponencial do crescimento em outros ensaios, especialmente o ensaio Ma-16, ($GLN_0 = 1,75 \text{ g/L}$), indicado na mesma Figura 5.3, observa-se que a célula desenvolve-se com alta velocidade específica de crescimento, $0,025 \text{ h}^{-1}$, mesmo com concentrações de GLN inferiores a 500 mg/L .

Figura 5.37. Evolução da concentração de glutamina nos ensaios com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase exponencial.

d) Influência de NH_4^+ na fase de crescimento exponencial. Ao se analisar os dados obtidos nos ensaios Ma-10 a Ma-17 verifica-se que nos ensaios nos quais o fim da fase exponencial não indica limitação por GLC e GLN (Ma-10, Ma-14 e Ma-17) as concentrações de NH_4^+ estão entre 70 mg/L e 163 mg/L ao final da fase exponencial como indica a Figura 5.38.

Figura 5.38. Evolução da concentração de NH_4^+ . a) Ensaios com diferentes GLC_0 (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A); b) Ensaios com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase de crescimento exponencial.

Sabe-se que células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) não acumulam NH_4^+ ao longo do cultivo. Células de *Drosophila melanogaster*, S2, assim como a linhagem *Trichoplusia ni* (Tn-5), ao contrário, acumulam NH_4^+ . Os dados de literatura informam sobre níveis de inibição de NH_4

para culturas de células de mamíferos que acumulam NH_4^+ e não foram localizadas referências sobre níveis de inibição por amônio de células S2 ou Tn-5. Para células de mamíferos ocorre inibição quando a concentração de NH_4^+ é superior a valores que podem estar no intervalo entre 36 a 72,1 mg/L. Como a célula S2 tem comportamento similar a células Tn-5 e a células de mamíferos, os valores encontrados sugerem inibição por NH_4^+ ao crescimento da célula.

e) Influência da concentração de GLU na fase exponencial. Os dados obtidos nos ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17, ilustrados na Figura 5.39, indicam as concentrações de GLU ao final da fase exponencial de 849 a 1033 mg/L, sugerindo que GLU não limita o crescimento da célula S2.

Figura 5.39. Evolução na concentração de glutamato. a) Ensaio com diferentes GLC_0 (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A); b) Ensaio com diferentes GLN_0 (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase de crescimento exponencial.

f) Influência da concentração de LAC na fase exponencial. Os ensaios com variação da concentração inicial de GLC (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14) indicam concentrações de LAC ao final da fase exponencial de 0 a 300 mg/L, como ilustra a Figura 5.40 (A). Os ensaios com variação da concentração inicial de GLN (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17) indicam concentrações de LAC ao final da fase exponencial de 0 a 180 mg/L como ilustra a Figura 5.40 (B). A literatura indica inibição por lactato em células de mamíferos para concentrações superiores a 1,7 g/L. Esses dados sugerem, portanto, que lactato não inibe o crescimento das células S2. É importante destacar que as células Sf9 não acumulam lactato em seus cultivos e que as células S2, assim como linhagem *Trichoplusia ni*, apresentam um comportamento similar a células de mamíferos.

Figura 5.40. Evolução da concentração de lactato. a) Ensaios com diferentes GLC₀ (Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14; Quadro A1, Anexo A); b) Ensaios com diferentes GLN₀ (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17; Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final da fase de crescimento exponencial.

g) Influência de O₂ no metabolismo de S2 na fase exponencial de crescimento (Ensaios Ma-07 a Ma-10). A influência de O₂ dissolvido na fase exponencial do cultivo foi avaliada a partir dos dados de Aguiar(2010) considerando a sua influência nos seguintes parâmetros: μ_{Xmax} , $Y_{X/GLC}$, $Y_{LAC/GLC}$, $Y_{ALA/GLC}$, $Y_{X/GLN}$, $Y_{NH4/GLN}$, $Y_{ALA/GLN}$, $Y_{GPV/X}$, $Y_{GPV/GLC}$. A Figura 5.41 indica um efeito inibidor da concentração de O₂ na velocidade específica máxima de crescimento (μ_{Xmax}).

Figura 5.41. Influência da concentração de O₂ na velocidade específica de crescimento (μ_{Xmax}). Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A1, Anexo A).

A Figura 5.42 indica uma maior conversão de GLC em células quando a concentração de O₂ é igual ou inferior a 30% e uma diminuição dessa conversão para valores superiores a 30%. Essa mudança na eficiência da conversão de GLC em células sugere uma mudança de metabolismo celular em função da disponibilidade de O₂ no meio. Essa afirmação baseia-se

no fato de as fases exponenciais estarem muito bem caracterizadas em cada um desses ensaios (AGUIAR, 2010). É possível também afirmar que o sistema está inibido para valores de O_2 superiores a 30 % de oxigênio dissolvido.

Figura 5.42. Influência da concentração de O_2 no fator $Y_{X/GLC}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.43 ilustra claramente a afirmação anterior sobre a mudança de metabolismo em função da concentração de O_2 no meio, pois, para concentrações inferiores a 40%, observa-se uma condição que caracteriza um metabolismo fermentativo com formação de lactato. Como mencionado anteriormente, essa resposta pode ser explicada por uma forte inibição das células S2 para concentrações de oxigênio dissolvido acima de 40 %, de tal ordem, que μ_{Xmax} (Figura 5.41) é bastante reduzida e, conseqüentemente, deve ser alterado todo o metabolismo celular.

Figura 5.43. Influência da concentração de O_2 no fator $Y_{LAC/GLC}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.44 ilustra mais uma vez a mudança de metabolismo, já indicada anteriormente, e que também leva a um aumento da conversão de alanina a partir de GLC para concentrações

de O_2 superiores a 50%. Esse é um dado interessante, pois demonstra que, sob forte estresse ambiental, a célula não é capaz de transformar o carbono (GLC) consumido em material celular e o excreta na forma de um subproduto, no caso alanina. Esse resultado também leva a concluir que quando o metabolismo é mais ativo ($pO_2 < 50\%$) a célula não é capaz de excretar o excedente de GLC como Ala (um subproduto menos tóxico), mas tem que eliminá-lo como lactato (Figura 5.43).

A Figura 5.45 indica uma variação na conversão de GLN em células similar a observada para a conversão de GLC (Figura 5.42). Assim, para concentrações de O_2 inferiores a 30%, verificam-se altas conversões e, quando a concentração de O_2 é superior a esse valor, baixas conversões. Evidentemente, isso indica uma mudança de metabolismo celular em função da disponibilidade de O_2 no meio, com perfil bastante similar ao observado para o fator $Y_{X/GLC}$ (Figura 5.42).

Figura 5.44. Influência de O_2 no fator $Y_{ALAC/GLC}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

Figura 5.45. Influência de O_2 no fator $Y_{X/GLN}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.46 também indica uma variação na conversão de NH_4^+ em células, variação similar à observada para a conversão de alanina a partir de GLC, que também leva a um aumento da conversão a partir de concentrações de O_2 superiores a 50%. Evidentemente isso reafirma as indicações de uma mudança de metabolismo celular em função da disponibilidade de O_2 no meio. Reforça também a hipótese de que sob estresse ($p\text{O}_2 > 50\%$) a célula secreta excedente de carbono (aqui GLN) na forma de subproduto do seu metabolismo, neste caso NH_4^+ .

Figura 5.46. Influência de O_2 no fator $Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.47 indica um aumento na conversão de GLN em NH_4^+ aproximadamente proporcional ao aumento da concentração de O_2 dissolvido no meio, confirmando a resposta observada na Figura 5.45.

Figura 5. 47. Influência de O_2 no fator $Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.48 indica um aumento da conversão de GLN em ALA em função do teor de O_2 dissolvido no meio muito similar à variação observada na conversão de GLN em NH_4^+ . A formação de alanina é uma resposta celular ao excedente de GLC e GLN, gerado pela

incapacidade das células de crescer em teores de pO_2 elevados, o que se verifica, sobretudo para $pO_2 > 50 \%$.

Figura 5. 48. Influência de O_2 no fator $Y_{ALA/GLN}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.49 indica um aumento na conversão de GPV por unidade de massa celular em função do aumento do teor de O_2 dissolvido no meio. Esse aumento do fator de conversão em concentrações inibidoras de crescimento celular (Figura 5.41) sugere que o oxigênio interfere de forma diferente no processo de crescimento e no de síntese de GPV.

Figura 5. 49. Influência de O_2 no fator $Y_{GPV/X}$. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.50 indica uma diminuição da conversão de GPV por unidade de glicose consumida. No entanto, frente aos perfis das demais grandezas analisadas, o efeito do teor de oxigênio no fator $Y_{GPV/X}$ é pequeno.

Figura 5. 50. Influência de O₂ no fator Y_{GPV/GLC}. Ensaios Ma-07 a Ma-10 (Quadro A.1, Anexo A).

h) Influência da concentração inicial de GLC na fase exponencial de crescimento. (Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14).

A influência da concentração de GLC inicial durante a fase exponencial do cultivo foi avaliada considerando a sua influência nos seguintes parâmetros: μ_{Xmax} , $Y_{X/GLC}$, $Y_{LAC/GLC}$, $Y_{ALA/GLC}$, $Y_{X/GLN}$, $Y_{NH4/GLN}$, $Y_{ALA/GLN}$, $Y_{GPV/X}$, $Y_{GPV/GLC}$. A Figura 5.51 indica um efeito limitante da concentração de GLC na velocidade específica máxima de crescimento (μ_{Xmax}) com valores máximos para concentrações superiores a 10 g/L. De forma, semelhante ao que se viu no item anterior (efeito de pO₂, Figura 5.41). Acredita-se que a limitação em GLC, ocasionou uma mudança de metabolismos, visto que os valores de μ_{Xmax} foram calculados a partir de um grande conjunto de pontos experimentais e com boa linearidade (para Ma-11, 15 pontos, $r^2 = 0,989$; para Ma-12, 13 pontos, $r^2 = 0,9939$).

De forma semelhante ao que foi visto para o efeito do teor de oxigênio, as alterações do metabolismo em decorrência das diferentes concentrações de glicose será observada nas demais grandezas cinéticas analisadas. A Figura 5.52 indica um máximo de conversão de GLC em células quando a concentração inicial de GLC no meio é 10 g/L e uma diminuição dessa conversão tanto para concentrações maiores, como para concentrações menores a esse valor. Há duas hipóteses para essa mudança na eficiência da conversão de GLC em células. A primeira sugere uma mudança de metabolismo celular em função da concentração inicial de GLC no meio como já comentado no item anterior e ilustrado pela Figura 5.51. A outra

hipótese diz respeito não a uma mudança de metabolismo, mas uma distribuição de fluxos de metabólitos em uma dada via e que se aplicaria à condição $GLC_0 > 1$ g/L.

Figura 5.51. Influência da concentração inicial de GLC na velocidade específica de crescimento, ($\mu_{X,max}$). Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

Figura 5. 52. Influência da concentração inicial de GLC no fator de conversão $Y_{X/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.53 indica a pouca influência da concentração inicial de GLC no fator de conversão de glicose em lactato fator esse, como já foi indicado anteriormente (Figura 5.43), farto esse sensível à concentração de O_2 no meio. Diferentemente do que se notou nos ensaios com diferentes teores de pO_2 , aqui os dados sugerem não uma inibição pela GLC_0 , mas sim uma limitação.

Figura 5. 53. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{LAC/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.54 indica uma pequena influência da concentração inicial de GLC na formação de ALA, com a indicação da existência de mínimo quando GLC_0 é 10 g/L. Este perfil está em sintonia com o observado na Figura 5.43. Nas condições em que o desempenho da célula é menor, há maior formação de alanina e vice-versa.

Figura 5. 54. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{ALA/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.55 indica a existência de valor máximo de conversão de glutamina em células quando a concentração inicial de GLC está entre 7,5 g/L e 10 g/L. Este perfil é semelhante ao observado para $Y_{X/GLC}$ (Figura 5.52), e que indica um metabolismo mais eficiente quando a GLC_0 está na faixa de 5 a 10 g/L. A interdependência dos metabolismos de GLC e GLN em células animais é um fato conhecido (ALTAMIRANO; GÒDIA; CAIRÓ, 2008).

Figura 5. 55. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{X/GLN}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.56 indica um aumento de formação de NH_4^+ por unidade de células formadas com o aumento da concentração inicial de glicose no meio acima de 10 g/L.

Figura 5. 56. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{NH_4/X}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.57 indica um aumento da formação de NH_4 por unidade de glutamina consumida com o aumento da concentração inicial de glicose no meio, para valores inferiores a 5 g/L.

Figura 5. 57. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{NH_4/GLN}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.58 não indica influência da GLC_0 inicial de no fator de conversão de GLN em ALA. É interessante notar que o efeito da GLC_0 sobre a síntese de alanina foi distinto quando se relacionaram os dois substratos de origem: GLC ($Y_{ALA/GLN}$, Figura 5.54) e GLN ($Y_{ALA/GLN}$, Figura 5.58). Isso se explica por uma redistribuição dos fluxos de GLC e GLN de forma distinta.

Figura 5.58. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{ALA/GLN}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.59 também não indica influência sobre formação de GPV por unidade de células em função da concentração inicial de GLC.

Figura 5. 59. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{GPV/X}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.60 indica a influência da concentração inicial de GLC no fator de conversão de GPV por unidade de células e a existência de máximo de conversão quando a concentração inicial de GLC é 10 g/L. Diferentemente do que foi observado para o conjunto de ensaios com diferentes pO_2 , neste caso, o efeito da GLC_0 foi similar para o crescimento (Figura 5.52) e para a síntese da proteína (Figura 5.60).

Figura 5. 60. Influência da concentração inicial de GLC no fator $Y_{GPV/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14. (Quadro A.1, Anexo A).

i) Influência da concentração inicial de GLN na fase exponencial de crescimento (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). A Figura 5.63 indica um efeito limitante da concentração de GLN_0 na velocidade específica de crescimento ($\mu_{X_{max}}$) para concentrações de GLN inferiores a 2,0 g/L. Novamente, como a fase exponencial para a condição $GLN_0 = 0,6$ g/L é muito bem

caracterizada (8 pontos; $r^2 = 0,992$) acredita-se que a limitação em GLN tenha levado a uma alteração do metabolismo.

Figura 5.61. Influência da concentração inicial de GLN na velocidade específica máxima de crescimento. ($\mu_{X,max}$). Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)

A Figura 5.62 indica uma diminuição do fator conversão de GLC em células com o aumento da concentração inicial de GLN, que é significativa quando a concentração de GLN é superior a 3,5 g/L. Diferentemente do que aconteceu quando se avaliou o efeito de GLC_0 (Figura 5.52), não se observou uma alteração no padrão de consumo de GLC para a condição de GLN_0 baixa, condição indicada como limitante na Figura 5.63. A resposta em termos de LAC e ALA (dois subprodutos) não coincidem com o comportamento observado para o valor de $Y_{X/GLC}$.

Figura 5.62. Influência da concentração inicial de GLN no fator de conversão $Y_{X/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)

A Figura 5.63 indica a existência de um valor mínimo do fator de conversão de glicose em lactato quando a concentração inicial de GLN no meio é 3,5 g/L.

Figura 5.63. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{LAC/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)

A Figura 5.64 indica aumento do fator de conversão de glicose em alanina quando se aumenta concentração inicial de GLN no meio.

Figura 5. 64. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{ALAC/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A)

A Figura 5.65 indica a diminuição do fator de conversão de glutamina em células quando se aumenta a concentração inicial de GLN. É interessante notar a maior eficiência na produção

de células a partir de GLN para a condição de GLN_0 que foi considerada limitante (Figura 5.61).

Figura 5.65. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{X/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.66 indica uma tendência similar à observada quando se analisou a influência da concentração inicial de GLC no fator de conversão de NH_4 por unidade de massa celular (Figura 5.56), ou seja, verifica-se aumento de formação de NH_4 por células formadas para valores da concentração inicial de glutamina no meio superiores a um certo limite ($GLN_0 > 3,5$ g/L).

Figura 5.66. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{NH4/X}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.67 indica diminuição do fator de conversão de NH_4 por unidade de glutamina consumida com o aumento da concentração inicial de glutamina no meio, tendência similar à observada quando se avaliou a influência do fator de conversão de glutamina em NH_4^+ em função da concentração de glicose no meio (Figura 5.57). Entretanto, essa resposta não era esperada visto que a Figura 5.65 indica um metabolismo mais eficiente para valores mais baixos de GLN_0 .

Figura 5.67. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).

A Figura 5.68 indica uma diminuição do fator de conversão de GLN em ALA em função da concentração inicial de GLN. Aqui vale o mesmo comentário feito em relação com quebra de expectativas feita ao se analisar a Figura 5.67.

A Figura 5.69 indica um máximo no fator de conversão de GPV por unidade celular sendo esse máximo encontrado quando a concentração inicial de GLN é 3,5 g/L.

E, finalmente, a Figura 5.70 indica a existência de máximo de conversão de GPV por glicose consumida quando a concentração inicial de GLN é 3,5 g/L.

Figura 5.68. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{ALA/GLN}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).

Figura 5.69. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{GPV/X}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).

j) Influência da concentração inicial de GLC na fase de crescimento estacionário, (ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14). O final do crescimento, início da fase estacionária, ocorre quando há esgotamento de GLC nos ensaios com concentrações iniciais na faixa entre 1 a 10 g/L como indica Figura 5.71(a).

Figura 5.70. Influência da concentração inicial de GLN no fator $Y_{GPV/GLC}$. Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17. (Quadro A.1, Anexo A).

Figura 5.71. Evolução da concentração de GLC (a) e GLN (b) durante os cultivos com diferentes concentrações iniciais de GLC (Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14). (Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final do crescimento.

No ensaio Ma-11 ($GLC_0 = 1 \text{ g/L}$) a glicose esgota-se antes do final do crescimento (AGUIAR, 2010). A não interrupção do crescimento com o esgotamento de GLC no ensaio Ma-11, por outro lado, obriga a se considerar erros na detecção de GLC nesses (baixos) níveis ou erros na determinação da duração das fases exponencial e estacionária. A Figura 5.71(b) também indica que não há esgotamento de GLN e que, portanto, a fase estacionária não se deve ao esgotamento de glutamina. No ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 15 \text{ g/L}$, $GLN_0 = 3,5 \text{ g/L}$) não se esgota GLC_0 e GLN_0 no final do crescimento (ver Figura 5.73). Para esse ensaio, a

interrupção do crescimento, sem esgotamento desses substratos, é uma indicação da existência de outros fatores (limitação por aminoácidos ou inibições por metabólitos, NH_4^+ ou lactato).

h) Influência da concentração inicial de GLN na fase de crescimento estacionária (Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). Nos ensaios nos quais se variou a concentração inicial de GLN, o final do crescimento ou fase estacionária pode ser atribuído às baixas concentrações de GLN apenas em dois ensaios, $\text{GLN}_0 = 0,6 \text{ g/L}$ e $\text{GLN}_0 = 1,75 \text{ g/L}$ (Ma-15 e Ma-16, respectivamente), nos quais a concentração de GLN no meio, ao final do crescimento, foi 88,0 mg/L e 38,0 mg/L (AGUIAR, 2010) e como indica a Figura 5.72b. Essas baixas concentrações podem levar a dificuldades no transporte para a célula e constata-se síntese de GLN no meio. O ensaio Ma-10, com GLN_0 de 3,5 g/L, há esgotamento apenas de GLC. No ensaio Ma-17, planejado com concentração inicial de GLN_0 de 7,0 g/L, não se verifica esgotamento de GLC e GLN ao final da fase estacionária, como indica a Figura 5.72a. Nesse caso, outros fatores devem estar determinando a interrupção do crescimento que não o esgotamento de GLC e GLN.

i) Influência da concentração de NH_4^+ na fase de crescimento estacionária. Os ensaios Ma-14 ($\text{GLC}_0 = 15 \text{ g/L}$, $\text{GLN}_0 = 3,5 \text{ g/L}$) e Ma-17 ($\text{GLC}_0 = 10 \text{ g/L}$, $\text{GLN}_0 = 7,0 \text{ g/L}$) nos quais ocorre interrupção do crescimento sem esgotamento de GLC e GLN, a causa aparente do fim do crescimento pode ser atribuída à concentração de NH_4^+ no meio. Nesses ensaios as concentrações de NH_4^+ foram 132 mg/L e 180 mg/L, respectivamente, como indicado na Figura 5.73.

j) Acúmulo NH_4^+ na fase de crescimento estacionária. Os ensaios Ma-10, Ma-16 e Ma-17, nos quais se variou a concentração de GLN_0 (Figura 5.75b), e nos ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 (Figura 5.75a), que testaram diferentes GLC_0 , há indicação de aumento na velocidade de acúmulo de NH_4^+ na fase estacionária do cultivo. Esse aumento na velocidade de formação de NH_4^+ , aparentemente, está relacionado ao esgotamento de glicose que leva a uma mudança de metabolismo celular. Nessa condição, as células não podem mais excretar alanina, pois não há disponibilidade de GLC e, assim, o excedente de GLC será metabolizado com liberação de NH_4^+ , aumentando a velocidade de secreção desse subproduto.

Figura 5.72. Evolução das concentrações de GLC (a) e de GLN (b) nos ensaios com diferentes GLN_0 (Ensaio Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). (Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final do crescimento.

Figura 5.73. Evolução da concentração de NH_4^+ em função da variação de: a) concentração inicial de GLC (Ensaio Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-14); b) concentração inicial de GLN (Ensaio Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). (Quadro A1, Anexo A). Linhas verticais, final do crescimento.

As Figuras 5.74 e 5.75 apresentam os dados de formação de NH_4^+ , em comparação com o consumo de GLC. Nas Figuras 5.74a e 5.75b é evidente que a velocidade de formação de NH_4^+ aumenta quando ocorre o esgotamento de GLC. Na Figura 5.75b tal fato não é observado, pois há excesso de GLC durante todo o cultivo. Finalmente, a Figura 5.74b mostra um comportamento distinto, com o aumento da velocidade de formação de NH_4^+ após 100 horas após do esgotamento de GLC. Dados não apresentados evidenciam nesse intervalo a célula consome o lactato formado durante a fase de crescimento. Quando o lactato esgota-se ocorre o aumento da velocidade de síntese de NH_4^+ .

Figura 5.74. Evolução da concentração de NH_4^+ e GLC (b) em função da variação da concentração inicial de GLC: a) $\text{GLC}_0 = 10 \text{ g/L}$ (Ensaio Ma-10); b) $\text{GLC}_0 = 1,0 \text{ g/L}$ (Ensaio Ma-11) (Quadro A.1, Anexo A).

Figura 5.75. Evolução da concentração de NH_4^+ e GLC em função da variação da concentração inicial de GLC: a) $\text{GLC}_0 = 5,0 \text{ g/L}$ (Ensaio Ma-12); b) $\text{GLC}_0 = 15,0 \text{ g/L}$ (Ensaio Ma-14) (Quadro A.1, Anexo A).

k) Consumo de alanina na fase de crescimento estacionária. Considerando os resultados dos ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17, nos quais se variou a concentração inicial de GLN, durante a fase estacionária, verifica-se consumo de alanina acumulada no meio quando ocorre esgotamento de glicose, com exceção de ensaio Ma-15 no qual existe excesso de GLC como

indica a Figura 5.76a. Também quando se varia a concentração inicial de GLC (ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12 e Ma-14), verifica-se consumo de ALA na fase estacionária com exceção do ensaio Ma-14 que apresenta excesso de GLC, como indica a Figura 5.76b.

Figura 5.76 Evolução da concentração de ALA; a) Efeito de diferentes GLN₀ (Ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16, Ma-17; Quadro A.1, Anexo A); b) Efeito de diferentes GLC₀ (Ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-14; Quadro A.1, Anexo A).

l) Influência da concentração de GLC na fase de morte celular (ensaios Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-14). Os dados ilustrados na Figura 5.79a (ensaios Ma-10) indicam o início do declínio da viabilidade celular quando se esgota a GLC para o ensaio Ma-10 (Figura 7.77a) e Ma-12 (Figura 7.77b). Observa-se também uma significativa diminuição da viabilidade celular no ensaio Ma-14 (GLC₀ = 15 g/L) quando a concentração de GLC é de cerca de 6 g/L. Isso indica a influência de outros fatores que não a concentração inicial de GLC na viabilidade celular.

Foram analisadas outras influências na diminuição da viabilidade celular tais como concentração de GLN, lactato e NH₄⁺ no ensaio Ma-14 (GLC₀ = 15 g/L) e indicadas nas Figuras 5.78, 5.79 e 5.80. É possível verificar que o aumento linear na concentração de LAC, aparentemente, não se correlaciona com a diminuição da viabilidade celular como indica a Figura 5.78. Por outro lado, não se observa o esgotamento de GLN nesse ensaio e a diminuição significativa da viabilidade celular ocorre quando a concentração de GLN está em torno de 580 mg/L como indica a Figura 5.79. Não se atribui essa diminuição de viabilidade a uma possível limitação de GLN, mas essa questão será mais bem tratada no item subsequente. Uma associação mais evidente pode ser verificada entre a concentração de NH₄⁺ e a viabilidade celular como indica a Figura 5.80. Verifica-se uma diminuição significativa da viabilidade celular quando a concentração de NH₄⁺ atinge 190 mg/L e que se mantém nesse nível durante a queda de viabilidade.

Figura 5.77. Evolução da concentração de GLC e a viabilidade celular: a) $GLC_0 = 10,0$ g/L (Ensaio Ma-10, Quadro A.1, Anexo A); b) $GLC_0 = 5,0$ g/L (Ensaio Ma-1; Quadro A.1, Anexo A). Linha vertical, esgotamento de glicose.

Figura 5.78. Evolução da concentração de LAC e da viabilidade celular no ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 14$ g/L). Linha vertical, início de morte celular.

Figura 5.79. Evolução da concentração de GLN e da viabilidade celular no ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 14 \text{ g/L}$). Linha vertical; início de morte celular

Figura 5.80. Evolução da concentração de NH_4^+ e da viabilidade celular no ensaio Ma-14 ($GLC_0 = 14 \text{ g/L}$). Linha vertical; início de morte celular.

m) Influência da concentração de GLN na fase de morte (ensaios Ma-10, Ma-15, Ma-16 e Ma-17). Os dados relativos aos ensaios com menores valores de GLN_0 não permitem relacionar a diminuição significativa da viabilidade com esgotamento de GLN como indica a Figura 5.81. Nos demais ensaios, a concentração de glutamina sempre foi elevada quando a viabilidade celular decrescia.

Figura 5.81. Evolução da concentração de GLN e da viabilidade celular: a) Ensaio Ma-15 (GLN₀ = 0,5 g/L); b) Ma-16 (GLN₀ = 1,75 g/L). Linha vertical, início de morte celular.

No ensaio Ma-16 (GLN₀ = 1,75 g/L), a redução da viabilidade pode ser atribuída ao esgotamento de GLC, com, atesta a Figura 5.82.

Figura 5.82. Evolução da concentração de GLC e da viabilidade celular no ensaio Ma-16 (GLN₀ = 1,75 g/L). Linha vertical, início de morte celular

No entanto, a diminuição de viabilidade no ensaio Ma-15 (GLN₀ = 0,6 g/L) não se explica da mesma forma como indica a Figura 5.83. Tão pouco é possível correlacionar a morte celular nesse ensaio com a produção de inibidor como NH₄⁺ (ver Figura 5.84). A formação de lactato foi também avaliada, visto ser este um inibidor clássico em culturas de células animais (Figura 5.85). Entretanto, parece pouco provável que concentrações da ordem de 0,3 g g/L possam ter tal efeito danoso. Assim, com os dados disponíveis até o momento, não é possível explicar esse comportamento.

Figura 5.83. Evolução da concentração de GLC e da viabilidade celular no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6 \text{ g/L}$). Linha vertical, início de morte celular

Figura 5.84. Evolução da concentração de NH_4^+ e da viabilidade celular no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6 \text{ g/L}$). Linha vertical, início de morte celular.

Os dados apresentados sugerem a influência do esgotamento de GLC e da formação de NH_4 na diminuição da viabilidade celular.

Figura 5.85. Evolução da concentração de LAC e da viabilidade celular no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6$ g/L). Linha vertical, início de morte celular. Linha vertical, início de morte celular

n) Influência das concentrações iniciais de GLC e de GLN na formação de GPV. A Figura 5.86 apresenta perfis típicos de formação da glicoproteína do vírus da raiva (GPV, medida em $\mu\text{g/mL}$) e do teor celular dessa proteína (GPV_E , medido em $\mu\text{g}/10^7\text{cel}$) que é sintetizada na membrana celular. Aguiar (2010) apresentou resultados referentes à síntese de GPV para diferentes concentrações iniciais de GLC e de GLN. Suas principais conclusões foram:

- GLC_0 não influi no teor de GPV nas células, mas se observou valor máximo para $GLC_0 = 10,0$ g/L.
- o teor de GPV diminui para valores de GLN_0 inferiores a $3,5$ g/L e, semelhante o que foi observado para diferentes concentrações iniciais de glicose, a curva de GPV apresentou um valor máximo para $GLN_0 = 3,5$ g/L.

Aguiar (2010) indicou, ainda, que a inibição por NH_4^+ seria responsável pela redução no teor de GPV, fato que ocorreu invariavelmente em todos os experimentos (Figura 5.86, $t = 90$ h). Essa redução do valor de GPV_E ocorreu em diversos instantes do cultivo; em alguns antes da fase exponencial de crescimento; em outros, após o término dessa fase. Isso indica que os fatores que controlam o crescimento e a síntese da proteína podem ser distintos.

Neste trabalho foram utilizadas novas análises de aminoácidos, visando à identificação de um possível composto limitante. Infelizmente, não foi possível realizar as análises em todos os experimentos devido ao custo da análise. Entre os aminoácidos medidos, particularmente

entre os que se esgotam ou apresentam concentrações que podem limitar o processo, destacam-se a glutamina e a cistina.

Figura 5.86. Evolução da concentração de GPV e do teor GPV_E no ensaio Ma-10 (GLC₀ = 10,0 g/L). Linhas verticais: t_{GPVMAX} - linha tracejada; t_{GPVEMAX} - linha contínua.

A Figura 5.87 permite avaliar a influência de GLN e cistina (CYS) na síntese da proteína. Nesse ensaio (Ma-10) o fim do patamar de teor de GPV ocorre em 90 h quando a concentração de cistina, como indica a Figura 5.89, atingiu valores bastante baixos (1,1 mg/L) o que sugere limitar da síntese da proteína por esse aminoácido. No ensaio Ma-11, o fim do patamar do teor máximo de GPV ocorre em 166 h (Figura 5.88) e a concentração de cistina estava em torno de 1,3 mg/L nesse instante (Figura 5.89). Novamente essa concentração de cistina baixa também sugere limitação da síntese da proteína.

No ensaio Ma-15 (GLN₀ = 0,6 g/L), o fim do patamar do teor de GPV ocorreu em 243 h (Figura 5.90) houve esgotamento de cistina no meio a partir da duzentas horas de cultivo como indicam, a Figura 5.91. Nesse caso, não é tão clara a relação entre o esgotamento em cistina e o comprometimento da síntese da proteína.

Figura 5.87 Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-10 ($GLC_0 = 10,0$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Figura 5.88. Evolução da concentração de GPV e GPVe no ensaio Ma-11 ($GLC_0 = 1,0$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Figura 5.89. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-11 ($GLC_0 = 1,0$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Figura 5.90. Evolução da concentração de GPV e GPVe no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Figura 5.91. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-15 ($GLN_0 = 0,6 \text{ g/L}$). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Para o ensaio Ma-17, o fim do patamar do teor de GPV ocorre em 80 h (Figura 5.92) quando a concentração de cistina era cerca de 2 mg/L que, aparentemente, poderia limitar a síntese da proteína como indica a Figura 5.93.

Figura 5.92. Evolução da concentração de GPV e GPV_E no ensaio Ma-17 ($GLN_0 = 7,0 \text{ g/L}$). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Figura 5.93. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-17 ($GLN_0 = 7,0$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

No entanto, os dados do ensaio Ma-07 sugerem o fim do patamar de teor de GPV em 45 h (Figura 5.94) quando a concentração de cistina é superior a 5 mg/L (18 % do valor inicial) que, aparentemente, não seria limitante para a síntese da proteína como pode ser verificado na Figura 5.95.

Figura 5.94. Evolução da concentração de GPV e GPVe no ensaio Ma-07 ($GLC_0 = 10,0$ g/L, $GLN_0 = 3,5$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Figura 5.95. Evolução da concentração de CYS e GLN no ensaio Ma-07 ($GLC_0 = 10,0$ g/L, $GLN_0 = 3,5$ g/L). Linhas verticais: t_{GPVmax} - linha tracejada; $t_{GPVEmax}$ - linha contínua.

Assim, não é possível caracterizar de forma segura uma limitação da síntese de GPV devido ao esgotamento de GLN ou CYS e será adotada a proposição de Aguiar (2010) de limitação da síntese por inibição de NH_4^+ .

5.3.2 Modelo 6. Inclusão de fatores para incorporar a influência de pO_2 , GLC_0 e GLN_0 .

Assim, a partir das análises dos fenômenos observados, foi feita uma nova proposta de modelo que manteve algumas hipóteses anteriores e introduziu, além de incorporar fatores de correção para as mudanças metabólicas resultantes dos efeitos de diferentes condições de pO_2 , GLC_0 e GLN_0 .

Neste modelo, busca-se incorporar uma característica evidenciada nos ensaios realizados e indicada na Tabela 5.1 e que revela uma variabilidade metabólica superior às observadas em cultivos com outras células animais. Essa variabilidade metabólica também se evidencia na dependência de grandezas cinéticas como a velocidade específica de crescimento e dos fatores de conversão com as variáveis ambientais do cultivo como o teor de oxigênio dissolvido e as concentrações de glicose e de glutamina. Nesta proposta de modelo não-estruturado, essa variabilidade metabólica foi incorporada com o auxílio de fatores de correção, F_{cs} , que modificam essas grandezas que na modelagem usual são mantidas constantes. Assim, foram estabelecidos fatores adimensionais a partir das Figuras 5.41 a 5.70 para modelar a cinética do processo. Esses fatores, contudo, foram calculados na fase exponencial de crescimento e, evidentemente, não se pode afirmar que sejam os mesmos para as outras fases do processo,

especialmente nas fases finais, quando GLC e GLN tornam-se limitantes e o metabolismo celular sofre outras alterações.

Essas alterações da cinética do processo decorrentes das alterações das condições de cultivo e da variabilidade metabólica foram incluídas, não apenas com os fatores de correção, mas também pela definição de quatro situações características do processo que apresentam dinâmicas diferentes e que foram implementadas por *IF* lógicos. Essas quatro situações, quatro blocos de programação diferentes, foram assim caracterizadas:

Caso 1. Sem limitação de GLC e GLN;

Caso 2. Sem limitação de GLC e com limitação de GLN;

Caso 3. Com limitação de GLC e sem limitação de GLN;

Caso 4. Com ambas as limitações: GLC e GLN.

O novo conjunto de equações que representa o Modelo 6 está indicado na Tabela 5.6 e as suas características principais são:

- a velocidade específica de crescimento é limitada por glicose e glutamina e inibida por NH_4^+ (Equação 5.6.1);
- a velocidade específica de morte celular é inibida por glicose e modulada por NH_4^+ (Equação 5.6.2);
- o consumo de glicose foi considerado para três finalidades do metabolismo celular: crescimento, formação de alanina e manutenção celular (Equação 5.6.3);
- há consumo de glutamina para duas finalidades do metabolismo celular: crescimento celular, e formação de NH_4^+ ;
- formação de glutamina quando a concentração de glutamina atinge valores inferiores a 0,1g/L (Equação 5.6.14).

Tabela 5.6. Equações do modelo 6

Equação	Nº
$\mu_x = \mu_{X_{\max}} * Fc_{1O2} * Fc_{1GLN} * Fc_{1GLC} \left[\frac{GLC}{k_{GLC} + GLC} \right] \left[\frac{GLN}{k_{GLN} + GLN} \right] \left[\frac{k_{iNH4}}{k_{iNH4} + NH_4} \right]$	[5.6.1]
$Fc_{1O2} = \mu_{X_{\max,i}} / \max(\mu_{\max,i}), \text{ ver Figura 5.41}$	
$Fc_{1GLC} = \mu_{X_{\max,i}} / \max(\mu_{\max,i}), \text{ ver Figura 5.51}$	
$Fc_{1GLN} = \mu_{X_{\max,i}} / \max(\mu_{\max,i}), \text{ ver Figura 5.61}$	
$\mu_m = k_m \cdot \left[\frac{k_{mGLC}}{k_{mGLC} + GLC} \right] \left[\frac{NH_4}{k_{mNH4} + NH_4} \right]$	[5.6.2]
$\mu_{NH4} = Fc_{2O2} * Fc_{2GLN} * Fc_{2GLC} * \alpha_{NH4} \cdot \mu_X$	[5.6.3]
$Fc_{2O2} = Y_{NH4/X,i} / \min(Y_{NH4/X,i}), \text{ ver Figura 5.46}$	
$Fc_{2GLC} = Y_{NH4/X,i} / \min(Y_{NH4/X,i}), \text{ ver Figura 5.56}$	
$Fc_{2GLN} = Y_{NH4/X,i} / \min(Y_{NH4/X,i}), \text{ ver Figura 5.66}$	
$\mu_{ALA} = \alpha_{ALA} \cdot \mu_X + \beta_{ALA} \left(\frac{GLC}{k_{ALA} + GLC} \right)$	[5.6.4]
$\mu_{GPV} = Fc_{3O2} * Fc_{3GLC} * Fc_{3GLN} * \alpha_{GPV} \cdot \mu_X \cdot \left(\frac{k_{dGPV/NH4}}{k_{dGPV/NH4} + NH_4} \right)$	[5.6.5]
$Fc_{3O2} = Y_{GPV/X,i} / \min(Y_{GPV/X,i}), \text{ ver Figura 5.49}$	
$Fc_{3GLC} = Y_{GPV/X,i} / \max(Y_{GPV/X,i}), \text{ ver Figura 5.59}$	
$Fc_{3GLN} = Y_{GPV/X,i} / \max(Y_{GPV/X,i}), \text{ ver Figura 5.69}$	
$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_X - \mu_m) X_v$	[5.6.6]
$\frac{dX_d}{dt} = \mu_m \cdot X_v$	[5.6.7]
$\frac{dGLC}{dt} = - \left[\frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLC} * Fc_{4O2} * Fc_{4GLC} * Fc_{4GLN}} \right] - \left[\frac{\mu_{ALA} \cdot X_v}{Y_{ALA/GLC} \cdot Fc_{5O2} * Fc_{5GLC} * Fc_{5GLN}} \right] - m_S \cdot X_v$	[5.6.8]
$Fc_{4O2} = Y_{X/GLC,i} / \max(Y_{X/GLC,i}), \text{ ver Figura 5.42}$	
$Fc_{4GLC} = Y_{X/GLC,i} / \max(Y_{X/GLC,i}), \text{ ver Figura 5.52}$	
$Fc_{4GLN} = Y_{X/GLC,i} / \max(Y_{X/GLC,i}), \text{ ver Figura 5.62}$	
$Fc_{5O2} = Y_{ALA/GLC,i} / \min(Y_{ALA/GLC,i}), \text{ ver Figura 5.44}$	
$Fc_{5GLC} = Y_{ALA/GLC,i} / \min(Y_{ALA/GLC,i}), \text{ ver Figura 5.54}$	
$Fc_{5GLN} = Y_{ALA/GLC,i} / \min(Y_{ALA/GLC,i}), \text{ ver Figura 5.64}$	

(continua)

Tabela 5.6. Equações do modelo 6 (continuação)

Equação	Nº
Bloco 1. Sem limitação de glicose (GLC>=0,1 g/L) e sem limitação de GLN(GLN>=0,10 g/L)	
$\frac{dGLN}{dt} = - \left[\frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLN} * Fc_{6O2} * Fc_{6GLC} * Fc_{6GLN}} \right] - \left[\alpha_{NH4} \frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{NH4/GLN} * Fc_{7O2} * Fc_{7GLC} * Fc_{7GLN}} \right]$	[5.6.9]
$Fc_{6O2} = Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, ver Figura 5.45	
$Fc_{6GLC} = Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, ver Figura 5.55	
$Fc_{6GLN} = Y_{X/GLN,i}/\max(Y_{X/GLN,i})$, ver Figura 5.65	
$Fc_{7O2} = Y_{NH4/GLN,i}/\min(Y_{NH4/GLN,i})$, ver Figura 5.47	
$Fc_{7GLC} = Y_{NH4/GLN,i}/\min(Y_{NH4/GLN,i})$, ver Figura 5.57	
$Fc_{7GLN} = Y_{NH4/GLN,i}/\max(Y_{NH4/GLN,i})$, ver Figura 5.67	
$\frac{dALA}{dt} = \mu_{ALA} * X_v$	[5.6.10]
$\frac{dNH_4^+}{dt} = \mu_{NH4} * X_v$	[5.6.11]
$\frac{dGPV}{dt} = \mu_{GPV} * X_v - k_{dGPV} * GPV$	[5.6.12]
$\frac{dGLU}{dt} = 0$	[5.6.13]
Bloco 2. Sem limitação GLC (GLC>= 0,1 g/L) e com limitação de GLN (GLN<0,1 g/L)	
$\frac{dGLN}{dt} = k_{sin GLN} * Y_{GLN/GLU}$	[5.6.14]
$\frac{dNH_4^+}{dt} = \mu_{NH4} * X_v - k_{sin GLN} * Y_{NH4/GLU}$	[5.6.15]
$\frac{dALA}{dt} = \mu_{ALA} * X_v$	[5.6.10]
$\frac{dGLU}{dt} = -k_{sin GLN}$	[5.6.16]
(continua)	

Tabela 5.6. Equações do modelo 6 (continuação)

Equação	Nº
Bloco 3. Com limitação GLC (GLC<0,1 g/L) e sem limitação de GLN (GLN>= 0,1 g/L)	
$\frac{dGLN}{dt} = - \left[\frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{X/GLN} \cdot F_{C6O2} \cdot F_{C6GLC} \cdot F_{C6GLN}} \right] - \left[\alpha_{NH4} \frac{\mu_X \cdot X_v}{Y_{NH4/GLN} \cdot F_{C7O2} \cdot F_{C7GLC} \cdot F_{C7GLN}} \right]$	[5.6.9]
$F_{C6O2} = Y_{X/GLN,i} / \max(Y_{X/GLN,i})$, ver Figura 5.45	
$F_{C6GLC} = Y_{X/GLN,i} / \max(Y_{X/GLN,i})$, ver Figura 5.55	
$F_{C6GLN} = Y_{X/GLN,i} / \max(Y_{X/GLN,i})$, ver Figura 5.65	
$F_{C7O2} = Y_{NH4/GLN,i} / \max(Y_{NH4/GLN,i})$, ver Figura 5.47	
$F_{C7GLC} = Y_{NH4/GLN,i} / \max(Y_{NH4/GLN,i})$, ver Figura 5.57	
$F_{C7GLN} = Y_{NH4/GLN,i} / \max(Y_{NH4/GLN,i})$, ver Figura 5.67	
$\frac{dNH_4}{dt} = \mu_{NH4} \cdot X_v + k_{dALA} \cdot Y_{NH4/ALA}$	[5.6.17]
$\frac{dALA}{dt} = -k_{dALA}$	[5.6.18]
$\frac{dGLU}{dt} = 0$	[5.6.19]
Bloco 4. Com limitação de GLC (GLC<0,1 g/L) e com limitação de GLN (GLN<0,1 g/L)	
$\frac{dGLN}{dt} = k_{sinGLN} \cdot Y_{GLN/GLU}$	[5.6.14]
$\frac{dNH_4}{dt} = \mu_{NH4} \cdot X_v + k_{dALA} \cdot Y_{NH4/ALA} - k_{sinGLU} \cdot Y_{NH4/GLU}$	[5.6.20]
$\frac{dALA}{dt} = -k_{dALA}$	[5.6.18]
$\frac{dGLU}{dt} = -k_{sinGLN}$	[5.6.16]

- formação de NH_4^+ associada ao crescimento celular (Equação 5.6.3) em quatro situações distintas dependendo das concentrações de glicose e glutamina: sem limitação de glicose e de glutamina, (Equação 5.6.11); sem limitação de glicose e com limitação de glutamina, (Equação 5.6.15); com limitação de glicose e sem limitação de glutamina, (Equação 5.6.17); com limitação de glicose e com limitação de glutamina, (Equação 5.6.20);

- consumo de NH_4^+ para síntese de glutamina, incluído nas Equações 5.6.14 e 5.6.20;
- formação de NH_4^+ devido ao consumo de alanina quando há limitação de glicose, incluído na Equação 5.6.17;
- formação de GPV associada ao crescimento celular e sujeita a inibição por NH_4 , (Equação 5.6.5);
- degradação de GPV, incluída na Equação 5.6.12;
- formação de alanina parcialmente associada ao crescimento celular e limitada por GLC, (Equação 5.6.5);
- consumo de alanina quando há esgotamento de glicose no meio, incluída na Equação 5.6.18;
- consumo de glutamato e NH_4^+ quando há esgotamento de glutamina, (Equações 5.6.16 e Equações 5.6.15, respectivamente);
- consumo de glutamato condicionado ao esgotamento de GLN (Equação 5.6.16);

Dessa forma, o modelo incorpora alterações metabólicas em função das concentrações de glutamina, glicose e teores de oxigênio dissolvido do meio.

Todas essas alternativas foram implementadas no programa CI_ Mod6 (Anexo B) na subrotina FCN por meio de *if* lógicos que alteram a dinâmica do processo e a sua formulação pode ser mais bem compreendida pela Figura 5.96.

5.3.3 Modelo 6a Ajuste do modelo para a etapa inicial de crescimento (Bloco 1).

Decidiu-se realizar, preliminarmente, o ajuste do modelo aos dados dos ensaios Ma-07, Ma-08, Ma-09, Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-15 e Ma-16 na fase na qual não se caracteriza limitação por glicose e glutamina, ou seja, considerando apenas as equações que correspondem ao bloco lógico 1. Os resultados do ajuste estão indicados na Figuras 5.97 a Figura 5.104 e na Tabela 5.7. Foram feitas tentativas considerando o conjunto completo de ensaios, porém ficou evidente que a estrutura do modelo fenomenológico proposto não era capaz de contemplar as respostas obtidas nos ensaios Ma-14 ($\text{GLC}_0 = 15 \text{ g/L}$) e Ma-17 ($\text{GLN}_0 = 7 \text{ g/L}$). Esses dois ensaios, então, foram excluídos do conjunto de dados utilizados para realizar o ajuste de parâmetros.

Figura 5.96. Diagrama de blocos da dinâmica do processo (subrotina FCN) com os IF lógicos para os diferentes blocos identificados no modelo

Figura 5.97 Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-07, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos; dados experimentais).

Figura 5.98 Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A) (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.99. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-09 célula S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.100. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-10 célula S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.101. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-11 célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 1,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.102. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-12, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 5,0$ g/L. (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.103. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-15 célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 0,6$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.104. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6a para o ensaio Ma-16, célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 1,75$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Tabela 5.7. Valores dos parâmetros para o modelo 6. Ensaios considerados Ma-07 a Ma-12, Ma-15 e Ma-16. ($5\% < pO_2 < 80\%$; $1,1 \text{ g/L} < GLC_0 < 10,0 \text{ g/L}$; $0,6 \text{ g/L} < GLN_0 < 3,5 \text{ g/L}$). Célula S2AcGPV2.

Parâmetro		Modelo 6a	Modelo 6b	Modelo 6c (**)
μ_{Xmax} (1/h)	PAR(1)	4,00E-02^(*)	4,00E-02^(*)	4,00E-02^(*)
k_{GLC} (g/L)	PAR(2)	3,02E-01	0,596E+00	0,624E+00
k_{GLN} (g/L)	PAR(3)	6,87E-02	0,101E+00	0,260E-01
k_{iNH_4} (g/L)	PAR(4)	0,435E-01	0,435E-01	0,444E-01
k_m (1/h)	PAR(5)	0,221E-02	0,221E-02	0,247E-02
k_{mGLC} (g/L)	PAR(6)	1,04E+00	0,164E+02	0,199E+02
k_{mNH_4} (g/L)	PAR(7)	0,233E+00	0,265E+00	0,383E+00
$\alpha_{NH_4}(Y_{NH_4X})$	PAR(8)	0,546E-01	0,546E-01	0,697E-01
$\alpha_{ALA}(Y_{ALAX})$	PAR(9)	0,714E-03	0,965E-03	0,604E-03
β_{ALA}	PAR(10)	0,749E-04	0,253E-04	0,318E-04
k_{ALA}	PAR(11)	0,978E+01	0,100E-01	0,100E-04
$\alpha_{GPV}(Y_{GPVX})$	PAR(12)	0,230E+01	0,230E+01	0,231E+01
k_{dGPVNH_4}	PAR(13)	0,488E-01	0,488E-01	0,351E-01
Y_{XGLC}	PAR(14)	6,00E+02	0,186E+03	0,188E+03
Y_{ALAGLC}	PAR(15)	0,719E+00	0,649E+03	0,667E+03
m_s	PAR(16)	0,163E-04	0,821E-07	0,821E-07^(*)
Y_{XGLN}	PAR(17)	2,43E+01	0,280E+04	0,299E+04
Y_{NH_4GLN}	PAR(18)	3,37E+03	3,37E+03	0,307E+03
k_{dGPV}	PAR(19)	0,652E-02	0,786E-02	0,519E-02
k_{sinGLN}	PAR(20)	-	0,587E-05	0,167E-02^(*)
Y_{GLNGLU}	PAR(21)	-	1,01^(*)	1,01E+00^(*)
Y_{NH_4GLU}	PAR(22)	-	0,124^(*)	1,24E-01^(*)
k_{dALA}	PAR(23)	-	0,68897E-02	0,760E-02
Y_{NH_4ALA}	PAR(24)	-	0,203^(*)	2,03E-01^(*)
SSR	-	0,145E+03	0,267E+03	0,240E+03
Inclinação(C.A.)	-	0,997E+00	0,102E+01	0,104E+01
R^2	-	0,899E+00	0,879E+00	0,855E+00

(*) parâmetros mantidos constantes; (**) Ensaio Ma-15 não foi considerado.

Para realizar o ajuste do modelo 6a, Bloco 1, foram considerados os dados dos ensaios mencionados excluindo-se, em cada ensaio, os dados referentes a tempos de cultivo da fase lag e os tempos nos quais as concentrações de GLC ou GLN eram inferiores a 0,1 g/L. Em alguns casos isso acarretou em um conjunto de pontos pouco representativo do ensaio (Ensaio Ma-11 e Ma-15). Por outro lado, esse conjunto permitiu um primeiro ajuste de parâmetros, uma primeira avaliação da qualidade do modelo proposto avaliado as suas previsões da dinâmica do processo.

Uma das características destacadas no processo do ajuste não-linear de parâmetros é a sua dependência dos valores iniciais adotados no ajuste (HIMMELBLAU, 1970). Para evitar a obtenção de mínimos locais no ajuste, tomou-se o cuidado de alterar os valores iniciais e, principalmente, adotou-se o procedimento de adotar como estimativa inicial os valores estimados na tentativa anterior. A primeira estimativa inicial foi fundamentada na análise preliminar dos fenômenos e na estimativa preliminar dos parâmetros realizada nessa etapa.

O ajuste realizado é um ajuste com restrições, pois para cada parâmetro foi estipulado um intervalo (valor mínimo e valor máximo) (Tabela 5.6). Esse intervalo também foi definido a partir da avaliação preliminar dos parâmetros sendo adotado o seguinte critério: o extremo superior foi calculado como sendo igual ao dobro do valor experimental máximo encontrado; o limite inferior como sendo a metade o valor experimental máximo calculado. Os valores calculados a partir dos dados experimentais estão indicados nas Figuras 5.41 a 5.70. Para alguns parâmetros, especialmente as constantes de saturação, havia uma estimativa inicial da análise preliminar de fenômenos que indicava valores a serem adotados. Em outros casos, para os quais não havia uma avaliação preliminar, adotaram-se, por segurança, intervalos amplos para a busca dos parâmetros. A Tabela 5.8 indica o intervalo de busca adotado para os parâmetros no ajuste do modelo 6a.

A velocidade específica de crescimento, $\mu_{x_{\max}}$, foi mantida constante em $0,04h^{-1}$, em decorrência de observações feitas durante o ajuste. Verificou-se que o parâmetro sempre alcançava o valor máximo do intervalo definido ($0,01$ a $0,05 h^{-1}$). Como é bastante conhecida a interação de parâmetros no ajuste não-linear (HIMMELBLAU, 1970), também se verificou que os outros parâmetros do modelo eram muito sensíveis a esse parâmetro. Em função dessa interação, decidiu-se fixar o parâmetro no valor experimental máximo observado com essa célula (SWIECH, 2007; BATISTA, 2007).

A partir de uma avaliação visual é possível afirmar que as previsões do modelo ajustam-se aos dados experimentais e podem ser feitas duas importantes ressalvas: o intervalo utilizado e as previsões do modelo são muito pouco representativos da dinâmica dos ensaios Ma-11 e Ma-15 e, evidentemente, trata-se de ajuste parcial da dinâmica do processo (Figuras 101 a 5.103).

Tabela 5.8. Intervalo adotado para ajuste dos parâmetros para o modelo 6a.

Parâmetros	Denominação no programa	Valor min	Valor max	Unidades
μ_{Xmax}	PAR(1)	0,04	0,04	(h ⁻¹)
k_{GLC}	PAR(2)	0,01	2,5	(g/L)
k_{GLN}	PAR(3)	0,01	1,5	(g/L)
k_{iNH4}	PAR(4)	0,001	0,3	(g/L)
k_m	PAR(5)	1,0E-06	0,5	(1/h)
k_{mGLC}	PAR(6)	0,0001	11,0	(g/L)
k_{mNH4}	PAR(7)	1E-02	0,3	(g/L)
$\alpha_{NH4}(Y_{NH4X})$	PAR(8)	1E-3	2,0	(mg/1,0E07cel)
$\alpha_{ALA}(Y_{ALAX})$	PAR(9)	1E-4	0,06	(g/1.0E7cel.h)
β_{ALA}	PAR(10)	1E-6	0,7	(g/1.0E7cel.h)
k_{ALA}	PAR(11)	0,01	10,0	(g/L)
$\alpha_{GPV}(Y_{GPVX})$	PAR(12)	0,01	15	(μGPV/1,0E7cel)
$k_{dGPVNH4}$	PAR(13)	0,01	0,3	(g/L)
Y_{XGLC}	PAR(14)	1	620,0	(1,0E07cel/g)
Y_{ALAGLC}	PAR(15)	0,01	650,0	(g/g)
ms	PAR(16)	1E-8	0,1	(g/1,0E07cel, h)
Y_{XGLN}	PAR(17)	10,0	4,5E+03	1,0E07cel/g
Y_{NH4GLN}	PAR(18)	1E-3	650,0	(mg/g)
k_{dGPV}	PAR(19)	1E-6	1,0	(1/h)

Foi feita a análise estatística dos resultados obtidos, o que exigiu a avaliação do erro experimental dos ensaios. Para a estimativa do erro experimental foram realizados 15 ensaios em condições padrão [ensaios C07, C08, C09, C10, C12, C14, C15, C16, C17, resultados estão indicados no trabalho de Aguiar (2010)]. Esses ensaios permitiram estimar a variância do erro experimental das variáveis X_v e X_d como indica a Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Estimativa das variâncias experimentais

Variável de estado	Np	Somatória dos resíduos	Médias	SSE _Y
Xv	110	2,131	16	0,0277
Xd	112	14,983	15	0,1561

Para as demais variáveis cujo erro não foi estimado neste trabalho (GLC, GLN, NH₄⁺, LAC, GPV, ALA, GLU) foram utilizadas as variâncias estimadas por Suárez (2002) ou consideradas análogas às variáveis estimadas nesse trabalho como foi o caso do erro experimental de ALA, que foi considerada igual ao de glutamina (0,0388), e GPV que foi considerada como igual à variância de Xd (0,0388), a pior variância experimental observada, e estão indicadas na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 Estimativa das variâncias experimentais

Variável de estado	SSE _Y	Referência
GLC	0,0181	Suárez (2002)
GLN	0,0388	Suárez (2002)
NH4	0,0301	Suárez (2002)
ALA	0,0388	-
GLU	0,0388	Suárez (2002)
GPV	0,1561	-
GLOBAL	0,0620	

A análise exige o cálculo da variância proveniente da falta de adequação do modelo aos dados experimentais, também denominada falta de ajuste (*lack off it*), SS_{LOF}, conforme indicado no item 4.6.2. Os resultados encontrados estão indicados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Valores de F para o modelo 6a.

Parâmetro	Valor
SS_{LOF}	0,031
SS_{PE,Global}	0,062
F_{cal}	0,947
F(1-α;N-p;N-nm)	0,955
Graus de liberdade ,df1	1567
Graus de liberdade df2	2072
1- α	0,95

A análise indica que o modelo é validado ($F_{cal} < F$) no intervalo de dados utilizados, contudo como o modelo é um modelo parcial e não representa a dinâmica do processo em suas fases finais, buscou-se ampliar o ajuste a um intervalo de dados maior.

5.3.4 Modelo 6b. Ajuste do modelo em todas as fases do processo (Bloco 1, Bloco 2, Bloco 3 e Bloco 4).

Para o ajuste do modelo 6b adotaram-se todos os dados dos ensaios Ma-07, Ma-08, Ma-09, Ma-10, Ma-11, Ma-12, Ma-15 e Ma-16 o que implicou utilizar os blocos de programação que representam todas as fases do cultivo (Tabela 5.6). Deve-se, contudo, observar que o ensaio Ma-15 apresentou uma característica particular, pois indicou um consumo NH_4^+ na fase estacionária do cultivo. Como essa característica não era prevista pelo modelo nesta etapa do ajuste, foram utilizados dados até 400 horas do cultivo. Os resultados do ajuste estão indicados nas Figuras 5.105 a 5.112 e na Tabela 5.7.

Figura 5.105. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-07, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.106. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.107. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-09 célula S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.108. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-10 célula S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.109. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6 para o ensaio Ma-11 célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 1,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.110. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6 para o ensaio Ma-12, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 5,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.111. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-15 célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 0,6$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.112. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6b para o ensaio Ma-16 célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 1,75$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

No ajuste do modelo 6b, os parâmetros 21, 22 e 24 ($Y_{\text{GLN/GLU}}$, $Y_{\text{NH}_4/\text{GLU}}$ e $Y_{\text{NH}_4/\text{ALA}}$) foram calculados como indica a Tabela 5.12 e mantidos constantes. O intervalo de busca dos demais parâmetros utilizados está indicado na Tabela 5.13.

Tabela 5.12. Valores dos fatores de conversão utilizados no modelo 6b.

	Massa Molar (g/mol)		Massa Molar (g/mol)	Fator de conversão (g/g)	Valor
GLU	145,09	GLN	146,13	$Y_{\text{GLN/GLU}}$	1,0071
ALA	89,09	NH_4^+	18,04	$Y_{\text{NH}_4^+/\text{ALA}}$	0,2025
GLU	145,09	NH_4^+	18,04	$Y_{\text{NH}_4^+/\text{GLU}}$	0,1243

Tabela 5.13. Intervalo adotado para ajuste dos parâmetros para o modelo 6b.

Parâmetros	Denominação no programa	Valor mín	Valor max	Unidades
μ_{Xmax}	PAR(1)	0,040	0,040	(1/h)
k_{GLC}	PAR(2)	0,1	2,0	(g/L)
k_{GLN}	PAR(3)	0,01	1,50	(g/L)
k_{NH_4}	PAR(4)	0,001	0,5	(g/L)
k_m	PAR(5)	1,0E-06	0,5	(1/h)
k_{mGLC}	PAR(6)	0,001	15	(g/L)
k_{mNH_4}	PAR(7)	5,0E-06	0,3	(g/L)
α_{NH_4}	PAR(8)	1,0E-03	2,0	(mg/1,0E07cel)
α_{ALA}	PAR(9)	2,0E-04	5,0E-02	(g/1.0E7cel.h)
β_{ALA}	PAR(10)	1,0E-06	1,0E-03	(g/1.0E7cel.h)
k_{ALA}	PAR(11)	1,0E-03	50	(g/L)
α_{GPV}	PAR(12)	0,01	15	($\mu\text{GPV}/1,0\text{E}+07\text{cel}$)
$k_{\text{dGPV/NH}_4}$	PAR(13)	0,01	0,3	(g/L)
$Y_{\text{X/GLC}}$	PAR(14)	20,0	200	(1,0E07cel/g)
$Y_{\text{ALA/GLC}}$	PAR(15)	0,01	650	(g/g)
m_s	PAR(16)	1,0E-8	0,1	(g/1,0E07cel. h)
$Y_{\text{X/GLN}}$	PAR(17)	150	4500	(1,0E07cel/g)
$Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$	PAR(18)	1,9E-04	350	(mg/g)
k_{dGPV}	PAR(19)	1,0E-04	1,0	(1/h)
k_{sinGLN}	PAR(20)	0,01	50	(1/h)
k_{dALA}	PAR(23)	1,0E-7	10	1/h

As previsões do modelo acompanham, na maioria dos casos, a evolução dos dados experimentais com algumas ressalvas importantes. Em dois ensaios, Ma-10 (Figura 5.108) e Ma-16 (Figura 5.112), o modelo não reproduz a velocidade específica máxima de crescimento experimental, subestimando a valor determinado, provavelmente pela forte inibição por NH_4^+ prevista pelo modelo. No ensaio Ma-16, o modelo subestima o consumo de glicose na fase

final do crescimento e, em decorrência, também não acompanha a evolução de NH_4^+ e ALA e o consumo de GLU no mesmo ensaio. A produção de GPV é subestimada no ensaio Ma-11 (Figura 5.109) e superestimada no ensaio Ma-16, previsões que estão, aparentemente, relacionadas à alteração no teor de GPV na célula em função das condições de cultivo e que não estão incorporadas no modelo. A concentração de ALA prevista pelo modelo nos ensaios Ma-07 (Figura 5.105) e Ma-15 (Figura 5.111) é muito superior à observada, especialmente após esgotamento de glicose. Certamente esse comportamento deve-se ao alto valor de $Y_{\text{ALA/GLC}}$ ajustado para esse conjunto de dados, 900x maior que o valor encontrado para o Bloco 1 (Modelo 6a, Tabela 5.7). Essa enorme variação sugere que o parâmetro é pouco sensível para o conjunto de dados utilizado. Além disso, os parâmetros $Y_{\text{X/GLN}}$ e k_{ALA} também sofreram uma variação drástica (115x e 0,001x, respectivamente, como indica a Tabela 5.7).

Foi feita a análise estatística e os resultados estão indicados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Valores de F para o modelo 6b.

Parâmetro	Valor
SS_{LOF}	0,063
$\text{SS}_{\text{PE,Global}}$	0,062
Fcal	1,01
$F(1-\alpha; N-p; N-nm)$	0,956
df1	2146
df2	2072
$1-\alpha$	0,95

A análise indica que o modelo não é validado, pois Fcal é maior que o F tabelado para as condições do ajuste, o que levou a uma busca de um conjunto de dados que pudesse validar o modelo.

5.3.5 Modelo 6c. Ajuste do modelo 6 em todas as fases do processo (Bloco 1, Bloco 2, Bloco 3 e Bloco 4), sem o ensaio Ma-15.

Antes do ajuste para o conjunto de dados considerado foi feito um ajuste do modelo 6 para cada ensaio individualmente, considerando em cada caso todos os blocos lógicos que correspondem a todas as fases identificadas do processo. Dessa forma, pode-se avaliar a

qualidade do ajuste obtido individualmente e suas limitações. Nesses ajustes, verificou-se que o modelo, mesmo incorporando o consumo de NH_4^+ para a síntese de glutamina a partir de glutamato, não foi capaz de prever o consumo de NH_4^+ no nível observado no ensaio Ma-15. Dessa forma, o ensaio Ma-15 foi retirado do conjunto de dados utilizados para ajustar o modelo. Essa redução no conjunto de dados necessariamente reduz a amplitude e capacidade de aplicação do modelo, porém representa um compromisso em aplicação e precisão possível de ser estabelecido neste estágio do trabalho. Por outro lado, verificou-se que o parâmetro 16, m_s , manteve o mesmo valor encontrado no ajuste anterior (modelo 6b) quando se fez o ajuste individual do modelo aos ensaios e, por essa razão, foi mantido constante no valor anteriormente encontrado. Isso é uma indicação de baixo consumo de glicose para manutenção celular. O ensaio Ma-16 é o único ensaio no qual existe uma formação significativa de glutamina na fase final do cultivo (Figura 5.112). O valor do parâmetro 20, k_{sinGLN} , ajustado para o ensaio Ma-16, foi mantido constante para o ajuste dos demais parâmetros do modelo 6c. Os intervalos de busca dos parâmetros do modelo 6c estão indicados na Tabela 5.15 e os resultados do ajuste estão indicados nas Figuras 5.113 a 5.119 e na Tabela 5.7.

Tabela 5.15. Intervalo adotado para ajuste dos parâmetros para o modelo 6c.

Parâmetro	Denominação	Valor mínimo	Valor máximo	Unidades
k_{GLC}	PAR(2)	0,2	2,5	(g/L)
k_{GLN}	PAR(3)	0,0	1,5	(g/L)
k_{INH_4}	PAR(4)	0,001	0,5	(g/L)
k_m	PAR(5)	1,0E-06	0,5	(1/h)
$k_{m\text{GLC}}$	PAR(6)	0,1	15	(g/L)
$k_{m\text{NH}_4}$	PAR(7)	0,01	0,5	(g/L)
α_{NH_4}	PAR(8)	1,0E-04	2,0	(mg/1,0E+07cel)
α_{ALA}	PAR(9)	2,0E-4	5,0E-02	(g/1.0E+07cel.h)
β_{ALA}	PAR(10)	1,0E-06	1,0E-03	(g/1.0E+07cel.h)
k_{ALA}	PAR(11)	1,0E-05	50	(g/L)
α_{GPV}	PAR(12)	0,01	15	($\mu\text{gGPV}/1,0\text{E}+07\text{ce}$)
$k_{d\text{GPVNH}_4}$	PAR(13)	0,01	0,5	(g/L)
$Y_{\text{X/GLC}}$	PAR(14)	50	200	(1,0E+07cel/g)
$Y_{\text{ALA/GLC}}$	PAR(15)	1,0E-02	700	(g/g)
$Y_{\text{X/GLN}}$	PAR(17)	150	4500	1,0E+07cel/g
$Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$	PAR(18)	1,0E-03	350	(mg/g)
$k_{d\text{GPV}}$	PAR(19)	1,0E-04	1	(1/h)
$k_{d\text{ALA}}$	PAR(23)	1,0E-07	50	(1/h)

Figura 5.113. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-07, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 5\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.114. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-08, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 50\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.115. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-09, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 80\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.116. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-10, célula S2AcGPV2, $pO_2 = 30\%$ (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo, símbolos, dados experimentais).

Figura 5.117. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-11, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 1,0$ g/L (Quadro A1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.118. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-12, célula S2AcGPV2, $GLC_0 = 5,0$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

Figura 5.119. Comparação entre dados experimentais e as previsões do modelo 6c para o ensaio Ma-16, célula S2AcGPV2, $GLN_0 = 1,75$ g/L (Quadro A.1, Anexo A). (linha contínua, previsões do modelo; símbolos, dados experimentais).

A partir dos resultados obtidos é possível constatar que o modelo 6c proposto apresenta dificuldades para ajustar todos os dados experimentais. Contudo é possível validar o modelo para o conjunto de ensaios utilizados com um nível de significância de 85 % como indica a Tabela 5.16.

Tabela 5.16. Valores de F para o modelo 6c

Parâmetro	Valor
SS_{LOF}	0,059
$SS_{PE,Global}$	0,062
Fcal	0,947
$F(1-\alpha; N-p; N-nm)$	0,955
df1	1999
df2	2072
$1-\alpha$	0,85

A partir do ajuste realizado e dos parâmetros obtidos verifica-se que o modelo 6c ajustado prevê de forma bastante adequada os seguintes fenômenos biológicos:

a) a limitação do crescimento por glicose para concentrações inferiores a 0,6 g/L (k_{GLC} , Tabela 5.7), valor coerente com a análise preliminar dessa constante realizada no item 5.3.1b, sendo que a fase estacionária de crescimento advém do esgotamento de glicose no meio. Em um caso, o modelo prevê esgotamento simultâneo de glicose e de glutamina (ensaio Ma-07), como indica a Figura 5.113.

b) o crescimento celular previsto pelo modelo acompanha a evolução experimental da concentração celular, porém não reproduz o valor de μ_{Xmax} e a duração da fase exponencial nos ensaios Ma-10 e Ma-16, como indicam as Figuras 5.116 e 5.119. A velocidade específica máxima de crescimento simulada é inferior à determinada experimentalmente, em decorrência, a concentração celular nessa fase é subestimada no ensaio Ma-10. A diminuição da velocidade específica de crescimento no modelo é decorrência da influência da concentração de NH_4^+ já que GLC e GLN não limitam o crescimento. Também não é possível descartar a possibilidade de erro experimental nesses ensaios, uma vez que esse erro é elevado e, de forma geral, há uma boa aderência das previsões com os dados experimentais.

c) A evolução da concentração de glicose prevista praticamente coincide com a evolução experimental com exceção dos valores encontrados no ensaio Ma-09, ensaio sujeito a forte inibição por oxigênio dissolvido e para o qual o modelo prevê um consumo maior de glicose que o verificado experimentalmente, como indica a Figura 5.115. Como essa é uma medida que tem boa precisão analítica, isso sugere que a dependência do metabolismo de glicose para níveis de oxigênio dissolvido elevados ainda não está suficientemente formulada no modelo.

d) praticamente não ocorre limitação do crescimento por GLN, pois a constante de saturação estimada é de 0,026 g/L (k_{GLN} , Tabela 5.7). Essa característica deve estar associada ao fato de haver síntese de GLN quando esse substrato está em baixas concentrações, ou seja, quando a concentração de glutamina no meio é aparentemente inferior a 0,1 g/L. As curvas de evolução de GLN durante o cultivo, previstas pelo modelo, acompanham os dados experimentais, mostrando pequenos desvios no ensaio Ma-09 e no ensaio Ma-11, como indicam as Figuras 5.115 e 5.117. O ajuste do ensaio Ma-16 indica que a constante de síntese, k_{sinGLN} , é $0,170E-02$ gGLU/L.h o que explica adequadamente o aumento da concentração de GLN observada. O fator de rendimento de glutamina em células ($Y_{X/GLN}$) ajustado, $2989,5 \cdot 10^7$ cel/gGLN, está acima do intervalo de valores estimados experimentalmente (entre $47,0 \cdot 10^7$ cel/gGLN a

1920x10⁷ cel/g_{GLN}) o que indica que o fluxo de glutamina para o crescimento é menor que o indicado pela estimativa inicial do parâmetro.

e) uma forte inibição do crescimento pelo íon NH₄⁺ dado a valor da constante de inibição encontrada (0,0444 g/L). Esse valor implica um efeito inibitório elevado e pode explicar, como já comentado, a diferença entre as previsões do modelo com os dados experimentais nos ensaios Ma-10 e Ma-16, uma vez que concentrações dessa ordem são encontradas, por exemplo, na fase exponencial de crescimento nesses ensaios.

f) aumento da velocidade de formação de NH₄⁺ regulada pelo esgotamento de glicose. Possivelmente, a glutamina, nesse caso, passa a ser incorporada ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos pela ação das enzimas PAG e GDH que a convertem a α -cetoglutarato com formação de dois grupos NH₄⁺ como indicado na Figura 3.2. Durante a fase de crescimento exponencial, quando há glicose em excesso, como já mencionado por Drews *et al.* (2000), as células Sf9 podem realizar uma transferência parcial de nitrogênio para ALA sem formação de NH₄⁺. Entende-se, portanto, que na fase exponencial de crescimento, com a formação de alanina, e ao final do crescimento com esgotamento de GLC ocorram transformações com estequiometrias diferentes de formação de NH₄⁺. As previsões do modelo acompanham a tendência experimental com exceção o ensaio Ma-16, como indica a Figura 5.119, que, por não prever o esgotamento de GLC, não prevê o aumento da velocidade de formação desse produto ao final do cultivo.

g) velocidade de morte celular de ordem zero, pois os valores das constantes de inibição da morte celular por GLC e NH₄⁺ encontrados são altos (19,9 g/L e 0,383 g/L, respectivamente), frente às concentrações medidas durante o cultivo. Esse resultado não era esperado, pois pela análise prévia de fenômenos e pelas indicações da literatura havia a expectativa de verificar aumento da velocidade de morte celular com baixas concentrações de glicose e com o aumento da concentração de NH₄⁺ no meio. As previsões do modelo acompanham a tendência experimental com exceção do ensaio Ma-16 (Figura 5.119).

h) velocidade formação de alanina associada ao crescimento celular. Como já foi dito (itens 3.2.1 e 3.2.20), ALA pode ser considerada como o destino mais importante para o piruvato resultante do metabolismo da glicose e, portanto, dependente da concentração de glicose. Por

outro lado, como também já afirmado, a formação de alanina parece depender igualmente da disponibilidade de glutamina (Figura 5.58; BATISTA *et al.*, 2009a; AGUIAR, 2010) e de outros fatores como, por exemplo, o nível de oxigênio dissolvido no meio, Figura 5.58. O modelo reproduz essa dependência da cinética de formação de ALA com esses dois substratos durante a fase exponencial de crescimento, pois a síntese de alanina é interrompida quando há esgotamento desses dois substratos. Foi adotada uma formulação que admitia cinética de formação de ALA parcialmente associada ao crescimento, pois se verificou formação desse aminoácido, mesmo sem crescimento celular, porém sem esgotamento de GLC e GLN. O valor da constante k_{ALA} corresponde à expressão (5.6.4), encontrado no ajuste do modelo 6c e cujo valor é $0,100E-04$ g/L, indica que o termo não associado ao crescimento é de ordem zero em relação à glicose, ou seja, esse termo não depende da concentração de GLC. É importante destacar que o modelo, em alguns casos, tende a superestimar a concentração de alanina durante o cultivo, como indicam as Figuras 5.113 e 5.119.

i) consumo de alanina com o esgotamento de glicose. Porém, verifica-se que o consumo desse aminoácido está subestimado, como indica a Figura 5.119 (ensaio Ma-16).

j) formação de GPV associada ao crescimento e inibição da síntese pelo acúmulo de NH_4^+ . A constante de inibição dessa síntese sugere que esse efeito é destacado quando as concentrações de NH_4^+ são superiores a 35 mg/L, valores encontrados no cultivo antes do final da fase exponencial. Esse resultado reforça a hipótese formulada por Aguiar (20110) que indicou ser a inibição por NH_4^+ responsável pela redução no teor de GPV nas células. O valor máximo de GPV ocorre quando deixam de haver crescimento e a síntese de GPV e passa a prevalecer o efeito da degradação da proteína. As previsões do modelo acompanham a tendência experimental com exceção dos ensaios Ma-10 e Ma-10 (Figuras 5.116 e 5.119) para os quais o modelo não prevê degradação significativa da proteína. Novamente, é importante destacar que o erro experimental na determinação da GPV deve ser elevado, o que torna difícil a caracterização de sua dinâmica no processo.

k) consumo de glutamato para formação de glutamina. Nos ensaios Ma-7, Ma-10 e Ma-16, nos quais a concentração de GLN atinge valores inferiores a 0,1 g/L, o modelo prevê consumo de glutamato como se verifica experimentalmente. Nos demais ensaios, nos quais a concentração de GLN não atinge esse limiar, o modelo não prevê consumo de GLU.

Experimentalmente isso também é verificado, com exceção do ensaio Ma-9 que indica consumo de GLU, mesmo concentrações de GLN superiores a 1 g/L.

6 CONCLUSÕES

Os estudos iniciais sobre o **metabolismo** da linhagem de *Drosophila melanogaster* trasfectada para expressar a glicoproteína do vírus da raiva compararam dados experimentais obtidos por diferentes pesquisadores do nosso grupo e permitiu confirmar uma série de hipóteses levantadas pelo grupo ao longo dos trabalhos realizados:

1. A linhagem S2AcGPV2 apresenta comportamento metabólico significativamente distinto em resposta a alterações no meio ambiente, que podem decorrer das condições iniciais impostas ao sistema, ou da própria evolução do cultivo.
2. Em diferentes meios de cultura (SF900 II[®], TC100 modificado e IPL-41 modificado) foi possível observar valores muito diferentes para as principais grandezas que caracterizam o crescimento e a síntese de proteína, respectivamente, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{X_{max}}$) e as medidas do teor de proteína nas células (GPV_E) e da sua concentração máxima (GPV). Os valores de $\mu_{X_{max}}$ estão na faixa de 0,0028 a 0,05h⁻¹, uma variação de aproximadamente 18x; enquanto os valores relativos à produção da GPV apontam para as faixas 177<GPV_{max}<1205 ng/mL, uma variação de 6,8x, e 1716<GPV_{Emax}<2800ng/10⁷cel, uma variação de 1,6x (considerando dados advindos apenas da metodologia otimizada para determinação da GPV);
3. Essa variabilidade de respostas observadas, que pode ser explicada por uma grande flexibilidade da linhagem S2 para se adaptar às condições ambientais, aparentemente alterando os fluxos metabólicos pelas principais vias de assimilação da glicose e da glutamina, tornou impossível a proposição de um modelo único que representasse as cinéticas de crescimento celular, consumo de substratos (GLC e GLN), produção de produto (GPV) e produção de subprodutos (NH₄⁺ e LAC) nos três diferentes meios de cultura;
4. Uma **proposta preliminar de modelo** (modelos 1 e 2) para um conjunto de ensaios realizados em um mesmo meio de cultura (TC100AG - modificado) sob diferentes condições de oxigênio dissolvido (5 a 80 % da saturação em ar) considerou:

- a) Crescimento celular duplamente limitado por GLC e por GLN representado por uma estrutura matemática tipo Monod; e, ao mesmo tempo, inibido por amônio, que foi simulado por uma inibição do tipo hiperbólica;
- b) Efeito limitante e ao mesmo tempo inibitório do oxigênio dissolvido sobre o crescimento celular que foi representado de duas formas distintas: segundo a proposição de Andrews (1968) e também como sugerido por Wu (1988);
- c) Morte celular limitada por NH_4^+ e inibida por GLC e GLN;
- d) Formação de amônio e GPV associados ao crescimento celular;
- e) Degradação de GPV segundo uma cinética de primeira ordem;
- f) Consumo de glicose para formação de material celular, síntese da proteína de interesse e manutenção;
- g) Consumo de glutamina para formação de material celular e formação de amônio;
- h) Os ajustes obtidos com esse conjunto de equações foram considerados ruins segundo uma análise visual;

Dada a enorme dificuldade de se representar as alterações no metabolismo celular empregando um equacionamento do tipo fenomenológico não-estruturado, adotaram-se as seguintes **formulações matemáticas para interpretar essa flexibilidade** da linhagem S2AcGPV2, cultivada em meio TC100, sob condições variáveis de pO_2 (5 a 80 % da saturação em ar), de GLC_0 (1 a 15 g/L) e de GLN_0 (0,6 a 7 g/L):

5. A influência das condições de cultivo, em especial, do teor de oxigênio dissolvido, da concentração inicial de glicose e da concentração inicial de glutamina, sobre as grandezas de processo, na fase exponencial, foi formulada como fatores de correção ($F_{c_{ij}}$) para o efeito da variável j (O_2 , GLC_0 ou GLN_0) sobre o parâmetro i ($\mu_{X_{\max}}$, $Y_{X/\text{GLC}}$, $Y_{X/\text{GLN}}$, $Y_{\text{NH}_4/\text{GLN}}$, $Y_{\text{ALA}/\text{GLC}}$, $Y_{\text{NH}_4/X}$, $Y_{\text{GPV}/X}$), definidos como a relação $(F_{c_{ij}})/\max(F_{c_{ij}})$.

A incorporação desses fatores de correção nos modelos 4, 5 e 6a, em condições de cultivo sem limitação em GLC ou GLN, resultou em modelos que representam adequadamente os dados experimentais (análise visual). Mas o modelo 6a, só foi validado estatisticamente (teste F, $\alpha=95\%$), considerando valores de erro experimental calculados e disponíveis na literatura, quando foram eliminados os ensaios com maiores concentrações iniciais de

GLC e GLN. Dessa forma, o modelo é válido no intervalo de $5 < pO_2 < 80 \%$, $1 < GLC_0 < 10$ g/L e $0,6 < GLN_0 < 3,5$ g/L;

6. Formulação matemática independente para as quatro diferentes situações metabólicas observadas - sem limitação em GLC ou GLN, com limitação apenas em GLC, com limitação apenas em GLN e, finalmente, limitada em GLC e em GLN - com as equações sendo organizadas segundo uma sequência de “if’s” lógicos, para direcionar o metabolismo;
7. O modelo 6c, que **representa as quatro diferentes situações metabólicas** observadas (item 6) permite prever as seguintes características do cultivo:
 - a) Velocidade específica de crescimento caracterizada por ser do tipo Monod com múltipla limitação de substratos (glicose e glutamina) e com inibição hiperbólica por NH_4^+ ;
 - b) Limitação do crescimento por glicose para concentrações inferiores a 0,6 g/L;
 - c) Não limitação do crescimento por GLN, pois a constante de saturação estimada é de 0,026 g/L;
 - d) Forte inibição do crescimento pelo íon NH_4^+ dado o valor da constante de inibição encontrada (0,0444 g/L);
 - e) Consumo de glicose caracterizado, fundamentalmente, para duas finalidades: crescimento celular e formação de alanina;
 - f) Velocidade específica de morte celular é uma cinética de ordem zero, tendo em vista os valores ajustados para os parâmetros k_{mNH_4} (0,383 g/L) k_{mGLC} (19,9 g/L);
 - g) Formação de glutamina quando a concentração de glutamina atinge valores inferiores a 0,1 g/L. A constante de síntese, k_{sinGLN} , $0,170E-02$ gGLN/L.h, explica adequadamente o aumento da concentração de glutamina observada
 - h) Consumo de glutamato condicionado ao esgotamento de GLN para formação de glutamina;
 - i) Velocidade específica de formação de alanina parcialmente associada ao crescimento celular. O valor da constante k_{ALA} encontrado no ajuste do modelo 6c indica que o termo não associado ao crescimento é de ordem zero em relação à glicose;
 - j) Formação de NH_4^+ associada ao crescimento celular e aumento da velocidade formação regulada pela glicose;

- k) Formação de GPV associada ao crescimento celular e sujeita a inibição por NH_4 , pois não se encontrou elementos para concluir a existência de limitação da síntese por esgotamento de aminoácidos, em particular, por glutamina ou cistina;
- l) Degradação da proteína na fase estacionária do crescimento;
- m) O modelo foi validado, com nível de significância de 85 %, para a faixa de $5 < \text{pO}_2 < 80$ %, $1 < \text{GLC}_0 < 10$ g/L e $1,75 < \text{GLN} < 3,5$.

7. REFERÊNCIAS¹

- AGUIAR, M. A. **Estudo Cinético de células de *Drosophila melanogaster* transfectadas para a produção da glicoproteína da raiva em biorreator**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- AGUIAR, M. A.; BARRAL, M. F.; PICCOLI, R. A. M.; LÉO, P.; ASTRAY, R. M.; ANDRADE, R. J. AUGUSTO, E.F.P. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido no Crescimento e Produção de Células de *Drosophila melanogaster* Transfectadas para a Expressão da Glicoproteína do Vírus da Raiva. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS –SINAFER. 2009. Natal. **Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal: UFRN. 2009. 1-5p
- ALTAMIRANO, C.; GÒDIA, F.; CAIRÓ, J. J. Metabolismo de células de mamíferos cultivadas in vitro. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.) **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2008. p. 81-104.
- ALTAMIRANO, C.; ILLANES A.; BECERRA S.; CAIRO J.J.; GÒDIA, F. Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p.547-556, 2006a.
- ALTAMIRANO, C.; ILLANES, A.; CANESSA, R.; BECERRA, S. Specific nutrient supplementation of defined serum-free medium for the improvement of CHO cells growth and t-PA production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p.61-67, 2006b.
- AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: CASTILHO, L. R.; MORAES A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. (Orgs.). **Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. London: Taylor & Francis, 2008. p.75-110.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, p.707-723, 1968.
- ANTONIUKAS, L.; GRAMMEL, H.; REICHL, U. Production of hantavirus Puumala nucleocapsid protein in *Saccharomyces cerevisiae* for vaccine and diagnostics. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p.347-362, 2006.
- ASSENKA, S. P.; YOU, M.; SHY, C. H.; YAMAGISHI, J.; SAKAGUCHI, T.; ZHOU, J.; KIBE, M. K.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. The use of a recombinant baculovirus expressing a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its potential application as a bioacaricide for tick control. **Parasitology Research**, v. 98, p.111-118, 2006.

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002,

ASTRAY, R. M.; AUGUSTO, E.; YOKOMIZO, A. Y.; PEREIRA, C. A. Analytical approach for the extraction of recombinant membrane viral glycoprotein from stably transfected *Drosophila melanogaster* cells. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 98-103, 2008.

AUGUSTO, E. F. P., BARRAL, M. F., PICCOLI, R. A. M. Modelos de crescimento e formação de produtos no cultivo de células animais. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R. (Eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Roca, 2008, p. 170-215.

BACHMANN, A. S.; CORPUZ, G.; HARELD, W.P.; WANG, G.; COLLIER, B. A. A simple method for the rapid purification of copia virus-like particle from *Drosophila* Schneider 2 cell. **Journal of Virological Methods**, v. 115, p. 159- 165, 2004.

BANKS, D. J.; HUA, G.; ADANG, M. Cloning of a *Heliothis virescens* 110kda aminopeptidase N in *Drosophila* S2 cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 499- 508, 2003.

BASSANEZI, R. C. **Ensino - Aprendizagem com Modelagem Matemática**. São Paulo: Contexto, 2002. 389p.

BATISTA, F. R. X.; PEREIRA, C. A.; MENDONÇA, R. Z.; MORAES, A. M. Evaluation of concentrated milk whey as a supplement for SF9 *Spodoptera frugiperda* cells in culture. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p.522-532, 2006.

BATISTA, F. R. X. **Formulação de meio de cultura livre de proteína animal para células de *Drosophila melanogaster* produtoras da glicoproteína G do vírus da raiva**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

BATISTA, F. R. X.; PEREIRA, C. A.; MENDONÇA, R. Z.; MORAES, A. M. Formulation of a protein-free medium based on IPL-41 for the sustained growth of *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, p. 11-22, 2008.

BATISTA, F. R. X.; MORAES, A. M.; BÜNTEMEYER, H.; NOLL, T. Influence of culture conditions on recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells producing rabies virus glycoprotein cultivated in serum-free medium. **Biologicals**, v. 37, p. 108-118, 2009a.

BATISTA F. R. X.; GRECO, K. N.; ASTRAY, R. M.; JORGE, S. A. C.; AUGUSTO, E. F. P.; PEREIRA, C. A.; MENDONÇA, R. Z.; MORAES, A. M. Behavior of wild-type and transfected S2 cells cultured in two different media. Aceito para publicação em **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009b.

BATT, C.; KOMPALA, S. K. A structured modelling framework for dynamics of hybridoma growth in continuous suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 515-531, 1989.

BEBBINGTON, C.R.; RENNER, G.; THOMSON, S.; KING, D.; ABRAMS, D.; YARRANTON, G.T.; High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. **Biotechnology**, v. 10, p.169–175, 1992.

BEDARD, C.; TOM, R.; KAMEN, A. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 615-624, 1993.

BENSLIMANE, C.; ELIAS, C. B.; HAWARI, J.; KAMEN, A. Insights into the Central Metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4(Tn-5) Insect Cells by Radiolabeling Studies. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 78-86, 2005.

BERNAL, V.; CARINHAS, N.; YOKOMIZO, A. Y.; CARRONDO, M. J.; ALVES, P. M. Cell density effect in the baculovirus-insect cells system: A quantitative analysis of energetic metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v.104, p. 162-180, 2009.

BIRCH, J. R.; THOMPSON, P. W.; BORASTON, R. Production of monoclonal antibodies in large-scale cell culture. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, p. 10-12, 1985.

BIRCH, J. R.; LAMBERT, K.; THOMPSON, P. W.; KENNEY, A. C.; WOOD, L. A. Antibody production with airlift fermenters . In: LYDERSEN, B. K. (Ed.). **Large Scale Cell Culture Technology**. Munich: Hanser, 1993, p. 1-20.

BHATIA, R.; JESIONOWSKI, G.; FERRANCE, J.; ATAAL, M. M. Insect cell physiology. **Cytotechnology**, v. 24, p. 1-9, 1997.

BONOMI, A.; FLEURY, A.T.; PICCOLI, A.M.; QUIROZ, L.H.C.; PEREIRALIMA, P.S.;TANNURI,E.A.; MATTOS; M. N. Modelagem matemática, otimização e controle avançado do processo de produção de plástico biodegradável a partir de cana de açúcar por via fermentativa. IN: CONGRESSO DE EQUIPAMENTOS E AUTOMAÇÃO DA INDÚSTRIA QUÍMICA. 1999. São Paulo. Anais do 4º Congresso de Equipamentos e Automação da Indústria Química: São Paulo: 1999.

BOVO, R.; GALESI, A.; JORGE, S.; PICCOLI, R.; MORAES, A.; PEREIRA, C.; AUGUSTO, E. Kinetic response of a *Drosophila melanogaster* cell line to different medium formulations and culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, p. 23-35, 2008.

BREE, M. A.; DHURJATI, P.; GEOGHEGAN, R.; ROBNETT, B. Kinetic modelling of hybridoma cell growth and immunoglobulin production in a large-scale suspensions culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 1067-1072, 1988.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 68, p. 283-291, 2005.

BUTLER, M.; JENKINS, H. Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 97-110, 1989.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1733-1761, 1999.

CHA, H. J.; SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHO, H. S.; DALAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 225-233, 2005.

CHICO, E.; RODRÍGUEZ, G.; FIGUEIREDO, A. Biorreatores para células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.). **Tecnologia do Cultivo de Células Animais**. São Paulo: Rocca, 2008. p. 216-254.

COWGER, N. L.; O'CONNOR, K. C.; HAMMOND, T. G.; LACKS, D. J.; NAVAR, G. L. Characterization of bimodal cell death of insect cells in a rotating-wall vessel and shaker flask. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 14-26, 1999.

CRUZ, H. J.; FREITAS, C. M.; ALVES, P. M.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p.43-52, 2000a.

CRUZ, P. E.; GONCALVES, D.; ALMEIDA, J.; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T. Modeling retrovirus production for gene therapy. 2. Integrated optimization of bioreaction and downstream processing. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 350-357, 2000b.

DALILI, M.; OLLIS, D. F. Transient kinetics of hybridoma growth and monoclonal antibody production on serum-limited cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, 984-990, 1989.

DALILI, M.; SAYLES, G. D.; OLLIS, D. F. Glutamine- limited batch hybridoma growth and antibody production: experiment and model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 74-82, 1990.

DE TREMBLAY, M.; PERRIER, M.; CHAVARIE, C.; ARCHAMBAULT, J. Optimization of fed-batch culture of hybridoma cell using dynamic programming: single and multi feed case. **Bioprocess Engineering**, v. 7, p.229-234, 1992.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DEML, L.; WOLF, H.; WAGNER, R. High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected *Drosophila* Schneider -2 cells. **Journal of Virological Methods**, v.79, p. 191-203, 1999a.

DEML, L.; S HIRMBECK,R.; REIMANN, J. ; WOLF, H.; WAGNER, R. Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in *Drosophila* Schneider -2 cells. **Journal of Virological Methods**, v.79, p. 205-217, 1999b.

DEUTSCHMANN, S. M.; JAGER, V. Optimization of the growth conditions of Sf21 insect cells for high- density perfusion culture in stirred-tank bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 506-512, 1994.

DOVERSKOG, M., HAN, L., HÄGGSTRÖM, L. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. **Cytotechnology**, v. 26, p. 91-102, 1998.

DOVERSKOG, M.; LJUNGGREN, J.; ÖHMAN, L.; HÄGGSTRÖM, L. Physiology of cultured animal cells. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 103-115, 1997.

DOVERSKOG, M.; JACOBSSON, U.; CHAPMAN, B. E.; KUCHEL, P. W.; HÄGGSTRÖM, L. Determination of NADH-dependent glutamate synthase (GOGAT) in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells by a selective ¹H/¹⁵N NMR in vitro assay. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 87-97, 2000.

DREWS, M.; DOVERSKOG, M. Ö. L.; CHAPMAN, B. E.; JACOBSSON, U.; KUCHEL, P. W.; HÄGGSTRÖM, L. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by ¹H/¹⁵N NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 23-37, 2000.

DREWS, M.; DOVERSKOG, M.; ÍHMAN, L.; CHAPMAN, B. E.; JACOBSSON, U.; KUCHEL, P.W.; HÄGGSTRÖM, L. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by ¹H/¹⁵N NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 23-37, 2000.

DREWS, M.; PAALME, T.; VILU, R. The Growth and Nutrient Utilization of the Insect-Cell Line *Spodoptera-Frugiperda* Sf9 in Batch and Continuous-Culture. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 187-198, 1995.

ELIAS, C. B.; CARPENTIER, E.; DUROCHER, Y.; BISSON, L.; WAGNER, R.; KAMEN, A. Improving Glucose and Glutamine Metabolism of Human HEK 293 and *Trichoplusia* Insect Cells Engineered To Express a Cytosolic Pyruvate Carboxylase Enzyme. **Biotechnology Progress**, v. 19 , p. 90-97, 2003.

EUROPA, A. F.; GAMBHIR, A.; FU, P. C.; HU, W. S. Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 25-34, 2000.

FERRANCE, J. P.; GOEL, A.; ATAAL, M. M. Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: Quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 697-707, 1993.

FERRAZ, L.P.C. **Proposição de um modelo fenomenológico estruturado cibernético para o processo de produção de copolímeros de polihidroxialcanoatos por via fermentativa.**

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. São Paulo. 1999.

FIBER CELL SYSTEMS INC. **HOLLOW Fiber Bioreactors and Related Products**. Disponível em <http://www.fibercellsystems.com/documents/brochure.pdf>. 2008. Acesso em 14-7-2009.

FOLLSTAD, B. D.; BALCARCEL, R. R.; STEPHANOPOULOS, G.; WANG, D. I. C. Metabolic flux analysis of hybridoma continuous culture steady state multiplicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 675-683, 1999.

FRAME, K. K.; HU, W. S. Kinect study of hybridoma cell growth in continuous culture. I. A model for non-producing cell. **Biotechnology and Bioengineering**, p. 55-64, 1991a.

FRAME, K. K.; HU, W. S. Comparison of growth kinetics of producing and nonproducing hybridoma cells in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 690-696, 1991b.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique**. 5a edição, New York: Wiley-Liss, 2005.

FROMENT, G.; BISCHOFF, K. B. **Chemical Reator Analysis and Design**. New York: John Wiley and Sons, 1979.

FROMENT, G. F.; HOSTEN, L. H. Catalytic Kinetics: Modelling. In: ANDERSON, J. R.; BOUDART, M. (Eds.) **Catalysis. Science and Technology**. New York: Springer-Verlag, 1981.

GAERTNER, J. G.; DHURJATI, P. Fractional factorial study of hybridoma behavior. 1. Kinetics of growth and antibody production. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 298-308, 1993a.

GAERTNER, J. G.; DHURJATI, P. Fractional factorial study of hybridoma behavior. 2. Kinetics of nutrient uptake and waste production. **Biotechnology Progress**, v. 9, p. 309-316, 1993b.

GALES, A. L. L.; PEREIRA, C. A.; MORAES, A. M. Culture of transgenic *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells in serum-free media based on TC100 basal medium. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1399-1407, 2007.

GALES, A. L. L. **Cultivo de células de *Drosophila melanogaster* em diferentes formulações de meios de cultura livres de soro visando a produção da glicoproteína do vírus da raiva**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. UNICAMP. Campinas. 2007.

GALES, A. L. L.; AGUIAR, M. A.; ASTRAY, R. M.; AUGUSTO, E. F. P.; MORAES, A. M. Growth of recombinant *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells producing rabies virus

glycoprotein in bioreactor employing serum-free medium. **Cytotechnology**, v. 57, p. 73-81, 2008.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W.; TUFFEREAU, C.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Rabies virus glycoprotein is a trimer. **Virology**, v. 187, p. 627-632, 1992.

GAUDIN, Y. Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3742-3750, 1997.

GHOSH, S.; PARVEZ, M. K.; BANERJEE, K.; SARIN, S. K.; HASNAIN, S. E. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. **Molecular Therapy**, v. 6, p. 5-11, 2002.

GIBSON, K. R.; VANEK, P. G.; KALOSS, W. D.; COLLIER, G. B.; CONNAUGHTON, J. F.; ANGELICHIO, M.; LIVI, G. P.; FLEMING, P. J. Expression of dopamine- β -hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 cell - Evidence of mechanism of membrane-binding other than uncleaved signal peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 9490-9495, 1993.

GLACKEN, M. W.; ADEMA, E.; SINKSKEY, A. J. Mathematical description of hybridoma culture kinetics . I. Initial metabolic rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 491-506, 1988.

GLACKEN, M. W.; HUANG, C.; SINSKEY, A. J. Mathematical description of hybridoma culture kinetics:III. Simulation of fed-batch bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 39-66, 1989.

GUARDIA, M. J.; GAMBHIR, A.; EUROPA, A. F.; RAMKRISHNA, D.; HU, W. S. Cybernetic modeling and regulation of metabolic pathways in multiple steady states of hybridoma cells. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 847-853, 2000.

GRIFFIN, T. J.; SETH, G.; XIE, H.; BANDHAKAVI, S.; HU, W. S. Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies. **Trends in Biotechnology**, v. 25, p. 401-408, 2007.

HAMMONS, C.; NARCISO, H. **Rhabdoviridae**. Disponível em <http://www.stanford.edu/group/virus/rhabdo/2005/index.htm>, acesso em 3/08/2009.

HAGGSTROM L. Animal cell metabolism. In: Spier R (Ed.), **Encyclopedia of Cell Technology**. New York: Wiley & Sons , 2000. pp. 392-411

HARIGAE, M.; MATSUMURA, M.; KATAOKA, H. Kinetic study on HBs-MAb production in continuous cultivation. **Journal of Biotechnology**, v. 34, p. 227-235, 1994.

HILLER, G. W.; AESCHLIMANN, A. D.; CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum-free medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 733-741, 1991.

HIMMELBLAU, D.M. **Process Analysis by Statistical Methods**. New York: John Wiley & Sons. 1970.

HITZEMAN, R. A.; HAGIE, F. E.; LEVINE, H. L.; GOEDDEL, D. V.; AMMERER, G.; HALL, B. D. Expression of A Human-Gene for Interferon in Yeast. **Nature**, v. 293, p. 717-722, 1981.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 1-20, 2003.

JAIN, E.; KUMAR, A. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 46-72, 2008.

JANG, J. D.; BARFORD, J. P. An unstructured kinetic model of macromolecular metabolism in batch and fed-batch cultures of hybridoma cells producing monoclonal antibody. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 153-168, 2000.

JEON, H. K.; CHANG, K. H.; KIM, K. I.; CHUNG, I. K. Functional expression of recombinant tumstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cell. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 102-109, 1998.

JO, E. C.; PARK, H. J.; PARK, J. M.; KIM, K. H. Balanced nutrient fortification enables high density hybridoma cell culture in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 717-722, 1990.

KAHANER, D.; MOLER, C. B.; NASH, S. **Numerical methods and software : computer methods for mathematical computations** . Englewood: Prentice-Hall, 1989.

KANG, C. Y. Expression of human immunodeficiency virus genes using baculovirus expression system. **Molecular Biotechnology**, v. 8, p. 173-187, 1997.

KEEN MJ, HALE C. The use of serum-free medium for the production of functionally active humanised monoclonal antibody from NSO mouse myeloma cells engineered using glutamine synthetase as a selectable marker. **Cytotechnology**, v, 18, p.207–217. 1996.

KIRKPATRICK, R. B.; GANGULY, S.; ANGELICHIO, M; GRIEGO, S.; SHATZMAN, A.; SILVERMAN, C.; ROSEMBERG, M. Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via BiP-mediated pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 34, p. 19800-19805.

KEEN M. J., HALE C. The use of serum-free medium for the production of functionally active humanised monoclonal antibody from NSO mouse myeloma cells engineered using glutamine synthetase as a selectable marker. **Cytotechnology**, v, 18, p.207–217. 1996.

KUNKEL, J. P.; JAN, D. C.; JAMIESON, J. C.; BUTLER, M. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. **Journal of Biotechnology**, v.2, p.55-71, 1998.

KUNKEL, J. P.; JAN, D. C.; BUTLER, M.; JAMIESON, J. C. Comparisons of the glycosylation of a monoclonal antibody produced under nominally identical cell culture conditions in two different bioreactors. **Biotechnology Progress**. v. 16, p. 462-470, 2000.

KUROKAWA, H.; PARK, Y.; IJIMA, S.; KOBAYASHI, T. Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p.95-103, 1994.

LEE, J. M.; PARK, J.H.; PARK, J.O.; CHANG, K.H.; CHUNG, I.S. Exsion of recombinant erythropoietin stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 36, p. 348-350, 2000.

Correlation between steady-state cell concentration and cell death of hybridoma cultures in chemostat. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p.18-26, 1995.

LEE, Y.-K.; YAP, P.-K.; TEOH, A.-P. Correlation between steady-state cell concentration and cell death of hybridoma cultures in chemostat. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p.18-26, 1995.

LÉO, P.; GALESI, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, A. M. Células Animais: Conceitos Básicos. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.), **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Roca, 2008, p. 15-41.

LIM HJ, CHA HJ. Observation and modeling of induction effect on human transferrin production from stably transfected *Drosophila* S2 cell culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.208-214, 2006

LINARDOS, T. I.; KALOGERAKIS, N.; BEHIE, L. A.; LAMONTAGNE, L. R. The Effect of Specific Growth-Rate and Death Rate on Monoclonal-Antibody Production in Hybridoma Chemostat Cultures. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 69, p.429-438, 1991.

LINZ, M.; ZENG, A. P.; WAGNER, R.; DECKWER, W. D. Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. **Biotechnology Progress**, v.13, p.453-463, 1997.

LIU, L.; SPURRIER, J.; BUTT, T. R.; STRICKLER, J. E. Enhanced protein expression in the baculovirus/insect cell system using engineered SUMO fusions. **Protein Expression and Purification**, v.62, p21-28, 2008.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. Reprinted from Journal of Biochemical and Microbiological Technology

Engineering Vol. I, No. 4. Pages 393-412 (1959). **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, p.636-644, 2000.

MARTINELLE K.; WESTLUND, A.; HAGGSTROM, L. Saturable ammonium ion transport in myeloma and hybridoma cells is mediated by the Na⁺K⁺2Cl⁻-cotransporter. **Biotechnology Letters**, v. 20, p.81-86, 1998.

MARTINELLE, K.; HAGGSTROM, L. Effects of NH₄⁺ and K⁺ on the energy metabolism in Sp2/0-Ag14 myeloma cells. **Cytotechnology**, v. 29, p.45-53, 1999.

MCQUEEN, A.; MEILHOC, E.; BAILEY, J.E. Flow effects on the viability and lysis of suspended mammalian cells. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 831-836. 1987

MCQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.1067-1077, 1990.

MEISENHOLDER, G. Postmodern Culture Maximizing Cell Culture Output At Every Level. **The Scientist**, v. 13, p.14-21, 1999. Imagem disponível em <http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr1999/july/jul_art/brunswick.gif> acessada em julho de 2009.

MENDONÇA, R. Z.; PALOMARES, L. A.; RAMIREZ, O. T. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. **Journal of Biotechnology**, v.72, p. 61-75, 1999.

MENESES-ACOSTA, A.; MENDONÇA, R.; MERCHANT, H.; COVARRUBIAS, L.; RAMIREZ, O. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p.441-457, 2001.

MEUWLY, F.; RUFFIEUX, P. A.; KADOURI, A.; VON STOCKAR, U. Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: Bioprocess and biomedical applications. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 45-56, 2007.

MILLER, W. M.; WILKE, C. R.; BLANCH, H. W. Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture. **The Journal of Cellular Physiology**, v.132, p.524-530, 1987.

MILLER, W. M.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, p.947-965, 1988.

MILLER, W. M.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture I . Glucose pulse and step changes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, p.477-486, 1989a.

MILLER, W. M.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II . Glutamine pulse and step changes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 477-486, 1989b.

MIRZAEI, M.; XU, Y.; ELIAS, C. B.; PRAKASH, S. Nonviral Production of Human Interleukin-7 in Spodoptera Frugiperda Insect Cells as a Soluble Recombinant Protein. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, ID 637942, 2009, 8 p.

MONOD, J. **Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes**. Paris, Hermann et Cie., 1942.

MONTOR, W. R.; SOGAYAR, M. C. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. **Ciência Hoje**, agosto, p. 17-23, 2003.

NEGRETE, A.; KOTIN, R. M. Production of recombinant adeno-associated vectors using two bioreactor configurations at different scales. **Journal of Virological Methods**, v.145, p.155-161, 2007.

NELDER, J.A.; MEAD, R. A simplex method for functions minimization. **Computer Journal**, v. 7, p. 308-313, 1965.

NEWLAND, M.; GREENFIELD, P. F.; REID, S. Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production. **Cytotechnology**, v. 3, p. 215-229, 1990.

NILSANG, S.; NEHRU, V.; PLIEVA, F. M.; NANDAKUMAR, K. S.; RAKSHIT, S. K.; HOLMDAHL, R.; BO MATTIASSON, B.; KUMAR, A. Three-dimensional culture for monoclonal antibody production by hybridoma cells immobilized in macroporous gel particles. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1122-1131, 2008.

NOLLERT, M. U.; DIAMOND, S. L.; MCINTIRE, L. V. Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 588-602, 1991.

ÖHMAN, L.; LJUNGGREN, J.; HAGGSTROM, L. Induction of A Metabolic Switch in Insect Cells by Substrate Limited Fed-Batch Cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 1006-1013, 1995.

ÖHMAN, L.; ALARCON, M.; LJUNGGREN, J.; RAMQVIST, A. K.; HAGGSTROM, L. Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cells. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 765-770, 1996.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON, B. O. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 418-431, 1992.

PALOMARES, L. A.; LOPEZ, S.; RAMIREZ, O. T. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 87-93, 2004.

PAREDES, C.; PRATS, E.; CAIRO, J. J.; AZORIN, F.; CORNUDELLA, L.; GODIA, F. Modification of glucose and glutamine metabolism in hybridoma cells through metabolic engineering. **Cytotechnology**, v. 30, p. 85-93, 1999.

PELLEGRINI, M. P.; PINTO, R., C., V.; CASTILHO, L., R. Mecanismos de crescimento e morte de células animais cultivadas *In vitro*. In: In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. (Eds.) **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Roca, 2008. p. 138-169.

PORTNER, R.; SCHAFER, T. Modelling hybridoma cell growth and metabolism--a comparison of selected models and data. **Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 119-135, 1996.

REUVENY, S.; VELEZ, D.; MACMILLAN, J. D.; MILLER, L. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. **Journal of Immunological Methods**, v. 86, p. 53-59, 1986.

RHIEL, M.; MITCHELLLOGEAN, C. M.; MURHAMMER, D. W. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five(TM)) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, p. 909-920, 1997.

ROYCE, P. N. A Discussion of Recent Developments in Fermentation Monitoring and Control from A Practical Perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 117-149, 1993 .

SCHNEIDER, Y. J.; LAVOIX, A. Monoclonal antibody production in semi-continuous serum- and protein-free culture. Effect of glutamine concentration and culture conditions on cell growth and antibody secretion. **Journal of Immunological Methods**, v. 129, p. 251-268, 1990.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture . **Journal of Biotechnology**, v. 46, p. 161-185, 1996.

SIDOLI, F. R.; MANTALARIS, A.; ASPREY, S. P. Modelling of Mammalian Cells and Cell Culture Processes. **Cytotechnology**, v. 44, p. 27-46, 2004.

SINGH, V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. **Cytotechnology**, v. 30, p.149-158, 1999.

SHISHIDO, T.; KURATA, N.; YOON, M. E.; TANAKA, T.; YAMAJI, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. A high-level expression vector containing selectable marker for continuous

production of recombinant protein in insect cells. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 623-627, 2009.

SONDERGAARD L. *Drosophila* cells can be grown to high cell densities in bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v. 10, p.161-166. 1996.

SUÁREZ, I. **Estudo do processo de cultivo de células de hibridomas: modelagem matemática e otimização preliminar do processo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) . EPUSP.São Paulo. 2002.

SUGIURA, T.; AMANN, E. Properties of two insect cell lines useful for the Baculovirus expression system in serum-free culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 494-499, 1996.

SURESHKUMAR, G. K.; MUTHARASAN, R. The influence on temperature on a mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p. 292-295, 1991.

SWIECH, K. **Identificação de aspectos cinéticos e fisiológicos chave no cultivo de células de *Drosophila melanogaster* S2 para a produção de glicoproteína do vírus da raiva (GPV) recombinante**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.

SWIECH, K.; DA SILVA, C. S.; ARANTES, M. K.; DOS SANTOS, A. S.; ASTRAY, R. M.; PEREIRA, C. A.; SUAZO, C. A. Characterization of growth and metabolism of cells transfected with the rabies-virus glycoprotein gene. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.49, p.41-49, 2008a.

SWIECH, K.; ROSSI, N.; SILVA, B. G.; JORGE, S. A.; ASTRAY, R. M.; SUAZO, C. A. Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, v. 57, p.61-66, 2008b.

SWIECH, K.; ROSSI, N.; ASTRAY, R. M.; SUAZO, C. A. Enhanced production of recombinant rabies virus glycoprotein (rRVGP) by *Drosophila melanogaster* S2 cells through control of culture conditions. **Cytotechnology**, v. 57, p. 67-72, 2008c.

TEIXEIRA, A.; CUNHA, A. E.; CLEMENTE, J. J.; MOREIRA, J. L.; CRUZ, H. J.; ALVES, P. M.; CARRONDO, M. J. T.; OLIVEIRA, R. Modelling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 290-303, 2005.

THARANKAN, J. P.; CHAU, P. C. Serum free batch production of IgM. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 457-462, 1986.

VALLE, M.; KESTER, M.; BURNS, A.; MARX, S.; SPIEGEL, A.; SHILOACH, J. Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. **Cytotechnology**, v. 35, p. 127-135, 2001.

VELEZ, D.; REUVENY, S.; MILLER, L.; MACMILLAN, J. D. Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. **Journal of Immunological Methods**, v. 86, p. 45-52, 1986.

VOLESKY, B.; VOTRUBA, J. **Modeling and Optimization of Fermentation Processes**. Amsterdam: Elsevier, 1992.

YIN, J. C.; LI, G. X.; REN, X. F.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 335-347, 2007.

YOKOMIZO, A. Y.; JORGE, S. A.; ASTRAY, R. M.; FERNANDES, I.; RIBEIRO, O. G.; HORTON, D. S.; TONSO, A.; TORDO, N.; PEREIRA, C. A. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnol Journal**, v. 2, p. 102-109, 2007.

WARNOCK, J. N.; MERTEN, O. W.; AL RUBEAI, M. Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes. **Cytotechnology**, v. 50, p. 141-162, 2006.

WU, Y. C.; HAO, O. J.; SCHOLZE, R. J. Treatment of leachate from a solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p. 257-266, 1988.

ZENG, A. P.; DECKWER, W. D.; HU, W. S. Determinants and rate laws of growth and death of hybridoma cells in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 642-654, 1998a.

ZENG, A. P.; HU, W. S.; DECKWER, W. D. Variation of stoichiometric ratios and their correlation for monitoring and control of animal cell cultures. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 434-441, 1998b.

ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Model simulation and analysis of perfusion culture of mammalian cells at high cell density. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 373-382, 1999.

ZENG, C. Q. Y.; WENTZ, M. J.; COHEN, J.; ESTES, M. K.; RAMIG, R. F. Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. **Journal of Virology**, v. 70, p. 2736-2742, 1996.

ZHOU, W. C.; REHM, J.; EUROPA, A.; HU, W. S. Alteration of mammalian cell metabolism by dynamic nutrient feeding. **Cytotechnology**, v. 24, p. 99-108, 1997.

ANEXO A.

Quadro A1. Quadro dos ensaios utilizados para estudo de fenômenos cinéticos e ajuste preliminar de parâmetros.

Quadro A2. Composição dos meios utilizados nos trabalhos.

Quadro A1. Quadro dos ensaios utilizados para estudo de fenômenos cinéticos e ajuste preliminar de parâmetros. Ensaios realizados em batelada.

Referência	Ensaio	Célula	Meio	pH	OD(%)	Pluronic (% v/v)		
Galesi (2007)	RE-1	S2AcGPV2	TC100_AG	6,00-6,25	40,0	0,1		
	RE-2				40,0	0,1		
	RE-3				30,0	0,1		
	RE-4				30,0	0,3		
	RE-5				30,0	0,6		
Swiech (2007)	AP_1	S2AcGPV2	SF900 II®	6,3 - 6,7	89 - 0,8	Desconhecido		
	AP_2			6 - 6,5	90 - 0			
	AP_3			5,9 - 7,10	77 - 52			
	Bio_2			6,2	50,0			
	Bio_3			6,2	50,0			
	Bio_5			6,2	50,0			
Batista (2007)	5%	S2AcGPV2	IPL 41 FB	6,3	5,0	0,1		
	20%				20,0			
	40%				40,0			
	60%				60,0			
	95%				95,0			
Aguiar (2009) e Aguiar (2010)	Ma-02	S2AcGPV2_KTC100	TC100-AG	6,00 - 6,25	5,0	0,6		
	Ma-03				30,0			
	Ma-04				50,0			
	Ma-06				80,0			
						GLC	GLN	Pluroni
	Ma-07	S2AcGPV2	TC100-AG	6,00 - 6,25	5,0	10,0	3,5	0,6
	Ma-08				50,0	10,0	3,5	0,6
	Ma-09				80,0	10,0	3,5	0,6
	Ma-10				30,0	10,0	3,5	0,6
	Ma-11				30,0	1,0	3,5	0,6
	Ma-12				30,0	5,0	3,5	0,6
	Ma-13				30,0	15,0	3,5	0,6
	Ma-14				30,0	15,0	3,5	0,6
	Ma-15				30,0	10,0	0,6	0,6
	Ma-16				30,0	10,0	1,75	0,6
	Ma-17				30,0	10,0	7,00	0,6

Quadro A2. Composição dos meios utilizados nos trabalhos.

Componentes	TC100-AG, (Galesi, 2007)	SF900 II® (Swiech, 2007)	IPL41-FA (Batista, 2007)
CaCl ₂	996,6	n.d.	500,0
KCl	2870,0	n.d.	1200,0
MgCl ₂	1070,0	n.d.	1068,18
MgSO ₄	1360,0	n.d.	918,26
NaCl	500,0	n.d.	2850,0
NaHCO ₃	350,0	n.d.	350,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1008,7	n.d.	1160,0
Glicose	10000,0	10000,0	10000,0
Frutose		n.d.	500
Sacarose		2000,0	1650,0
Lactose			2000,0
Maltose		1200,0	1026,9
Ac. Fumárico		n.d.	4,40
Ac. α -cetoglutárico		n.d.	29,60
Ac. Málico		n.d.	53,60
Extrato de levedura	3000,0		6,0
Pluronic F68	0,1 %(m/v)		
Emulsão lipídica	1 %(m/m)		1 % (v/v)
Triptose	2000,0		
L-Alanina	225,0	360,0	
B-Alanina			300,0
L-Arginina		330,0	
L-Arginina-HCl	666		800,0
L-Asparagina	350	1100,0	1307,8
Ácido aspártico	350,0	-	1300,0
L-Cisteína		45,0	
L-Cistina		-	119,14
L-Cistina-2HCl	28,7		
Fenilalanina	150	870,0	1000,0
Ac. Glutâmico	600,0	1650,0	1500,0
L-Glicina	650	570,0	200,0
L-Glutamina	3500,0	2300,0	3500,0
L-Histidina	3700	220,0	200,0
L-Isoleucina	50	760,0	750,0
L-Leucina	75	360,0	250,0
L-Lisina		640,0	
L-Lisina-HCl	625		700,0
L-Metionina	50	1000,0	14800,0
Prolina	350	600,0	506,5
Hidroxi-L-prolina			800,0
Serina	550	310,0	200,0
Treonina	175	350,0	200,0
Triptofano	100	-	100,0
Tirosina	72,02	230,0	600,0
Valina	100	620,0	6500,0
Biotina	0,01	n.d.	0,16
Cloreto de colina		n.d.	20,0
Ac. Fólico	0,02	n.d.	0,08
Inositol	0,02	n.d.	0,40
Niacina	0,02	n.d.	-
Ac. Aminobenzóico	0,02	n.d.	0,32
Ac pantotênico	0,02	n.d.	0,008
Piridoxina	0,02	n.d.	-
Roboflavina	0,02	n.d.	0,08
Tiamina	0,52	n.d.	0,8
B ₁₂			0,24

ANEXO B

PROGRAMA CI_mod6.for

```

*****
***** PROGRAMA ci_mod6.FOR *****
*****
***** Programa adaptado para ajustar *****
***** modelo matemático para crescimento de células S2*****
***** e formação de glicoproteína GPV *****
***** UTILIZANDO O METODO DE OTIMIZACAO *****
***** DOS POLIEDROS FLEXIVEIS (NELDER & MEAD) *****
***** Ref.: HIMMELBLAU, D.M. (1972) *****
***** Applied Nonlinear Programming *****
***** McGraw-Hill, Inc., New York *****
*****
***** LIMITES: 50 PARAMETROS AJUSTAVEIS *****
***** 10 VARIÁVEIS DE ESTADO INICIAIS *****
***** AJUSTAVEIS *****
***** 50 PARAMETROS + VARIÁVEIS AJUSTAVEIS *****
***** 50 PARAMETROS FIXOS *****
***** 60 PARAMETROS FIXOS + AJUSTAVEIS *****
***** 15 VARIÁVEIS DE ESTADO *****
***** 20 VARIÁVEIS OPERACIONAIS *****
***** 20 VARIÁVEIS OPERACIONAIS VARIÁVEIS *****
***** 20 VARIÁVEIS OPERACIONAIS FIXAS *****
***** 40 ENSAIOS *****
***** 40 PONTOS EXPERIMENTAIS POR ENSAIO *****
*****
***** FUNCAO OBJETIVO (RESIDUO): *****
***** SOMATORIA DO QUADRADO DOS DESVIOS NORMALISADOS *****
***** PELA MEDIA ENTRE O VALOR EXPERIMENTAL E *****
***** O VALOR CALCULADO *****
***** (Resíduo Não e Calculado Quando as Variáveis *****
***** Experimentais e Calculadas Sao Menores que *****
***** um Valor Mínimo Lido) *****
*****
***** (Coeficiente Angular Combinado e Coeficiente *****
***** de Correlação Globais - So Calculados) *****
*****
***** Rotina DDRIV2 para solução de um sistema de *****
***** Equações Diferenciais Ordinárias Não Lineares *****
***** pelo Método de Adams ou Gear *****
***** Referência: KAHANER,D., MOLER, C., NASH, S. *****

```

```

*****          "Numerical Methods and Software" *****
*****          Prentice Hall 1988.                      *****
*****
*****
*****
*****
IMPLICIT REAL (A-H,O-Z)
CHARACTER NOME*15
DIMENSION V(50,55),VI(50),VS(50),FO(55)
common/danidtza/ iultimo
iultimo = 0
***
*** ABERTURA DOS ARQUIVOS DE DADOS E DE SAIDA
***
WRITE(*,100)
100 FORMAT(1X,'*****',/,
1      1X,'* QUAL O NOME DO ARQUIVO DE DADOS? *',/,
2      1X,'* <nome.DAT>                      *',/,
3      1X,'*****',//)
READ(*,101)NOME
101 FORMAT(A)
OPEN(UNIT=9,FILE=NOME,STATUS='OLD')
WRITE(*,102)
102 FORMAT(1X,'*****',/,
1      1X,'* QUAL O NOME DO ARQUIVO DO RESULTADO DO AJUSTE *',/,
2      1X,'* PARA IMPRESSAO? <nome.AJP>                      *',/,
3      1X,'*****',//)
READ(*,101)NOME
OPEN(UNIT=10,FILE=NOME,STATUS='UNKNOWN',ACCESS='SEQUENTIAL',
1      FORM='FORMATTED')
WRITE(*,1020)
1020 FORMAT(1X,'*****',/,
1      1X,'* QUAL O NOME DO ARQUIVO DO RESULTADO DO AJUSTE *',/,
2      1X,'* PARA SIMULACAO? <nome.AJS>                      *',/,
3      1X,'*****',//)
READ(*,101)NOME
OPEN(UNIT=13,FILE=NOME,STATUS='UNKNOWN',ACCESS='SEQUENTIAL',
1      FORM='FORMATTED')
WRITE(*,103)
103 FORMAT(1X,'*****',/,
1      1X,'* QUAL O NOME DO ARQUIVO DOS PONTOS PARA *',/,
2      1X,'* TRACAR O GRAFICO DO AJUSTE GLOBAL? *',/,
3      1X,'* <nome.GRF>                      *',/,

```

```

4      1X, '*****', //)
      READ(*,101)NOME
      OPEN(UNIT=11,FILE=NOME,STATUS='UNKNOWN',ACCESS='SEQUENTIAL',
1      FORM='FORMATTED')
      WRITE(*,104)
104  FORMAT(1X, '*****', //,
1      1X, '* QUAL O NOME DO ARQUIVO RESUMO *', //,
2      1X, '* DO RESULTADO DO AJUSTE?          *', //,
3      1X, '* <nome.RES>                        *', //,
4      1X, '*****', //)
      READ(*,101)NOME
      OPEN(UNIT=12,FILE=NOME,STATUS='UNKNOWN',ACCESS='SEQUENTIAL',
1      FORM='FORMATTED')
***
***  LEITURA DOS PARAMETROS DE OTIMIZACAO
***

      READ(9,*)ALFA,BETA,GAMA,FOTOL
      READ(9,*)ITMAX,ITIMP
      WRITE(10,200)ALFA,BETA,GAMA,FOTOL,ITMAX,ITIMP
200  FORMAT(1X, //, 10X, 'OTIMIZACAO DE PARAMETROS - METODO DOS POLIEDROS'
1      , ' FLEXIVEIS', //, 1X, 'PARAMETROS DE OTIMIZACAO: ALFA  = ',
2      E12.5, //, 27X, 'BETA  = ', E12.5, //, 27X, 'GAMA  = ', E12.5, //,
3      27X, 'TOL    = ', E12.5, //, 27X, 'ITMAX = ', I6, //, 27X, 'ITIMP = ',
4      I6, //)
***
***  PARAMETROS DO MODELO A SEREM AJUSTADOS (VERTICES DO POLIEDRO)
***  LEITURA DO NUMERO/NOME/VALORES INICIAIS
***

      CALL PARAJ(NV,V)
***
***  LIMITES INFERIORES E SUPERIORES DOS PARAMETROS DO MODELO A SEREM
***  AJUSTADOS
***

      CALL LPARAJ(NV,VI,VS)
***
***  LEITURA DOS ENSAIOS - PONTOS EXPERIMENTAIS
***  LEITURA DOS PARAMETROS FIXOS DO MODELO
***  LEITURA DOS PARAMETROS DE INTEGRACAO
***

      CALL LEITURA

```



```

***
***  CALCULO DA F.O. PARA OS VERTICES INICIAIS
***
***      WRITE(*,300)
          WRITE(10,300)
300  FORMAT(1X,///,1X,'CALCULO DOS RESIDUOS PARA AS ESTIMATIVAS',
1      ' INICIAIS DOS PARAMETROS',///)
      DO 3 I=1,NV+1
          WRITE(10,301)I,(V(J,I),J=1,NV)
301  FORMAT(1X,'ESTIMATIVA INICIAL ',I2,/,10(1X,6E12.5,/))
      IF(I.GT.1)GOTO 70
      IFLAG=1
      GOTO 71
70  IFLAG=0
71  CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
      WRITE(10,302)FO(I),CA,CR
302  FORMAT(1X,/,10X,'RESIDUO = ',E12.5,/,10X,
1      'COEF. ANGULAR COMBINADO GLOBAL (SO CALCULADO) = ',E12.5,/,
2      10X,'COEF. DE CORRELACAO GLOBAL (SO CALCULADO) = ',E12.5,
3      //)
3  CONTINUE
      IT=1
      ITI=0
4  WRITE(*,402)IT
402  FORMAT(1X,'ITERACAO: ',I5)
      IF(IT.LT.ITI)GOTO 60
      WRITE(10,107)IT
107  FORMAT(1X,/,1X,'ITERACAO: ',I4)
***
***  CALCULO DA FOH E FOL
60  IH=1
      FOH=FO(1)
      DO 6 I=2,NV+1
          IF(FO(I).LE.FOH)GOTO 6
          IH=I
          FOH=FO(I)
6  CONTINUE
      IL=1
      FOL=FO(I)
      DO 7 I=2,NV+1
          IF(FO(I).GE.FOL)GOTO 7

```

```

      IL=I
      FOL=FO(I)
7  CONTINUE
***
***  CALCULO DO CENTRO DE GRAVIDADE DE TODOS OS VERTICES EXCLUIDO O
***  VERTICE "H" - V(I,NV+2)
***
      DO 8 I=1,NV
      V(I,NV+2)=0.
8  CONTINUE
      DO 9 I=1,NV+1
      IF(I.EQ.IH)GOTO 9
      DO 10 J=1,NV
      V(J,NV+2)=V(J,NV+2)+V(J,I)
10 CONTINUE
9  CONTINUE
      DO 11 I=1,NV
      V(I,NV+2)=V(I,NV+2)/NV
      IF(V(I,NV+2).GE.VI(I))GOTO 12
      V(I,NV+2)=VI(I)
      GOTO 11
12 IF(V(I,NV+2).LE.VS(I))GOTO 11
      V(I,NV+2)=VS(I)
11 CONTINUE
      I=NV+2
      IF(IT.LT.ITI)GOTO 61
      WRITE(10,303)(V(J,I),J=1,NV)
303 FORMAT(1X,/,10(1X,7E12.5,/))
61 IF(IT.EQ.ITMAX)GOTO 50
      IFLAG=0
      GOTO 51
50 IFLAG=2
      WRITE(12,107)IT
      WRITE(12,305)(V(J,I),J=1,NV)
305 FORMAT(1X,/,60E12.5,/ )
      IF(IT.GE.ITI)GOTO 51
      WRITE(10,107)IT
      WRITE(10,303)(V(J,I),J=1,NV)
51 CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
      IF(IT.LT.ITI)GOTO 62
      WRITE(10,302)FO(I),CA,CR

```

```

        IF(IT.NE.ITMAX)GOTO 62
        WRITE(12,302)FO(I),CA,CR
*       DO 500 J=1,NE
*       WRITE(12,501)J
* 501  FORMAT(1X,/,10X,'ENSAIO ',I2)
*       DO 502 K=1,NVEE(J)
*       WRITE(12,503)IVEE(K),CAVE(J,K),CRVE(J,K)
* 503  FORMAT(20X,'VE(',I2,')',10X,'CA = ',E12.5,10X,'CR = ',E12.5)
* 502  CONTINUE
* 500  CONTINUE
***
***  VERIFICACAO DA CONVERGENCIA
***
        62 COND=0.0
        DO 13 I=1,NV+1
            COND=COND+(FO(I)-FO(NV+2))*(FO(I)-FO(NV+2))
        13 CONTINUE
            COND=COND/(FO(NV+2)*FO(NV+2))
            COND=ABS(COND/(NV+1))
            COND=SQRT(COND)
            IF(IT.LT.ITI)GOTO 63
            WRITE(10,105)COND
        105 FORMAT(10X,'*** COND = ',E12.5,' ***')
            GOTO 64
        63 IF(IT.LT.ITMAX)GOTO 64
            WRITE(10,302)FO(I),CA,CR
            WRITE(10,105)COND
        64 IF(COND.GT.FOTOL)GOTO 52
            WRITE(*,304)
            WRITE(10,304)
        304 FORMAT(1X,///,1X,'*** RESULTADO FINAL ***')
            I=NV+2
            WRITE(*,107)IT
            WRITE(10,107)IT
            WRITE(12,107)IT
            WRITE(*,303)(V(J,I),J=1,NV)
            WRITE(10,303)(V(J,I),J=1,NV)
            WRITE(12,303)(V(J,I),J=1,NV)
            IFLAG=2
            iultimo = 4
            CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)

```

```

        WRITE(*,302)FO(I),CA,CR
        WRITE(10,302)FO(I),CA,CR
        WRITE(12,302)FO(I),CA,CR
*       DO 504 J=1,NE
*       WRITE(12,501)J
*       DO 505 K=1,NVEE(J)
*       WRITE(12,503)IVEE(K),CAVE(J,K),CRVE(J,K)
* 505 CONTINUE
* 504 CONTINUE

        WRITE(*,105)COND
        WRITE(10,105)COND
        GOTO 14
***
*** REFLEXAO DO VERTICE "H" ATRAVES DO CENTRO DE GRAVIDADE - V(I,NV+3)
***
52 DO 15 I=1,NV
    V(I,NV+3)=V(I,NV+2)+ALFA*(V(I,NV+2)-V(I,IH))
    IF(V(I,NV+3).GE.VI(I))GOTO 16
    V(I,NV+3)=VI(I)
    GOTO 15
16 IF(V(I,NV+3).LE.VS(I))GOTO 15
    V(I,NV+3)=VS(I)
15 CONTINUE
    I=NV+3
    IFLAG=0
    CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
    IF(FO(NV+3).LE.FO(IL))GOTO 17
    DO 18 I=1,NV+1
    IF(I.EQ.IH)GOTO 18
    IF(FO(NV+3).LE.FO(I))GOTO 22
18 CONTINUE
    GOTO 19
***
*** EXPANSAO DA REFLEXAO DO VERTICE "H" - V(I,NV+4)
***
17 DO 20 I=1,NV
    V(I,NV+4)=V(I,NV+2)+GAMA*(V(I,NV+3)-V(I,NV+2))
    IF(V(I,NV+4).GE.VI(I))GOTO 21
    V(I,NV+4)=VI(I)
    GOTO 20

```

```

21 IF(V(I,NV+4).LE.VS(I))GOTO 20
    V(I,NV+4)=VS(I)
20 CONTINUE
    I=NV+4
    IFLAG=0
    CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
    IF(FO(NV+4).GE.FO(NV+3))GOTO 22
***
*** SUBSTITUICAO DO VERTICE V(I,IH) PELO VERTICE V(I,NV+4)
***
    DO 23 I=1,NV+1
        IF(I.NE.IH)GOTO 23
    DO 24 J=1,NV
        V(J,I)=V(J,NV+4)
24 CONTINUE
    IFLAG=0
    CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
    GOTO 25
23 CONTINUE
    GOTO 26
***
*** SUBSTITUICAO DO VERTICE V(I,IH) PELO VERTICE V(I,NV+3)
***
    DO 27 I=1,NV+1
        IF(I.NE.IH)GOTO 27
    DO 28 J=1,NV
        V(J,I)=V(J,NV+3)
28 CONTINUE
    IFLAG=0
    CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
    GOTO 25
27 CONTINUE
26 WRITE(10,106)
106 FORMAT(1X,/,/,
1      '***** EXISTE PROBLEMA COM O PROGRAMA COMPILADO *****')
    GOTO 14
***
*** PREPARO PARA NOVA ITERACAO
***
25 IT=IT+1
    IF(IT.GT.ITMAX)GOTO 14

```

```

        IF(IT.LE.ITI) GOTO 4
        ITI=ITI+ITIMP
        GOTO 4
***
*** CONTRACAO DA REFLEXAO DO VERTICE "H" - V(I,NV+5)
***
19 IF(FO(NV+3).GE.FO(IH))GOTO 29
    IHV=IH
    IH=NV+3
29 DO 30 I=1,NV
    V(I,NV+5)=V(I,NV+2)+BETA*(V(I,IH)-V(I,NV+2))
    IF(V(I,NV+5).GE.VI(I))GOTO 31
    V(I,NV+5)=VI(I)
    GOTO 30
31 IF(V(I,NV+5).LE.VS(I))GOTO 30
    V(I,NV+5)=VS(I)
30 CONTINUE
    I=NV+5
    IFLAG=0
    CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
    IF(FO(NV+5).GT.FO(IH))GOTO 32
    IF(IH.NE.(NV+3))GOTO 33
    IH=IHV
***
*** SUBSTITUICAO DO VERTICE V(I,IH) PELO VERTICE V(I,NV+5)
***
33 DO 34 I=1,NV+1
    IF(I.NE.IH)GOTO 34
    DO 35 J=1,NV
    V(J,I)=V(J,NV+5)
35 CONTINUE
    IFLAG=0
    CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
    GOTO 25
34 CONTINUE
    GOTO 26
***
*** REDUCAO DO POLIEDRO
***
32 DO 36 I=1,NV+1
    DO 37 J=1,NV

```

```

      V(J,I)=(0.5D0)*(V(J,I)+V(J,IL))
      IF(V(J,I).GE.VI(J))GOTO 38
      V(J,I)=VI(J)
      GOTO 37
38  IF(V(J,I).LE.VS(J))GOTO 37
      V(J,I)=VS(J)
37  CONTINUE
      IFLAG=0
      CALL FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
36  CONTINUE
      GOTO 25

***
***  FINAL - FECHAMENTO DOS ARQUIVOS
***

14  CLOSE(9,STATUS='KEEP')
      CLOSE(10,STATUS='KEEP')
      CLOSE(11,STATUS='KEEP')
      CLOSE(12,STATUS='KEEP')
      CLOSE(13,STATUS='KEEP')
      STOP
      END

*****
***  SUBROTINA PARA LEITURA DOS PARAMETROS E VARIAVEIS INICIAIS ***
*****  DO MODELO A SEREM AJUSTADOS (VERTICES DO POLIEDRO) *****
*****

      SUBROUTINE PARAJ(NV,V)
      CHARACTER NOMP(50)*5
      REAL V(50,55)

*
*  NV = NUMERO DE PARAMETROS A SEREM AJUSTADOS
*  NOMP = NOME DOS PARAMETROS A SEREM AJUSTADOS
*  V = PARAMETROS DO MODELO A SEREM AJUSTADOS
*

      READ(9,*)NV
      WRITE(10,100)NV
100  FORMAT(1X,'NUMERO DE PARAMETROS A SEREM AJUSTADOS: ',I2,/)
      DO 2 I=1,NV
      READ(9,104)NOMP(I)
104  FORMAT(A)

```

```

2 CONTINUE
  WRITE(10,101)(NOMPAR(I),I=1,4)
101 FORMAT(1X,'ESTIMATIVA INICIAL DOS PARAMETROS: ',4X,3(A5,6X),A5)
  IF(NV.LE.4)GOTO 4
  DO 3 I=5,NV,4
  J=I+3
  WRITE(10,102)(NOMPAR(K),K=I,J)
102 FORMAT(40X,3(A5,6X),A5)
3 CONTINUE
4 I=1
  READ(9,*)(V(J,I),J=1,NV)

  WRITE(10,103)(V(J,I),J=1,NV)

103 FORMAT(1X,/,13(36X,4E11.5,/))
  DO 1 I=2,NV+1
  READ(9,*)(V(J,I),J=1,NV)
1 CONTINUE
  DO 5 I=2,NV+1,4
  WRITE(10,105)V(I-1,I),V(I,I+1),V(I+1,I+2),V(I+2,I+3)
105 FORMAT(1X,/,36X,E11.5,/,47X,E11.5,/,58X,E11.5,/,69X,E11.5)
5 CONTINUE
  WRITE(*,200)
200 FORMAT(1X,'PARAMETROS LIDOS',/)
  RETURN
  END

```

```

*****
*** SUBROTINA PARA LEITURA DOS LIMITES INFERIORES E SUPERIORES ***
***** DOS PARAMETROS E VARIAVEIS INICIAIS DO MODELO *****
***** A SEREM AJUSTADOS *****
*****

```

```

      SUBROUTINE LPARAJ(NV,VI,VS)
      REAL VI(50),VS(50)
      DO 1 I=1,NV
      READ(9,*)VI(I),VS(I)
1 CONTINUE
      WRITE(10,100)(VI(J),J=1,NV)
100 FORMAT(1X,/,1X,'LIMITE INFERIOR DOS PARAMETROS: ',4E11.5,/,
1          12(36X,4E11.5,/))

```



```

WRITE(10,101)(VS(J),J=1,NV)
101 FORMAT(1X,/,1X,'LIMITE SUPERIOR DOS PARAMETROS:      ',4E11.5,/,
1      12(36X,4E11.5,/))
WRITE(*,200)
200 FORMAT(1X,'LIMITE DOS PARAMETROS LIDO',/)
RETURN
END

```

```

*****
**** SUBROTINA PARA LEITURA DOS ENSAIOS - PONTOS EXPERIMENTAIS ****
***** (MAXIMO DE 40 ENSAIOS COM 40 PONTOS/ENSAIO *****
***** E COM NO MAXIMO 20 VARIAVEIS OPERACIONAIS FIXAS, *****
*****          20 VARIAVEIS OPERACIONAIS VARIAVEIS          *****
***** (NUM TOTAL MAXIMO DE 20 VARIAVEIS OPERACIONAIS) *****
*****          E 15 VARIAVEIS DE ESTADO) *****
*****          50 PARAMETROS FIXOS DO MODELO *****
***** (PARA UM TOTAL MAXIMO DE 60 PARAMETROS) *****
***** 10 VARIAVEIS DE ESTADO INICIAIS AJUSTAVEIS *****
*****          LEITURA DOS PARAMETROS DE INTEGRACAO *****
*****

```

```

SUBROUTINE LEITURA
IMPLICIT REAL (A-H,O-Z)
CHARACTER NOMEVO(20)*4,NOMEVE(15)*4,NOMPAF(50)*5
DIMENSION IPARF(50),PARF(50),VEL(15),VOVL(20)
COMMON PAR(60),VOA(20),J
COMMON NE,NVEE(40),IVEE(40,15)
COMMON IPARV(50),NPARF,NVO
COMMON NPARAJ,NVEAJ,IVEAJ(10)
COMMON NVOF(40),IVOF(40,20),VOF(40,20)
COMMON VO(40,40,20),NPE(40),NVOV(40),IVOV(40,20),VEEM(40,15),
1      TE(40,40),VEE(40,40,15),T0(40),VE0(40,15),VEMIN(40,15)
COMMON MSTATE,EPS,EWT,MSTATEA
Common/barral/VEEINI(40,15),NENSCONT,VOFIX(40,20),IBAN

```

```

*****          no. de parâmetros ajustáveis e variáveis de estado ajustáveis

```

```

      READ(9,*)NPARAJ,NVEAJ
*****      índice de parâmetros ajustáveis e var. de estado ajustáveis
      READ(9,*)(IPARV(I),I=1,NPARAJ)
      IF(NVEAJ.EQ.0)GOTO 50
*****      índice de parâmetros de variáveis de estado ajustáveis
      READ(9,*)(IVEAJ(I),I=1,NVEAJ)
*****      numero de parâmetros fixos
50 READ(9,*)NPARF
      IF(NPARF.EQ.0)GOTO 1111
      READ(9,*)(IPARF(I),I=1,NPARF)
      DO 1 I=1,NPARF
        READ(9,100)NOMPAF(I)
100   FORMAT(A)
      1   CONTINUE
      IF(NPARF.GT.4)GOTO 2
      WRITE(10,101)(NOMPAF(I),I=1,NPARF)
101   FORMAT(1X,/,1X,'PARAMETROS FIXOS DO MODELO: ',3X,3(A5,8X),A5)
      GOTO 3
      2   WRITE(10,101)(NOMPAF(I),I=1,4)
      WRITE(10,102)(NOMPAF(I),I=5,NPARF)
102   FORMAT(12(24X,4A13,/))
      3   READ(9,*)(PARF(I),I=1,NPARF)
      WRITE(10,103)(PARF(I),I=1,NPARF)
103   FORMAT(13(26X,4E13.5,/))
      J=1
      DO 4 I=1,60
        IF(I.NE.IPARF(J))GOTO 4
        PAR(I)=PARF(J)
        J=J+1
      4   CONTINUE
1111 READ(9,*)NVE,NVO
      DO 5 I=1,NVE
        READ(9,100)NOMEVE(I)
      5   CONTINUE
      WRITE(10,104)NOMEVE(1)
104   FORMAT(1X,/,1X,'VARIÁVEIS DE ESTADO: VE( 1) = ',A4)
      DO 6 I=2,NVE
        WRITE(10,105)I,NOMEVE(I)
105   FORMAT(22X,'VE(',I2,') = ',A4)
      6   CONTINUE
*****

```

```

        IF(NVO.EQ.0)GOTO 200
*****
        DO 7 I=1,NVO
            READ(9,100)NOMEVO(I)
        7 CONTINUE
            WRITE(10,106)NOMEVO(1)
106 FORMAT(1X,/,1X,'VARIAVEIS OPERACIONAIS: VO( 1) = ',A4)
        DO 8 I=2,NVO
            WRITE(10,107)I,NOMEVO(I)
107 FORMAT(25X,'VO(',I2,') = ',A4)
        8 CONTINUE
*****
        200 CONTINUE
*****
            READ(9,*)NE,IIMP1,IIMP2
            WRITE(10,108)NE
108 FORMAT(1X,/,1X,'NUMERO DE ENSAIOS A SEREM AJUSTADOS: ',I2,/)

        DO 9 I=1,NE
            IF(IIMP2.EQ.0)GOTO 10
            WRITE(10,109)I
109 FORMAT(1X,/,1X,'ENSAIO ',I2,/)
        10 READ(9,*)NVOF(I)
            IF(NVOF(I).EQ.0)GOTO 15
            IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 11
            WRITE(10,113)NVOF(I)
113 FORMAT(11X,'NUMERO DE VARIAVEIS OPERACIONAIS FIXAS: ',I2)
        11 IF(NVOF(I).EQ.0)GOTO 15

        DO 16 J=1,NVOF(I)
            READ(9,*)IVOF(I,J),VOF(I,J)
*****
            BARRAL 2/06/10
            VOFIX(I,J)=VOF(I,J)

*
            BARRAL 5/08/10

C
            IBAN =0

        DO 17 K=1,40
            VO(I,K,IVOF(I,J))=VOF(I,J)
17 CONTINUE

```

```

        IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 16
        WRITE(10,114)IVOF(I,J),VOF(I,J)
114    FORMAT(21X,'VOF(' ,I2,' ) = ' ,E12.5)
16    CONTINUE

15    READ(9,*)NPE(I),NVEE(I),NVOV(I)
        IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 18
        WRITE(10,121)
        WRITE(10,115)NVOV(I)
115    FORMAT(11X,'NUMERO DE VARIAVEIS OPERACIONAIS VARIAVEIS: ' ,I2)
18    IF(NVOV(I).EQ.0)GOTO 19
        DO 20 J=1,NVOV(I)
            READ(9,*)IVOV(I,J)
            IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 20
            WRITE(10,116)IVOV(I,J)
116    FORMAT(21X,'VOV(' ,I2,' )')
20    CONTINUE
19    IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 21
        WRITE(10,121)
        WRITE(10,117)NVEE(I)
117    FORMAT(11X,'NUMERO DE VARIAVEIS DE ESTADO LIDAS: ' ,I2)
21    DO 22 J=1,NVEE(I)
        READ(9,*)IVEE(I,J)
        IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 22
        WRITE(10,118)IVEE(I,J)
118    FORMAT(21X,'VE(' ,I2,' )')
22    CONTINUE
        IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 23
        WRITE(10,121)
        WRITE(10,119)
119    FORMAT(11X,'MAXIMO VALOR DAS VARIAVEIS DE ESTADO LIDAS')
23    DO 24 J=1,NVEE(I)
        READ(9,*)VELM
        VEEM(I,IVEE(I,J))=VELM
        IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 24
        WRITE(10,120)IVEE(I,J),VELM
120    FORMAT(21X,'VEM(' ,I2,' ) = ' ,E12.5)
24    CONTINUE
        IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 60
        WRITE(10,121)

```

```

121  FORMAT(1X,/)
60   IF(NVOV(I).GT.0)GOTO 25
      DO 26 J=1,NPE(I)
          READ(9,*)TE(I,J),(VEL(K),K=1,NVEE(I))
          DO 27 K=1,NVEE(I)
              VEE(I,J,IVEE(I,K))=VEL(K)
*      valores iniciais  BARRAL  2/06/10
          veeini(i,k) = VEE(I,1,IVEE(I,K))
27   CONTINUE

      IF(IIMP2.EQ.0)GOTO 26
      IF(NVEE(I).GT.5)GOTO 40
      WRITE(10,122)TE(I,J),(VEL(K),K=1,NVEE(I))
122  FORMAT(1X,E12.5,5X,5E12.5)
      GOTO 26

40   WRITE(10,122)TE(I,J),(VEL(K),K=1,5)
      WRITE(10,123)(VEL(K),K=6,NVEE(I))
123  FORMAT(4(18X,5E12.5,/))
26   CONTINUE
      GOTO 28

25   DO 29 J=1,NPE(I)
****  variaveis medidas nos ensaios a cada instante
      READ(9,*)TE(I,J),(VEL(K),K=1,NVEE(I))
      READ(9,*)(VOVL(K),K=1,NVOV(I))
      DO 30 K=1,NVEE(I)
          VEE(I,J,IVEE(I,K))=VEL(K)
30   CONTINUE
      DO 31 K=1,NVOV(I)
          VO(I,J,IVOV(I,K))=VOVL(K)
31   CONTINUE
      IF(IIMP2.EQ.0)GOTO 29
      IF(NVEE(I).GT.5)GOTO 42
      WRITE(10,122)TE(I,J),(VEL(K),K=1,NVEE(I))
      GOTO 43

42  WRITE(10,122)TE(I,J),(VEL(K),K=1,5)
      WRITE(10,123)(VEL(K),K=6,NVEE(I))
43  WRITE(10,123)(VOVL(K),K=1,NVOV(I))
29  CONTINUE
28  READ(9,*)T0(I)
      READ(9,*)(VE0(I,J),J=1,NVE)
      IF(IIMP1.EQ.0)GOTO 33

```

```

        WRITE(10,121)
        WRITE(10,124)T0(I)
124  FORMAT(1X,'CONDICOES INICIAIS (T = ',F5.1,')')
        DO 32 J=1,NVE
            WRITE(10,125)J,VE0(I,J)
125  FORMAT(11X,'VE0(',I2,') = ',E12.5)
        32  CONTINUE
        33  READ(9,*)(VEMIN(I,J),J=1,NVE)
            IF(IIMP2.EQ.0)GOTO 9
            WRITE(10,126)VEMIN(I,1)
126  FORMAT(1X,/,1X,'VALORES MINIMOS DAS VARIABEIS DE ESTADO: '
1      'VEMIN( 1) = ',E12.5)
        DO 34 J=2,NVE
            WRITE(10,127)J,VEMIN(I,J)
127  FORMAT(42X,'VEMIN(',I2,') = ',E12.5)
        34  CONTINUE
        9   CONTINUE
            READ(9,*)MSTATE,EPS,EWT
            MSTATEA=MSTATE
            WRITE(*,129)
129  FORMAT(1X,'LEITURA DOS DADOS COMPLETADA',/)
        RETURN
        END

```

```

*****
***  SUBROTINA PARA CALCULO DA FUNCAO OBJETIVO ***
*****

```

```

        SUBROUTINE FOBJ(NV,I,V,FO,IFLAG,CA,CR)
*      PARAMETER(NVE=12,MINT=2,NROOT=0,
*****
        PARAMETER(NVE=8,MINT=2,NROOT=0,
*****
1          LW=NVE*NVE+10*NVE+2*NROOT+204,LIW=21+NVE,
2          NPR=40*40*NVE)
        IMPLICIT REAL (A-H,O-Z)
        CHARACTER NBLOCO*15
        integer FLAG_I,NENSCONT
        REAL V(50,55),FO(55),XC(40,NVE),XE(40,NVE),Y(NVE)
        REAL Tempo, GLC, GLN
        REAL XXE(NPR),XXC(NPR)
        real FOJ(40), mix

```

```

EXTERNAL FCN,G
DIMENSION IW(LIW),W(LW),VEL(15),VOVL(20)
COMMON PAR(60),VOA(20),J
COMMON NE,NVEE(40),IVEE(40,15)
COMMON IPARV(50),NPARF,NVO
COMMON NPARAJ,NVEAJ,IVEAJ(10)
COMMON NVOF(40),IVOF(40,20),VOF(40,20)
COMMON VO(40,40,20),NPE(40),NVOV(40),IVOV(40,20),VEEM(40,15),
1      TE(40,40),VEE(40,40,15),T0(40),VE0(40,15),VEMIN(40,15)
COMMON MSTATE,EPS,EWT,MSTATEA
common/danidtza/ iultimo
common/barral/VEEINI(40,15), NENSCONT,VOFIX(40,20), IBAN
Common/barral1/FLAG_I
Common/barral2/mix
Common/barral3/nBLOCO
Common/barral4/Tempo,GLC,GLN

      if(iultimo.eq. 0) then
        iultimo = 2
      elseif(iultimo.eq.2) then
        iultimo = 3
      endif
c      se iultimo = 2 , primeira chamada
c      se iultimo = 4 , ultima chamada

      DO 1 J=1,NPARAJ
        PAR(IPARV(J))=V(J,I)
1 CONTINUE
C      Zera o vetor FO(I)
      FO(I)=0.0
C      K2 contador do total de variaveis de estado utilizadas no conjunto
dos ensaios
      K2=0
C      Do para calculo da FO em todos os ensaios
      DO 2 J=1,NE
c      zera função objetivo
      FOJ(J)=0.0

      DO 30 K=1,NVO

```

```

        VOA(K)=0.0
30    CONTINUE

        DO 3 K=1,LIW
            IW(K)=0
3    CONTINUE

        DO 4 K=1,LW
            W(K)=0.0
4    CONTINUE

**        BARRAL  10/05/10

        IBAN = 0

C        K contador que identifica o inicio da simulação e os instantes do
ensaio
        K=1
c        Identifica os tempos iniciais dos ensaios
6    IF(TE(J,K).EQ.T0(J))GOTO 5
        K=K+1
        GOTO 6
C        K contador que identifica os instantes da simulação

5    K1=1

        DO 10 J2=1,NVE
            Y(J2)=VE0(J,J2)
10    CONTINUE

        IF(NVEAJ.EQ.0)GOTO 111
        DO 50 J2=1,NVEAJ
            Y(IVEAJ(J2))=V(NPARAJ + J2, I)
50    CONTINUE

111    DO 7 J2=1,NVEE(J)
        K2=K2+1
        XC(K1,J2)=VE0(J,IVEE(J,J2))
        XE(K1,J2)=VEE(J,K,IVEE(J,J2))
        XXC(K2)=VE0(J,IVEE(J,J2))/VEEM(J,IVEE(J,J2))

```



```

        XXE(K2)=VEE(J,K,IVEE(J,J2))/VEEM(J,IVEE(J,J2))
7    CONTINUE
        IF(IFLAG.EQ.0)GOTO 8
        WRITE(10,100)J
100   FORMAT(1X,/,1X,'ENSAIO ',I2,/)
        IF(NVE.GT.5)GOTO 9
        WRITE(10,101)T0(J),(Y(J2),J2=1,NVE)
101   FORMAT(1X,E12.5,5X,8E12.5)
        GOTO 8
        9    WRITE(10,101)T0(J),(Y(J2),J2=1,NVE)
c    WRITE(10,102)(Y(J2),J2=6,NVE)
102   FORMAT(3(18X,5E12.5,/))
        8    K=K+1
        K1=K1+1
        X=T0(J)
11    XEND=TE(J,K)
*****
        IF(NVO.EQ.0)GOTO 200
*****
        DO 12 J2=1,NVO
            VOA(J2)=VO(J,K-1,J2)
12    CONTINUE

*****
200    CONTINUE
*****

*        numero do ensaio (BARRAL/29/04/10)
        nenscont = J

c    Barral 10/05/10
C    if (IBAN == 1) then
        MSTATE=MSTATEA

        CALL SDRIV2(NVE,X,Y,FCN,XEND,MSTATE,NROOT,EPS,EWT,MINT,W,LW,IW,
1        LIW,G)

        DO 13 J2=1,NVE
            IF(Y(J2).GT.0.1E-6)GOTO 13
            Y(J2)=1E-6
            ! modificacao em 28/05/10
13    CONTINUE

```

```

IND=0
DO 14 J2=1,NVEE(J)
  IF(VEE(J,K,IVEE(J,J2)).GE.0.0)GOTO 14
  IND=IND+1
14 CONTINUE

  IF(IND.LT.NVEE(J))GOTO 40
  K=K+1
  GOTO 11
40 DO 15 J2=1,NVEE(J)
  XC(K1,J2)=Y(IVEE(J,J2))
  IF(VEE(J,K,IVEE(J,J2)).GE.0.0)GOTO 41
  XE(K1,J2)=XC(K1,J2)
  GOTO 15
41 XE(K1,J2)=VEE(J,K,IVEE(J,J2))
  K2=K2+1
  XXC(K2)=Y(IVEE(J,J2))/VEEM(J,IVEE(J,J2))
  XXE(K2)=VEE(J,K,IVEE(J,J2))/VEEM(J,IVEE(J,J2))
15 CONTINUE
  IF(IFLAG.EQ.0)GOTO 16
  IF(NVE.GT.5)GOTO 17
  WRITE(10,101)X,(Y(J2),J2=1,NVE)
c WRITE(10,1011)X,mix,(Y(J2),J2=1,NVE) ! Barral 17/05/10
1011 FORMAT(1X,E12.5,5X,E12.5,5X,8E12.5)
  GOTO 16
  17 WRITE(10,101)X,(Y(J2),J2=1,NVE)
c WRITE(10,102)(Y(J2),J2=6,NVE)
16 K=K+1
  IF(K.GT.NPE(J))GOTO 18
  K1=K1+1

  GOTO 11

18 DO 19 J1=1,NVEE(J)
  DO 21 J2=1,K1
  IF(XE(J2,J1).GE.VEMIN(J,IVEE(J,J1)))GOTO 22
  IF(XC(J2,J1).LT.VEMIN(J,IVEE(J,J1)))GOTO 21
22 FO(I)=FO(I)+((XC(J2,J1)-XE(J2,J1))/((XC(J2,J1)+XE(J2,J1))/2.))**2
  FOJ(J) = FOJ(J) +

```

```

+          ((XC(J2,J1)-XE(J2,J1))/((XC(J2,J1)+XE(J2,J1))/2.))**2
21      CONTINUE
19      CONTINUE
c      if((iultimo.eq. 2).or.(iultimo.eq.4)) then
        write(10,*) ' Residuo = ', foj(j)
c      endif
2 CONTINUE

SX=0.0
SY=0.0
SXY=0.0
SX2=0.0
SY2=0.0
DO 23 J1=1,K2
  SX=SX+XXE(J1)
  SY=SY+XXC(J1)
  SXY=SXY+XXE(J1)*XXC(J1)
  SX2=SX2+XXE(J1)*XXE(J1)
  SY2=SY2+XXC(J1)*XXC(J1)
  IF(SX2.NE.0.0)GOTO 231
  SX2=0.1E-06
  SX=0.1E-06
231 IF(SY2.NE.0.0)GOTO 23
  SY2=0.1E-06
  SY=0.1E-06
23 CONTINUE
  CA=SXY/SX2
  AUX=(K2*SX2-SX*SX)*(K2*SY2-SY*SY)

  IF(AUX.GT.0.0)GOTO 51
  AUX=0.1E-06
51 CR=(K2*SXY-SX*SY)/SQRT(AUX)

  IF(IFLAG.NE.2)GOTO 24
  WRITE(11,103)K2
103 FORMAT(1X,I5)
  DO 25 J=1,K2
    WRITE(11,104)XXE(J),XXC(J)
104 FORMAT(1X,2E12.5)
25 CONTINUE

```

GOTO 24

```
      WRITE(13,300)NE
300  FORMAT(1X,I2)
      NPAR=NPARG+NPARG
      DO 301 J=1,NE
      WRITE(13,300)NPAR
      DO 302 J1=1,NPAR
      WRITE(13,303)PAR(J1)
303  FORMAT(1X,E16.8)
302  CONTINUE
      WRITE(13,300)NVOF(J)
      DO 304 J1=1,NVOF(J)
      WRITE(13,305)IVOF(J,J1),VOF(J,J1)
305  FORMAT(1X,I2,1X,E16.8)
304  CONTINUE
      WRITE(13,306)NPE(J),NVEE(J),NVOV(J)
306  FORMAT(1X,3(I2,1X))
      WRITE(13,307)(IVEE(J,J1),J1=1,NVEE(J))
307  FORMAT(1X,15(I2,1X))
      WRITE(13,3070)(VEMIN(J,J1),J1=1,NVE)
3070 FORMAT(1X,15(E16.8,1X))
      IF(NVOV(J).GT.0)GOTO 308
      DO 309 J1=1,NPE(J)
      DO 310 J2=1,NVEE(J)
      VEL(J2)=VEE(J,J1,IVEE(J,J2))
310  CONTINUE
      WRITE(13,311)TE(J,J1),(VEL(J2),J2=1,NVEE(J))
311  FORMAT(1X,16(E16.8,1X))
309  CONTINUE
      GOTO 312
308  WRITE(13,313)(IVOV(J,J1),J1=1,NVOV(J))
313  FORMAT(1X,20(I2,1X))
      DO 314 J1=1,NPE(J)
      DO 315 J2=1,NVEE(J)
      VEL(J2)=VEE(J,J1,IVEE(J,J2))
315  CONTINUE
      WRITE(13,311)TE(J,J1),(VEL(J2),J2=1,NVEE(J))
      DO 316 J2=1,NVOV(J)
```

```

        VOVL(J2)=VO(J,J1,IVOV(J,J2))
316 CONTINUE
        WRITE(13,317)(VOVL(J2),J2=1,NVOV(J))
317 FORMAT(1X,20(E16.8,1X))
314 CONTINUE
312 WRITE(13,300)NVE
        DX=0.1
        TF=TE(J,NPE(J))+0.099
        WRITE(13,318)T0(J),DX,TF
318 FORMAT(1X,3(E16.8,1X))
        IF(NVEAJ.EQ.0)GOTO 320
        DO 321 J1=1,NVEAJ
            VE0(J,IVEAJ(J1))=V(NPARAJ+J1,I)
321 CONTINUE
320 WRITE(13,311)(VE0(J,J1),J1=1,NVE)
        WRITE(13,319)MSTATEA,EPS,EWT
319 FORMAT(1X,I1,2(1X,E16.8))
301 CONTINUE

24 RETURN
END

```

```

*****
***** SUBROTINA PARA CALCULO DAS DERIVADAS *****
*** (Subrotina a Ser Escrita pelo Usuario do Programa) ***
*****

```

```

SUBROUTINE FCN(N,X,Y,YPRIME)
IMPLICIT REAL(A-H,O-Z)
CHARACTER NBLOCO*15
integer NENSCONT
integer flag_I,N
REAL MIX,MID,MIGPV,MINH4, MIALA
REAL FF, fc1,fc2,fc3,fc4,fc5
REAL glc0, gln0, glcin, glnin, po20, po2in
REAL Tempo, GLC, GLN
DIMENSION Y(N),YPRIME(N)
COMMON PAR(60),VOA(20),J
Common/barral/VEEINI(40,15),NENSCONT,VOFIX(40,20), IBAN
Common/barral1/FLAG_I
Common/barral2/mix

```

Common/barral3/nBLOCO

Common/barral4/Tempo, GLC, GLN

```
*
*
*   PAR(1)  = mimax      (1/h)
*   PAR(2)  = kGlc       (g/l)
*   PAR(3)  = kGln       (g/l)
*   PAR(4)  = kiNH4      (g/l)
*   PAR(5)  = km         (1/h)
*   PAR(6)  = kmGlc      (g/l)
*   PAR(7)  = kmNH4      (g/l)
*   par(8)  = Alfa_NH4   (mg/1.0e07cell)
*   PAR(9)  = Alfa_ALA   (g/1.0e07cel)
*   PAR(10) = Beta_ALA   (g/1.0e07cel.h)
*   PAR(11) = kALAGLC    (g/L)
*   PAR(12) = Alfa_GPV   (µg/1.0e7cel)
*   PAR(13) = kdGPVNH4   (g/L)
*   PAR(14) = YXGlc      (1.0e7cel/g)
*   PAR(15) = YALAGLC    (g/g)
*   PAR(16) = ms         (g/1e07cel.h)
*   PAR(17) = YxGln      (1.0e07cel/g)
*   PAR(18) = YNH4Gln    (mg/g)
*   PAR(19) = kdGPV      (1/h)
*   par(20) = ksinGLN
*   par(21) = YGLNGLU
*   par(22) = YNH4GLU
*   par(23) = kdAla
*   par(24) = YNH4ALA
*
*
*
*   Y(1)= Xv             (1.0e07cel/ml)
*   Y(2)= Xd             (1.0e07cel/ml)
*   Y(3)= GLC            (g/L)
*   Y(4)= GLN            (g/L)
*   Y(5)= NH4            (g/L)
*   Y(6)= ALA            (g/L)
*   Y(7)= GPV            (microg/mL)
*   Y(8)= Glu            (g/L)
```

do i = 1, n

```

        if ( y(i) <= 1e-07 ) then
            y( i ) = 1e-07
        end if
    end do

*   Identificacao do condicao inicial de GLC, GLN e PO2

    glc0 = veeini(nenscont,3)
    gln0 = veeini(nenscont,4)
    po2in = VOFIX(nenscont, 1)
    glc0 = VOFIX(nenscont, 2)
    gln0 = VOFIX(nenscont, 3)

*   write(*,2244) ' nenscont = ' , nenscont
*   write(*,2245) ' veeini   = ' , veeini(nenscont,3)
* 2244      FORMAT(1X,A, 5x, I2)
* 2245      FORMAT(1X,A, 5x, E12.5)


    if ((glc0 > 13.0) .and. (glc0 < 16.0))      then
        glcin = 15.0
    else if ((glc0 > 4.5) .and. (glc0 < 6.0)) then
        glcin = 5.0
    else if ((glc0 > 0.8) .and. (glc0 < 1.5)) then
        glcin = 1.0
    else
        glcin = 10.0
    end if


    if ((gln0 > 6.5) .and. (gln0 < 8.0))      then
        glnin = 7.0
    else if ( (gln0 > 1.5).and. (gln0 < 2.0)) then
        glnin = 1.75
    elseif ((gln0 > 0.1) .and. (gln0 < 0.7)) then
        glnin = 0.6

```

```

else
  glnin  = 3.5
end if

```

```

if (glcin == 1.0) then
  fc1glc = 0.390    ! celula P2 , adriana mimax
c  fc1glc = 1.00    ! Barral teste 25/05/05
  fc2glc = 1.000    ! celula P2 , adriana YNH4X
  fc3glc = 1.000    ! celula P2 , adriana Ygpx
  fc4glc = 0.431    ! celula P2 , adriana Yxglc
c  fc4glc = 1.00    ! Barral teste 25/05/05
  fc5glc = 1.808    ! celula P2 , adriana YAlaglc
  fc6glc = 0.219    ! celula P2 , adriana Yxgln
c  fc6glc = 1.00    ! Barral teste 25/05/05
  fc7glc = 3.024    ! celula P2 , adriana Ynh4gln
C  fc7glc = 1.00    ! Barral teste 25/05/05
end if

```

```

if(glcin == 5.0) then
  fc1glc = 0.780    ! celula P2 , adriana mimax
C  fc1glc = 1.0      ! Barral teste 25/05/05
  fc2glc = 0.980    ! celula P2 , adriana YNH4X
  fc3glc = 1.000    ! celula P2 , adriana Ygpx
  fc4glc = 0.747    ! celula P2 , adriana Yxglc
  fc5glc = 1.265    ! celula P2 , adriana YAlaglc
C  fc5glc = 1.00    ! Barral teste 25/05/06
  fc6glc = 0.836    ! celula P2 , adriana Yxgln
  fc7glc = 1.092    ! celula P2 , adriana Ynh4gln
end if

```

```

if(glcin == 10.0) then
  fc1glc = 1.000    ! celula P2 , adriana mimax
  fc2glc = 1.020    ! celula P2 , adriana YNH4X
C  fc2glc = 1.00    ! Barral teste 25/05/05
  fc3glc = 1.000    ! celula P2 , adriana Ygpx
  fc4glc = 1.000    ! celula P2 , adriana Yxglc
  fc5glc = 1.000    ! celula P2 , adriana YAlaglc
  fc6glc = 0.953    ! celula P2 , adriana Yxgln
  fc7glc = 0.983    ! celula P2 , adriana Ynh4gln

```



```

end if

if(glcin == 15.0) then
    fc1glc = 0.860      ! celula P2 ,
    fc2glc = 4.400      ! celula P2 , adriana YNH4X
C    fc2glc = 1.00      ! Barral teste 25/05/05
    fc3glc = 1.000      ! celula P2 , adriana Ygpx
    fc4glc = 0.435      ! celula P2 , adriana Yxglc
    fc5glc = 1.489      ! celula P2 , adriana YAlaglc
C    fc5glc = 1.00      ! Barral teste 25/05/05
    fc6glc = 0.230      ! celula P2 , adriana Yxgln
    fc7glc = 0.99       ! celula P2 , adriana Ynh4gln
end if

if(glnin == 0.6) then
    fc1gln = 0.401      ! celula P2 , adriana mimax
    fc2gln = 1.000      ! celula P2 , adriana YNH4X
    fc3gln = 0.470      ! celula P2 , adriana Ygpx
    fc4gln = 1.000      ! celula P2 , adriana Yxglc
    fc5gln = 1.000      ! celula P2 , adriana YAlaglc
    fc6gln = 1.000      ! celula P2 , adriana Yxgln
    fc7gln = 1.000      ! celula P2 , adriana Ynh4gln
end if

if(glnin == 1.75) then
    fc1gln = 0.969      ! celula P2 , adriana mimax
    fc2gln = 1.000      ! celula P2 , adriana YNH4X
    fc3gln = 0.499      ! celula P2 , adriana Ygpx
    fc4gln = 1.00       ! celula P2 , adriana Yxglc
    fc5gln = 0.799      ! celula P2 , adriana YAlaglc
    fc6gln = 0.384      ! celula P2 , adriana Yxgln
    fc7gln = 0.549      ! celula P2 , adriana Ynh4gln
end if

if(glnin == 3.5) then
    fc1gln = 1.000      ! celula P2 , adriana mimax
    fc2gln = 1.000      ! celula P2 , adriana YNH4X
    fc3gln = 0.980      ! celula P2 , adriana Ygpx
    fc4gln = 0.99       ! celula P2 , adriana Yxglc
    fc5gln = 1.031      ! celula P2 , adriana YAlaglc
    fc6gln = 0.184      ! celula P2 , adriana Yxgln

```

```

        fc7gln = 0.220    ! celula P2 , adriana Ynh4gln
    end if

    if(glnin == 7.0) then
        fc1gln = 1.00    ! celula P2 , adriana mimax
        fc2gln = 4.240    ! celula P2 , adriana YNH4X
        fc3gln = 0.73     ! celula P2 , adriana Ygpvx
        fc4gln = 0.57     ! celula P2 , adriana Yxglc
        fc5gln = 2.158    ! celula P2 , adriana YAlaglc
        fc6gln = 0.078    ! celula P2 , adriana Yxgln
        fc7gln = 0.150    ! celula P2 , adriana Ynh4gln
    end if

    if(po2in == 5.0) then
        fc1o2 = 1.000     ! celula P2 , adriana mimax
        fc2o2 = 1.000     ! celula P2 , adriana YNH4X
        fc3o2 = 1.000     ! celula P2 , adriana Ygpvx
        fc4o2 = 1.000     ! celula P2 , adriana Yxglc
        fc5o2 = 1.000     ! celula P2 , adriana YAlaglc
        fc6o2 = 0.990     ! celula P2 , adriana Yxgln
        fc7o2 = 1.000     ! celula P2 , adriana Ynh4gln
    end if

    if(po2in == 30.0) then
        fc1o2 = 0.987     ! celula P2 , adriana mimax
        fc2o2 = 1.248     ! celula P2 , adriana YNH4X
        fc3o2 = 1.410     ! celula P2 , adriana Ygpvx
        fc4o2 = 0.960     ! celula P2 , adriana Yxglc
        fc5o2 = 0.99      ! celula P2 , adriana YAlaglc
        fc6o2 = 0.990     ! celula P2 , adriana Yxgln
        fc7o2 = 3.160     ! celula P2 , adriana Ynh4gln

    end if

    if(po2in == 50.0) then
        fc1o2 = 0.760     ! celula P2 , adriana mimax
        fc2o2 = 4.200     ! celula P2 , adriana YNH4X
        fc3o2 = 2.430     ! celula P2 , adriana Ygpvx
        fc4o2 = 0.320     ! celula P2 , adriana Yxglc
        fc5o2 = 1.05      ! celula P2 , adriana YAlaglc

```

```

        fc6o2 = 0.540      ! celula P2 , adriana Yxgln
        fc7o2 = 4.390      ! celula P2 , adriana Ynh4gln

    end if

    if(po2in == 80.0) then
        fc1o2 = 0.110      ! celula P2 , adriana mimax
        fc2o2 = 23.429      ! celula P2 , adriana YNH4X
        fc3o2 = 7.03       ! celula P2 , adriana Ygpx
        fc4o2 = 0.08       ! celula P2 , adriana Yxglc
        fc5o2 = 5.420      ! celula P2 , adriana YAlaglc
        fc6o2 = 0.090      ! celula P2 , adriana Yxgln
        fc7o2 = 5.730      ! celula P2 , adriana Ynh4gln
    end if

*      mix = fc1o2*fc1glc*fc1gln*mimax*(Glc/(kGlc+ Glc)*Gln/(kGln+
Gln)*kiNH4/(kiNH4+ NH4))      (1/h)

    mix=fc1o2*fc1glc*fc1gln*par(1)*(y(3)/(par(2)+ y(3)))*
    1(y(4)/(par(3)+ y(4)))*(par(4)/(par(4)+y(5)))

*      mid = kd*(kdGlc/(kdGlc+ Glc)*NH4/(kNH4+ NH4))      (1/h)
    mid = PAR(5)*(PAR(6)/(PAR(6)+ Y(3)))*(Y(5)/(PAR(7)+ Y(5)))

*      miNH4 = fc2o2*fc2glc*fc2gln*Alfa_n*mix      (mgNH4/1.0e7cel/h)
    miNH4 = fc2o2*fc2glc*fc2gln*PAR(8)*mix

*      miALA = Alfa_ALA*mix + Beta*( GLC/(kALA+ GLC))      (g/1.0e7cel/h)
    miALA = PAR(9)*mix + PAR(10)*(Y(3)/(PAR(11)+ Y(3)))

*      miGPV = fc3o2*fc3glc*fc3gln*alfa_GPV*mix*(kdGPVNH4/(kdGPVNH4 +NH4))
(microg/1.0e7cel/h)
    miGPV = fc3o2*fc3glc*fc3gln*PAR(12)*mix*(PAR(13)/(PAR(13)+Y(5)))

*      EDOS

*      dXv/dt = YPRIME(1) = (mix-mid)*Xv      (1.0e07 cel/mL.h)
    YPRIME(1) = (MIX-MID)*Y(1)

*      dXd/dt = YPRIME(2) = mid*Xv      (1.0e07 cel/ml.h)

```

```

YPRIME(2) = MID*Y(1)
*      dGlc/dt=YPRIME(3) = -( mix/YxGlc/fc4o2/fc4glc/fc4gln +
miALA/YAlaGlc/fc5o2/fc5glc/fc5gln + ms)*Xv  (gGlc/l.h)
      YPRIME(3)=-(MIX/PAR(14)/fc4o2/fc4glc/fc4gln + miALA/PAR(15)/
1 fc5o2/fc5glc/fc5gln + PAR(16))*Y(1)*1000
*      dGPV/dt =YPRIME(7) = miGPV*Xv - kdGPV*GPV  ! micro_gGPV/ml.h)
YPRIME(7) = miGPV*Y(1) - PAR(19)*Y(7)          ! micro_gGPV/ml.h
If ( IBAN == 0) then
    ! TRUE  Não houve síntese de GLN
    if ( Y(4) < 0.1) then
        ! TRUE  GLN < 0,1
*      Ativa a síntese de GLN
        IBAN = 1
        if (Y(3)<0.1) then
            ! TRUE  GLC < 0,1
*      BLOCO 4 síntese de GLN e NH4; consumo de NH4, ALA, GLU
        ! nensaio = Nenscont
        nBLOCO = 'BLOCO 4'
        tempo = X
        GLC = Y(3)
        GLN = Y(4)

*      dGLN/dt  = kinGLN*YGLN/GLU          ! (gGln/Lh)
YPRIME(4) = PAR(20)*Par(21)
*      dNH4/dt  = minNH4*Xv - ksinGLN*YNH4GLU + kdAla*YAlaNH4 !
(gNH4/l.h)
YPRIME(5) = minNH4*Y(1)-PAR(20)*Par(22)+PAR(23)*Par(24)
*      dALA/dt  = - kdAla                  ! (gALA/L.h)
YPRIME(6) = - PAR(23)
*      dGLU/dt  = YPRIME(8)= 0              ! (gGlu/Lh)
YPRIME(8) = - PAR(20)
        else
        ! FALSE GLC >= 0,1
*      BLOCO 2 Síntese de GLN , Consumo de NH4 e GLU
        ! False
        nBLOCO = 'BLOCO 2'
        tempo = X
        GLC = Y(3)
        GLN = Y(4)
*      dGLN/dt  = ksinGln*YGlnGlu          (gGln/L.h)
YPRIME(4) = PAR(20)*Par(21)

```

```

*      dNH4/dt      =  miNH4*Xv - ksinGln*YNH4Glu      (gNH4/l.h)
      YPRIME(5) =  miNH4*Y(1)- PAR(20)*Par(22)
*      dALA/dt      =  miALa*Xv*1000                      (gALA/L.h)
      YPRIME(6) =  miALA*Y(1)*1000
*      dGLU/dt      =  YPRIME(8)= 0                      (gGlu/L.h)
      YPRIME(8) =  - PAR(20)
      end if
    else
      ! FALSE GLN >= 0,1
      if (Y(3)<0.1) then
        ! TRUE GLC < 0,1
*      BLOCO 3 formacao de NH4 e consumo de ALA
      nBLOCO = 'BLOCO 3'
      tempo = X
      GLC = Y(3)
      GLN = Y(4)
*      dGLN/dt      = -(mix/YXGLN*fc6o2*fc6glc*fc6gln +
miNH4/YNH4GLN/fc7o2*fc7glc*fc7gln)*Y(1)*1000      (gGln/L.h)
      YPRIME(4)= -(mix/PAR(17)/fc6o2/fc6glc/fc6gln +
1      miNH4/PAR(18)/fc7o2/fc7glc/fc7gln)*Y(1)*1000
*      dNH4/dt      =  kdAla*YNH4Ala                      (gNH4/l.h)
      YPRIME(5) =  Par(23)* Par(24)
*      dALA/dt      =  - kdAla                      (gALA/L.h)
      YPRIME(6) =  - PAR(23)
*      dGLU/dt= YPRIME(8)= 0                      (gGlu/L.h)
      YPRIME(8)= 0
      else
        ! FALSE GLC >= 0,1
*      BLOCO 1 Condiçao normal
      nBLOCO = 'BLOCO 1'
      tempo = X
      GLC = Y(3)
      GLN = Y(4)
*      dGLN/dt      = -(mix/YXGLN*fc6o2*fc6glc*fc6gln +
miNH4/YNH4GLN/fc7o2*fc7glc*fc7gln)*Y(1)*1000      (gGln/L.h)
      YPRIME(4)= -(mix/PAR(17)/fc6o2/fc6glc/fc6gln +
1      miNH4/PAR(18)/fc7o2/fc7glc/fc7gln)*Y(1)*1000
*      dNH4/dt      =  miNH4*Xv                      (gNH4/l.h)
      YPRIME(5) =  miNH4*Y(1)
*      dALA/dt      =  miALa*Xv*1000                      (gALA/L.h)
      YPRIME(6) =  miALA*Y(1)*1000

```

```

*          dGLU/dt      =  YPRIME(8)= 0                      (gGlu/L.h)
          YPRIME(8) =  0.0
          end if
        end if
      else
        ! FALSE IBAN =1, houve sintese de GLN
        if (Y(3) <0.1) then
          ! True GLC <0,1
*        BLOCO 4  Formacao de GLN,NH4; consumo de NH4, ALA e GLU
          nBLOCO = 'BLOCO 4'
          tempo = X
          GLC = Y(3)
          GLN = Y(4)
*          dGLN/dt      =                      (gGln/L.h)
          YPRIME(4) =  PAR(20)*Par(21)
*          dNH4/dt      =  miNH4*Xv - ksinGLN*YNH4GLU + kdAla*YAlaNH4
(gNH4/l.h)
          YPRIME(5) =  miNH4*Y(1)-PAR(20)*Par(22)+PAR(23)*Par(24)
*          dALA/dt      =  - kdAla                      (gALA/L.h)
          YPRIME(6) =  - PAR(23)
*          dGLU/dt      =  YPRIME(8)= 0                      (gGlu/L.h)
          YPRIME(8) =  - PAR(20)
          else
            ! FALSE GLC > 0,1
*          BLOCO 2 Sintese de GLN, Consumo de NH4 e GLu
            nBLOCO = 'BLOCO 2'
            tempo = X
            GLC = Y(3)
            GLN = Y(4)
*          dGLN/dt      =  ksinGln*YGlnGlu                (gGln/L.h)
            YPRIME(4) =  PAR(20)*Par(21)
*          dNH4/dt      =  miNH4*Xv - ksinGln*YNH4Glu      (gNH4/l.h)
            YPRIME(5) =  miNH4*Y(1) - PAR(20)*Par(22)
*          dALA/dt      =  miALA*Xv*1000                  (gALA/L.h)
            YPRIME(6) =  miALA*Y(1)*1000
*          dGLU/dt      =  YPRIME(8)= 0                      (gGlu/L.h)
            YPRIME(8) =  - PAR(20)
            end if
          end if
        end if
      RETURN

```

END

```
*****
*****
*****
```

```
FUNCTION G(N,X,Y,NROOT)
IMPLICIT REAL(A-H,O-Z)
DIMENSION Y(N)
COMMON PAR(60),VOA(20),J
G=0.0
RETURN
END
```