

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE
CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CULTIVO DE *Streptococcus zooepidemicus*: MODELAGEM E
PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

Matheus Lopes Harth

São Carlos – SP

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E
DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**CULTIVO DE *Streptococcus zooepidemicus*: MODELAGEM E
PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO**

Matheus Lopes Harth

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de São
Carlos como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Luperni Horta
Coorientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

São Carlos – SP

2018

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Ilza, ao meu pai, Paulo (*in memoriam*), ao meu irmão, Rafael, sempre me apoiando e estando ao lado durante esta caminhada.

Aos meus orientadores, professores Dr. Antonio Carlos Luperni Horta e Dr. Roberto de Campos Giordano, por me acolherem no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pela confiança depositada em mim, apoio, profissionalismo e disponibilidade.

Às membras da banca, professoras Dr.^a Teresa Cristina Zangirolami e Dr.^a Maria Helena Santana Andrade, pela disponibilidade, conhecimentos e sugestões que enriqueceram o trabalho.

À Dr.^a Cíntia Sargo, cuja ajuda, experiência, paciência e conhecimentos transmitidos foram essenciais para execução deste trabalho.

À Dr.^a Daniela Correia por ter me apresentado a Biologia de Sistemas, que se tornou uma parte muito importante deste trabalho.

Ao Dr. Rhelvis de Campos Oliveira, cujos conhecimentos trocados foram a base deste trabalho.

Aos amigos da Bioquímica e Simulação, Gilson, Valdemir, Sheyla, Thaís, Thiago, Murilo, Eric, Martha, Bruna, Carlota, Letícia, Laiane e Vítor, pelo companheirismo, trocas de conhecimentos e, acima de tudo, momentos de descontração, que tornaram mais leves os dias.

Ao amigo Dr. João Henrique Dantas, que, em 2012, me mostrou e fez me apaixonar pela pesquisa científica.

Aos amigos Tiago e Eugênia pela amizade à distância.

Aos técnicos de laboratório, Amadeus, Thais e Alyne, pelas ajudas nas análises de cromatografia líquida.

A todos meus professores. Sem vocês e seus conhecimentos transmitidos, não teria chegado aqui.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho. À empresa Kerry, pela peptona de soja.

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O ácido hialurônico é um biopolímero encontrado em diversos organismos e que possui diversas aplicações biomédicas, como viscosuplementação em articulações e procedimentos estéticos. Tais aplicações estão associadas com suas propriedades reológicas, que dependem diretamente da massa molar. As bactérias *Streptococcus zooepidemicus* são capazes de produzir ácido hialurônico, no entanto, ainda é preciso determinar as melhores condições de operação do biorreator de modo que se obtenha maiores rendimentos de ácido hialurônico. Em vista disto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver modelos cinéticos e de escala genômica que descrevam a produção microbiana de ácido hialurônico. Para isso, foram levantadas informações a respeito do metabolismo do carbono central, de produção e consumo de aminoácidos do microrganismo *S. zooepidemicus*. Para ajustar e validar estes modelos, foram obtidos dados experimentais de cultivos usando glicose como fonte de carbono e peptona de soja como fonte de nitrogênio em biorreator automatizado tipo tanque agitado de 5 L. Para ajustar o modelo cinético foi utilizado o algoritmo PSO, enquanto que, para simular o modelo de escala genômica desenvolvido foi utilizado o *software* OptFlux. Os cultivos em biorreator tipo tanque agitado indicaram que o microrganismo consumiu outros açúcares presentes na peptona além da glicose adicionada ao meio, além de ser observada uma fase de adaptação de quase 20 h. Esta fase foi posteriormente reduzida ao se conduzir as etapas de pré-inóculo e inóculo usando concentrações mais altas de fonte de carbono. Além disso, os resultados experimentais mostraram que a concentração de aminoácidos aumenta no final do cultivo, que pode ser explicado por conta da ação de proteases. Em relação ao modelo cinético proposto, ele consegue descrever com competência a maioria dos dados experimentais, divergindo nos últimos dados de concentração celular e ácido láctico. Atribui-se este fato ao consumo mais intenso dos nutrientes da peptona utilizada. Quanto ao modelo de escala genômica adaptado, as principais alterações foram na adição de reações relacionadas à formação de ácido D-glicurônico e nas vias de biossíntese e consumo de alguns aminoácidos. Os resultados das simulações feitas para validar o modelo mostraram divergências com os dados experimentais. Acredita-se que isto seja decorrente do consumo de outros nutrientes presentes na peptona de soja utilizada, entretanto, destaca-se que não foram observados erros que comprometessem as simulações feitas, o que indica o potencial que o modelo de escala genômica desenvolvido possui.

Palavras chaves: modelo de escala genômica; ácido hialurônico; *Streptococcus zooepidemicus*; protease; modelo cinético; biorreator.

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a biopolymer found in many organisms, which has several biomedical applications, like viscosupplementation and aesthetic procedures. Such applications are associated with its rheological properties, that depend directly on the molar mass. *Streptococcus zooepidemicus* bacteria can produce hyaluronic acid. However, it is still necessary to determine the best operating conditions for a bioreactor so that higher HA yields are achieved. In the light of this, our work aims to develop kinetic and genome-scale models that describe the microbial production of hyaluronic acid. To reach this objective, information was collected regarding the central carbon metabolism, production, and consumption of amino acids of *S. zooepidemicus*. To adjust and validate these models, experimental data were obtained from cultures using glucose as carbon source and soybean peptone as nitrogen source in 5 L automated stirred tank bioreactor. To adjust the kinetic model, PSO algorithm was used, while OptFlux software was used to simulate the developed genome-scale model. The agitated tank bioreactor cultures indicated the microorganism consumed other nutrients present in the peptone besides the glucose added to the medium. In addition, an adaptation phase of almost 20 h. This phase was reduced by increasing the concentration of glucose in the inoculum and pre-inoculum. The experimental results also showed that the concentration of amino acids increases at the end of the culture, which can be explained by the action of proteases. Regarding the proposed kinetic model, it could competently describe most of the experimental data, diverging in the last data of cell and lactic acid concentration. This fact is attributed to the more intense consumption of the nutrients of the peptone used. As for the adapted genomic scale model, the major alterations were regarding the reactions related to the formation of acid D-glucuronic and the biosynthesis and consumption of amino acids. The validation tests results diverged from the experimental data. It is possible that consumption of other nutrients in the peptone were responsible for this. However, errors that compromised the simulations were not observed, indicating the developed genome-scale model potential.

Keywords: genome-scale model; hyaluronic acid; *Streptococcus zooepidemicus*; protease; kinetic model; bioreactor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Representação gráfica da unidade monomérica do ácido hialurônico.	15
Figura 2.	Via de biossíntese de ácido hialurônico em <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	19
Figura 3.	Representação gráfica do aparato experimental utilizado nos cultivos de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , composto por biorreator, linhas de gás e equipamentos usados para a aquisição de dados e controle.	34
Figura 4.	Correlação entre concentração celular em massa seca (C_X) e densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) do cultivo A.	44
Figura 5.	Concentração de biomassa, AH, glicose, lactato e acetato em função do tempo do cultivo A.	45
Figura 6.	Gráficos de concentração de biomassa e ácido hialurônico em função do tempo.	46
Figura 7.	Concentração de biomassa, AH, glicose, lactato e acetato em função do tempo do cultivo B.	46
Figura 8.	Cromatograma do conteúdo de carboidratos na peptona de soja.	47
Figura 9.	Perfis de concentração de (a) asparagina, aspartato e histidina; (b) metionina, isoleucina e valina; (c) glicina, treonina e tirosina; (d) fenilalanina, lisina e arginina; (e) alanina, leucina e prolina; e (f) glutamato, serina e cisteína do cultivo B.	49
Figura 10.	Balanço de carbono realizado para o cultivo (a) A e (b) B.	50
Figura 11.	Gráficos de (a) permissividade e concentração celular em função do tempo e (b) de concentração celular em função da permissividade do cultivo A.	51
Figura 12.	Condutividade e concentração celular do cultivo A em função do tempo.	52
Figura 13.	Dados online de ambos cultivos de (a) agitação, (b) vazão de ar, (c) oxigênio dissolvido, (d) pH, (e) temperatura, (f) vazão de oxigênio puro, (g) fração de oxigênio e (h) de gás carbônico na saída do biorreator.	53
Figura 14.	Perfis de concentração de (a) biomassa, (b) glicose, (c) ácido hialurônico, (d) lactato e (e) acetato, em que os símbolos representam os dados experimentais e as linhas, a resposta dos modelos.	54
Figura 15.	Comparação entre a recuperação de carbono do CO_2 experimental e prevista pelo modelo.	56
Figura 16.	Vias de produção de asparagina, glutamato, homoserina e alanina (linhas cheias representam reações que possuem evidências genéticas, enquanto linha tracejadas, reações sem evidências).	61

Figura 17. Vias de produção de metionina e tirosina presentes apenas no modelo do <i>Streptococcus pyogenes</i>	62
Figura 18. Vias de consumo de glutamato, treonina e valina (linhas cheias e tracejadas representam reações com e sem evidências genéticas, respectivamente).	62
Figura 19. Vias de consumo de prolina, histidina e tirosina presentes apenas no modelo do <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	63
Figura 20. Via de assimilação de sacarose presente no modelo.....	66
Figura 21. Fração de oxigênio na saída do biorreator para o cultivo B em função do tempo.	67

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Tecidos ou fluidos corporais em que ácido hialurônico é encontrado e sua respectiva concentração.	16
Tabela 2.	Informações a respeito dos três modelos de escala genômica encontrados no <i>Biomodels Database</i>	31
Tabela 3.	Composição dos aminoácidos da peptona de soja fornecida pelo fabricante.	32
Tabela 4.	Concentrações de glicose de cada uma das etapas dos cultivos A e B.	33
Tabela 5.	Valores utilizados de massa molar dos componentes em $\text{g C}\cdot\text{mol}^{-1}$	36
Tabela 6.	Índices de desempenho dos cultivos realizados e encontrados na literatura.	51
Tabela 7.	Valores obtidos pelo PSO para os parâmetros da fase 3 do modelo.	55
Tabela 8.	Comparação de patogenicidade, produção de hialuronato sintase, quantidade de genes e enzimas entre <i>S. zooepidemicus</i> , <i>L. lactis cremoris</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> e <i>S. thermophilus</i>	57
Tabela 9.	Fluxos experimentais e simulados para as faixas 1 e 2.	65
Quadro 1.	Comparação entre as vias de biossíntese de aminoácidos dos microrganismos selecionados.	58
Quadro 2.	Comparação entre as vias de consumo de aminoácidos entre microrganismos selecionados.	59
Quadro 3.	Comparação entre as vias do carbono central entre <i>S. zooepidemicus</i> , <i>L. lactis cremoris</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> e <i>S. thermophilus</i>	60

LISTA DE SÍMBOLOS

AACT	Aminoacetona	
Ac	Acetato	
AcTP	Acetilfosfato	
ADP	Adenosina difosfato	
AH	Ácido hialurônico	
AKG	Alfa-cetogluturato	
Ala	Alanina	
AMP	Adenosina monofosfato	
AOBUT	2-amino-3-oxobutanoato	
Arg	Arginina	
ASC	Ácido ascórbico	
ASC6P	Ascorbato-6-fosfato	
Asn	Asparagina	
Asp	Aspartato	
ASPSA	L-aspartato semialdeído	
ATP	Adenosina trifosfato	
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Sangue)	
C_i	Concentração do componente <i>i</i>	(g L ⁻¹)
CO₂	Gás carbônico	
CoA	Coenzima A	
Cond	Condutividade	(mS cm ⁻¹)
Cys	Cisteína	
DNA	Ácido desoxirribonucleico	
DO₆₀₀	Densidade óptica medida em 600 nm	(-)
FBA	<i>Flux Balance Analysis</i> (Análise de Balanço de Fluxo Metabólico)	
fobj	Função-objetivo	
Glic	Glicose	
Gln	Glutamina	
Glu	Glutamato	
Gly	Glicina	
H⁺	Próton	
H₂O	Água	
H₂O₂	Peróxido de oxigênio	
His	Histidina	
Hom	Homoserina	
Ile	Isoleucina	
J_i	Fluxo de consumo ou produção do componente <i>i</i>	(mmol g _{MS} ⁻¹ h ⁻¹)
K_i	Constante de saturação do substrato <i>i</i>	(g L ⁻¹)
K_{ji}	Constante de inibição do componente <i>j</i>	
Lact	Lactato	
Leu	Leucina	
Lys	Lisina	
m_i	Vazão mássica do componente <i>i</i>	(g h ⁻¹)
m_e	Coeficiente de manutenção celular	(h ⁻¹)
Met	Metionina	
MM	Massa molar	(g C-mol ⁻¹)

MS	Massa seca	
MTHGXL	Metil-glioxilato	
n_i	Vazão molar do componente <i>i</i>	(mol h ⁻¹)
NADH/NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido	
NADPH/NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	
NC	Não calculado	
NH₃	Amônia	
NH₄⁺	Íon amônia	
O₂	Gás oxigênio	
OD	Oxigênio dissolvido	
PASP	4-fosfo-L-aspartato	
PEP	Fosfoenolpiruvato	
Perm	Permissividade	(pF cm ⁻¹)
pH	Potencial hidrogeniônico	(-)
Phe	Fenilalanina	
PI	Fosfato	
PPI	Difosfato	
Pro	Prolina	
PSO	Otimização por enxame de partícula	
PYR	Piruvato	
R_i	Recuperação de carbono do componente <i>i</i>	(%)
r_i	Velocidade de consumo ou produção do componente <i>i</i>	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
RNA	Ácido ribonucleico	
Ser	Serina	
Thr	Treonina	
Trp	Triptofano	
Tyr	Tirosina	
UDP	Uridina difosfato	
UDPG	UDP-glicose	
UDPGLCUR	Ácido d-glicurônico	
Val	Valina	
X	Biomassa	
Y_{i/j}	Fator de rendimento do componente <i>i</i> em relação a <i>j</i>	(g _i g _j ⁻¹)
y_i	Fração molar do componente <i>i</i> na fase gasosa	(-)

Letras gregas:

α_i	Parâmetro de formação do produto <i>i</i> associado ao crescimento	(g _i g _x ⁻¹)
β	Parâmetro de formação de produto não associado ao crescimento	(g _i g _j ⁻¹ h ⁻¹)
μ	Velocidade específica de crescimento	(h ⁻¹)
μ_m	Velocidade específica máxima de crescimento	(h ⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	ESTRUTURA E FUNÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO	15
2.2	APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	17
2.3	ROTAS DE OBTENÇÃO INDUSTRIAL	18
2.3.1	Extração de tecidos animais.....	18
2.3.2	Rota microbiana.....	19
2.3.2.1	Meio de cultura	20
2.3.2.2	Aeração	22
2.3.2.3	Temperatura.....	23
2.3.2.4	Potencial hidrogeniônico	23
2.4	MODELOS	24
2.4.1	Modelos não-estruturados.....	25
2.4.2	Modelos estruturados.....	28
2.4.3	Modelos estequiométricos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	MICROORGANISMO.....	32
3.2	MEIO DE CULTURA.....	32
3.3	PRÉ-INÓCULO E INÓCULO	33
3.4	CULTIVOS EM BIORREATOR	33
3.5	SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO	34
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	35
3.7	PROCEDIMENTOS MATEMÁTICOS	35
3.7.1	Balanco de carbono	35
3.7.2	Balanco de massa.....	37
3.7.2.1	Cálculo da velocidade específica de crescimento celular máxima	37
3.7.2.2	Cálculo dos fatores de rendimento	38
3.7.2.3	Cálculo dos fluxos dos componentes	39
3.7.2.3.1	<i>Componentes da fase líquida.....</i>	<i>39</i>
3.7.2.3.2	<i>Componentes da fase gasosa</i>	<i>40</i>

3.8	MODELAGEM CINÉTICA E AJUSTE DE PARÂMETROS.....	41
3.9	ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	42
3.9.1	Seleção do modelo base para modificações.....	42
3.9.2	Alterações no modelo	43
3.9.3	Validação do modelo	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	CULTIVOS EM BIORREATOR	44
4.2	AJUSTE DO MODELO CINÉTICO	54
4.3	ADAPTAÇÃO PARCIAL DO MODELO DE ESCALA GENÔMICO	56
4.3.1	Seleção do modelo base	56
4.3.2	Alterações no modelo	61
4.3.3	Validação do modelo	63
5	CONCLUSÕES.....	68
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
	REFERÊNCIA.....	70

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é uma biomolécula cuja estrutura química foi elucidada em 1934, sendo encontrada em diversos animais e em algumas bactérias (LAURENT; FRASER, 1992). Esta substância, cada vez mais, tem sido requisitada em diversos âmbitos da Ciência, sendo um dos compostos mais destacados no ramo da Ortopedia.

Por conta de suas propriedades reológicas, o interesse na produção de ácido hialurônico de alta massa molar tem crescido nos últimos anos. Este produto é muito utilizado em pacientes que possuem artrose ou artrite, cujo uso se dá através de injeções regulares de viscosuplementação para aliviar as dores (HOCHBERG et al., 2012). Outros ramos da Medicina também fazem uso deste biopolímero como a Oftalmologia, utilizando-o como lubrificante, durante os procedimentos cirúrgicos, para mitigar o inchaço da região e, em alguns casos, prevenir cegueira (BALAZS, 2004).

Apesar de ser sintetizado por animais, algumas bactérias também possuem a capacidade de produzir AH. Dentre elas, o uso da espécie *Streptococcus zooepidemicus* se destaca no meio industrial. A produção microbiana de ácido hialurônico tem sido estudada desde a década de 1990 e ainda enfrenta alguns desafios, como a viscosidade do caldo, que aumenta proporcionalmente com a concentração do produto, dificultando a transferência de oxigênio. Além disso, a glicose é consumida na biossíntese do AH e no crescimento celular, de maneira que estes dois processos competem por esta fonte de carbono. Diversos trabalhos estudaram o uso de diferentes modos de operação de biorreator, composição do meio de cultivo e concentração de oxigênio dissolvido para superar tais desafios. Porém, ainda não existe consenso a respeito de quais seriam as condições ótimas de tais variáveis (LIU et al., 2011).

O uso de técnicas computacionais mais avançadas, como a Análise de Balanço de Fluxo (FBA), pode ajudar a definir estratégias a fim de otimizar a produção microbiana de ácido hialurônico, superando os obstáculos acima citados (ORTH; THIELE; PALSSON, 2010). A grande vantagem de utilizar tais ferramentas é a possibilidade de orientar as pesquisas em direção a resultados mais promissores com maior rapidez, precisão e diminuição significativa do esforço laboratorial. Diante disto, o presente trabalho buscou definir um modelo cinético e de escala genômica que permita o desenvolvimento de uma estratégia de controle a ser implementada em um biorreator automatizado tipo tanque agitado para a produção de ácido hialurônico em cultivos de *Streptococcus zooepidemicus*.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo, em parceria com o grupo de pesquisas liderado pela professora Dr.^a Maria Helena Andrade Santana da Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos da UNICAMP, desenvolver modelos (cinéticos e de escala genômica) que descrevessem a produção de ácido hialurônico em cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* utilizando biorreator tipo tanque agitado.

Quanto aos objetivos específicos, foram definidos os seguintes:

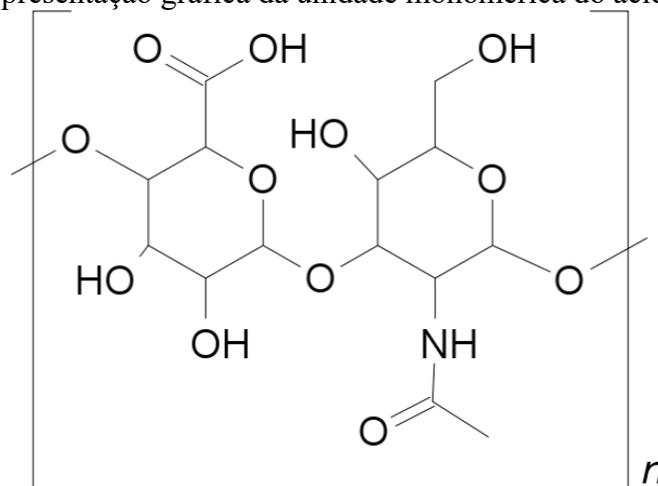
- Desenvolver os modelos cinéticos que descrevessem a produção de ácido hialurônico;
- Desenvolver modelo de escala genômica para o *Streptococcus zooepidemicus* que englobasse a produção de ácido hialurônico;
- Validar os modelos desenvolvidos utilizando dados obtidos em biorreator.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O ácido hialurônico é um biopolímero linear de alta massa molecular cuja estrutura química foi elucidada por Karl Meyer e John W. Palmer, em 1934. Sua unidade básica é composta por uma molécula de ácido D-glicurônico e uma de N-acetilglicosamina unidas por meio de uma ligação glicosídica β -1,3. Entre cada monômero existe uma ligação glicosídica β -1,4 (LAURENT; FRASER, 1992). Na Figura 1 encontra-se representada tal estrutura.

Figura 1. Representação gráfica da unidade monomérica do ácido hialurônico.



Fonte: Adaptado de Boeriu et al. (2013)

Conforme apresentado acima, o ácido hialurônico é uma molécula cuja estrutura pode ser considerada simples, porém, tal característica não limita as suas funções nos organismos. Ele atua na homeostase celular por conta de sua habilidade de reter grandes volumes de água; pode induzir sinais intracelulares de transdução e interage com macromoléculas extracelulares, moldando a matriz extracelular, ou seja, possui a habilidade de modelar ou remodelar tecidos (TOOLE, 2004).

Apesar de Meyer e Palmer terem isolado esta molécula a partir do humor vítreo bovino, já se sabe que ele está presente em vários tecidos de diferentes de animais, como galos, coelhos, bovinos e humanos. Vale destacar que algumas bactérias também produzem o AH, como o *Streptococcus zooepidemicus* (KOGAN et al., 2007). Na Tabela 1 são listados os tecidos ou fluidos de animais e a concentração em que o ácido hialurônico é encontrado.

Tabela 1. Tecidos ou fluidos corporais em que ácido hialurônico é encontrado e sua respectiva concentração.

Tecido ou fluido corporal	Concentração de ácido hialurônico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Crista de galo	7500
Cordão umbilical humano	4100
Fluido sinovial humano	1400 – 3600
Cartilagem nasal bovina	1200
Humor vítreo humano	140 – 340
Derme humana	200 – 500
Epiderme humana	100
Cérebro de coelho	65
Coração de coelho	27
Linha torácica humana	0,2 – 50
Urina humana	0,1 – 0,3
Soro humano	0,01 – 0,1

Fonte: Kogan et al. (2007)

Em um mesmo animal, a massa molecular do ácido hialurônico varia de acordo com o tecido de origem. Estima-se que ela atinge valores da ordem de 10^6 a 10^7 Da, de modo que o tamanho da cadeia do polímero varia de 2 a 25 μm (TOOLE, 2004).

Em solução aquosa, mesmo em baixas concentrações, as moléculas de ácido hialurônico interagem umas com as outras formando redes. É natural que o tamanho da cadeia, ou seja, a massa molar influencie na estrutura espacial destas redes. Esta alteração na estrutura leva a mudanças na reologia da solução e na capacidade das moléculas reterem água (ARMSTRONG; JOHNS, 1997). Desta forma, consegue-se observar que, de fato, a massa molar tem influência na aplicação destinada ao composto. Portanto, esta propriedade se torna um parâmetro muito importante no controle de qualidade de um processo industrial de produção de ácido hialurônico.

Nos seres humanos, o AH possui algumas funções específicas. Quando os raios ultravioletas entram em contato com a pele, reações de oxidação ocorrem formando radicais livres que irão danificar o material genético das células, causando, eventualmente, degeneração e morte delas. Porém, o ácido hialurônico consegue remover tais radicais livres que se encontram na pele, sendo, portanto, uma das primeiras defesas do organismo contra este tipo de radiação (KOGAN et al., 2007).

Por conta de sua habilidade de se unir a proteoglicanos, o ácido hialurônico é encontrado em cartilagens. Inicialmente, não se acreditava que ele teria funções estruturais tão importantes neste tecido, porém, estudos mostraram que sua presença faz com que a concentração de agrecana (composto celular que permite a rigidez da cartilagem) seja maior, melhorando as propriedades biomecânicas do tecido (HARDINGHAM, 1998).

Outra parte do organismo em que se encontra o ácido hialurônico é nas articulações, em especial no líquido sinovial. Este fluido possui como função reduzir a fricção entre os ossos, de modo que o desgaste seja mitigado e que não existam dores relacionadas ao movimento. Neste caso, o ácido hialurônico deve possuir alta massa molar, de modo que a viscosidade do líquido sinovial aumente. Estudos mostram que doenças como a artrite reumatoide fazem com que radicais livres sejam formados em alta quantidade durante o processo inflamatório. Tais radicais se combinam formando peroxinitrito, que é responsável pela degradação das moléculas de AH de alta massa molar. Isto faz com que a viscosidade do fluido diminua consideravelmente (ŠOLTÉS et al., 2006).

2.2 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

De modo geral, as aplicações biomédicas de ácido hialurônico são baseadas em suas propriedades reológicas em meios aquosos. Estudos têm sido conduzidos em busca de novas aplicações, porém, algumas já são consideradas clássicas dentro da Medicina. Uma delas é o uso de soluções altamente purificadas em cirurgias oftalmológicas, com destaque para facectomia (tratamento contra catarata) e transplante de córneas. Durante estes procedimentos existe o risco das células do endotélio da córnea serem removidas, o que levaria a complicações futuras para o paciente (desde inchamento até cegueira em alguns casos). Usar a solução de ácido hialurônico nestas cirurgias as torna mais seguras (ele atua como um amortecedor mecânico para as células) e mais rápidas (por conta de sua viscosidade) (BALAZS, 2004).

Outra aplicação interessante de soluções de ácido hialurônico é no tratamento de pacientes com artrose. Esta enfermidade é causada devido à redução da capacidade do corpo em produzir os componentes das cartilagens que possuem resistência e elasticidade adequadas (TREVISANI; FIDELIX, 2009). Neste caso, usa-se o ácido hialurônico com alta massa molar por conta de sua viscosidade para proteger a cartilagem, normalizar o líquido sinovial e reduzir a dor sentida pelos pacientes (ASARI, 2004).

É possível formar géis de AH por meio de reticulação polimérica. Tais géis também possuem suas próprias aplicações como preenchimento de rugas faciais e cicatrizes profundas, além de serem usados para diminuir os riscos de aderência após realização de uma cirurgia (a formação de tecido fibroso entre órgãos em cirurgias abdominais é considerada uma complicação séria pelos profissionais da área). Acredita-se que, nesta última aplicação, os retículos de ácido hialurônico se unam a moléculas de fibrina e fibrinogênio, impedindo que estas duas últimas substâncias formem as aderências (ASARI, 2004; BALAZS, 2004).

Sabe-se, também, que o ácido hialurônico é encontrado em abundância durante o desenvolvimento embrionário, em tecidos em regeneração e em feridas em processo de cicatrização. Por conta disto, este polímero é comumente associado à cultura de células animais embrionárias e a Engenharia de Tecidos, sendo que, neste tipo de estudo, o ácido hialurônico quimicamente modificado é usado como suporte para o crescimento de células (ASARI, 2004; BURDICK; PRESTWICH, 2011).

2.3 ROTAS DE OBTENÇÃO INDUSTRIAL

Existem, atualmente, duas possibilidades para a produção industrial de AH: extração de tecidos animais e usando bactérias. Outra abordagem que tem sido estudada recentemente é a produção *in vitro* usando hialuronato sintase, enzima responsável pela reação de polimerização do ácido hialurônico. Vale destacar que ainda não se conseguiu a produção em grande escala com esta rota (BOERIU et al., 2013).

2.3.1 Extração de tecidos animais

A obtenção de ácido hialurônico via extração de tecidos animais é a técnica mais antiga das que são conhecidas atualmente. Sua principal matéria-prima é a crista de galo, porém, outras também são usadas, como o cordão umbilical humano, fluido sinovial e humor vítreo bovino (BOERIU et al., 2013). Estudos têm sido realizados buscando novas fontes de tecidos como globo ocular de atuns. Neste caso específico, foi observado que a massa molar média das moléculas de ácido hialurônico era inferior à obtida usando crista de galo (AMAGAI; TASHIRO; OGAWA, 2009).

Apesar de possuir algumas vantagens, como o baixo custo da matéria-prima, de serem produtos com massa molar alta (até 20 MDa) e ser uma tecnologia consolidada, a extração de tecidos animais apresenta diversas desvantagens a serem consideradas. As principais são o baixo rendimento e os processos de purificação extensivos que devem ser aplicados. Estas duas desvantagens afetam diretamente os custos do processo de manufatura. Outras complicações que devem ser destacadas são o alto risco de contaminação (desde proteínas até vírus) e o risco do ácido hialurônico ser degradado por enzimas endocelulares (BOERIU et al., 2013).

Um dos primeiros processos desenvolvidos para a extração de tecidos animais foi o de Balazs (1979), que consiste em 5 etapas básicas. Nele, o autor usa como matéria-prima a crista de galo, porém menciona a possibilidade de adaptar as etapas para usar cordão umbilical humano. Cada uma das cinco etapas possui um objetivo diferente: a primeira é a preparação da crista de galo; a

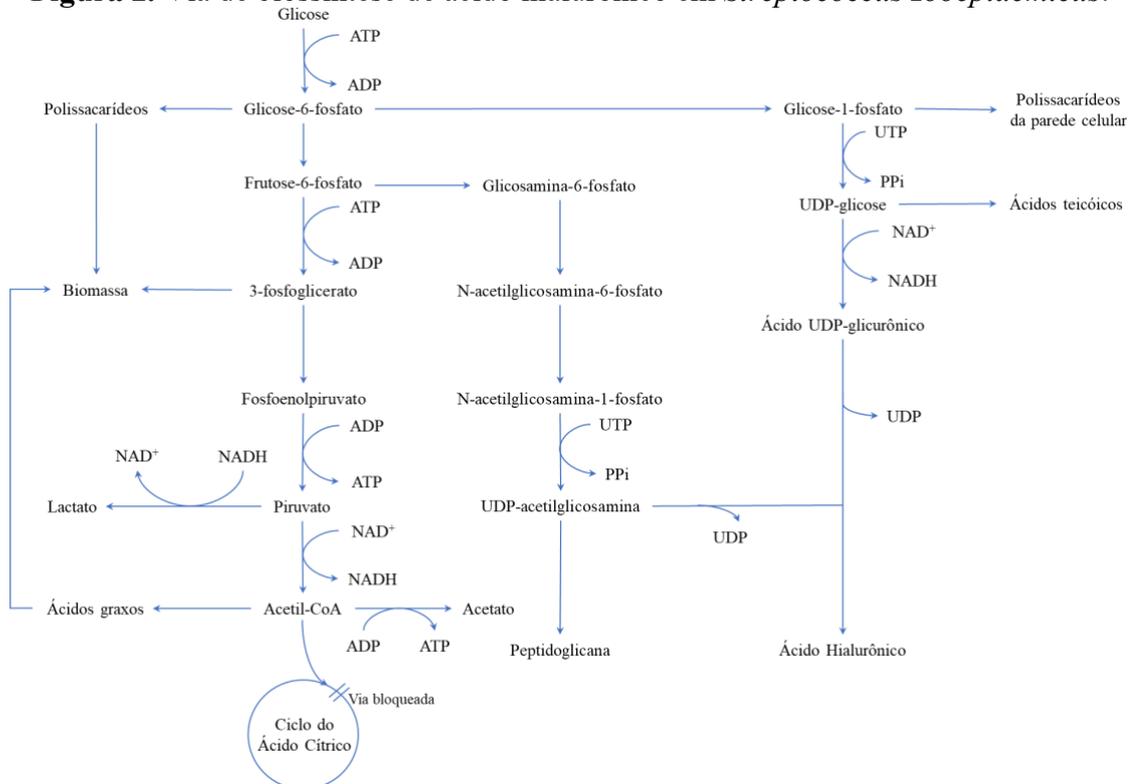
segunda, extração do AH; e as demais de purificação do AH, sendo que cada uma remove diferentes contaminantes.

2.3.2 Rota microbiana

Estudos mostraram que algumas espécies de bactérias sintetizam este produto na forma de uma cápsula extracelular, o que fez com que o interesse por esta rota aumentasse. Como o AH de origem animal e de origem microbiana são idênticos, passou-se a considerar uma rota biotecnológica para sua produção. Os microrganismos selecionados foram bactérias do gênero *Streptococcus*, em especial da espécie *S. zooepidemicus*, por não serem consideradas patogênicas para o ser humano (BOERIU et al., 2013).

Para compreender as necessidades do meio de cultura, pH e aeração, é preciso conhecer a via biossintética da produção de ácido hialurônico no *S. zooepidemicus*, mostrada na Figura 2. Inicialmente, a glicose é fosforilada, formando glicose-6-fosfato por ação da enzima glicocquinase. Paralelamente, ocorre a oxidação de ATP, produzindo ADP. A partir deste ponto existem duas possibilidades para esta molécula dentro da via biossintética: conversão em glicose-1-fosfato por ação da fosfoglicomutase e isomerização em frutose-6-fosfato (LIU et al., 2011).

Figura 2. Via de biossíntese de ácido hialurônico em *Streptococcus zooepidemicus*.



Fonte: Adaptado de Liu et al. (2011).

A glicose-1-fosfato é convertida em UDP-glicose catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase. Em seguida, esta substância pode ser convertida em ácidos teicóicos ou em ácido UDP-glicurônico. A partir deste ponto, ele já está pronto para formar o monômero do ácido hialurônico (LIU et al., 2011). Já as moléculas de frutose-6-fosfato também estão sujeitas a ação de duas enzimas diferentes: amidotransferase (formando glicosamina-6-fosfato) e fosfoglicerocinase (gerando 3-fosfoglicerato e regenerando ADP em ATP). No caso da primeira reação, o produto é convertido em N-acetilglicosamina-6-fosfato por ação da acetiltransferase. Ao entrar em contato com a enzima mutase, forma-se N-acetilglicosamina-1-fosfato (LIU et al., 2011).

Por fim, este intermediário é convertido em UDP-N-acetilglicosamina. Junto com o ácido UDP-glicurônico, formam o AH em reação catalisada pela hialuronato sintase. Porém, parte da UDP-N-acetilglicosamina também pode formar peptidoglicanos, bem como as moléculas de frutose-6-fosfato que formam 3-fosfoglicerato podem ser transformadas em biomassa e serem convertidas em fosfoenolpiruvato por meio da enzima fosfoglicomutase. Este intermediário, por sua vez, forma piruvato por ação da piruvato quinase. A partir deste ponto, uma nova ramificação surge, de modo que o produto final pode ser ácido láctico, acético, graxo (posteriormente convertido em biomassa) ou teicóicos (LIU et al., 2011).

As três principais dificuldades desta rota são: i) a alta viscosidade que o mosto pode atingir, dificultando a transferência de oxigênio e a agitação; ii) o ácido láctico produzido pela célula pode atuar como inibidor para o crescimento da mesma e para a síntese de ácido hialurônico, e, por fim, iii) tem-se competição pela fonte de carbono para a formação de biomassa e do produto final (LIU et al., 2011).

2.3.2.1 Meio de cultura

Cada microrganismo possui suas próprias necessidades nutricionais. Por isso, a definição da composição de um meio de cultura que consiga atendê-las é uma etapa muito importante no desenvolvimento e análise de um bioprocessamento industrial. Normalmente, um meio de cultura é constituído por fontes de carbono (como glicose, maltose, glicerol, entre outros), de nitrogênio (por exemplo, aminoácidos, sais de amônia e ureia) e de fósforo (por exemplo, quaisquer fosfatos solúveis em água). A célula ainda precisa de outras substâncias, como sódio, potássio e vitaminas, porém em quantidade e concentrações menores que as já citadas (ALTHERTHUMM, 2001).

No caso da produção microbiana de ácido hialurônico, as fontes de carbono mais utilizadas são glicose (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997; GAO; DU; CHEN, 2006) e sacarose (LIU et al., 2008a).

Buscando entender os efeitos que a concentração inicial da fonte de carbono pode ter na concentração e na massa molar do produto, Armstrong e Johns (1997) realizaram cultivos em biorreatores batelada tipo tanque agitado com três condições iniciais de glicose diferentes: 20, 40 e 60 g L⁻¹. Através deles, os autores verificaram que os melhores resultados, tanto em concentração, como em massa molar média do ácido hialurônico foram para as maiores concentrações iniciais de glicose, o que faz sentido, já que, com mais carbono disponível, mais percussores do AH serão produzidos. Os autores ainda afirmam que, para concentrações iniciais altas de glicose, foi observado crescimento díauxico, atribuindo a este fenômeno os bons resultados obtidos, sem mencionar, no entanto, qual foi o segundo substrato consumido pelo microrganismo.

A concentração inicial de glicose também impacta o crescimento celular de maneira semelhante, indicando que a inibição pelo substrato influencia a atividade celular de *S. zooepidemicus*. Entretanto, os efeitos deste fenômeno apenas se tornam mais pronunciados ao se trabalhar com concentrações iniciais maiores que 40 g L⁻¹ (DON; SHOPARWE, 2010; PIRES; SANTANA, 2010).

Usar apenas compostos inorgânicos (por exemplo, sais de amônia) como fonte de nitrogênio não traz bons resultados quando comparado com fontes complexas (IM et al., 2009). Armstrong, Cooney e Johns (1997) citam que onze aminoácidos são essenciais para o crescimento do microrganismo *Streptococcus zooepidemicus* (arginina, cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina e valina).

Deve-se evidenciar que, usando um meio definido, o rendimento de ácido hialurônico é menor do que se for usado um meio complexo. Por isso, é muito comum encontrar trabalhos que utilizam como fonte de nitrogênio extrato de levedura (DON; SHOPARWE, 2010; PIRES et al., 2010). Uma abordagem interessante é suplementar o meio complexo com um ou mais aminoácidos que melhorem o rendimento do bioprocesso. Porém, ainda não existe consenso a respeito de quais devem ser adicionados. Liu et al (2009) afirmam que são cisteína, lisina e arginina, enquanto para Im et al. (2009) devem ser glutamina e ácido glutâmico.

Apesar de ser recomendado pela *American Type Culture Collection* (ATCC), o uso de meios de cultura que contém produtos de origem animal (meio BHI ou meio triptona com sangue de carneiro desfibrilado) não é recomendado, uma vez que a rota microbiana foi desenvolvida como uma alternativa para minimizar contaminações relativas a tecidos animais. Neste contexto, portanto, o uso de fontes de nitrogênio complexas de origem vegetal, como a peptona de soja se destaca, além de atender aos apelos da Química Verde (BENEDINI; SANTANA, 2013).

Sabe-se, também, que a quantidade de peptona impacta a produção de AH. Porém, como ela varia de acordo com o lote, uma boa estratégia é o uso de razões carbono:nitrogênio (C:N). Oliveira (2014) verificou a influência da razão em cultivos de *S. zooepidemicus*. Os resultados mostraram que a razão C:N ótima para um cultivo com alta produção de AH depende muito da concentração dos aminoácidos presentes na peptona, em especial de arginina, glutamina e glutamato. Por exemplo, para uma peptona que possui maiores concentrações destes aminoácidos, a razão C:N ótima é 4,1:1, enquanto para uma que possui baixa concentração dos mesmos, a razão ótima é 6,3:1.

2.3.2.2 Aeração

As bactérias da espécie *S. zooepidemicus* são anaeróbias facultativas, de forma que a produção de ácido hialurônico usando este microrganismo pode ser feita tanto na presença como na ausência de oxigênio. Porém, Chong et al. (2005) mostram que, em aerobiose, o rendimento de AH é maior do que em anaerobiose, inclusive, a massa molar média também é maior.

Oliveira et al. (2013) estudaram o efeito da aeração usando dois meios de cultura diferentes (suco de caju puro e suplementado com extrato de levedura). Usando aeração natural, obteve-se maior produção usando o suco de caju suplementado, porém, ao realizar a aeração forçada de 2,2 vvm, o resultado foi inverso. Os referidos autores afirmam que o excesso de oxigênio dissolvido favorece a ocorrência de outra rota metabólica. Desta forma, a suplementação promovida pelo extrato de levedura não aumenta a concentração de ácido hialurônico.

Como a viscosidade do caldo aumenta conforme o cultivo progride, a transferência de massa de oxigênio é igualmente prejudicada. Uma possibilidade para solucionar este problema é aumentar a agitação, porém, ao fazer isso, a tensão de cisalhamento na célula será maior, prejudicando-a. Outra solução é o uso de “vetores de oxigênio”, que são substâncias, geralmente insolúveis em água, que aumentam a solubilidade do oxigênio. O uso de n-dodecano e n-hexadecano como vetores de oxigênio já foi estudado, sendo observado aumento na produtividade de ácido hialurônico e da massa molar média para velocidades moderadas do impelidor para ambas as substâncias, destacando que o uso do segundo vetor obteve os melhores resultados (LAI et al., 2012). Contudo, é prudente enfatizar que o uso de tais compostos, num processo industrial, aumentaria os custos nas etapas de purificação, visto que o dodecano possui propriedades carcinogênicas (WARSHAWSKY; BARKLEY;

BINGHAM, 1993) e o hexadecano, ao entrar em contato com a pele, pode causar eritema e edema (LINDBERG; SAGSTROM, 1989).

2.3.2.3 Temperatura

A temperatura é uma variável muito importante para processos que envolvem reações químicas. De modo geral, espera-se que o aumento da temperatura aumente a velocidade da reação e, conseqüentemente, a concentração final dos produtos.

No entanto, no caso das reações bioquímicas deve-se ressaltar que o fenômeno descrito acima só é observado em um intervalo limitado, sendo que, para valores acima desta faixa, a velocidade de reação começa a diminuir. A influência da temperatura na produção de AH usando *S. zooepidemicus* também ocorre desta forma.

Estudos mostraram que, operando em temperaturas amenas (30 a 35 °C), a concentração final de ácido hialurônico é maior do que quando se conduz cultivos em valores maiores ou menores do que da faixa ótima. Porém, a massa molar média do produto final não segue esta mesma tendência: o aumento na temperatura leva a diminuição na massa molar (ARMSTRONG; JOHNS, 1997).

Buscando solucionar esta questão, Jagannath e Ramachandran (2010) propuseram trabalhar com ciclos de temperatura: durante uma hora, o cultivo era feito a 37 °C; em seguida, diminuía-se a temperatura até 30 °C por uma hora; sendo que, logo depois, trabalhava-se novamente com 37 °C e, assim, sucessivamente, até o final do cultivo. Comparando os resultados com experimentos controle feitos a 30 e 37 °C, a concentração final de ácido hialurônico foi de 2,57 g L⁻¹ (no controle foram 2,10 e 2,15, respectivamente), enquanto a massa molar média final atingida foi 2,7 MDa (comparando com os experimentos controle de 2,1 e 2,9 MDa, respectivamente). A redução na massa molar em relação ao controle de 37 °C não é tão significativa (menos de 7%), ao mesmo tempo em que se observa um ganho expressivo na concentração (cerca de 20%).

2.3.2.4 Potencial hidrogeniônico

O metabolismo de uma célula pode ser interpretado como um conjunto de reações enzimáticas. Sabe-se que a velocidade de reações catalisadas por enzimas é influenciada pelo pH, de tal forma que existe um valor de pH denominado “ótimo” no qual a velocidade será maior. Neste contexto, espera-se o mesmo comportamento para bioprocessos que envolvem células.

Johns, Goh e Oeggerli (1994) estudaram o efeito que o pH tem na produção anaeróbia de ácido hialurônico com *Streptococcus zooepidemicus*. Em tal trabalho, os autores concluíram que o pH ideal era 6,9, uma vez que, neste valor, foram obtidos os melhores dados de rendimento, velocidade específica máxima de crescimento, concentração e velocidade de produção de ácido hialurônico. No entanto, neste mesmo pH, foi observada uma velocidade alta de produção de lactato, que pode inibir a formação de biomassa. Como alternativa para mitigar os efeitos que este metabólito pode ter, é possível trabalhar com pH inferior a 6,9, pois para valores mais altos, os parâmetros analisados diminuía com mais intensidade.

Com relação à influência que o pH pode ter na massa molar média do ácido hialurônico, Armstrong e Johns (1997) concluíram que ela é muito pequena, apesar de concordarem que trabalhar com faixas de pH superiores a 7 aumenta o rendimento de AH.

O estresse gerado por um meio alcalino pode melhorar a produção microbiana de ácido hialurônico. Liu et al. (2008) submetem as células a estresse alcalino intermitente: durante as primeiras 6 h de cultivo, o pH foi mantido em 7, depois disso, aumentou-se para 8,5 durante 1 h, para, em seguida, diminuir para 7 por 1 h. Este ciclo foi mantido até o fim do cultivo de 16 h. Foi observado aumento na concentração de ácido hialurônico e acético, ao mesmo tempo em que reduziu a de lactato e biomassa. Os autores atribuem este fato à redução da atividade da enzima lactato desidrogenase em paralelo ao aumento da atividade de acetato quinase e NADH oxidase.

2.4 MODELOS

Modelos são representações matemáticas de um fenômeno físico, químico ou biológico, que podem apresentar graus de complexidade diferentes. Neste contexto, Casti (1997, p. 2) afirma que “o sentido de desenvolver modelos é ser capaz de trazer um sentido de ordem às experiências e observações, assim como fazer previsões específicas sobre alguns aspectos do mundo que se vivencia”.

Além de permitir realizar previsões sobre fenômenos com facilidade, modelos, dentro do contexto de Engenharia Química, permitem o desenvolvimento de sistemas de controle de processos. No ramo da Engenharia Bioquímica, o uso desta ferramenta é normalmente aplicado no controle da vazão de alimentação em biorreatores tipo batelada alimentada. Esta vazão pode ser definida previamente, baseada nos resultados de simulações ou então ser alterada ao longo do processo (COONEY et al., 1999).

Na Engenharia Bioquímica, os modelos de crescimento celular podem ser classificados de acordo com o detalhamento da composição celular (modelos estruturados ou

não) e com a heterogeneidade das mesmas, com relação ao tamanho, taxa de crescimento, idade e estado metabólico (modelos segregados ou não) (BAILEY; OLLIS, 1986).

2.4.1 Modelos não-estruturados

Os modelos não-estruturados são aqueles em que as mudanças que ocorrem na composição da biomassa são ignoradas ou que não tem influências significativas na cinética do crescimento celular. Normalmente, estes modelos descrevem bem o comportamento observado experimentalmente durante as fases exponencial e estacionária do crescimento celular (ESENER et al., 1982). No entanto, estes modelos não consideram aspectos do metabolismo da célula estudada, apresentando, neste aspecto, uma visão simplista de um processo extremamente complexo.

Dentre as considerações dos modelos não-estruturados conhecidos, uma que é utilizada com frequência é a da “célula média”, que desconsidera a influência que as diferenças de tamanho, taxa de crescimento e idade das células têm na cinética. O modelo mais famoso que utiliza tal simplificação é o hiperbólico proposto por Monod (1949). Este modelo baseia-se no fato de que o metabolismo celular é composto por uma série de reações, que, em sua maioria, são catalisadas por enzimas. Portanto, é natural concluir-se que algumas delas atuem como etapas controladoras do crescimento do microrganismo. Supondo que estas reações sigam a cinética de Michaelis-Menten, espera-se que uma equação que relacione a concentração de substrato (C_S [$g L^{-1}$]) com a velocidade específica de crescimento celular (μ [h^{-1}]) seja semelhante a ela (SHULER; KARGI, 2002). A seguir encontra-se a Equação (1) do modelo de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_m C_S}{K_S + C_S} \quad (1)$$

Este modelo é válido somente quando só existe uma fonte de carbono e ela é o substrato limitante.

Outros modelos que também não consideram a heterogeneidade das células e que devem ser citados são os de Moser, Tessier e Contois (SHULER; KARGI, 2002), mostradas nas Equações (2) a (4), respectivamente.

$$\mu = \frac{\mu_m C_S^n}{K_S + C_S^n} \quad (2)$$

$$\mu = \mu_m (1 - e^{-KC_S}) \quad (3)$$

$$\mu = \frac{\mu_m C_S}{K_{SX} C_X + C_S} \quad (4)$$

O modelo de Moser, que possui como parâmetros n (adimensional), μ_m e K_S , pode ser compreendido como uma generalização da equação de Monod. Porém, o parâmetro n não possui nenhum sentido fenomenológico. Já o modelo de Tessier, diferente dos demais, usa o formato exponencial para descrever o crescimento celular, tendo por parâmetros μ_m e K ($g L^{-1}$). Por fim, o modelo de Contois, cujos parâmetros são μ_m e K_{SX} ($g L^{-1}$), também considera o efeito da concentração celular na cinética (SHULER; KARGI, 2002).

Uma situação que pode ser observada em cultivos celulares é a presença de um determinado produto ou substrato em excesso no meio reacional que diminui a velocidade de crescimento específica, ou seja, “inibindo” o metabolismo da célula. Alguns modelos não-estruturados tentam prever este comportamento. No caso da inibição por substrato, destaca-se o modelo de Andrews (1968) mostrado na Equação (5) seguir:

$$\mu = \frac{\mu_m C_S}{K_S + C_S + C_S^2/K_{IS}} \quad (5)$$

sendo K_{IS} a constante de inibição do substrato ($g L^{-1}$).

Já para casos em que existe inibição por produto, um modelo que merece destaque é o de Aiba, Shoda e Nagatani (1968), que propõe uma modificação no modelo de Monod, conforme pode ser observado a seguir:

$$\mu = \frac{\mu_m C_S}{K_S + C_S} e^{-K_{IP} C_P} \quad (6)$$

em que K_{IP} é a constante de inibição do produto ($g L^{-1}$).

Já para a cinética de formação de produto, um modelo não-estruturado muito utilizado é o proposto por Luedeking e Piret (1959). Nele, os autores estabelecem uma relação linear entre a velocidade de formação de produto específica ($\mu_P [h^{-1}]$) e a velocidade de crescimento específica, mostrada a seguir:

$$\mu_P = \alpha \mu + \beta \quad (7)$$

em que α ($g g^{-1}$) e β ($g g^{-1} h^{-1}$) são parâmetros de formação de produto associado e não associado ao crescimento, respectivamente.

Liu et al. (2008b) modelaram a produção de AH em batelada (comum e alimentada) por *S. zooepidemicus* WSH-24 usando modelos não-estruturados. A cinética para

crescimento celular escolhida pelos autores foi a de inibição não-competitiva pelo substrato juntamente com inibição por lactato. Além disso, os autores afirmaram que o lactato também inibe a produção de ácido hialurônico e do próprio lactato. Por conta disto, foram feitas alterações no modelo de Luedeking-Piret. Nas Equações (8) a (12) encontram-se as equações do modelo desenvolvido pelos autores.

$$\mu = \frac{\mu_m C_S}{K_S + C_S + C_S^2/K_{IS}} \frac{1}{1 + C_{Lact}/K_{ILac}} \quad (8)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu C_X \quad (9)$$

$$\frac{dC_{AH}}{dt} = \frac{\alpha_{AH}}{1 + C_{Lact}/K_{AH}} \mu C_X \quad (10)$$

$$\frac{dC_{Lact}}{dt} = \frac{\alpha_{Lact}}{1 + C_{Lact}/K_{Lact}} \mu C_X \quad (11)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dC_X}{dt} - \frac{1}{Y_{AH/S}} \frac{dC_{AH}}{dt} - \frac{1}{Y_{Lact/S}} \frac{dC_{Lact}}{dt} - m_e C_X \quad (12)$$

sendo K_{ILac} a constante de inibição por lactato no crescimento celular ($g L^{-1}$), α_i o parâmetro de formação do produto i ($g g^{-1}$), K_{AH} a constante de inibição de lactato na formação de AH, K_{Lact} a constante de inibição de lactato na sua formação e Y_{ij} o coeficiente de rendimento de i em relação a j ($g_i g_j^{-1}$).

Don e Shoparwe (2010) estudaram a cinética de crescimento celular de *S. zooepidemicus* e verificaram que a inibição pelo substrato afeta o crescimento do microrganismo. Neste trabalho, os autores também buscaram identificar qual modelo cinético que descreve este fenômeno. No caso, foi o modelo de Han e Levenspiel (1988), mostrado na Equação (13):

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{C_S}{C_S^*}\right)^n \left[\frac{C_S}{C_S + K_S(1 - C_S/C_S^*)^m} \right] \quad (13)$$

em que m (adimensional), n (adimensional) e C_S^* ($g L^{-1}$) são parâmetros do modelo de Han e Levenspiel sem significado físico.

Deve-se ressaltar que este é um modelo de 5 parâmetros e que os autores conseguiram resultados muito similares utilizando modelos de apenas 3 parâmetros (inibição de substrato não-competitiva e tipo Tessier, mostrada na Equação (14)). Dessa forma, pelo princípio da parcimônia, é recomendável o uso destes últimos modelos.

$$\mu = \mu_m \left[\exp\left(-\frac{C_S}{K_{IS}}\right) - \exp\left(-\frac{C_S}{K_S}\right) \right] \quad (14)$$

2.4.2 Modelos estruturados

Nas situações em que mudanças na célula, associadas a mecanismos adaptativos, possuem a mesma ordem de grandeza que as condições ambientais, devem-se usar modelos estruturados. Tais modelos, que usam mais de uma variável para descrever a atividade celular, consideram o estado fisiológico do organismo e o expressam como uma função do tempo. Desta forma, o seu uso permite avaliar a quantidade e a qualidade das células (ESENER et al., 1982).

No desenvolvimento de modelos estruturados, deve-se selecionar algumas variáveis que descrevem o estado fisiológico da célula, como DNA, RNA, conteúdo proteico e carboidratos, que devem ser medidos experimentalmente. Porém, informações como tamanho da célula e resistências difusionais não podem ser obtidos a partir de tais variáveis. Assim, outros parâmetros também devem ser incluídos para que o modelo seja confiável e se obtenha boas previsões, no entanto, isto resultaria em um modelo muito complexo (ESENER et al., 1982).

Por conta disto, surgem os modelos compartimentados, que consideram de duas a quatro variáveis relativas à atividade celular, podendo ser considerados extensões dos modelos não-estruturados. O primeiro modelo compartimentado que se tem conhecimento é o de Williams (1967). Nele, o autor considera apenas dois compartimentos: um deles compreende a porção genético-estrutural da célula (G), enquanto que o outro, a porção sintética (S). O compartimento S consome o substrato que está no meio exterior à célula, ao mesmo tempo em que “alimenta” G. Uma vantagem do uso deste modelo é que ele consegue descrever bem a fase lag do crescimento celular.

O uso de modelos estruturados para descrever o crescimento de *S. zooepidemicus* e a produção de ácido hialurônico não é comum. O único trabalho encontrado foi o de Cooney et al. (1999), que usa um modelo baseado em dois compartimentos. Nele, os autores testam duas condições de cultivo diferentes: cultivo aeróbico e anaeróbico. Após determinar os parâmetros do modelo para ambos os casos, foram feitos novos cultivos, com o objetivo de validar os modelos. Para ambos os cultivos, o modelo conseguiu descrever bem os dados experimentais.

Para testar mais ainda o modelo, foram realizados experimentos em batelada alimentada em que a vazão da fonte de nitrogênio (no caso, extrato de levedura) era controlada

pelo modelo desenvolvido. Numa primeira tentativa, o sistema de controle desenvolvido começou a aumentar a vazão até que ela ultrapassou o limite máximo estimulado. Acredita-se que isto aconteceu pelo sistema tratar uma fonte complexa como definida, ou seja, sem definir a composição do extrato de levedura. A partir do momento que os autores quantificaram os aminoácidos presentes no extrato de levedura, o sistema de controle desenvolvido conseguiu controlar melhor a vazão de alimentação (COONEY et al., 1999).

2.4.3 Modelos estequiométricos

Define-se um sistema como sendo um grupo de componentes que interagem entre si, formando uma unidade funcional. Dentro deste contexto, a Biologia de Sistemas é a área da Ciência que investiga como as interações entre os componentes biológicos afetam a funcionalidade do sistema estudado (SNOEP; WESTERHOFF, 2005).

Como células possuem a habilidade de adaptar suas características de acordo com as condições do ambiente em que elas se encontram, as interações entre os componentes da célula variam muito e são, tipicamente, não-lineares (SNOEP; WESTERHOFF, 2005).

A Biologia de Sistemas permite que seja feita uma abordagem holística no entendimento de como a célula funciona e como fatores externos a ela podem alterar seu funcionamento. Por conta disto, é uma Ciência multidisciplinar que engloba Biologia, Ciências da Computação, Engenharia, Bioinformática, entre outras (WESTERHOFF; ALBERGHINA, 2005).

Uma aplicação particularmente interessante da Biologia de Sistemas são os modelos metabólicos de escala genômica. A construção de tais modelos pode ser dispendiosa por necessitar de informações do genoma e do fenótipo da célula estudada, além de como a primeira influencia a segunda. Porém, todo esforço é recompensado com um modelo que compreende a maioria das reações que ocorrem na célula (LIU et al., 2010). No caso específico da Engenharia, o conhecimento de tais informações facilita no desenvolvimento de bioprocessos e de estratégias de controle deles.

Modelos de escala genômica são essencialmente representações estequiométricas das reações mais importantes que podem ocorrer no metabolismo da célula. Uma hipótese muito importante feita nestes modelos é que todos os metabólitos internos e externos se encontram em estado estacionário. Esta hipótese é feita para que, no balanço material, o termo relacionado ao acúmulo (que é normalmente expressado na forma da derivada da massa do componente em relação ao tempo) seja igual a zero (LIU et al., 2010). Dessa forma, a representação matemática destes modelos é feita da seguinte forma (Equação 15):

$$\underline{S} \cdot \underline{v} = 0 \quad (14)$$

em que \underline{S} é a matriz de coeficientes e \underline{v} é o vetor posição que representa o fluxo de uma determinada reação.

A Análise de Balanço de Fluxo (do inglês, “*Flux Balance Analysis*” ou FBA) é uma técnica que utiliza modelos de escala genômica. Através dela, consegue-se obter com facilidade relações quantitativas que modelam a velocidade de consumo de nutrientes com a de formação de produto e crescimento celular. Normalmente, são criadas restrições relacionadas aos fluxos de entrada de diferentes substâncias, determina-se uma função objetivo (a mais comum de ser utilizada é a maximização da formação de biomassa) e, por meio de Programação Linear (um método de otimização), a melhor solução é obtida (LIU et al., 2010; ORTH; THIELE; PALSSON, 2010). Já existem hoje muitos softwares que realizam este tipo de análise, como OptFlux (ROCHA et al., 2010), CellNetAnalyzer (KLAMT; SAEZ-RODRIGUEZ; GILLES, 2007) e Systems Biology Research Tool (WRIGHT; WAGNER, 2008).

Atualmente, muitos avanços foram feitos a respeito do metabolismo celular com o uso de modelos estequiométricos. Além disso, estes modelos podem auxiliar no desenvolvimento de cepas mutantes mais eficientes. Um bom exemplo desta aplicação foi a construção de uma cepa de *Pseudomonas putida* para a produção de polihidroalcanoatos, um biopolímero biodegradável com propriedades termoplásticas. Por meio da adição do gene *ackA* de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, a cepa foi capaz de resistir ao estresse anaeróbico por um período maior (SOHN et al., 2010).

Chong e Nielsen (2003) desenvolveram um modelo estequiométrico do *S. zooepidemicus*. No entanto, este modelo só compreendia as vias da glicólise, pentose fosfato e produção de AH, lactato, acetato, etanol e formato, ou seja, apenas 33 reações e 54 metabólitos. Apesar de mais limitado, algumas conclusões já puderam ser tiradas a partir das simulações usando este modelo, como que a produção de AH não é limitada pela disponibilidade de energia na célula em condições normais de cultivo.

Outras técnicas que utilizam estes modelos são Análise de Variabilidade de Fluxo (“*Flux Variability Analysis*” ou FVA), utilizada para calcular possíveis variações em cada fluxo de reação e Análise de Acoplamento de Fluxo (“*Flux Coupling Analysis*” ou FCA), cuja função é elucidar possíveis correlações entre diferentes fluxos (LIU et al., 2010).

Foram encontrados três modelos de escala genômica para *Streptococcus zooepidemicus*: BMID000000141620, BMID000000142049 e BMID000000142687 (CHELLIAH

et al., 2015). Na Tabela 2 encontram-se algumas informações a respeito destes modelos, como número de reações, metabólitos e genes.

Tabela 2. Informações a respeito dos três modelos de escala genômica encontrados no *Biomodels Database*.

Modelo	Quantidade de reações		Quantidade de metabólitos	Quantidade de genes
	Internas	Transporte		
BMID000000141620	1287	0	635	670
BMID000000142049	1244	0	615	650
BMID000000142687	1207	0	587	622

Fonte: Chelliah et al. (2015).

Estes três modelos foram gerados automaticamente através de sequências do genoma de três diferentes cepas de *S. zooepidemicus*, porém nenhum deles foi curado manualmente. Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que utilizou qualquer um destes modelos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo selecionado (*Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* ATTC 39920), adquirido da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA), foi mantido à -80 °C em ampolas com meio contendo 20% (m/m) de glicerol, gentilmente cedido pelo Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos – FEQ/UNICAMP.

3.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura era composto por glicose e peptona de soja, da marca Kerry. Na Tabela 3 encontra-se a composição de aminoácidos livres e totais, fornecido pelo fabricante.

Tabela 3. Composição dos aminoácidos da peptona de soja fornecida pelo fabricante.

Aminoácido	Total (mg g ⁻¹)	Livre (mg g ⁻¹)
Alanina	23,0	3,1
Arginina	37,0	8,9
Asparagina	0	3,4
Aspartato	7,4	5,1
Cisteína	1,0	0,2
Fenilalanina	26,0	2,4
Glicina	22,0	2,8
Glutamato	123,0	5,3
Glutamina	3,3	3,3
Histidina	13,0	1,3
Isoleucina	20,0	0,3
Leucina	38,0	8,1
Lisina	39,0	6,8
Metionina	5,0	0,3
Prolina	29,0	0,0
Serina	32,0	5,5
Tirosina	18,0	0,0
Treonina	22,0	2,5
Triptofano	0	2,1
Valina	22,0	1,0

Fonte: Kerry.

Foram realizados dois cultivos: A e B. Em todos eles a concentração de peptona de soja utilizada, tanto no biorreator como no inóculo e pré-inóculo, foi de 113 g L⁻¹. No entanto, a concentração de glicose foi diferente em algumas etapas. Na Tabela 4 encontram-se detalhadas as concentrações de glicose nos cultivos A e B.

Tabela 4. Concentrações de glicose de cada uma das etapas dos cultivos A e B.

Cultivo	$C_{\text{glicose}} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$		
	Pré-inóculo	Inóculo	Biorreator
A	25	25	70
B	70	70	70

3.3 PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

Uma alíquota de 150 μL de uma ampola previamente descongelada foi espalhada em placas de Petri contendo peptona de soja (67 g L^{-1}) e ágar (30 g L^{-1}) (BENEDINI; SANTANA, 2013). Em seguida, foram incubadas durante 24 h em temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na etapa de preparação de inóculo, todas as colônias da placa foram transferidas para erlenmeyer de 50 mL, contendo 25 mL meio de cultura previamente esterilizado, cuja composição está descrita na Tabela 4. Estes frascos foram incubados em shakers em $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm por 12 h. Passado este tempo, 10% do volume do frasco foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL, contendo o mesmo meio de cultura previamente esterilizado, que foi mantido em shaker por 6 h, nas mesmas condições anteriores. Garantiu-se que o microrganismo estava na fase exponencial do crescimento celular nas etapas de aumento de escala.

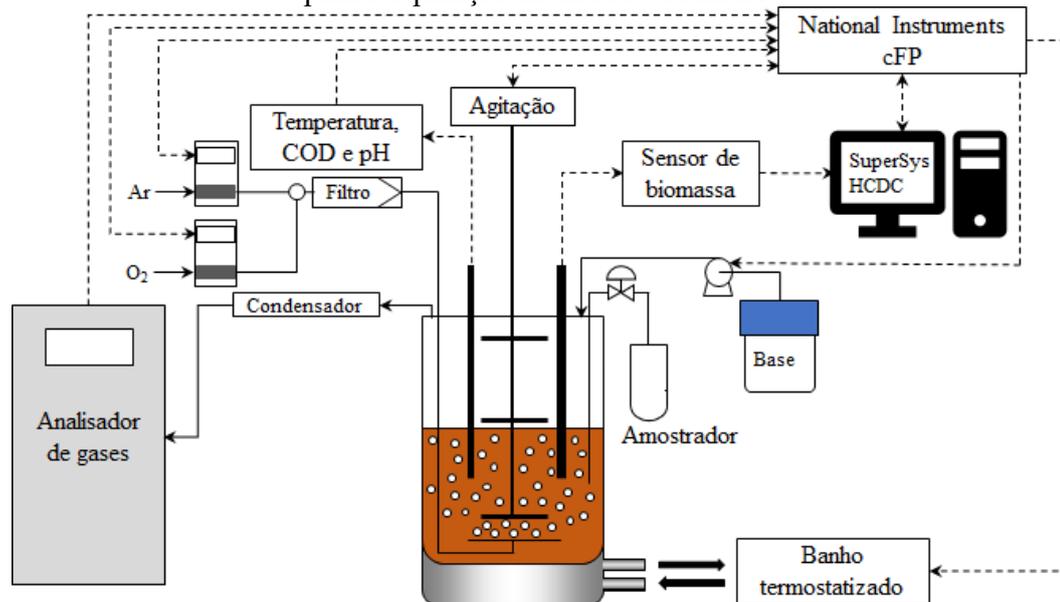
3.4 CULTIVOS EM BIORREATOR

O conteúdo do erlenmeyer de 250 mL foi transferido para o biorreator. Os cultivos foram feitos em batelada com volume reacional de 2,5 L. O aparato experimental consistia em um biorreator tipo tanque agitado de 5 L, um computador e equipamentos de controle e aquisição de dados online, conforme mostra a Figura 3.

Para monitoramento e controle do biorreator foi utilizado o software SUPERSYS_HCDC[®] (HORTA et al., 2014). A comunicação entre o computador e os instrumentos de medida foi feita utilizando *compact Field Point* (cFP) da empresa National Instruments. Também foi usado inversor de fases para controlar a agitação por meio do cFP/computador, transmissor de pH (GLI Pro) com aquisição via cFP, pHmetro Redox (3100-32-Pt1000, Mettler Toledo), transmissor de concentração de oxigênio dissolvido (CE-O2 4050, Mettler Toledo) por meio do cFP com transmissão analógica, sensor amperométrico de oxigênio dissolvido (InPRO 6800, Mettler Toledo), analisador de gases (Sick/MAIHAK S710) com aquisição analógica via cFP, bomba de base (NaOH 40% m/m) (Masterflex) com controle on/off por meio da comunicação computador/cFP, dois fluxômetros de massa (GFC – AALBORG) para fornecimento de ar e oxigênio puro (ambos eram controlados remotamente via computador/cFP), filtro de ar (Sartofluor 0,20 μm , Sartorius), banho térmico controlado por

meio de interface NOVUS e termopar com aquisição via cFP. O tempo de aquisição destes equipamentos foi de 200 ms. Também foi utilizado um sensor de biomassa (Incyte Unit DN12-320, Hamilton), que lia dados de permissividade e condutividade, com tempo de aquisição de 2 min. Todos os dados coletados foram salvos em intervalos de 10 s.

Figura 3. Representação gráfica do aparato experimental utilizado nos cultivos de *Streptococcus zooepidemicus*, composto por biorreator, linhas de gás e equipamentos usados para a aquisição de dados e controle.



Fonte: Adaptado de Sargo (2011) e Campani et al. (2016).

Os *setpoints* de temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido foram de 37 °C, 7 e 90% da saturação, respectivamente. A elevada concentração de oxigênio foi adotada baseada na hipótese de que o estresse gerado pelo excesso de oxigênio no meio era responsável pela produção de ácido hialurônico.

Foram retiradas amostras ao longo do cultivo para analisar concentração celular, lactato, acetato, glicose e AH, além de densidade óptica em 600 nm (DO_{600}).

3.5 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

A amostra de caldo foi centrifugada durante 20 min, adicionando-se etanol ao sobrenadante na razão volumétrica etanol: sobrenadante 1,5:1. A mistura foi mantida, durante 1 h, a 4 °C e, em seguida, centrifugada para precipitar o ácido hialurônico (PIRES; SANTANA, 2010). Ao corpo de fundo da centrifugação adicionou-se cloreto de sódio ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$) para ressolubilização. A esta nova solução, repetiu-se o processo descrito anteriormente mais duas vezes (PIRES; SANTANA, 2010).

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para quantificar a concentração celular, o corpo de fundo da amostra de caldo foi lavado e centrifugado mais duas vezes usando água deionizada. Em seguida, determinou-se a concentração de células pelo método da massa seca.

Para analisar as concentrações dos metabólitos, as amostras foram filtradas com membranas com tamanho de poro de 0,2 μm . Em seguida, realizou-se cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica usando 20 μL do filtrado e uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de dimensões 7,8 x 300 mm. A fase móvel utilizada era composta por ácido sulfúrico (5 mmol L^{-1}) numa vazão de 0,6 mL min^{-1} , a temperatura de 65 $^{\circ}\text{C}$ (CHONG; NIELSEN, 2003b).

A análise de carboidratos foi realizada também em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com uma coluna SugarPak I (300 x 6,5 mm), com água ultrapura como fase móvel numa vazão de 0,6 mL min^{-1} a 80 $^{\circ}\text{C}$. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtros Sep-Pak C18 (Waters) e de membranas com poros de 0,20 μm (MILESSI et al., 2016).

A concentração de ácido hialurônico foi determinada por turbidimetria (500 nm), de acordo com o método elaborado por Chen e Wang (2009). Como padrão foi utilizado hialuronato de sódio adquirido de Genzyme Corporation (Cambridge, MA, EUA).

3.7 PROCEDIMENTOS MATEMÁTICOS

Neste trabalho, todos os cultivos em biorreator foram realizados em batelada. Além disso, eles foram considerados isotérmicos, homogêneos e com pH constante.

3.7.1 Balanço de carbono

O balanço de carbono considera o número total de C-mols de células, açúcares, ácidos orgânicos (lactato e acetato), gás carbônico, aminoácidos e ácido hialurônico em um determinado momento, comparando-o com a quantidade de C-mol no início do cultivo. Dessa forma, utilizou-se a Equação (16) para calcular a recuperação de carbono naquele momento.

$$R_i(t) = \frac{N_i(t)}{\sum_i N_i(t=0)} \quad (16)$$

em que $R_i(t)$ é a recuperação de carbono do componente i no tempo t (%); $N_i(t)$ é a quantidade de C-mol de carbono presente no componente i no tempo t (C-mol); e $\sum_i N_i(t=0)$, a quantidade total de C-mol de carbono disponível no início do cultivo (C-mol).

A quantidade de C-mol de carbono para os componentes da fase líquida (célula, açúcares, lactato, acetato, aminoácidos e AH) foi estimada pela Equação (17), mostrada a seguir:

$$N_i(t) = \frac{C_i(t)V}{MM_i} \quad (17)$$

em que C_i é a concentração de i no tempo t (g L^{-1}); V , volume do reator (L) e MM_i , a massa molar de i (g C-mol^{-1}).

Como as medidas de gás carbônico são feitas online na forma de fração da corrente gasosa efluente do biorreator, o cálculo da quantidade de C-mol deve ser feito de outra maneira, representado pela Equações (18) e (19).

$$N_{\text{CO}_2}(t) = \int_0^t \dot{n}_{\text{CO}_2}^{\text{saída}} dt \quad (18)$$

$$\dot{n}_{\text{CO}_2}^{\text{saída}} = y_{\text{CO}_2}^{\text{saída}} Q^{\text{saída}} \frac{P^{\text{saída}}}{RT^{\text{saída}}} \quad (19)$$

sendo $Q^{\text{saída}}$ a vazão volumétrica de gases efluente do biorreator (L min^{-1}), R a constante dos gases ideais ($0,082 \text{ L atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), $\dot{n}_{\text{CO}_2}^{\text{saída}}$ a vazão molar de CO_2 (mol L^{-1}), $P^{\text{saída}}$ a pressão (atm) e $T^{\text{saída}}$ a temperatura (K), todas aferidas na saída no biorreator.

Na Tabela 5 encontram-se os valores utilizados de massa molar. Para o cálculo da massa molar da célula, foi utilizada a fórmula mínima média da célula de bactérias $\text{C}_1\text{H}_{1,666}\text{N}_{0,27}\text{O}_{0,27}$, considerando 8,0% de cinzas (SHULER; KARGI, 2002).

Tabela 5. Valores utilizados de massa molar dos componentes em g C-mol^{-1} .

Componente	MM (g C-mol^{-1})	Componente	MM (g C-mol^{-1})	Componente	MM (g C-mol^{-1})
Célula ¹	20,05	Cisteína	40,38	Metionina	29,84
Glicose	30,03	Glutamato	29,43	Prolina	23,03
AH	27,09	Glutamina	29,23	Serina	35,03
Lactato	30,03	Glicina	37,53	Treonina	29,78
Acetato	29,52	Fenilalanina	18,35	Triptofano	18,57
Alanina	29,70	Histidina	25,86	Tirosina	20,13
Arginina	29,03	Isoleucina	21,86	Valina	23,43
Asparagina	33,03	Leucina	21,86	-	-
Aspartato	33,28	Lisina	24,37	-	-

¹ Já foi descontado o valor referente aos 8,0% de cinzas.

3.7.2 Balanço de massa

A equação geral do balanço material de um volume de controle do componente i envolve a massa acumulada, as vazões de entrada e saída, o volume e a velocidade de reação, de consumo ou produção, conforme está disposta na Equação (20).

$$\frac{dm_i}{dt} = \dot{m}_i^{\text{entrada}} - \dot{m}_i^{\text{saída}} \pm r_i V \quad (20)$$

em que m_i (g) é massa de i no volume de controle; \dot{m}_i (g h⁻¹), vazão mássica de i ; r_i (g L⁻¹ h⁻¹) velocidade de reação volumétrica e V (L), volume.

No caso particular de um biorreator operando em batelada, sabe-se que a fase líquida é modelada de maneira diferente da fase gasosa. Para a fase líquida, considerando que não existe entrada ou saída dos componentes presentes nela (como biomassa, substratos e produtos) e que seu volume é constante, obtém-se a Equação (21).

$$\frac{dC_i}{dt} = \pm r_i \quad (21)$$

Já a fase gasosa, considera-se que ela opera em regime permanente sem acúmulo de nenhum dos gases (O₂, CO₂ e N₂). Portanto, o balanço material em base molar para estes componentes é:

$$0 = \dot{n}_i^{\text{entrada}} - \dot{n}_i^{\text{saída}} \pm r_i V \quad (22)$$

sendo \dot{n}_i (mol h⁻¹) a vazão molar de i .

Neste trabalho considerou-se a velocidade volumétrica de formação de produtos como sendo positiva, enquanto que a de consumo de substratos, negativa.

3.7.2.1 Cálculo da velocidade específica de crescimento celular máxima

Para quantificar a taxa de crescimento celular é comum utilizar a definição de velocidade específica de crescimento (μ (h⁻¹)), cuja representação matemática encontra-se na Equação (23) (SHULER; KARGI, 2002).

$$\mu_i = \frac{r_i}{C_X} \quad (23)$$

Realizando manipulações algébricas na Equação (23) e substituindo o resultado na equação do balanço material para biomassa, obtido através da Equação (21), obtém-se a Equação (24):

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu C_X \quad (24)$$

Durante a fase exponencial do crescimento celular, é sabido que as células crescem a uma velocidade específica de crescimento constante máxima, ou seja, $\mu = \mu_{\text{máx}}$. Portanto, a Equação (24), nesta fase do crescimento, torna-se:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_{\text{máx}} C_X \quad (25)$$

Sabe-se que no tempo inicial ($t = t_0$), a concentração de células é C_{X0} . Dessa forma, resolvendo a Equação Diferencial Ordinária (25) e aplicando esta condição inicial ($C_X(t = t_0) = C_{X0}$), obtém-se uma relação linear entre $\ln C_X$ e $(t - t_0)$, mostrada na Equação (26). Realizando-se uma regressão linear com os dados do logaritmo natural de concentração celular e de tempo foi possível obter a velocidade específica de crescimento máxima.

$$\ln C_X = \mu_{\text{máx}} (t - t_0) + \ln C_{X0} \quad (26)$$

3.7.2.2 Cálculo dos fatores de rendimento

Sabe-se que o coeficiente de rendimento de um componente i em relação a um componente j ($Y_{i/j}$) é definido como a razão entre as velocidades volumétricas de i em relação à velocidade de j , conforme mostra a Equação (27).

$$Y_{i/j} = \frac{r_i}{r_j} \quad (27)$$

No entanto, no caso específico de i e j ser biomassa e um substrato S (como a glicose), respectivamente, e de se analisar dados retirados da fase exponencial do crescimento celular, a Equação (27) pode ser reescrita na forma da Equação (28).

$$Y_{X/S} = \frac{C_X - C_{X0}}{C_{S0} - C_S} \quad (28)$$

Rearranjando a Equação (28), é possível obter uma relação linear, mostrada na Equação (29).

$$(C_X - C_{X0}) = Y_{X/S}(C_{S0} - C_S) \quad (29)$$

Analogamente para o caso de i ser um produto P e j , biomassa, encontra-se uma relação linear para cálculo de $Y_{P/X}$ (Equação (30)). Por meio de regressão linear, determinou-se o valor dos coeficientes de rendimento.

$$(C_P - C_{P0}) = Y_{P/X}(C_P - C_{P0}) \quad (30)$$

3.7.2.3 Cálculo dos fluxos dos componentes

Define-se fluxos de um componente i (J_i) como sendo a razão entre a velocidade volumétrica deste componente e a concentração celular (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998), como mostra a Equação (31).

$$J_i = \frac{r_i}{C_X} \quad (31)$$

Como a própria modelagem de cada fase do biorreator é feita de forma diferente, é natural que o cálculo do fluxo dos componentes de cada fase seja feito de maneira diferente. Deve-se destacar que a unidade de fluxo é $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Dessa forma, todos os valores obtidos foram convertidos para satisfazer esta condição.

3.7.2.3.1 Componentes da fase líquida

No caso do fluxo de biomassa, em cultivos realizados em batelada, durante a fase exponencial, ele é definido como igual a $\mu_{\text{máx}}$ (SAUER et al., 1999). Para o cálculo do fluxo dos demais componentes da fase líquida, é preciso realizar algumas manipulações algébricas na Equação (31).

Conforme já foi mostrado, o coeficiente de rendimento de biomassa em relação a um substrato S é a razão entre a velocidade volumétrica de reação destes dois componentes. Ao dividir o denominador e o numerador desta razão pela concentração celular, obtém-se a Equação (32) (SAUER et al., 1999).

$$Y_{X/S} = \frac{r_X/C_X}{r_S/C_X} \quad (32)$$

Usando a definição de fluxo da Equação (31) juntamente com a Equação (32) é possível escrever $Y_{X/S}$ como a razão entre o fluxo de biomassa e o de substrato (SAUER et al., 1999). Realizando manipulações matemáticas, obtém-se a Equação (33), que foi utilizada para calcular o fluxo de glicose e aminoácidos.

$$J_S = \frac{J_X}{Y_{X/S}} \quad (33)$$

Realizando o mesmo procedimento, porém desta vez com o coeficiente $Y_{P/X}$, foi obtida a Equação (34) usada para calcular o fluxo de lactato, aceto e ácido hialurônico (SAUER et al., 1999).

$$J_P = Y_{P/X} J_X \quad (34)$$

3.7.2.3.2 Componentes da fase gasosa

Para o cálculo dos fluxos dos componentes da fase gasosa (O_2 e CO_2), manipula-se a Equação (22) de maneira que se obtém uma relação para calcular a velocidade volumétrica do componente i da fase gasosa. No caso do gás carbônico, obtém-se a Equação (35).

$$r_{CO_2} = \frac{\dot{n}_{CO_2}^{saída} - \dot{n}_{CO_2}^{entrada}}{V} \quad (35)$$

Substituindo a Equação (35) em (31) e rearranjando-a, obtém-se

$$J_{CO_2} = \frac{\dot{n}_{CO_2}^{saída} - \dot{n}_{CO_2}^{entrada}}{C_X V} \quad (36)$$

Logo, o fluxo de gás carbônico pode ser escrito como:

$$J_{CO_2} = \frac{\dot{n}_{CO_2}^{saída} - \dot{n}_{CO_2}^{entrada}}{m_X} \quad (37)$$

em que m_X é a massa de células contidas no biorreator.

Manipulando a Equação (37), obtém-se uma relação linear entre massa de células e vazão molar de CO_2 produzida no cultivo em que o fluxo de produção de CO_2 é o coeficiente angular desta relação, que se encontra na Equação (38).

$$\dot{n}_{CO_2}^{saída} - \dot{n}_{CO_2}^{entrada} = J_{CO_2} m_X \quad (38)$$

Analogamente, obtém-se uma relação para o cálculo do fluxo de oxigênio consumido, mostrado na Equação (39). Por meio de regressão linear, os fluxos dos componentes da fase gasosa do biorreator foram calculados.

$$\dot{n}_{O_2}^{entrada} - \dot{n}_{O_2}^{saída} = J_{O_2} m_X \quad (39)$$

As vazões molares de CO₂ produzido e de O₂ consumido foram calculadas como sendo a diferença entre as vazões de saída e entrada de cada um dos componentes.

3.8 MODELAGEM CINÉTICA E AJUSTE DE PARÂMETROS

Foi desenvolvido um modelo cinético que considerava 2 substratos (glicose e lactato) e 2 produtos (ácido hialurônico e acetato). Mais especificamente, assumiu-se que acetato poderia ser formado a partir do consumo de glicose e lactato, no entanto, o ácido hialurônico só poderia ser formado a partir do consumo de glicose. Além disso, o consumo de ambos os substratos poderia ser convertido em biomassa. A escolha de tais hipóteses foi baseada em relatos da literatura e nos dados experimentais obtidos. Foi considerado também que as fontes de carbono eram os únicos substratos limitantes.

Com relação à cinética, foi proposto que tanto o lactato como a glicose possuíam efeitos inibitórios sobre o crescimento. Portanto, para a velocidade específica de crescimento relacionada ao consumo de lactato foi utilizada o modelo de Andrews e, para a glicose, foi assumido um modelo misto de inibição por lactato juntamente com o modelo de Andrews para inibição do substrato. Assumiu-se que a formação de todos os produtos era associada ao crescimento, baseado nos dados experimentais.

A partir das hipóteses anteriores, obteve-se as Equações (40) a (46).

$$\mu_1 = \frac{\mu_{m1} C_{Glic}}{K_S + C_{Glic} + C_{Glic}^2 / K_{IGlic}} \frac{1}{1 + C_{Lact} / K_{ILact,G}} \quad (40)$$

$$\mu_2 = \frac{\mu_{m2} C_{Lact}}{K_{Lact} + C_{Lact} + C_{Lact}^2 / K_{ILact}} \quad (41)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu_1 + \mu_2) C_X \quad (42)$$

$$\frac{dC_{Glic}}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{X/Glic}} + \frac{\alpha_{AH}}{Y_{AH/Glic}} + \frac{\alpha_{Ac,1}}{Y_{Ac/Glic}} \right) \mu_1 C_X \quad (43)$$

$$\frac{dC_{Lact}}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{X/Lact}} + \frac{\alpha_{Ac,2}}{Y_{Ac/Lact}} \right) \mu_2 C_X \quad (44)$$

$$\frac{dC_{AH}}{dt} = \alpha_{AH} \mu_1 C_X \quad (45)$$

$$\frac{dC_{Ac}}{dt} = (\alpha_{Ac,1} \mu_1 + \alpha_{Ac,2} \mu_2) C_X \quad (46)$$

sendo C_i a concentração de i (g L⁻¹), μ a velocidade específica de crescimento (h⁻¹), μ_m parâmetro cinético de velocidade específica de crescimento (h⁻¹), K_{Glic} a constante de saturação

de glicose, K_{Lact} a constante de saturação de lactato ($g L^{-1}$), $K_{ILact,G}$ a constante de inibição de lactato no crescimento celular a partir de glicose ($g L^{-1}$), K_{ILact} a constante de inibição de lactato no crescimento celular a partir de lactato ($g L^{-1}$), α_i a constante de formação de i associada ao crescimento ($g g^{-1}$) e Y_{ij} o coeficiente de rendimento de i em relação a j ($g g^{-1}$).

Deve-se destacar que o modelo cinético desenvolvido não compreende os efeitos de qualquer outro nutriente presente na peptona de soja usada.

O sistema de equações foi resolvido utilizando a função *ode23s* da biblioteca do Matlab[®]. Para o ajuste dos parâmetros do modelo, utilizou-se um algoritmo desenvolvido internamente de Otimização por Enxame de Partículas (em inglês, “*Particle Swarm Optimization*” ou PSO). A função-objetivo (fobj) selecionada foi:

$$fobj = \underline{X}^t \underline{X} \quad (47)$$

sendo \underline{X} o vetor do resultado da diferença entre a concentração de todas as espécies analisadas experimentais e a simulada pelo modelo. Vale destacar que a Equação (47) é a representação vetorial dos mínimos quadrados.

É preciso destacar que as concentrações iniciais de todas as espécies foram tratadas como parâmetros adicionais do modelo

3.9 ESTUDOS *IN SILICO*

3.9.1 Seleção do modelo base para modificações

Foram selecionados quatro modelos de escala genômica de diferentes bactérias lácticas como candidatos para serem a base para a construção do modelo para *Streptococcus zooepidemicus*: *Lactococcus lactis cremoris* MG1363 (FLAHAUT et al., 2013), *Streptococcus pneumoniae* R6 (ainda em desenvolvimento), *Streptococcus pyogenes* NZ131 sorotipo M49 (LEVERING et al., 2016) e *Streptococcus thermophilus* LMG18311 (PASTINK et al., 2009).

Foram levantados alguns critérios para auxiliar na escolha do modelo mais adequado: quantidade de genes e reações catalisadas por enzimas já identificadas, capacidade de produzir a enzima hialuronato sintase e semelhança de vias metabólicas (carbono central, produção e consumo de aminoácidos). Como a composição da parede celular pode variar se o microrganismo é patógeno ou não, outro critério utilizado foi a patogenicidade do microrganismo candidato. O microrganismo selecionado foi o que for mais semelhante ao *Streptococcus zooepidemicus*.

3.9.2 Alterações no modelo

Para definir as alterações feitas no modelo comparou-se as vias metabólicas do carbono central, de consumo e produção de aminoácidos presentes no modelo do microrganismo selecionado e as vias previstas em *S. zooepidemicus* na base de dados *MetaCyc* (CASPI et al., 2014). Para minimizar as modificações feitas no modelo foram apenas adicionadas as vias previstas no *MetaCyc* com evidências genéticas de ocorrerem.

Não foram encontradas muitas referências na literatura a respeito de representação de reações de polimerização em modelos de escala genômica. Dreyfuss et al. (2013) citam que existem duas alternativas: para um polímero cujo monômero se repete n vezes, é possível criar n reações no modelo ou unir todas elas em apenas uma. A primeira alternativa se torna inviável pois o monômero do ácido hialurônico pode se repetir mais de duas mil vezes quando a massa molar é superior a 1 MDa. Já a segunda alternativa também se torna inviável, uma vez que é comum que nem todas as moléculas de ácido hialurônico produzidas possuem o mesmo tamanho de cadeia. Diante disto, optou-se por não adicionar a reação de formação de ácido hialurônico.

Uma estratégia comum de ser encontrada na literatura quando se deseja estudar a produção de um biopolímero com modelos de escala genômica é através dos fluxos de formação dos monômeros. Por conta disto, mediu-se a produção de ácido hialurônico através dos fluxos de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina.

3.9.3 Validação do modelo

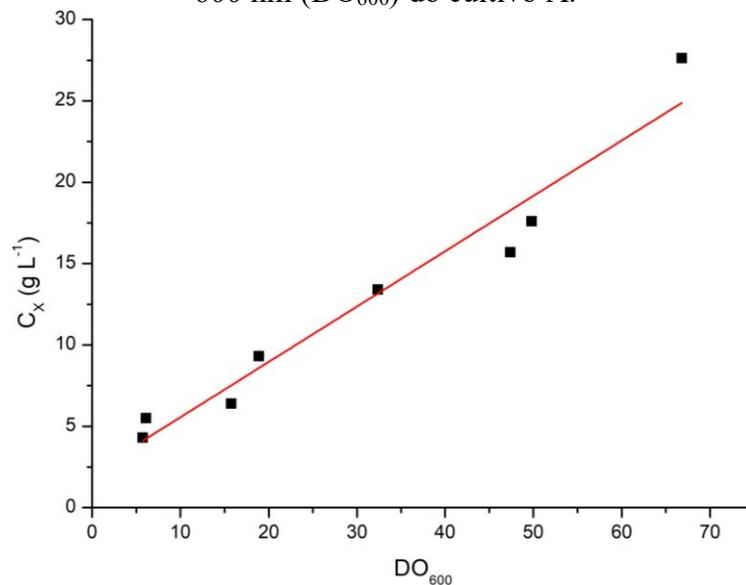
A validação do modelo de escala genômica desenvolvido foi feito por meio da comparação entre os fluxos calculados experimentalmente e valores simulados. Para obter tais dados simulados foi utilizado o software OptFlux 3.3.5. Em todas as simulações realizadas, a função-objetivo selecionada foi a maximização da reação da biomassa utilizando o método pFBA (“*parsimonious Flux Balance Analysis*”). Como restrição ambiental, foi utilizado o fluxo de biomassa experimental.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CULTIVOS EM BIORREATOR

Ao longo do cultivo foi medida a densidade óptica e massa seca. Sabe-se que estas duas variáveis podem ser correlacionadas, conforme mostra a Figura 4. Nela nota-se que a concentração celular em massa seca varia linearmente com a densidade óptica. Portanto, ajustando uma reta, obtém-se a Equação (48), em que $R^2 = 0,953$. Vale destacar que esta correlação só é válida para a fase exponencial do cultivo.

Figura 4. Correlação entre concentração celular em massa seca (C_X) e densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) do cultivo A.



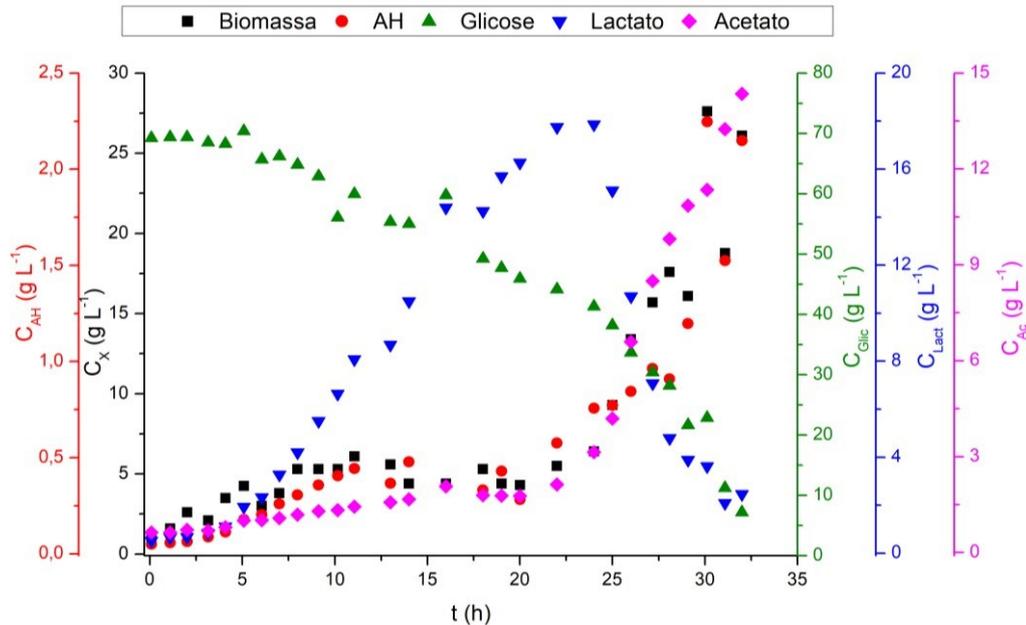
Fonte: Acervo pessoal.

$$C_X = (0,34 \pm 0,03)DO_{600} + (2 \pm 1) \quad (47)$$

Na Figura 5, encontram-se os perfis de concentração de biomassa, glicose, ácido hialurônico, lactato e acetato para o cultivo A. Nota-se que a ocorrência de 3 fases distintas. Na primeira fase (de 0 a 7 h) observa-se crescimento celular sem consumo significativo de glicose. Provavelmente nesta fase, o crescimento foi suportado por aminoácidos ou outros nutrientes da peptona. Já na segunda fase (de 7 a 20 h), o consumo de glicose já é significativo, porém sem crescimento e com formação intensa de lactato. Acredita-se que esta segunda fase seja de adaptação, uma vez que houve uma mudança brusca de concentração de glicose: no pré-inóculo e inóculo, a concentração de glicose era $25 g L^{-1}$, enquanto, no biorreator, a concentração era $70 g L^{-1}$. Por fim, a terceira fase (de 20 a 32 h) foi caracterizada pela retomada do crescimento

celular aliado ao consumo simultâneo de lactato e glicose, além da alta produção de ácido hialurônico e acetato.

Figura 5. Concentração de biomassa, AH, glicose, lactato e acetato em função do tempo do cultivo A.



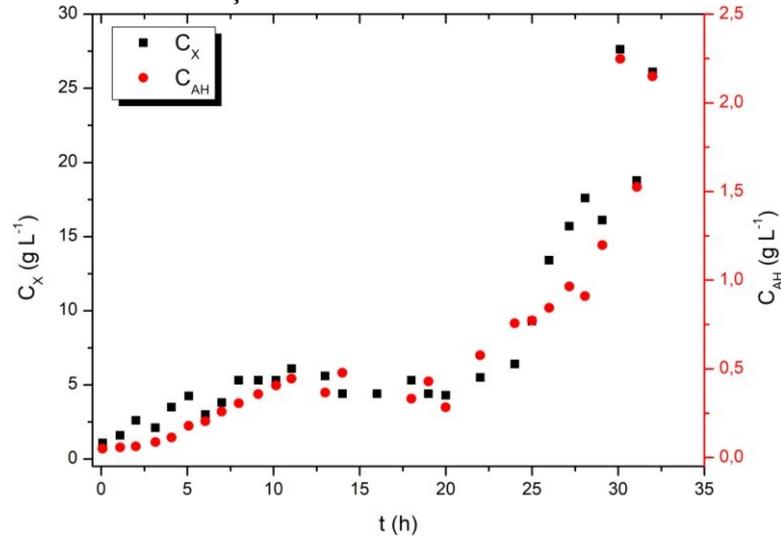
Fonte: Acervo pessoal.

Ao analisar a concentração de ácido láctico em função do tempo, nota-se que ele passa por um máximo em 24 h indicando que a velocidade de assimilação de lactato é maior que a de formação, apesar da glicose ainda não ter sido consumida totalmente. Taniai et al. (2008) reportaram que *Streptococcus pneumoniae*, na presença de oxigênio, possui a habilidade de assimilar lactato para convertê-lo em acetato, de forma que o primeiro se torna uma fonte alternativa de energia para a célula, já que este processo libera um ATP. Inclusive, os autores citam que o microrganismo estudado por eles produz continuamente a enzima lactato oxidase (enzima responsável pela primeira etapa da produção de acetato a partir de lactato), mesmo na presença de glicose.

No entanto, os autores não verificaram crescimento celular após o início do consumo de lactato. Por outro lado, deve ser destacado que não foi realizado nenhum ensaio em que o meio de cultivo foi suplementado com lactato. No trabalho de Seki et al. (2004) com *Streptococcus pyogenes*, verificou-se que, apesar do microrganismo consumir lactato apenas após esgotamento de glicose, a suplementação do meio com lactato viabilizou o crescimento celular, apesar de ter sido observada redução na velocidade específica máxima de crescimento do cultivo com glicose para o de lactato ($0,48 \pm 0,01$ e $0,319 \pm 0,004$ h⁻¹, respectivamente).

Com relação à formação de ácido hialurônico, é possível afirmar que é associada ao crescimento celular. A Figura 6 mostra que a concentração de AH segue a mesma tendência dos dados de concentração de biomassa. Esta observação condiz com os resultados de Liu et al. (2008b) e Don e Shoparwe (2010).

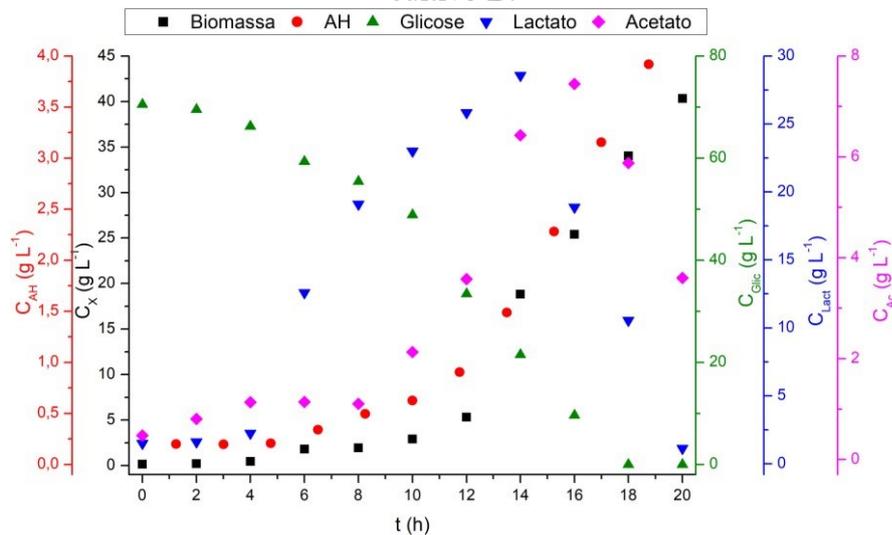
Figura 6 Gráficos de concentração de biomassa e ácido hialurônico em função do tempo.



Fonte: Acervo pessoal.

Foi realizado também um cultivo em que a concentração de glicose do pré-inóculo, inóculo e biorreator era a mesma ($70 g L^{-1}$), chamado de cultivo B. Na Figura 7 encontra-se a concentração de biomassa, glicose, AH, lactato e acetato em função do tempo.

Figura 7. Concentração de biomassa, AH, glicose, lactato e acetato em função do tempo do cultivo B.



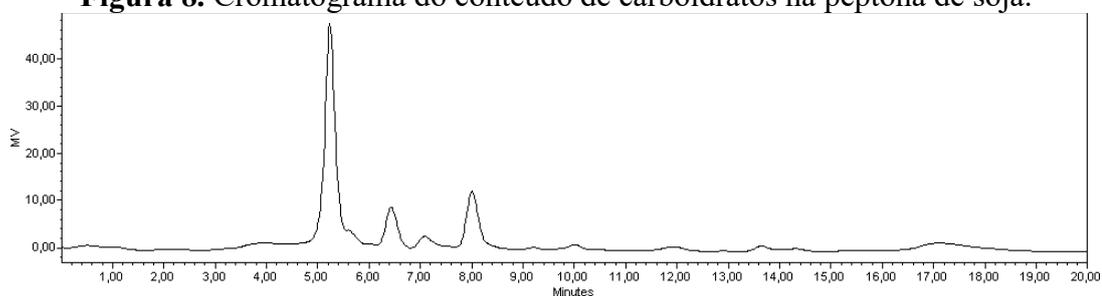
Fonte: Acervo pessoal.

A presença de uma fase *lag* consideravelmente mais curta (ao comparar com os resultados do cultivo A) é o que mais chama a atenção num primeiro momento. Acredita-se que, conduzindo o ensaio dessa forma, as células foram adaptadas a um ambiente de glicose elevada, diminuindo o período de adaptação do microrganismo durante a etapa de cultivo em biorreator.

Mais uma vez, nota-se que a concentração de lactato atinge um valor máximo e passa a ser consumido em seguida. Observa-se também que, no cultivo B, acetato foi consumido após o esgotamento da glicose. Deve-se destacar que no cultivo A, este ácido orgânico não foi consumido, porém não foi observado o esgotamento da glicose.

No cultivo B, nota-se que a glicose é completamente consumida antes do final do ensaio (em 18 h). Porém ao analisar o perfil de concentração celular, nota-se que o microrganismo continua a crescer, mesmo com a concentração dos ácidos orgânicos já diminuindo. É possível que existam outros nutrientes na peptona de soja utilizada e que o microrganismo passou a consumi-los. Para confirmar esta hipótese foi realizada uma análise cromatográfica em uma coluna SugarPak I. Na Figura 8 encontra-se o cromatograma obtido.

Figura 8. Cromatograma do conteúdo de carboidratos na peptona de soja.



Fonte: Acervo pessoal.

No cromatograma da Figura 8, notam-se, ao menos, quatro picos mais acentuados e outros menos: 5,2; 6,4; 7,1; 8,0; 13,9 e 17,1 min. Ao consultar o manual de operação da coluna, verificou-se que associados a estes tempos de retenção estão a glicose-6-fosfato, estaquiiose, rafinose, sacarose, glicerol e glicose, respectivamente. Estaquiiose é um tetrassacarídeo composto por duas unidades de galactose, uma de glicose e uma de frutose, enquanto rafinose é um trissacarídeo, cuja estrutura compreende uma unidade de galactose, uma de frutose e uma de glicose.

Caso o microrganismo seja capaz de assimilar os carboidratos, quer seja em sua forma bruta ou hidrolisada, eles se tornam novas fontes de carbono, conseguindo explicar a manutenção do crescimento celular, mesmo depois da glicose esgotar. Vale destacar que não

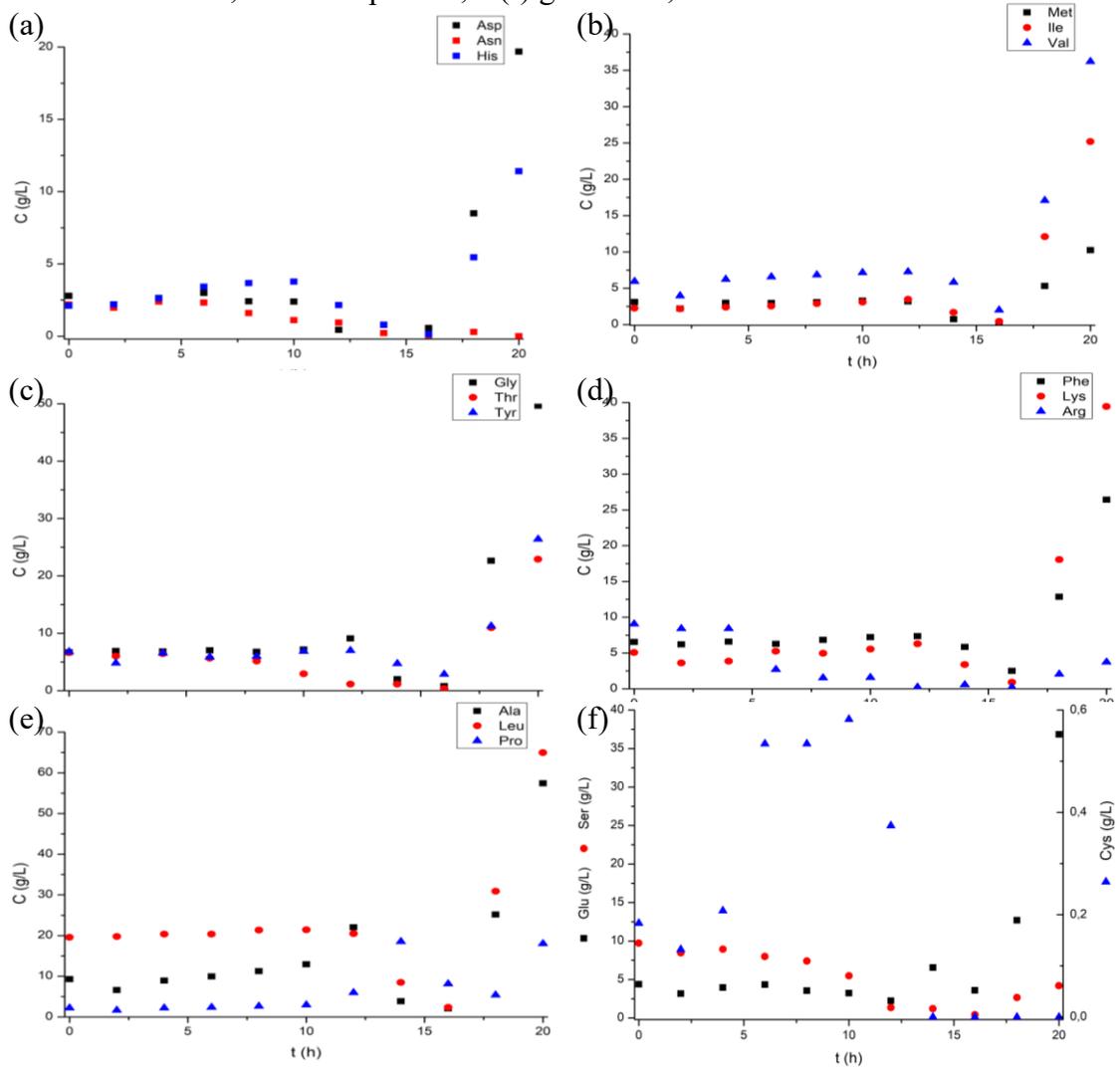
foram encontrados na literatura transportadores de glicose-6-fosfato para *S. zooepidemicus*, dessa forma não é esperado que este carboidrato seja consumido.

Analisando os dados de concentração celular do cultivo B, nota-se que, entre 12 e 14 h, ocorre um aumento vertiginoso na concentração celular, enquanto a concentração de glicose diminui de, aproximadamente, 33 para 22 g L⁻¹. Acredita-se que este aumento brusco na concentração celular seja resultado de uma mudança no metabolismo do microrganismo. De fato, Pires e Santana (2010) verificaram que na presença de glicose a fermentação homolática prevalece, ao passo que, em sua ausência, a via dominante é a fermentação ácida mista. Diante disto, é possível que as células passaram por uma fase de adaptação ao novo metabolismo, uma vez que, cerca de 50% da glicose inicial já havia sido consumida.

Outra evidência de que houve uma mudança no metabolismo pode ser vista no perfil de concentração dos aminoácidos do cultivo B, disposto na Figura 9. Nota-se que os aminoácidos analisados, exceto asparagina, treonina, arginina, serina e cisteína, começam a ser consumidos de fato a partir de 12 h, mantendo-se constante até então. Liu et al. (2009) observaram o mesmo fenômeno para a maioria dos aminoácidos, chamando-o de “equilíbrio dinâmico”. Acredita-se que ele seja resultado da ação de proteases, enzimas com capacidade de hidrolisar proteínas e peptídeos. De fato, Kittang et al. (2017) já relataram que *S. zooepidemicus* é capaz de produzir tais enzimas.

Pelo perfil de concentração de cisteína, pode-se inferir que, desde 4 h de cultivo, proteases já atuavam na hidrólise de peptídeos. O único aminoácido cuja concentração não sofreu um aumento considerável ao longo do cultivo foi asparagina. Isto é decorrente da própria peptona, uma vez que, de acordo com os dados do fabricante, toda asparagina presente encontra-se livre.

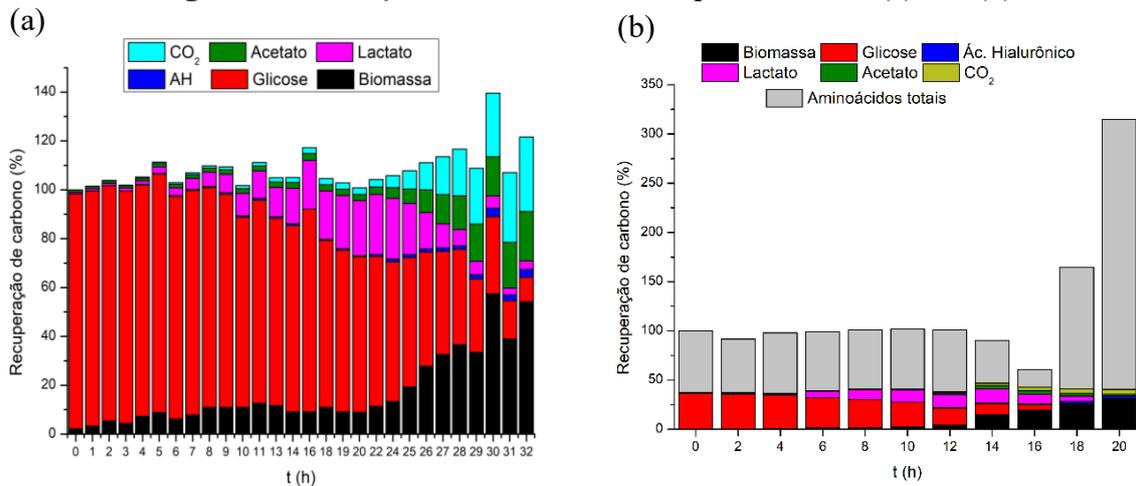
Figura 9. Perfis de concentração de (a) asparagina, aspartato e histidina; (b) metionina, isoleucina e valina; (c) glicina, treonina e tirosina; (d) fenilalanina, lisina e arginina; (e) alanina, leucina e prolina; e (f) glutamato, serina e cisteína do cultivo B.



Fonte: Acervo pessoal.

Com o objetivo de verificar se o aumento na concentração dos aminoácidos é resultado da ação de proteases, lise celular ou produção do microrganismo foi feito o balanço de carbono, representado na Figura 10b. A partir de 18 h, o balanço de carbono confirma a hipótese de que peptídeos, que não foram contabilizados no balanço, foram hidrolisados, uma vez que a recuperação de carbono atingiu níveis de 150 e 350%.

Figura 10. Balanço de carbono realizado para o cultivo (a) A e (b) B.



Fonte: Acervo pessoal.

Nota-se que, entre 14 e 16 h, a recuperação de carbono não é 100%. Acredita-se que a velocidade de hidrólise de proteínas era maior do que a velocidade de assimilação dos aminoácidos pelo microrganismo ou então que algum metabólito não foi levado em consideração.

Também foi feito o balanço de carbono para o cultivo A, mostrado na Figura 10a. Neste balanço não foram incluídos os valores relativos aos aminoácidos. Nele nota-se que a recuperação de carbono é maior que 100%, desde o início do cultivo, chegando no máximo a 140%. Isto acontece porque não foram contabilizados os aminoácidos. A partir de 22 h, a recuperação de carbono passa a aumentar até o final do cultivo, podendo ser um indicativo que o microrganismo está consumindo outros nutrientes da peptona que auxiliam no crescimento celular.

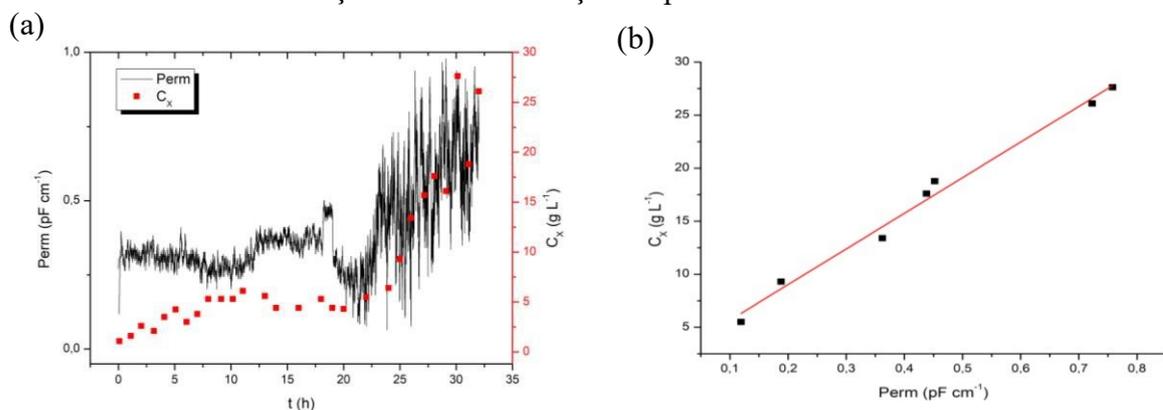
Na Tabela 6 encontram-se os parâmetros cinéticos calculados de ambos os cultivos. Nota-se que a velocidade específica máxima de crescimento foi diferente para os dois cultivos realizados, inclusive sendo menor para o cultivo B. De fato, como no primeiro cultivo as células no biorreator já estavam adaptadas a sobreviver em um meio de cultura de alta concentração de glicose, justificando a maior velocidade. Ao comparar com o resultado de Pires (2009), cuja concentração inicial de glicose foi de 90 g L^{-1} , nota-se que o valor do $\mu_{\text{máx}}$ é muito próximo do obtido no cultivo A. No entanto, o cultivo foi realizado sem controle de pH, logo, o acúmulo dos ácidos orgânicos formados tornou-se um novo estresse para a célula. Caso o pH tivesse sido controlado, é possível que o valor fosse semelhante ou maior que o obtido neste trabalho.

Tabela 6. Índices de desempenho dos cultivos realizados e encontrados na literatura.

Parâmetro cinético	Cultivo A	Cultivo B	Pires (2009)
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	$0,21 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$	0,28
$C_{X,\text{máx}}$ (g L^{-1})	27 ± 6	40,34	Não informado
$C_{\text{AH},\text{máx}}$ (g L^{-1})	$2,248 \pm 0,007$	3,92	2,40
$\text{Pr}_{\text{AH},\text{máx}}$ ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$0,0746 \pm 0,0002$	0,196	0,02
$\text{Pr}_{\text{AH},\text{máx cresc}}$ ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$0,206 \pm 0,001$	-	-
$Y_{X/\text{Glic}}$ ($\text{g}_{\text{MS}} \text{g}_{\text{Glic}}^{-1}$)	$0,94 \pm 0,09$	$0,12 \pm 0,01$	0,10
$Y_{\text{AH}/\text{Glic}}$ ($\text{g}_{\text{AH}} \text{g}_{\text{Glic}}^{-1}$)	$0,022 \pm 0,004$	$0,021 \pm 0,001$	0,02
$Y_{\text{Acet}/\text{Glic}}$ ($\text{g}_{\text{Acet}} \text{g}_{\text{Glic}}^{-1}$)	$0,45 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	Não informado
$Y_{\text{Lac}/\text{Glic}}$ ($\text{g}_{\text{Lac}} \text{g}_{\text{Glic}}^{-1}$)	-	$0,6 \pm 0,1$	Não informado

A concentração máxima de AH foi maior para o cultivo B, porém acredita-se que, caso o cultivo A tivesse sido prolongado por mais algumas horas, a concentração máxima seria mais próxima. Houve grandes divergências também na produtividade em ácido hialurônico, por conta da diferença do tempo de cultivo. Se este parâmetro for calculado apenas na fase de crescimento exponencial ($\text{Pr}_{\text{AH},\text{máx cresc}}$) atinge-se um valor muito semelhante.

No cultivo A foi utilizado um sensor de permissividade e condutividade Hamilton. A permissividade pode ser usada como uma estimativa para a concentração celular (HORTA et al., 2015). Na Figura 11a encontram-se os dados de permissividade e de concentração de biomassa em função do tempo. A partir do momento que a concentração celular atinge o valor de 5 g L^{-1} , nota-se que é possível correlacionar linearmente a concentração de biomassa com a permissividade, obtendo-se a Equação (49), sendo $R^2 = 0,9888$. Esta correlação é interessante para trabalhos futuros, uma vez que se tem a estimativa online de concentração celular, além de poder ser usada como um parâmetro para um futuro sistema de controle de vazão de alimentação (HORTA et al., 2014).

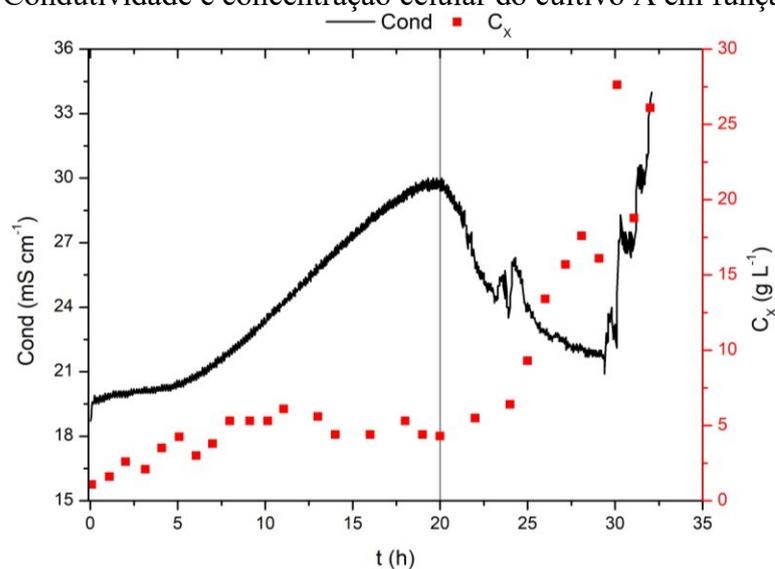
Figura 11. Gráficos de (a) permissividade e concentração celular em função do tempo e (b) de concentração celular em função da permissividade do cultivo A.

Fonte: Acervo pessoal.

$$C_X = (34 \pm 1)DO_{600} + (2,3 \pm 0,8) \quad (49)$$

Com relação aos dados de condutividade, deve-se destacar que o máximo da condutividade coincide com o início da terceira fase do cultivo, conforme pode ser observado na Figura 12. O fabricante informa que a condutividade pode relacionar-se com a decomposição de ácidos, bases ou sais em cátions ou ânions. Possivelmente, a queda na condutividade foi resultado do início do consumo de ácido láctico, que também coincidiu com a retomada do crescimento celular.

Figura 12. Condutividade e concentração celular do cultivo A em função do tempo.

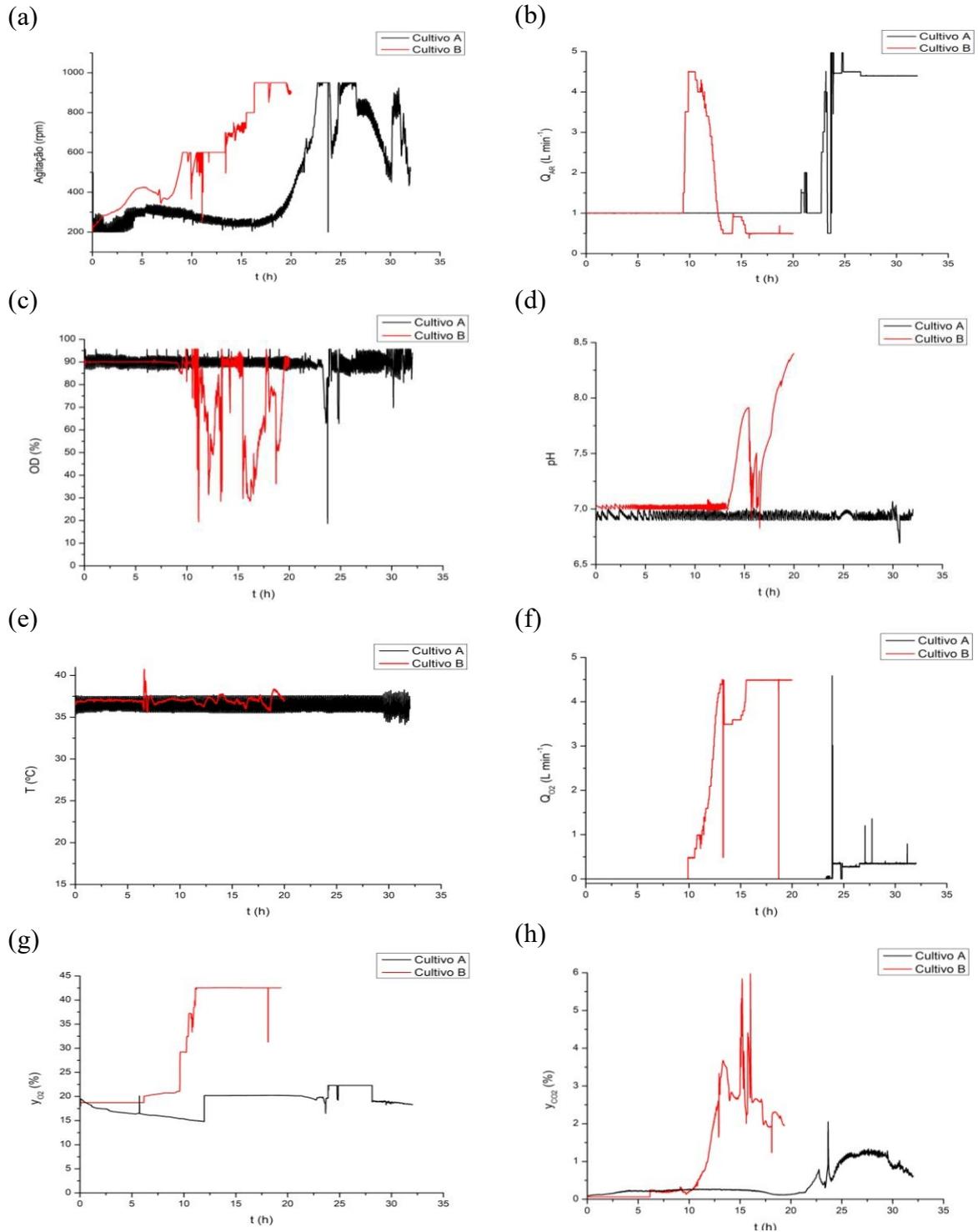


Fonte: Acervo pessoal.

Na Figura 13 encontram-se os principais dados online dos cultivos realizados. A demanda por oxigênio puro foi menor no cultivo A, já que o enriquecimento só iniciou em torno de 24 h e mesmo assim não chegou a ser maior do que $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Deve-se destacar que se acredita que os picos de vazão de oxigênio foram decorrentes de uma mudança no metabolismo celular, o que gerou instabilidades que o sistema de controle não havia sido preparado para lidar.

De modo geral, qualitativamente, a curva da fração de CO_2 na saída é semelhante nos dois cultivos, com a diferença de que no primeiro cultivo ela estava adiantada em relação a do segundo. Como a velocidade específica de crescimento do microrganismo foi maior no primeiro cultivo já era esperado que a fração de CO_2 no mesmo fosse maior que no segundo.

Figura 13. Dados online de ambos cultivos de (a) agitação, (b) vazão de ar, (c) oxigênio dissolvido, (d) pH, (e) temperatura, (f) vazão de oxigênio puro, (g) fração de oxigênio e (h) de gás carbônico na saída do biorreator.

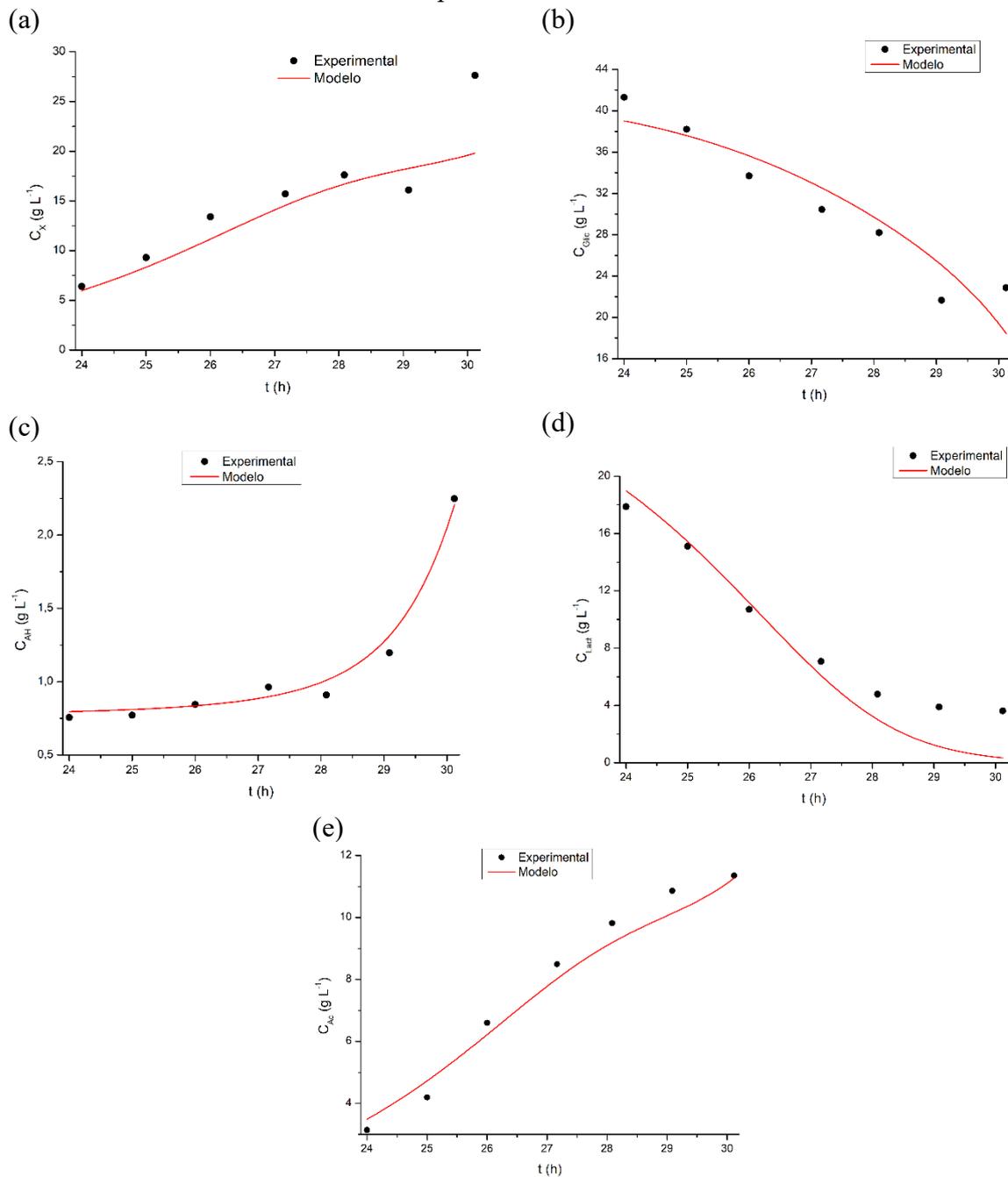


Fonte: Acervo pessoal.

4.2 AJUSTE DO MODELO CINÉTICO

Na Figura 14, encontram-se os dados experimentais do cultivo A das espécies analisadas bem como a resposta do modelo desenvolvido, que só foram ajustados aos dados da fase exponencial do cultivo A.

Figura 14. Perfis de concentração de (a) biomassa, (b) glicose, (c) ácido hialurônico, (d) lactato e (e) acetato, em que os símbolos representam os dados experimentais e as linhas, a resposta dos modelos.



Fonte: Acervo pessoal.

Com relação ao ajuste do modelo aos dados experimentais, nota-se que o modelo conseguiu descrever bem o consumo de glicose e a formação de acetato e ácido hialurônico. No entanto, ele não consegue descrever muito bem o comportamento do perfil de concentração da biomassa e lactato, havendo maiores divergências a partir de 28 h.

Acredita-se que este comportamento é por conta das hipóteses feitas para o desenvolvimento do modelo, já que ele só considera duas fontes de carbono. Como foi visto no balanço de carbono do cultivo A Figura 10b, existem outros compostos que estão sendo assimilados pelo microrganismo que não foram contabilizados no modelo.

Na Tabela 7 encontram-se os valores dos parâmetros do modelo. Analisando os parâmetros de formação de acetato associado ao crescimento, nota-se que o lactato é o principal responsável pela produção deste ácido orgânico, o que está de acordo com a literatura já mencionada.

Tabela 7. Valores obtidos pelo PSO para os parâmetros da fase 3 do modelo.

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
α_{HA1} ($g_{HA} g_{MS}^{-1}$)	0,89	$K_{ILact,G}$ ($g L^{-1}$)	0,05
α_{Ac1} ($g_{Ac} g_{MS}^{-1}$)	0,86	K_{ILact} ($g L^{-1}$)	891,49
α_{Ac2} ($g_{Ac} g_{MS}^{-1}$)	0,52	m_e ($g_{MS} g_{Glic}^{-1} h^{-1}$)	0,19
μ_{m1} (h^{-1})	1,26	$Y_{X/Glic}$ ($g_{MS} g_{Glic}^{-1}$)	0,99
K_{Glic} ($g L^{-1}$)	14,87	$Y_{HA/Glic}$ ($g_{AH} g_{Glic}^{-1}$)	0,99
K_{IGlic} ($g L^{-1}$)	791,55	$Y_{Ac/Glic}$ ($g_{Ac} g_{Glic}^{-1}$)	0,99
μ_{m2} (h^{-1})	0,62	$Y_{X/Lact}$ ($g_{MS} g_{Lact}^{-1}$)	1,00
K_{Lact} ($g L^{-1}$)	14,93	$Y_{Ac/Lact}$ ($g_{Ac} g_{Lact}^{-1}$)	1,00

Nota-se que a inibição por lactato e glicose é um fenômeno importante e que deve ser levado em consideração na modelagem. No entanto, dentre as inibições consideradas, a que possui efeito mais pronunciado é na inibição de lactato no crescimento celular a partir de glicose.

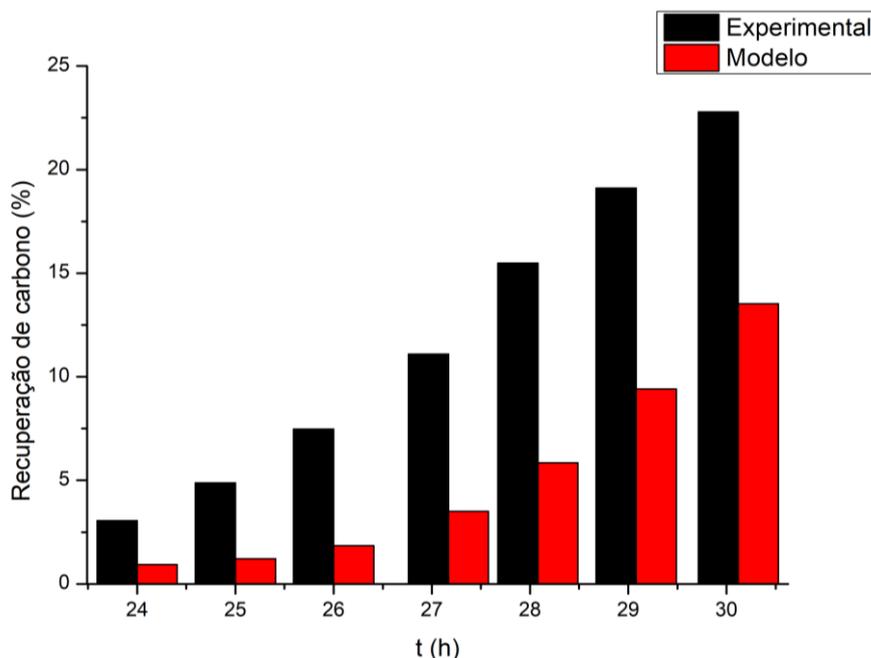
Vale destacar que os coeficientes de rendimento calculados pelo modelo são quase todos iguais a 1, exceto o $Y_{Ac/Glic}$. Acredita-se que eles foram superestimados porque utilizou-se uma fonte complexa de nitrogênio em alta concentração e rica em diversos outros nutrientes que não foram contabilizados na formulação do presente modelo.

Em seu trabalho, Don e Shoparwe (2010), para cinética de crescimento com inibição competitiva, obtiveram os seguintes valores para a K_{Glic} , $K_{Glic,I}$ e μ_m : $7,80 g L^{-1}$, $103,84 g L^{-1}$ e $1,26 h^{-1}$, respectivamente. Apesar dos valores estarem muito diferentes, vale destacar que os resultados dos autores seja um mínimo local em vez de um global, uma vez que o método de otimização utilizado foi de o Levenberg-Marquart (método de otimização local).

Além disso, a obtenção destes parâmetros cinéticos foi feita através do ajuste não-linear de velocidade específica de crescimento em função da concentração de glicose em vez de resolver sistemas de equações diferenciais ordinárias.

Foi feito um teste de consistência do modelo por meio do balanço de carbono. Como o modelo não prevê a formação de CO₂, ele é estimado como a diferença entre 100% e a soma da recuperação do carbono da biomassa, glicose, lactato, acetato e AH. Na Figura 15 encontra-se um gráfico que compara a recuperação de CO₂ experimental e a prevista pelo modelo. Esperava-se que a recuperação de carbono do CO₂ experimental e do modelo tivessem a mesma ordem de grandeza, no entanto, isto não foi observado, indicando que realmente existem outras fontes de carbono sendo consumidas que não foram contempladas pelo modelo.

Figura 15. Comparação entre a recuperação de carbono do CO₂ experimental e prevista pelo modelo.



Fonte: Acervo pessoal.

4.3 ADAPTAÇÃO PARCIAL DO MODELO DE ESCALA GENÔMICO

4.3.1 Seleção do modelo base

Iniciou-se a seleção do modelo com testes dos modelos BMID000000141620, BMID000000142049 e BMID000000142687. Ao testá-los no software OptFlux 3[®] alguns problemas surgiram: na abertura de um projeto novo, o software já informava que havia encontrado erro em algumas das reações descritas e que as eliminaria para o funcionamento do

modelo. Mesmo ignorando este erro e tentando realizar simulações, sem ou com condições ambientais para restringir a função-objetivo, os resultados mostravam que os fluxos eram iguais à zero ou NaN (“*not a number*”, traduzindo, “não é um número”). Acredita-se que estas ocorrências estão relacionadas ao fato de se tratar de modelos não-curados manualmente. Por isso, foi decidido que um modelo curado manualmente de outra bactéria seria adaptado para descrever o metabolismo do *Streptococcus zooepidemicus*.

Na Tabela 8, encontram-se informações relativas à patogenicidade, produção de hialuronato sintase, quantidade de genes e enzimas para os microrganismos. Nota-se que o número de genes do *L. lactis cremoris* é maior que o das bactérias do gênero *Streptococcus*, o que já era esperado, uma vez que microrganismos do mesmo gênero possuem quantidade de genes semelhantes. Com base nos dados da Tabela 8, já é possível perceber que o modelo de escala genômica do *S. pyogenes* se destaca entre os demais por conta da maior semelhança com *S. zooepidemicus*.

Tabela 8. Comparação de patogenicidade, produção de hialuronato sintase, quantidade de genes e enzimas entre *S. zooepidemicus*, *L. lactis cremoris*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *S. thermophilus*.

Critério	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	<i>L. lactis</i> <i>cremoris</i> MG1363	<i>S. pneumoniae</i> R6	<i>S. pyogenes</i> NZ131	<i>S.</i> <i>thermophilus</i> LMG18311
Quantidade de genes	1940	2515	1885	1780	1973
Quantidade de reações ²	661	877	714	843	676
É patógeno?	Sim	Não	Sim	Sim	Não
Produção de hialuronato sintase	Sim	Não	Não	Sim	Não

Fonte: Caspi et al. (2014)

No Quadro 1 encontra-se a comparação das vias de biossíntese de aminoácidos entre os microrganismos selecionados. Nota-se que existem evidências de que a bactéria *S. zooepidemicus* não é capaz de sintetizar onze dos vinte aminoácidos proteínogênicos. Richardson, Somerville e Sonenshein (2015) citam que é comum que bactérias patogênicas gram-positivas não possuam os genes necessários para síntese de alguns aminoácidos. De fato, Armstrong, Cooney e Johns (1997) mostraram que, para a cepa ATCC 35246, na ausência de oxigênio, onze aminoácidos devem estar presentes no meio para garantir o crescimento do microrganismo.

² Foram contabilizadas reações catalisadas por enzimas que possuíam um número EC completo ou parcial.

Quadro 1. Comparação entre as vias de biossíntese de aminoácidos dos microrganismos selecionados.

Via	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	<i>L. lactis</i> <i>cremoris</i> MG1363	<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> R6	<i>S.</i> <i>pyogenes</i> NZ131	<i>S.</i> <i>thermophilus</i> LMG18311
Alanina I	X	X	X	X	X
Alanina II	X	X	X		X
Alanina III	X	X		X	
Arginina II		X			X
Arginina IV	X	X	X	X	X
Asparagina I	X	X			
Asparagina II	X	X	X	X	X
Aspartato	X	X	X	X	X
Cisteína I	X	X	X	X	X
Fenilalanina		X			X
Glicina I	X	X	X	X	X
Glutamato I		X			
Glutamato II	X				
Glutamato III		X	X		X
Glutamina I	X	X	X	X	X
Histidina I		X			
Homocisteína		X			X
Homosserina	X	X	X		X
Isoleucina I		X	X		X
Leucina		X	X		X
Lisina I		X	X		X
Metionina I		X	X		X
Ornitina		X			X
Prolina I	X	X	X	X	X
Serina		X			X
Tirosina		X			X
Treonina	X	X	X		X
Triptofano	X	X	X		X

Fonte: Caspi et al. (2014)

Porém, vale destacar que os estudos de Caspi et al. (2014) divergem dos resultados obtidos por Armstrong, Cooney e Johns (1997), com relação aos aminoácidos essenciais. Enquanto estes consideram arginina, cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptofano, tirosina e valina essenciais; aqueles compreendem que a ausência de glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, tirosina e valina inviabilizam o crescimento celular.

É possível que esta divergência nos resultados dos estudos dos referidos autores seja proveniente do uso de métodos de análise diferentes: enquanto Armstrong, Cooney e Johns (1997) removeram um aminoácido por vez do meio de cultura definido, verificando se a sua ausência afetaria o crescimento celular; Caspi et al. (2014) realizaram por meio de evidências

computacionais (um *software* inferiu a presença de uma via por meio de similaridade na sequência do genoma, padrão de aminoácidos ou nucleotídeos, etc.).

No Quadro 2 está disposta a comparação das vias metabólicas de consumo de aminoácidos entre os microrganismos selecionados. É importante considerar o catabolismo dos aminoácidos na adaptação do modelo de escala genômica, visto que eles estão envolvidos em diversas reações do metabolismo microbiano (por exemplo, uma das etapas da via biossintética do ácido hialurônico envolve o consumo de glutamina).

Quadro 2. Comparação entre as vias de consumo de aminoácidos entre microrganismos selecionados.

Via	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	<i>L. lactis cremoris</i> MG1363	<i>S. pneumoniae</i> R6	<i>S. pyogenes</i> NZ131	<i>S. thermophilus</i> LMG18311
Alanina III	X	X	X		X
Alanina IV		X			X
Arginina III					X
Asparagina I	X	X	X	X	X
Aspartato I	X	X	X	X	X
Aspartato II	X	X		X	
Cisteína II	X				
Citrulina	X	X	X	X	X
Glutamato X	X				
Glutamina I	X	X	X	X	X
Glutamina II		X			
Histidina I				X	X
Histidina III				X	
Homocisteína	X				
Isoleucina I	X	X	X	X	X
Lisina			X		
Ornitina I		X			
Serina	X	X	X	X	X
Treonina II	X				
Treonina III	X				
Triptofano IV		X			X
Valina I	X	X	X	X	X
Valina II	X	X	X	X	X

Fonte: Caspi et al. (2014)

Comparando os Quadros 1 e 2, observa-se que o microrganismo que tem maior semelhança com *S. zooepidemicus*, levando em consideração a produção e consumo de aminoácidos, é o *S. pyogenes*. É preciso ainda analisar a semelhança das vias do carbono central, mostrada no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3. Comparação entre as vias do carbono central entre *S. zooepidemicus*, *L. lactis cremoris*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *S. thermophilus*.

Via	<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	<i>L. lactis</i> <i>cremoris</i> MG1363	<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> R6	<i>S.</i> <i>pyogenes</i> NZ131	<i>S.</i> <i>thermophilus</i> LMG18311
Ciclo do ácido cítrico					
Entner-Doudoroff					
Fermentação ácida mista		X		X	X
Fermentação láctica	X	X	X	X	X
Acetil-CoA a acetato	X	X	X	X	X
Glicólise	X	X	X	X	
Glioxilato					
Piruvato a acetato II	X				
Piruvato a acetil-CoA	X	X		X	
Piruvato a etanol I	X	X	X	X	X
Piruvato a lactato	X	X	X	X	X
Via das pentoses fosfato (não oxidativa)	X	X	X	X	X
Via das pentoses fosfato (parcial)	X				

Fonte: Caspi et al. (2014)

Analisando o quadro, nota-se a ausência do ciclo do ácido cítrico, da via de Entner-Doudoroff e do glioxilato, além da presença parcial da via das pentoses fosfato, possuindo apenas a parte não-oxidativa da via. Tais deficiências no metabolismo do carbono central sejam resultado de evolução reductiva e dos estresses ambientais que alteram o fluxo de carbono, como limitação de ferro e resposta do sistema imunológico do hospedeiro, tornando o microrganismo mais dependente do último. No entanto, a ausência de tais vias afeta a geração de energia da célula, tornando-a menos eficiente que outras que as possuem (RICHARDSON; SOMERVILLE; SONENSHEIN, 2015).

Nota-se que nenhum dos *Streptococcus* analisados são capazes de realizar o ciclo do ácido cítrico. Isto influencia diretamente a biossíntese de diversos aminoácidos, visto que muitos intermediários deste ciclo são precursores essenciais na síntese de muitos deles (por exemplo, oxaloacetato está envolvido na produção de lisina, aspartato, asparagina, cisteína, treonina, isoleucina e metionina, enquanto que α -cetogluturato é responsável pela síntese de glutamato, glutamina, arginina e prolina) (RICHARDSON; SOMERVILLE; SONENSHEIN, 2015). Portanto, é compreensível que estes microrganismos tenham necessidades tão específicas de aminoácidos, explicando o motivo pelo qual a maioria dos trabalhos encontrados na literatura de produção de ácido hialurônico com *Streptococcus zooepidemicus* utilizar fontes complexas de nitrogênio.

A ausência da parte oxidativa no metabolismo do *S. zooepidemicus* beneficia para a produção de AH, já que levará ao acúmulo de frutose-6-fosfato, que é um dos precursores de N-acetilglicosamina (precursor do ácido hialurônico). A capacidade de realizar a fermentação láctica já era esperada, visto que todos os microrganismos analisados são bactérias lácticas.

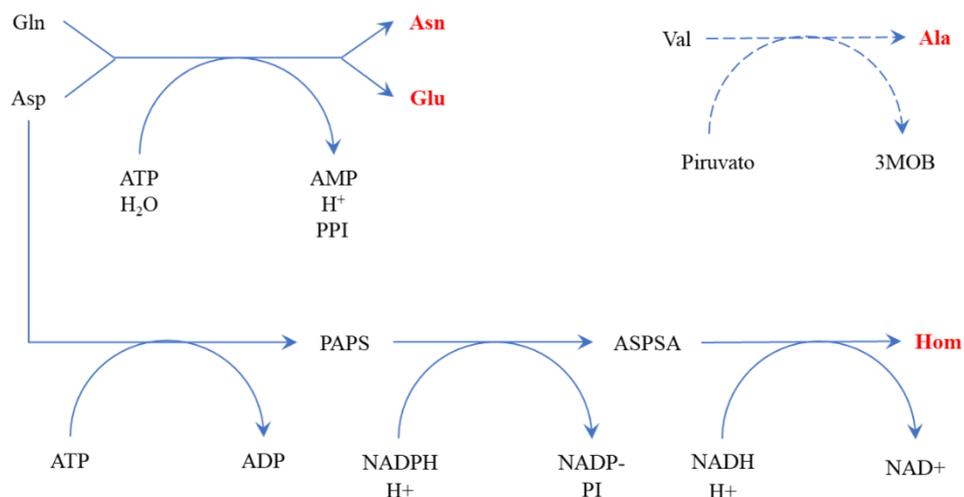
Baseado nas informações dispostas na Tabela 8 e nos Quadros 1, 2 e 3, infere-se que o *S. pyogenes* é o melhor candidato a ser utilizado como base.

4.3.2 Alterações no modelo

Analisando o modelo de escala genômica do *Streptococcus pyogenes* desenvolvido por Levering et al. (2016) verificou-se que não seria necessário realizar nenhuma alteração nas vias do carbono central, de forma que as alterações foram concentradas na produção dos precursores do ácido hialurônico, biossíntese e consumo de aminoácidos.

Comparando as reações de biossíntese de aminoácidos com o modelo, verificou-se que o modelo não previa a produção de asparagina, glutamato e homoserina, enquanto existem evidências de que o *S. zooepidemicus* seja capaz de sintetizá-los. Logo estas vias, mostradas em detalhe na Figura 16, foram adicionadas. Deve-se destacar que apesar da base de dados MetaCyc indicar que *S. zooepidemicus* é capaz de produzir alanina através do consumo de piruvato e esta reação não se encontrar no modelo do *S. pyogenes*, decidiu-se que esta reação não seria adicionada ao modelo, visto que não existem evidências genéticas do microrganismo produzir a enzima responsável por esta reação.

Figura 16. Vias de produção de asparagina, glutamato, homoserina e alanina (linhas cheias representam reações que possuem evidências genéticas, enquanto linha tracejada, reações sem evidências).



Fonte: Adaptado de Caspi et al. (2014).

Além disso, o modelo de escala genômica do *S. pyogenes* compreende a biossíntese de metionina e tirosina, cujas vias estão representadas na Figura 17, porém não foram encontradas evidências de que o *S. zooepidemicus* também possua esta capacidade. Por conta disto, decidiu-se remover estas vias.

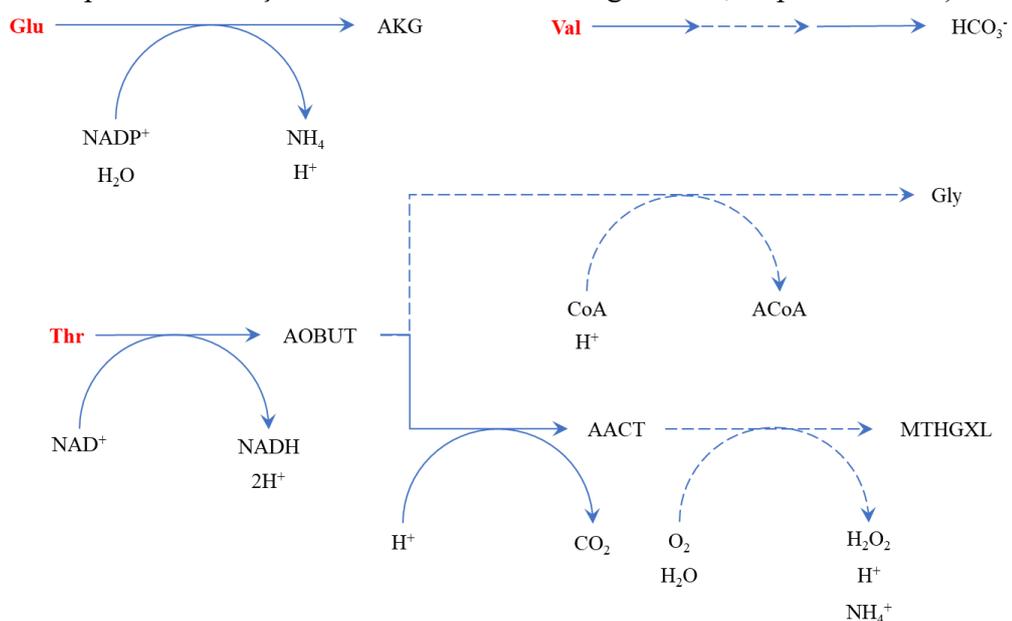
Figura 17. Vias de produção de metionina e tirosina presentes apenas no modelo do *Streptococcus pyogenes*.



Fonte: Adaptado de Caspi et al. (2014).

Com relação às vias de consumo de aminoácidos, deveriam ser adicionadas vias de consumo de glutamina, treonina e valina, representadas na Figura 18. No entanto, a via de consumo de glutamina é a mesma de produção de glutamato de forma que ela já havia sido adicionada. Com relação às vias de consumo de valina, uma delas já era compreendida pelo modelo do *S. pyogenes*. Já a segunda via não foi adicionada ao modelo, visto que não existem evidências genéticas do microrganismo produzir as enzimas responsáveis por algumas das etapas desta via.

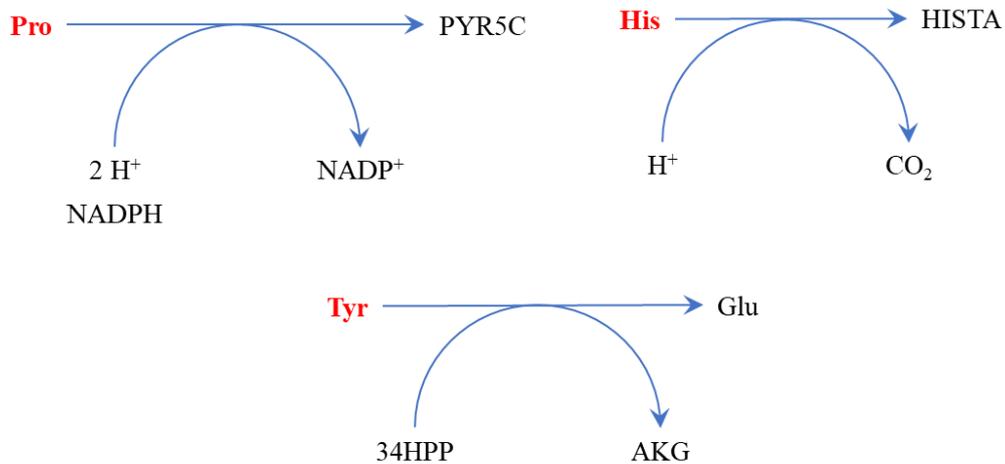
Figura 18. Vias de consumo de glutamato, treonina e valina (linhas cheias e tracejadas representam reações com e sem evidências genéticas, respectivamente).



Fonte: Adaptado de Caspi et al. (2014).

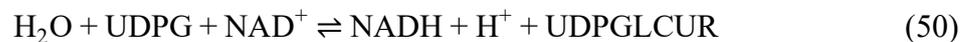
Foram encontradas duas vias de degradação de treonina: a primeira composta por duas etapas e a segunda, por três. No entanto, as vias não foram adicionadas completamente, pois apenas a primeira etapa de ambas as vias possui evidências genéticas de existir e uma das etapas ocorrer espontaneamente. Verificou-se, também, que o modelo previa consumo de histidina, prolina e tirosina (as vias estão representadas na Figura 19). Todas elas foram removidas.

Figura 19. Vias de consumo de prolina, histidina e tirosina presentes apenas no modelo do *Streptococcus zooepidemicus*.



Fonte: Adaptado de Caspi et al. (2014).

As alterações feitas que diziam respeito aos precursores do ácido hialurônico foram menores quando comparadas com as já efetuadas: adicionou-se um novo metabólito (ácido D-glicurônico), duas reações de transporte (para o ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina) e uma reação de conversão de UDP-glicose em ácido D-glicurônico (representada pela Equação (50)).



Feitas todas as alterações mencionadas anteriormente, verificou-se que era possível realizar simulações usando o modelo modificado, de forma que ele se encontra apto para realizações de testes para validá-lo.

4.3.3 Validação do modelo

As informações relativas ao consumo de aminoácidos são muito importantes para compreender o metabolismo do microrganismo, por isso utilizou-se os dados do cultivo B para validar o modelo. Dessa forma, decidiu-se que era necessário utilizar seus fluxos,

juntamente com os de glicose, acetato e lactato, para validar as adaptações feitas no modelo. Portanto, só seria possível utilizar os dados a partir de 12 h, uma vez que, até então, as concentrações da maioria dos aminoácidos são aproximadamente constantes.

Conforme descrito anteriormente, foi utilizada a técnica “*parsimonious flux balance analysis*” para realizar as simulações no OptFlux. No entanto, esta técnica possui algumas limitações, como a dificuldade de descrever situações em que o microrganismo consome mais de uma fonte de carbono simultaneamente (MAHADEVAN; EDWARDS; DOYLE, 2002). Como os dados sugerem que ambos ácidos orgânicos (lactato e acetato) são consumidos pelo microrganismo a partir de 14 h, optou-se por calcular os fluxos metabólicos somente até este momento. Dessa forma, a faixa do cultivo que foi utilizada para validação do modelo foi entre 12 e 14 h (faixa 1). Como o acúmulo de alguns aminoácidos seja resultado da atuação de proteases e não de produção do microrganismo, os fluxos destes aminoácidos não foram incluídos nas condições ambientais.

Como na faixa 1 existe a possibilidade de se estar medindo o fluxo aparente de consumo dos aminoácidos por conta da ação de protease, testou-se o modelo em outra faixa: no intervalo de 2 a 8 h de cultivo (faixa 2). Esta faixa foi selecionada, pois o consumo dos ácidos orgânicos ainda não era significativo, além de ser no meio de uma das fases exponenciais do cultivo. Para esta faixa, foi calculado apenas os fluxos de glicose, acetato, lactato, AH, oxigênio, gás carbônico e biomassa. Tanto os dados de fluxos simulados e experimentais para as faixas 1 e 2 estão dispostos na Tabela 9.

Vale destacar que em ambas as faixas, o modelo prevê o consumo de quatro vitaminas (folato, nicotinato, pantotenato e tiamina) e três bases nitrogenadas (adenina, citosina e guanina). No trabalho de Levering et al. (2016) foi determinado a composição de um meio mínimo para *Streptococcus pyogenes*. Dentre os componentes determinados, encontram-se as quatro vitaminas e duas das três bases nitrogenadas (adenina e guanina), explicando a previsão do modelo de consumo dessas substâncias. De fato, van de Rijn e Kessler (1980) desenvolveram um meio definido para bactérias do gênero *Streptococcus* do grupo A de *Lancefield* e estas mesmas substâncias fazem parte de sua composição.

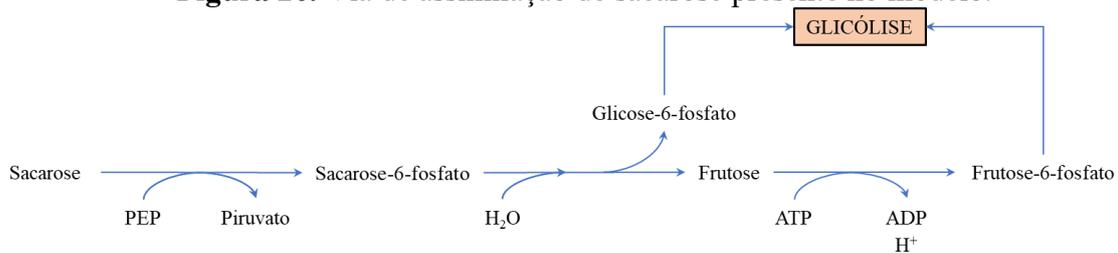
Tabela 9. Fluxos experimentais e simulados para as faixas 1 e 2.

Componente	Faixa 1 (12 a 14 h)		Faixa 2 (2 a 8 h)	
	J ^{exp} (mmol g _{MS} ⁻¹ h ⁻¹)	J ^{sim} (mmol g _{MS} ⁻¹ h ⁻¹)	J ^{exp} (mmol g _{MS} ⁻¹ h ⁻¹)	J ^{sim} (mmol g _{MS} ⁻¹ h ⁻¹)
Biomassa	0,633	0,633	0,370	0,370
Acetato	2,26	19,93	2,52	11,65
Adenina	NC	-0,0705	NC	-0,0412
Alanina	-9,55	-0,514	NC	-0,301
Amônia	NC	-0,122	NC	-0,0715
Arginina	NC	-0,112	NC	-0,0653
Asparagina	-0,258	-0,125	NC	-0,0731
Aspartato	NC	-0,125	NC	-0,0731
Cistina	NC	-0,0602	NC	-0,0352
Citosina	NC	-0,0959	NC	-0,0561
CO ₂	7,35	0,00152	1,30	0,000888
Fenilalanina	-0,425	-0,106	NC	-0,0622
Folato	NC	-6,33E-06	NC	-3,70E-06
Formato	NC	20,74	NC	12,12
Fosfato	NC	-0,436	NC	-0,255
Glicina	NC	-0,157	NC	-0,0917
Glicose	-3,10	-1,586	-15,02	-0,927
Glutamato	NC	0	NC	-0,0415
Glutamina	NC	0	NC	-0,174
Guanina	NC	-0,0751	NC	-0,0439
H ⁺	NC	37,55	NC	21,95
Histidina	-0,412	-0,0479	NC	-0,0280
Isoleucina	-0,644	-0,154	NC	-0,0902
Lactato	1,42	0	34,82	0
Leucina	-4,29	-0,234	NC	-0,137
Lisina	-0,925	-0,225	NC	-0,132
Metionina	-0,769	-0,0632	NC	-0,0369
Nicotinato	NC	-0,00127	NC	-0,000740
O ₂	-102,37	-9,78	-7,53	-5,72
Pantotenato	NC	-0,00013	NC	-7,40E-05
Prolina	NC	-0,114	NC	-0,0668
Sacarose	NC	-4,75	NC	-2,78
Tiamina	NC	-6,33E-06	NC	-3,70E-06
Timidina	NC	-0,0150	NC	-0,00876
Tirosina	-0,582	-0,0798	NC	-0,0466
Treonina	NC	-0,165	NC	-0,0967
Triptofano	NC	-0,0213	NC	-0,0124
Valina	-0,575	-0,194	NC	-0,113

Numa primeira análise da resposta do modelo, nota-se que, para atingir o fluxo de biomassa desejado, era necessário o consumo de duas fontes de carbono diferentes: sacarose e glicose, em ambas as faixas testadas. Ao analisar a via de assimilação de sacarose, observa-se que, além da produção de glicose-6-fosfato, há formação de frutose, que posteriormente será

convertida em frutose-6-fosfato, conforme mostra a Figura 20, enquanto a assimilação de glicose formará apenas glicose-6-fosfato. Deve-se destacar que os resultados da simulação foram obtidos por meio da solução de um problema de otimização, portanto, sob este ponto de vista, a assimilação de sacarose é mais vantajosa. Deve-se ressaltar que os fluxos das três reações mostradas na Figura 20 é igual ao de consumo de sacarose. Estas observações suportam a hipótese do consumo de outras fontes de carbono provenientes da peptona de soja.

Figura 20. Via de assimilação de sacarose presente no modelo.

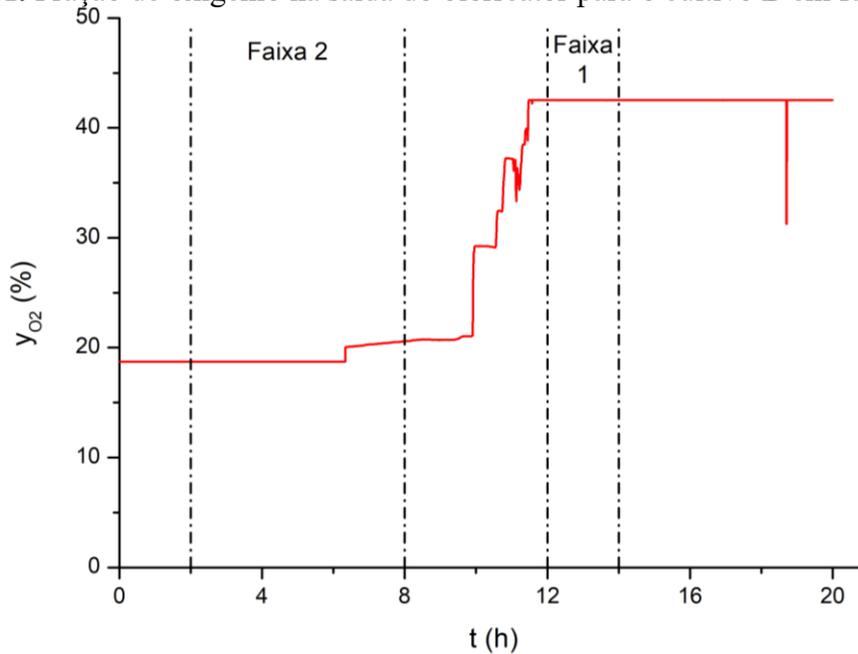


Fonte: Acervo pessoal.

Além disso, observa-se que o modelo não indicou a produção de N-acetilglicosamina. Ao se analisar os fluxos internos, observou-se que a N-acetilglicosamina era produzida, porém ela era destinada apenas para formação de UDP e peptidoglicana. Não foi observada a formação de ácido D-glicurônico, mesmo ao se analisar os fluxos internos. Estes resultados indicam que, possivelmente, escolher apenas a reação da biomassa como função-objetivo pode não ser uma boa estratégia, sendo necessário buscar-se novas funções-objetivo, ou novos métodos de otimização.

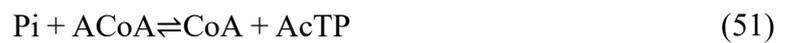
Outro ponto a ser considerado é o fluxo de consumo de oxigênio. Os fluxos simulados e experimentais, na faixa 2, são aproximadamente iguais. No entanto, o mesmo não é observado na faixa 1. Deve-se ressaltar que a fração de oxigênio na saída do biorreator, nesta faixa, era maior que 20%, como mostra a Figura 21. Por conta de limitações experimentais, o sensor de oxigênio foi calibrado em ar atmosférico, ou seja, o valor máximo na calibração era de, aproximadamente, 21% e qualquer valor acima deste torna-se uma extrapolação, diminuindo a confiança em sua medida. Esta limitação pode levar a superestimação do fluxo experimental de oxigênio, explicando o motivo do mesmo ser quase dez vezes maior que o simulado, na faixa 1.

Figura 21. Fração de oxigênio na saída do biorreator para o cultivo B em função do tempo.



Fonte: Acervo pessoal.

Com relação aos fluxos de acetato, nota-se que o simulado é muito maior que o experimental. Ao analisar os fluxos internos, foi observado que o alto valor do fluxo para a reação de formação de acetilfosfato, mostrada na Equação (51). Outra possibilidade é que, na faixa analisada, o acetato já estava sendo consumido pelo microrganismo, de forma que o fluxo experimental foi subestimado.



5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que houve um bom ajuste do modelo cinético desenvolvido aos dados experimentais, exceto para a concentração celular e de lactato, sugerindo que a maior parte da produção de ácido hialurônico ocorreu por conta da assimilação de glicose, enquanto o crescimento foi suportado por outros nutrientes da peptona. Desta forma, o modelo pode ser usado, futuramente, para estudos computacionais para otimizar a produção de ácido hialurônico e novas estratégias de cultivo, como batelada alimentada.

Além disso, ressalta-se que o consumo dos ácidos orgânicos (em especial, o lactato) também se mostrou como uma alternativa interessante para a produção microbiana de ácido hialurônico. Como a demanda energética da produção deste biopolímero é alta e a reassimilação de lactato leva a formação de um ATP, a eficiência energética da célula aumentou, o que pode ter impactado diretamente a concentração celular e de produto. Inclusive, esta situação pode ser utilizada futuramente para o desenvolvimento de novas estratégias de cultivo.

Outro resultado a ser destacado é a produção de proteases pelo microrganismo. Estas enzimas, ao hidrolisar as proteínas da peptona de soja, permite aproveitar-se ao máximo deste substrato de maior valor, o que, de um ponto de vista econômico e de processo, torna-se interessante.

Por meio de alterações nas vias de consumo e produção de aminoácidos e formação de ácido D-glicurônico no modelo de escala genômica do *Streptococcus pyogenes*, foi possível desenvolver um modelo para o *S. zooepidemicus*. Apesar de haver divergências entre os dados experimentais e os resultados das simulações, é preciso lembrar que estes resultados foram obtidos em meio complexo, o que dificulta a validação deste tipo de modelo. No entanto, deve-se destacar que as simulações não apresentaram erros do tipo “NaN” ou com fluxos iguais a zero, ou seja, foi desenvolvido um modelo estruturalmente correto. Dessa forma, após serem feitos ensaios em quimiostato com meio definido, o modelo pode apresentar grande potencial para auxiliar no melhor entendimento do metabolismo do *S. zooepidemicus* e no desenvolvimento de novas estratégias de cultivo, como por exemplo, suplementação com aminoácidos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no trabalho, são feitas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Testar meios definidos encontrados na literatura para avaliar o crescimento celular e a produção de AH e demais metabólitos;
- Conduzir experimentos em quimiostato com meio definido para validar o modelo de escala genômica desenvolvido;
- Elucidar melhor a composição da peptona e qual dos componentes é responsável pela alta produção de AH;
- Realizar testes em concentrações menores de glicose em biorreatores batelada;
- Realizar cultivos em batelada alimentada (quer seja alimentando glicose e/ou peptona ou aminoácidos críticos).

REFERÊNCIA

- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845–864, 1968.
- ALTHERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. In: BORZANI, W. et al. (Eds.). . **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2001. p. 1–32.
- AMAGAI, I.; TASHIRO, Y.; OGAWA, H. Improvement of the extraction procedure for hyaluronan from fish eyeball and the molecular characterization. **Fisheries Science**, v. 75, n. 3, p. 805–810, 2009.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, 1968.
- ARMSTRONG, D. C.; COONEY, M. J.; JOHNS, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 309–312, 1997.
- ARMSTRONG, D. C.; JOHNS, M. R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.
- ASARI, A. Medical Application of Hyaluronan. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 457–473.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2. ed. New York: McGraw Hill, 1986.
- BALAZS, E. A. **Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof** Estados Unidos, 1979. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4141973.html>>
- BALAZS, E. A. Viscoelastic Properties of Hyaluronan and Its Therapeutic Use. In: GARG, H. G.; HALES, C. A. (Eds.). . **Chemistry and Biology of Hyaluronan**. 1. ed. Oxford: Elsevier Science Ltd, 2004. p. 415–455.
- BENEDINI, L. J.; SANTANA, M. H. A. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 798–800, fev. 2013.
- BOERIU, C. G. et al. Production Methods for Hyaluronan. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, p. 14, 2013.
- BURDICK, J. A.; PRESTWICH, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 23, n. 12, p. 41–56, 2011.
- CAMPANI, G. et al. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 103, p. 63–69, 2016.
- CASPI, R. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc

collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D459–D471, 1 jan. 2014.

CASTI, J. L. **Reality rules: picturing the world in mathematics**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

CHELLIAH, V. et al. BioModels: ten-year anniversary. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D542–D548, 28 jan. 2015.

CHEN, Y.-H.; WANG, Q. Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 1, p. 178–181, 4 ago. 2009.

CHONG, B. F. et al. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.

CHONG, B. F.; NIELSEN, L. K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 153–162, 2003a.

CHONG, B. F.; NIELSEN, L. K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 33–41, 9 jan. 2003b.

COONEY, M. J. et al. Structured Model-Based Analysis and Control of the Hyaluronic Acid Fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological Implications of Glucose and Complex-Nitrogen-Limited Growth. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 898–910, 1999.

DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 95–103, 15 mar. 2010.

DREYFUSS, J. M. et al. Reconstruction and Validation of a Genome-Scale Metabolic Model for the Filamentous Fungus *Neurospora crassa* Using FARM. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 7, p. e1003126, 18 jul. 2013.

ESENER, A. A. et al. Modeling of bacterial growth; Formulation and evaluation of a structured model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 8, p. 1749–1764, 1982.

FLAHAUT, N. A. L. et al. Genome-scale metabolic model for *Lactococcus lactis* MG1363 and its application to the analysis of flavor formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 19, p. 8729–8739, 2013.

GAO, H.-J.; DU, G.-C.; CHEN, J. Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 399–408, 2006.

HAN, K.; LEVENSPIEL, O. Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 4, p. 430–447, 1988.

HARDINGHAM, T. E. **Cartilage: aggrecan, link protein, hyaluronan aggregates**. Disponível em: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA05/HA05E.html>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

HOCHBERG, M. C. et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 4, p. 465–474, 2012.

HORTA, A. C. L. et al. A supervision and control tool based on artificial intelligence for high cell density cultivations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 457–468, 2014.

HORTA, A. C. L. et al. On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 4, p. 821–829, 2015.

IM, J.-H. et al. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1337, 2009.

JAGANNATH, S.; RAMACHANDRAN, K. B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 148–158, 15 jan. 2010.

JOHNS, M. R.; GOH, L.-T.; OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 507–512, 1994.

KITTANG, B. R. et al. Zoonotic necrotizing myositis caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in a farmer. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 147, 2017.

KLAMT, S.; SAEZ-RODRIGUEZ, J.; GILLES, E. D. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. **BMC Systems Biology**, v. 1, p. 2, 8 jan. 2007.

KOGAN, G. et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 1, p. 17–25, 2007.

LAI, Z.-W. et al. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 3, p. 286–291, 2012.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan. **Faseb Journal**, v. 6, n. 7, p. 2397–2404, 1992.

LEVERING, J. et al. Genome-scale reconstruction of the *Streptococcus pyogenes* M49 metabolic network reveals growth requirements and indicates potential drug targets. **Journal of Biotechnology**, v. 232, p. 25–37, 20 ago. 2016.

LINDBERG, M.; SAGSTROM, S. Changes in sodium-potassium ratio in guinea-pig epidermis in n-hexadecane-induced hyperplasia. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 69, n. 5, p. 369–372, 1989.

LIU, L. et al. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 383–388, 2008a.

- LIU, L. et al. Influence of culture modes on the microbial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 3, p. 269, 2008b.
- LIU, L. et al. Modeling and optimization of microbial hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* using radial basis function neural network coupling quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1819–1825, 2009.
- LIU, L. et al. Use of genome-scale metabolic models for understanding microbial physiology. **FEBS Letters**, v. 584, n. 12, p. 2556–2564, 18 jun. 2010.
- LIU, L. et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2011.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 393–412, 1959.
- MAHADEVAN, R.; EDWARDS, J. S.; DOYLE, F. J. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 3, p. 1331–1340, set. 2002.
- MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, 2016.
- MONOD, J. The Growth of Bacterial Culture. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371–394, 1949.
- OLIVEIRA, A. H. et al. Cashew apple juice as microbial cultivation medium for non-immunogenic hyaluronic acid production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1097–1104, 2013.
- OLIVEIRA, R. DE C. **Estudo da produção de ácido hialurônico utilizando peptona de soja**. [s.l.] UNICAMP, 2014.
- ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. Ø. What is flux balance analysis? **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 245–248, mar. 2010.
- PASTINK, M. I. et al. Genome-scale model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for metabolic comparison of lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3627–3633, 2009.
- PIRES, A. M. B. **Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para produção microbiana de ácido hialurônico**. [s.l.] UNICAMP, 2009.
- PIRES, A. M. B. et al. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6506–6509, ago. 2010.
- PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1751–1761, 2010.

RICHARDSON, A. R.; SOMERVILLE, G. A.; SONENSHEIN, A. L. Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec.MBP-0004–2014, jun. 2015.

ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC Systems Biology**, v. 4, p. 45, 19 abr. 2010.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de rE. coli utilizando glicerol como fonte de carbono**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SAUER, U. et al. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of Escherichia coli central carbon metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6679–6688, 1999.

SEKI, M. et al. Hydrogen peroxide production in Streptococcus pyogenes: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2046–2051, 2004.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002.

SNOEP, J. L.; WESTERHOFF, H. V. From isolation to integration, a systems biology approach for building the Silicon Cell. In: ALBERGHINA, L.; V. WESTERHOFF, H. (Eds.). **Systems Biology: Definition and Perspectives**. 13. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2005. p. 408.

SOHN, S. B. et al. In silico genome-scale metabolic analysis of Pseudomonas putida KT2440 for polyhydroxyalkanoate synthesis, degradation of aromatics and anaerobic survival. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 7, p. 739–750, 2010.

ŠOLTÉS, L. et al. Degradative Action of Reactive Oxygen Species on Hyaluronan. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 659–668, 1 mar. 2006.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic Engineering: Principles and Methodologies**. 1. ed. San Diego: Academic Press Inc, 1998.

TANIAI, H. et al. Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of Streptococcus pneumoniae: role of lactate as an energy source. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 10, p. 3572–3579, 2008.

TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 528–539, jul. 2004.

TREVISANI, V. F. M.; FIDELIX, T. S. DE A. Osteoartrite. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 12, p. 51–59, 2009.

VAN DE RIJN, I.; KESSLER, R. E. Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. **Infection and immunity**, v. 27, n. 2, p. 444–448, fev. 1980.

WARSHAWSKY, D.; BARKLEY, W.; BINGHAM, E. Factors affecting carcinogenic potential of mixtures. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 376–382, 1993.

WESTERHOFF, H. V.; ALBERGHINA, L. Systems Biology: Did we know it all along? In: WESTERHOFF, H. V.; ALBERGHINA, L. (Eds.). . **Systems Biology: Definition and Perspectives**. 13. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2005. p. 408.

WILLIAMS, F. M. A model of cell growth dynamics. **Journal of Theoretical Biology**, v. 15, n. 2, p. 190–207, 1967.

WRIGHT, J.; WAGNER, A. The Systems Biology Research Tool: evolvable open-source software. **BMC Systems Biology**, v. 2, p. 55, 29 jun. 2008.