



LUCAS GELAIN

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO
Trichoderma harzianum EM MEIO SUBMERSO E BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO**

**Campinas
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

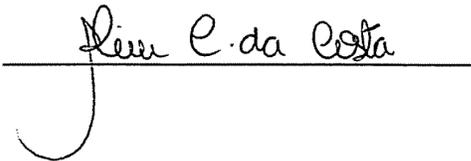
LUCAS GELAIN

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO
Trichoderma harzianum EM MEIO SUBMERSO E BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Engenharia Química
da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. ALINE CARVALHO DA COSTA
Co-Orientador: Dr. JOSÉ GERALDO DA CRUZ PRADELLA

Este exemplar corresponde à versão
final da Dissertação de Mestrado
defendida pelo aluno Lucas Gelain e
orientada pela Profa. Dra. Aline
Carvalho da Costa

A handwritten signature in black ink, reading "Aline C. da Costa", is written over a horizontal line. A large, stylized letter "J" is written below the line, extending downwards.

**Campinas
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

G28m Gelain, Lucas, 1988-
Modelagem matemática da produção de enzimas utilizando *Trichoderma harzianum* em meio submerso e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono / Lucas Gelain. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Coorientador: José Geraldo da Cruz Pradella.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Modelagem matemática. 2. *Trichoderma*. 3. Bagaço de cana. 4. Cana-de-açúcar - Fermentação. 5. Processo - Fermentação. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Pradella, José Geraldo da Cruz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mathematical modeling of enzymes production using *Trichoderma harzianum* in submersed fermentation and sugarcane bagasse as carbon source

Palavras-chave em inglês:

Mathematical modeling

Trichoderma

Sugarcane bagasse

Cane sugar - Fermentation

Fermentation process

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

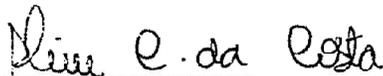
Jaciane Lutz Ienczak

Antonio Maria Francisco Luiz José Bonomi

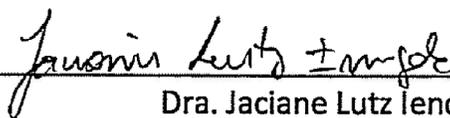
Data de defesa: 01-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Lucas Gelain e aprovada em 01 de agosto de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
(Orientadora)



Dra. Jaciane Lutz Ienczak
(titular)



Dr. Antonio Maria Francisco Luiz José Bonomi
(titular)

Resumo

Modelos matemáticos são necessários para o desenvolvimento de processos, pois permitem o entendimento dos fenômenos envolvidos e podem ser usados para scale-up e otimização das condições de operação. O objetivo deste trabalho foi propor um modelo matemático para descrever a cinética de crescimento celular, consumo de substrato e produção de enzimas utilizando o *Trichoderma harzianum* em diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar (fonte de carbono). Além disso, realizaram-se testes utilizando uma sonda de capacitância para estimação on-line da concentração de células no meio. As concentrações de bagaço de cana-de-açúcar empregadas foram de: 5; 10; 20; 30; e 40 g L⁻¹, onde a concentração 10 g L⁻¹ foi utilizada para validar o modelo e as demais concentrações para a estimação dos parâmetros. As enzimas analisadas foram: celulase (FPase), beta-glicosidase e xilanase. A estimação da concentração de células utilizando a sonda de capacitância mostrou ser uma alternativa interessante, indicando que há boa correlação entre o sinal da sonda e a concentração de células em meio solúvel. No entanto, o meio insolúvel (contendo bagaço de cana-de-açúcar) causou interferências, impedindo seu uso para uma análise quantitativa. Modelos matemáticos foram construídos para descrever as cinco variáveis de estado (concentrações de células e substrato, assim como atividades de celulase (FPase), beta-glicosidase e xilanase). Os modelos parecem representar bem a cinética com um bom ajuste para a maioria dos ensaios. Alterações nos modelos e novos ensaios com concentrações diferentes de substrato ainda precisam ser realizados com a finalidade de melhorar o ajuste e aumentar confiabilidade dos modelos.

Abstract

Mathematical models are necessary to processes development, because they enable the understanding of the involved phenomena and can be used to scale-up and optimization of operation conditions. The aim of this work was to propose a mathematical model to describe the kinetics of the cellular growth, substrate consumption and enzyme production using *Trichoderma harzianum* in different sugar cane bagasse concentrations (carbon source). Besides, tests using a capacitance probe to on-line cellular estimation were performed. The sugar cane bagasse concentrations employed were: 5; 10; 20; 30; e 40 g L⁻¹. The 10 g L⁻¹ concentration was used to validate the model and the others to parameters estimation. The enzymes analyzed were cellulase; beta-glucosidase; and xylanase. The estimation of cellular concentration using the capacitance probe is an interesting alternative indicating good correlation between the sign of the probe and the cells in soluble medium. However, the insoluble medium (with sugar cane bagasse) caused interferences that prevented quantitative analysis. Mathematical models were built to describe the five dependents variables (concentrations of cells and substrate, as well as activities of cellulase (FPase), beta-glucosidase and xylanase). The models seem to represent well the kinetics with a good fit for the majority of the assays. Alterations in the models and new assays with different substrate concentration are needed to provide better fit and increase the model trustworthiness.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	19
2.	Objetivo geral.....	21
2.1	Objetivos específicos.....	21
3.	Revisão bibliográfica	22
3.1	Bioetanol de segunda geração	22
3.2	Bagaço de cana-de-açúcar.....	23
3.3	Processo de produção de enzimas	24
3.3.1	Enzimas.....	24
3.3.2	Micro-organismo	25
3.3.3	Indução e repressão da síntese de enzimas.....	26
3.3.4	Condições do processo.....	27
3.4	Cinética.....	28
3.4.1	Cinética do crescimento celular	28
3.4.2	Cinética de formação do produto	30
3.4.3	Cinética do consumo de substrato.....	31
3.5	Modelagem matemática	32
3.5.1	Otimização.....	34
3.5.2	Estimação dos parâmetros.....	35
3.5.3	Resolução do modelo	35
3.6	Modelos matemáticos.....	37
4.	Materiais e Métodos.....	42
4.1	Equipamentos.....	42
4.2	Micro-organismo	42
4.3	Bagaço de cana-de-açúcar (BED).....	42
4.4	Meios de cultura e condições experimentais.....	43
4.5	Metodologias analíticas	44
4.5.1	Concentração de celulose e massa seca total.....	44
4.5.2	Concentração de células	45
4.5.3	Atividade enzimática	45
4.5.4	Observações microscópicas	46

4.6	Métodos Matemáticos	46
4.7	Função objetivo	47
5.	Resultados e discussão.....	48
5.1	Células	48
5.1.1	Micrografias.....	52
5.2	Cinética.....	54
5.3	Modelos matemáticos.....	59
5.3.1	Fase inicial	59
5.3.2	Células	59
5.3.3	Enzimas.....	60
5.3.4	Substrato	62
5.4	Estimação dos parâmetros.....	63
5.5	Resultados dos modelos.....	65
5.6	Validação	70
6.	Conclusões	74
7.	Referências.....	76
8.	Apêndice	81

Lista de parâmetros e variáveis dos modelos matemáticos propostos

μ_m	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
K_S	Constante modelo de <i>Monod</i> para o crescimento (g L^{-1})
X_m	Crescimento máximo (g L^{-1})
r	Expoente de repressão do crescimento (-)
μ_{md}	Velocidade específica máxima de perda de massa celular (h^{-1})
K_{Sd}	Constante modelo de <i>Monod</i> para a perda de massa celular (g L^{-1})
T_L	Constante da fase inicial (h)
Y_{XS}	Fator de conversão de células em relação ao substrato (g g^{-1})
m_F	V. específica de formação da atividade de FPase não associada ao crescimento ($\text{FPU g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
F_m	Atividade máxima de FPase (FPU L^{-1})
n	Expoente de repressão da produção da atividade de FPase (-)
K_{FS}	Constante de proporcionalidade de FPase (h L g^{-1})
K_{iF}	Constante de inibição de formação da atividade de FPase (g L^{-1})
K_{Fd}	Constante de perda da atividade de FPase (h^{-1})
m_B	V. específica de formação da atividade de β -glicosidase não associada ao crescimento ($\text{U g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
B_m	Atividade máxima de β -glicosidase (U L^{-1})
o	Expoente de repressão da produção de β -glicosidase (-)
K_{BS}	Constante de proporcionalidade de β -glicosidase (h L g^{-1})
K_{iB}	Constante de inibição da formação da atividade de β -glicosidase (g L^{-1})
K_{Bd}	Constante de perda da atividade de β -glicosidase (h^{-1})
m_{Xy}	V. específica de formação da atividade de xilanase não associada ao crescimento ($\text{U g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Xy_m	Atividade máxima de xilanase (U L^{-1})
p	Expoente de repressão da produção de xilanase (-)
K_{XyS}	Constante de proporcionalidade de xilanase (h L g^{-1})
K_{iF}	Constante de inibição da formação da atividade de xilanase (g L^{-1})
K_{Xyd}	Constante de perda da atividade de xilanase (h^{-1})
X	Concentração de células (g L^{-1})
S	Concentração de celulose (g L^{-1})
F	Atividade de FPase (FPU L^{-1})
B	Atividade de beta-glicosidase (U L^{-1})
Xy	Atividade de xilanase (U L^{-1})

Agradecimentos

A minha família, amigos, colegas de laboratório, orientadores, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem demonstrando que a produção e o uso de biocombustíveis, como o bioetanol, podem ser benéficos para países em desenvolvimento. Entre os motivos destacam-se: redução de emissão de gases em comparação com combustíveis fósseis; desenvolvimento de uma nova e atrativa atividade no setor agrícola; e diminuição da dependência de importação de combustíveis fósseis (LAGO et al., 2012).

Em processos fermentativos, a produção de bioetanol vem de cultivos utilizando leveduras em condições específicas. Para o crescimento destes micro-organismos é necessário, entre outros nutrientes, fontes de carbono como açúcares de baixa massa molecular. Esses açúcares podem vir da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, matéria-prima renovável mais abundante na natureza, que são geralmente pré-tratados para facilitar a atuação das enzimas.

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos oferece uma ótima alternativa para a produção de açúcares que podem servir como matéria-prima para vários produtos de interesse comercial (bioetanol, ácidos orgânicos e outros produtos químicos) (HUI et al., 2010).

Os complexos celulolíticos têm sido os sistemas multi-componentes de enzimas mais extensivamente estudados nos últimos tempos devido à sua habilidade em decompor materiais lignocelulósicos em açúcares (SHAHRIARINOUR et al., 2011). Ainda assim, o alto custo da produção das celulasas ainda limita o seu uso para a produção de açúcares solúveis (AHAMED et al., 2010)

Fungos filamentosos têm sido tradicionalmente utilizados para produção de complexos enzimáticos para hidrólise dos principais componentes de materiais lignocelulósicos (MERINO e CHERRY, 2007) devido a sua capacidade de produção de complexos enzimáticos com altas atividades.

Uma etapa importante no desenvolvimento de um processo é a modelagem matemática e as simulações, pois são importantes ferramentas para avaliar determinadas condições de um processo e elaborar estratégias para maximizar a formação do produto de interesse. Devido à sua importância, a elaboração de modelos que descrevam fenômenos naturais torna-se indispensável para evitar gastos desnecessários e perda de tempo de produção dentro de uma empresa.

A produção de celulasas em grande quantidade requer entendimento da cinética de crescimento e produção de enzimas, possibilitando o controle destes fatores. Este é um sistema extremamente complexo, já que diversos fatores influenciam a sua cinética. Ainda assim, mesmo com

o enorme interesse pela produção de celulases, existem relativamente poucos trabalhos recentes tratando da modelagem matemática deste processo. A maioria das publicações na área mostra dados de desempenho de diferentes cepas de fungos em condições específicas sem tentativa de modelagem. Os modelos matemáticos disponíveis em geral baseiam-se na proposta de um artigo de 1993 (BADER et al., 1993).

Neste trabalho, o foco estará direcionado na modelagem matemática da produção de enzimas geradas pelo *Trichoderma harzianum* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo matemático para a produção de enzimas utilizando o *Trichoderma harzianum*. O modelo visa descrever a velocidade de formação das enzimas celulolítica e hemicelulolítica em função da concentração da fonte de carbono empregada.

2.1 Objetivos específicos

- I. Realização de ensaios em reator variando a concentração inicial de substrato;
- II. Estimação on-line da concentração de células utilizando uma sonda de capacitância;
- III. Proposição de modelos matemáticos para descrever as velocidades de consumo de substrato, formação de enzimas e crescimento celular;
- IV. Validação dos modelos matemáticos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bioetanol de segunda geração

Os problemas gerados a partir do uso dos combustíveis fósseis, como acúmulo de gases na atmosfera e mudanças climáticas, vêm incentivando pesquisadores a buscar formas de maximizar a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis e minimizar os efeitos nocivos ao meio ambiente causados pelos processos de produção.

O bioetanol é um combustível que pode ser gerado a partir de fontes renováveis como materiais lignocelulósicos, e por ser um combustível oxigenado, melhora a combustão e, portanto reduz a emissão de hidrocarbonetos, monóxido de carbono e partículas (BALAT et al., 2008).

O Brasil utiliza principalmente a cana-de-açúcar como matéria prima para a produção deste combustível no processo chamado de primeira geração. Um dos resíduos gerados por esse processo é o bagaço da cana-de-açúcar, que também pode ser convertido a bioetanol através das seguintes etapas: pré-tratamento do bagaço; hidrólise; fermentação; e separação do produto (BALAT et al., 2008). Este combustível gerado a partir dos resíduos lignocelulósicos é chamado de bioetanol de segunda geração.

O pré-tratamento é uma etapa importante na conversão dos resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis. A cristalinidade da celulose, grau de polimerização, umidade, área superficial disponível e a quantidade de lignina são fatores que impedem a ação dos agentes que proporcionam a hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é remover a lignina e fracionar o material para aumentar a velocidade e o rendimento da hidrólise (KARP et al., 2013). Os tratamentos podem ser físicos, químicos ou biológicos.

Após o pré-tratamento, o material é hidrolisado pela clivagem da molécula de celulose através da adição da molécula de água. Essa reação pode ser catalisada por um ácido diluído ou enzimas (celulases) (BALAT et al., 2008). A hidrólise enzimática é mais atrativa porque apresenta maior rendimento do que a hidrólise catalisada por ácido e o custo da produção das enzimas vem sendo reduzido substancialmente (PAN et al., 2005). As enzimas utilizadas na hidrólise podem ser produzidas utilizando o mesmo material lignocelulósico empregado na produção do bioetanol de segunda geração como fonte de carbono.

Na fermentação, um micro-organismo converte o caldo rico em glicose proveniente da hidrólise em bioetanol. A recuperação do produto a partir do caldo ocorre através da destilação ou destilação combinada com a adsorção (MOSIER et al., 2005).

A produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos vem sendo investigada durante os últimos anos, mas a sua produção em larga escala ainda não se comprovou economicamente viável. Estudos levando em consideração o processo de integração das unidades de operação, e aumento nos rendimentos de fermentação são alguns ramos do processo que precisam ser avaliados com o intuito de tornar a produção de bioetanol de segunda geração uma tecnologia competitiva (RIVEIRA et al., 2010).

3.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por três grupos de polímeros: celulose; hemiceluloses; e lignina. A celulose e as hemiceluloses são frações ricas em açúcares que despertam o interesse de indústrias, pois podem ser convertidos a diversos produtos através do processo de fermentação (MUSSATTO e TEIXEIRA, 2010).

Um dos principais materiais lignocelulósicos encontrado em grande quantidade, especialmente em países tropicais, é o bagaço de cana-de-açúcar (CARDONA et al., 2010). Esse bagaço torna-se um resíduo em potencial para a produção de bioetanol de segunda geração por sua abundante disponibilidade (proveniente de processos de produção de açúcar e bioetanol de primeira geração) e seus pré-tratamentos de baixo custo (LOH et al., 2013).

Cada tonelada de cana-de-açúcar (50 % umidade) processada para produzir bioetanol ou açúcar gera aproximadamente 0,3 toneladas de bagaço (HOFSETZ e SILVA, 2012). Em uma usina de bioetanol, parte desse bagaço é empregado para gerar energia térmica e elétrica através da combustão. No entanto, processos vêm sendo estudados para minimizar a demanda de energia nestas usinas, o que irá resultar em um aumento no excesso de bagaço (DIAS et al., 2012). Esse bagaço em excesso pode ser convertido a bioetanol proporcionando um aumento na produção deste combustível nestas usinas sem recorrer a um aumento na plantação da matéria prima (cana-de-açúcar).

3.3 Processo de produção de enzimas

A hidrólise é uma das principais etapas do processo de produção de bioetanol de segunda geração, pois a partir deste processo ocorre a liberação de açúcares fermentescíveis que serão posteriormente convertidos a bioetanol por uma levedura específica. A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise ácida como maior rendimento. Além disso, as enzimas apresentam alta especificidade de substrato e menor formação de produtos secundários do que reações químicas convencionais (SEIBOTH et al., 2011).

Quando a hidrólise enzimática é escolhida, o processo de produção de enzimas passa a ser também uma etapa importante do processo. A produção de enzimas em processos de fermentação consiste inicialmente em definir as enzimas de interesse, o micro-organismo que irá gerá-las (fungos, bactérias ou leveduras), definir as condições operacionais (pH, temperatura, reator) e de cultivo (nutrientes), as formas do processo de produção (batelada, batelada alimentada, contínuo) e o estado do meio em que será realizado (fermentação em estado sólido ou submerso). Cada escolha depende do objetivo principal, disponibilidade de materiais, interesse comercial, e do conhecimento das vantagens e desvantagens associadas. Alguns desses importantes aspectos são apresentados a seguir.

3.3.1 Enzimas

As enzimas de interesse a serem produzidas para hidrólise enzimática são as capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos. Antes da hidrólise enzimática ocorre o pré-tratamento que pode conter uma etapa de remoção da lignina. Desta forma, a composição após o pré-tratamento destes materiais se torna basicamente celulose e hemicelulose (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012).

Em geral é aceito que para hidrolisar a celulose em seus monômeros de glicose, são necessários três tipos de enzimas (celulases): exo-1,4- β -glicanases, EC 3.2.1.91, (celobiohidrolases); endo-1,4- β -glicanases, EC 3.2.1.4; e β -glicosidases, EC 3.2.1.21 (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012). As endo-1,4- β -glicanases atacam internamente e randomicamente as cadeias da celulose, gerando oligossacarídeos com terminais não-redutores. As celobiohidrolases atacam os terminais não-redutores das cadeias da celulose, formando o dissacarídeo celobiose, que é composto por duas unidades de glicose ligadas por ligações covalentes da estrutura glicosídica nas posições β 1-4. As β -

glicosidases hidrolisam a celobiose e outros celo-oligossacarídeos de cadeia curta até D-glicose (THONGEKKAEW et al., 2008).

As hemiceluloses têm uma composição mais variada em comparação à celulose e por isso requerem um número maior de enzimas para ocorrer uma hidrólise eficiente. Algumas das principais enzimas para degradar as hemiceluloses são: endo-xilanase; acetil-xilano-esterase; β -xilosidase; endo-mannanase; β -mannosidase; α -L-arabinofuranosidase (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

O polímero mais frequente nas hemiceluloses é a xilana e as principais enzimas para degradá-lo são (xilanases): as endo-xilanases, que clivam a cadeia principal em oligossacarídeos menores; e as β -xilosidases, que clivam as cadeias curtas de xilo-oligossacarídeos em xilose (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

Neste trabalho a atividade das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose foram representadas pela atividade de FPase e β -glicosidase. A FPase (atividade de papel filtro) corresponde a atividade de uma mistura de exo-glicanases e endo-glicanases (SANTOS et al., 2011). Já para degradação da hemicelulose, a atividade de xilanase foi considerada.

3.3.2 Micro-organismo

Os fungos filamentosos são geralmente saprofíticos, desta forma secretam uma ampla gama de enzimas envolvidas na decomposição e reciclagem de biopolímeros. A maioria das enzimas são hidrolíticas e desenvolvem um importante papel na alimentação destes fungos, liberando carbono e nitrogênio de macromoléculas insolúveis (EL-ENSHASY, 2007).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* são reconhecidos pela sua habilidade de secretar grandes quantidades de proteínas, metabólitos e ácidos orgânicos no meio de crescimento (CONESA et al., 2001). Dentre os fungos capazes de degradar celulose e hemiceluloses, as espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* vêm sendo extensivamente estudadas (STRAKOWSKA et al., 2014). O *Trichoderma reesei* é um dos fungos filamentosos mais empregados para a produção em escala comercial de diferentes celulases e hemicelulases e está bem adaptado em processos de fermentação (STRAKOWSKA et al., 2014).

Nos processos de fermentação em estado submerso, os fungos sofrem diversas mudanças morfológicas. Uma descrição detalhada da morfologia se torna interessante porque sua correlação com a produtividade pode ser avaliada e utilizada para a otimização do processo. Geralmente em

meio submerso as células dos fungos filamentosos apresentam três principais fases. A primeira fase corresponde à dilatação e germinação dos esporos, extensão das hifas e ramificações. Na segunda fase ocorre a formação das redes de hifas ou “*biopellet*”. E a terceira fase ocorre à autólise das células (EL-ENSHASY, 2007).

À medida que as hifas se estendem, o crescimento celular dos fungos filamentosos ocorre devido ao aumento da formação das pontas. Novas pontas formadas pela ramificação geram novos ramos que possibilitam o aumento do crescimento superficial, melhorando a captação de nutrientes e secreção de produtos (EL-ENSHASY, 2007). A secreção de enzimas por fungos filamentosos se restringe principalmente às pontas das hifas em crescimento (HESHAM, 2007). Um hipotético caminho para secreção de enzimas por fungos está descrito em Conesa et al. (2001). As proteínas que são secretadas começam sua jornada para o meio extracelular, entrando no retículo endoplasmático (RE) onde são dobradas e podem ser submetidas em distintas modificações como glicosilação, formação de pontes de dissulfeto, fosforilação, e montagem de subunidades. Depois, as proteínas deixam o RE sendo transportadas em vesículas para o complexo de Golgi, onde modificações adicionais podem ser realizadas como mais glicosilação e processamento de peptídeos. Finalmente as vesículas transferem as proteínas para a membrana plasmática onde a partir desta etapa, são secretadas.

3.3.3 Indução e repressão da síntese de enzimas

As celulasas são induzidas, na maioria dos fungos, na presença de celulose ou um indutor. Acredita-se que existam três estados de regulação das celulasas em nível de transcrição: expressão a nível basal; secreção da massa de celulasas induzida por indutores, e repressão catabólica ou por glicose. Em geral é aceito que a celulose, por si só, não é capaz de desencadear a indução direta das celulasas por ser uma molécula muito grande para entrar na célula (ARO, 2003) e por ser insolúvel (SUTO e TOMITA, 2001). A presença de um nível basal de celulasas constitutivas pode degradar a celulose em celo-oligossacarídeos solúveis, permitindo a entrada desses sacarídeos na célula e sua conversão a indutores que desencadearão a indução. Após a degradação da celulose, uma grande quantidade de glicose é liberada, causando repressão catabólica (SUTO e TOMITA, 2001). A repressão catabólica irá prevenir a síntese de um excesso de celulasas em circunstâncias onde há uma abundante fonte de carbono facilmente assimilável (SUTO e TOMITA, 2001).

O menor celo-oligossacarídeo, a celobiose, é considerada um indutor por muitos pesquisadores (SUTO e TOMITA, 2001). A sofrorse, que é um dissacarídeo da glicose com ligação β -1,2, também é considerada um indutor de celulasas para o fungo *Trichoderma reesei*. Acredita-se que esse último é produzido por transglicosilação (SUTO e TOMITA, 2001).

A produção de diversas hemicelulasas de *Trichoderma reesei* é induzida durante o crescimento na presença de celulose, xilana, sofrorse, xilobiose e L-arabitol. A repressão da síntese de hemicelulasas também pode ser causada pelo excesso de glicose (ARO, 2003).

3.3.4 Condições do processo

As condições em que o processo ocorre exercem um papel fundamental no crescimento celular e geração do produto. Cada cultivo utilizando um micro-organismo apresenta condições ótimas que podem ser obtidas através de planejamentos experimentais e amplo número de ensaios avaliando os principais componentes que influenciam o processo tendo como objetivo maximizar o rendimento do produto de interesse.

Entre os principais fatores que influenciam o crescimento de um micro-organismo e a geração do produto estão: pH; temperatura; aeração; agitação; fontes de carbono e nitrogênio; e sais. Além disso, o processo pode ser conduzido em batelada, batelada alimentada, contínuo, fermentação em estado sólido ou submerso.

Algumas das características em que os processos são conduzidos devem ser avaliadas para escolher a melhor opção. Por exemplo, as fermentações em batelada ocorre em um sistema fechado em que os componentes do meio são colocados no reator no início do cultivo, com exceção dos gases (como oxigênio), ácido ou base para o controle do pH, e agentes anti-espumantes. Durante o processo não há adição ou remoção de nutrientes. A maior desvantagem desse processo é a baixa produtividade devido ao tempo morto entre duas bateladas (tempo de não produção, onde ocorre a limpeza e esterilização) (SRIVASTAVA e GUPTA, 2011).

Nos processos contínuos o meio é constantemente adicionado no fermentador com uma remoção simultânea do caldo contendo resíduos dos nutrientes e os produtos. Esse processo proporciona uma alta produtividade. No entanto, estas condições podem favorecer a contaminação e mutações. Já na batelada alimentada geralmente não ocorre remoção do caldo durante o período de fermentação. A razão de alimentação dos nutrientes ajuda a controlar as velocidades das reações. O

trabalho envolvido nesse processo é relativamente mais intenso, devido a necessidade de esterilização do equipamento após o final do cultivo e requer um controle preciso dos nutrientes adicionados. Esse processo apresenta vantagens, como redução de possíveis inibições do crescimento e produtos de metabolismo pelo substrato (SRIVASTAVA e GUPTA, 2011).

A diferença entre a fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES) está no fato de que a FES não apresenta água livre no meio de cultivo, já na FS, há a presença de água em excesso (SINGHANIA et al., 2010). Na FS, o processo de mistura é considerado perfeito, as concentrações de células, produtos e substrato são iguais em qualquer parte do reator. Na FES, o meio é considerado heterogêneo. FES apresenta algumas vantagens como: simplicidade do meio de cultivo; menor volume de efluentes líquidos; menor risco de contaminação. Algumas desvantagens incluem: difícil controle de parâmetros como pH, umidade, temperatura e difícil automação do processo (ZÚÑIGA, 2010). Em virtude das desvantagens da FES, a maioria das celulases comerciais produzidas por fungos filamentosos (*A niger* ou *T. reesei*) empregam a FS (SINGHANIA et al., 2010).

3.4 Cinética

Para construir as equações que irão representar um processo de interesse, é necessária a compreensão e descrição matemática da cinética dos principais componentes. Em relação aos processos de fermentação, o estudo da cinética de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato é essencial. A seguir é apresentada uma descrição matemática da cinética para um processo em batelada.

3.4.1 Cinética do crescimento celular

No crescimento celular em batelada observa-se geralmente a formação de diferentes fases que podem ser distinguidas construindo um gráfico logaritmo natural da concentração de células em função do tempo de cultivo: fase lag; aceleração; crescimento; declínio; estacionária; e morte.

Durante a fase de crescimento e declínio, a velocidade de crescimento pode ser descrita de acordo com a equação a baixo (DORAN, 1995):

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_c = \mu_X X \quad 1$$

Nesse período, a velocidade específica de crescimento (μ_X) depende da concentração de nutrientes presentes no meio. Geralmente em modelos matemáticos simples, um único substrato é considerado como o substrato limitante do crescimento (DORAN, 1995). A velocidade específica de crescimento pode ser relacionada com a concentração do substrato limitante do crescimento de acordo com a equação de *Monod*:

$$\mu_X = \mu_m \frac{S}{S + K_S} \quad 2$$

A equação de *Monod* é a mais empregada para descrever a influência da concentração do substrato limitante do crescimento na velocidade específica de crescimento (DORAN, 1995). Essa equação não considera inibição pelo produto e nem pelo substrato.

Quando o crescimento sofre inibição por altas concentrações do substrato ou produto, outros termos podem ser adicionados à equação do *Monod* para melhor descrever o processo. Um exemplo de equação que leva em consideração a inibição pelo substrato $\left(\frac{S^2}{K_i}\right)$ é a equação de *Andrews* (BONOMI e SHMIDELL, 2001):

$$\mu_X = \mu_m \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_i}} \quad 3$$

Por outro lado, a equação de *Aiba, Shoda e Nagatani* (BONOMI e SHMIDELL, 2001) leva em consideração a inibição pelo produto ($e^{(-K_P P)}$):

$$\mu_X = \mu_m \frac{S}{S + K_S} e^{(-K_P P)} \quad 4$$

A cinética de morte celular deve ser considerada em um processo de fermentação onde uma grande perda de viabilidade celular é esperada. A cinética de morte celular pode ser representada por uma equação de primeira ordem:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_d = k_{DX}X \quad 5$$

Considerando o balanço de massa para o crescimento celular, combinando-se as Equações 1 e 5:

$$\frac{dX}{dt} = \left(\frac{dX}{dt}\right)_c - \left(\frac{dX}{dt}\right)_d \quad 6$$

3.4.2 Cinética de formação do produto

A taxa de formação de produto em um processo de fermentação pode ser representada pela equação a seguir:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P X \quad 7$$

As células utilizam a energia proveniente do consumo do substrato para diferentes finalidades como crescimento celular, formação de produto e manutenção das células. A formação do produto pode estar diretamente associada ao crescimento, neste caso o produto será formado sempre que houver crescimento. A energia utilizada para a manutenção das células também pode proporcionar a formação do produto (DORAN, 1995).

Considerando que o produto é formado durante o crescimento e manutenção das células:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{PX} \left(\frac{dX}{dt}\right)_c + m_P X \quad 8$$

ou

$$\frac{dP}{dt} = (Y_{PX}\mu_X + m_P)X \quad 9$$

onde a velocidade específica de formação do produto pode ser representada como:

$$\mu_P = (Y_{PX}\mu_X + m_P) \quad 10$$

A velocidade específica de formação de produto (Equação 10) é igual à combinação do termo de formação de produto associado ao crescimento ($Y_{PX}\mu_X$) e não associado ao crescimento (m_P - velocidade específica de formação de produto não associado ao crescimento) (DORAN, 1995). Y_{PX} é o fator de conversão de produto em relação as células. A formação do produto pode ser considerada apenas associada ao crescimento ($m_P = 0$), não associada ao crescimento ($Y_{PX} = 0$), ou quando for parcialmente associada se utiliza as duas contribuições.

Considerando enzimas como produto de interesse, a cinética de desativação das enzimas pode ser representada por uma equação de primeira ordem:

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_a = k_{DP}P \quad 11$$

Considerando o balanço de massa para o produto, combinando-se as Equações 7 e 11:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P X - k_{DP}P \quad 12$$

3.4.3 Cinética do consumo de substrato

A velocidade de consumo de substrato em um processo de fermentação pode ser representada pela equação a seguir:

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_S X \quad 13$$

Em algumas culturas onde a síntese de um produto está parcialmente associada com o crescimento, a velocidade de consumo de substrato está relacionada a três fatores: velocidade de crescimento; velocidade de síntese do produto; e velocidade de substrato consumido para a manutenção das células (DORAN, 1995). A equação que inclui esses fatores está apresentada a seguir:

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{XS}}\left(\frac{dX}{dt}\right)_c + \frac{1}{Y_{PS}}\frac{dP}{dt} + m_S X\right) \quad 14$$

ou

$$\frac{dS}{dt} = -\left(\frac{\mu_X}{Y_{XS}} + \frac{\mu_P}{Y_{PS}} + m_S\right)X \quad 15$$

onde a velocidade específica de consumo de substrato pode ser representada como:

$$\mu_S = -\left(\frac{\mu_X}{Y_{XS}} + \frac{\mu_P}{Y_{PS}} + m_S\right) \quad 16$$

m_S corresponde a constante do consumo de substrato para a manutenção das células.

3.5 Modelagem matemática

Modelos descrevendo os principais componentes de um processo de fermentação são úteis para a otimização e controle das atuais operações de produção. Os modelos são desenvolvidos baseando-se na formação de células, consumo de substrato e formação de produtos. Os tratamentos matemáticos relacionados à bioengenharia são complicados devido à complexidade dos sistemas vivos e à natureza segregada do ciclo de vida dos micro-organismos (THILAKAVATHI et al., 2007). A combinação dos dados experimentais e modelagem matemática proporciona interpretações coerentes dos resultados experimentais e podem ser úteis para analisar novos aspectos da fisiologia do micro-organismo. Além disso, os modelos podem ser utilizados para planejar experimentos mais específicos, buscando um maior rendimento dos produtos de interesse (THILAKAVATHI et al., 2007).

Os modelos podem ser classificados em diversas formas: verbal, não verbal; estruturado, não estruturado; determinístico, estocástico; segregado, não segregado; discreto, contínuo; entre outros. No entanto, as principais classificações são: estruturado, não estruturado; e segregado, não segregado (THILAKAVATHI et al., 2007):

- i. Os modelos não estruturados são os mais utilizados para a modelagem de sistemas contendo micro-organismos por sua simplicidade e robustez. Não levam em consideração a estrutura interna das células e descrevem apenas implicitamente as mudanças fisiológicas das células em relação ao ambiente. O modelo considera as células como uma única unidade e as equações matemáticas são geralmente empíricas, o que limita sua capacidade de extrapolação. Apesar disso, esses modelos são relativamente fáceis de construir e são usados extensivamente;

- ii. Modelos estruturados dividem a massa da célula em compartimentos. Esses modelos incorporam um conhecimento biológico separando o biomaterial em compartimentos que são quimicamente e/ou fisicamente distintos. As interações entre compartimento-compartimento e compartimento-ambiente são descritas por equações estequiométricas, balanços de massa e energia e apresentam melhor capacidade de extrapolar do que os modelos não estruturados;
- iii. Modelos não segregados são baseados na população homogênea, utilizam uma única variável para representar toda a população;
- iv. Os modelos segregados consideram a população como heterogêneas e oferecem vantagens como relacionar as propriedades das células com atividades bioquímicas para distintas partes da população.

O desenvolvimento dos modelos matemáticos apresenta diversas etapas: avaliação da cinética dos componentes a serem representados por equações; construção dos modelos; estimação dos parâmetros; e validação do modelo. Os modelos devem conter parâmetros e estruturas matemáticas que possam representar as variações dos principais fenômenos naturais e com isso descrever satisfatoriamente um processo de interesse. Inicialmente é necessário compreender os principais fatores que podem perturbar o sistema.

Em um processo de fermentação existem diversos fenômenos que influenciam o comportamento da cinética de crescimento, síntese de produtos e consumo de substratos. No meio de cultivo devem ser observados a temperatura, pH, propriedades reológicas, sistemas multifase, etc. Já em relação ao micro-organismo, existe a heterogeneidade das células, adaptabilidade, variações genéticas, etc (BONOMI e SHMIDELL, 2001).

A descrição detalhada da influência de cada fenômeno e suas interações pode tornar o modelo muito complexo e de difícil resolução, além de exigir um conhecimento muito específico de cada acontecimento; por isso, geralmente opta-se pela construção de modelos matemáticos mais simples.

Equações diferenciais ordinárias (EDOs) podem ser utilizadas para tentar descrever a cinética dos principais componentes em processos de fermentação. Métodos numéricos são empregados para resolvê-las, os parâmetros podem ser estimados com auxílio de uma função objetivo e um método de otimização.

Após definir as EDOs, propõe-se uma função objetivo que consiste basicamente no cálculo dos resíduos entre o modelo e os dados experimentais, quanto menor seu valor, mais semelhantes são os valores experimentais em relação aos obtidos pelo modelo. Para diminuir o valor da função objetivo

utiliza-se um método de minimização que altera os valores dos parâmetros até uma condição a ser satisfeita.

A Figura 1 apresenta um diagrama simplificado para estimação dos parâmetros ótimos de modelos matemáticos baseando-se no método simplex de Nelder-Mead (PRESS et al.,1992). Valores iniciais são atribuídos aos parâmetros, calculam-se as EDOs e a função objetivo. Com esses dados a subrotina de otimização é iniciada até encontrar um valor mínimo para a função objetivo e conseqüentemente o melhor conjunto de parâmetros.

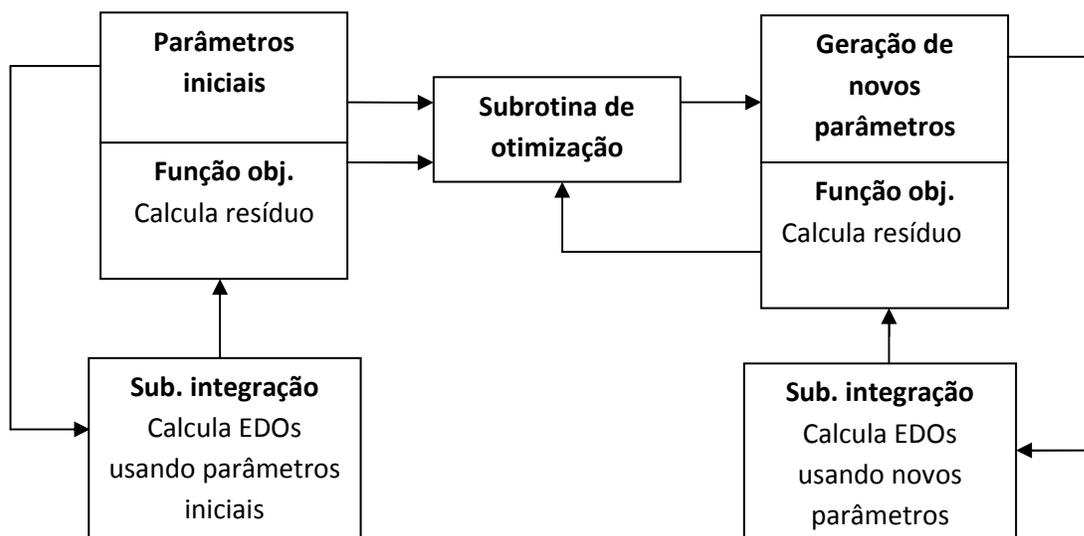


Figura 1 – Diagrama simplificado para determinação de parâmetros

3.5.1 Otimização

Problemas de otimização estão relacionados à minimização ou maximização de uma função. Uma função real $f(x)$, onde $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$, que se deseja minimizar é chamada de função objetivo, x é um n-vetor de variáveis independentes em que $x = [x_1, x_2, x_3 \dots]^T \in \mathbb{R}^n$. Em problemas de minimização com restrições, $x \in \Omega$ onde $\Omega \subset \mathbb{R}^n$, caso $\Omega = \mathbb{R}^n$, não há restrições (CHONG e ŽAK, 2001).

Quando uma função é minimizada, o valor da função pode corresponder a um mínimo local ou global. Supondo $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$ em que $\Omega \subset \mathbb{R}^n$. Mínimo local: um ponto $x^* \in \Omega$ é chamado de minimizador local se $f(x) \geq f(x^*)$ quando x estiver próximo de x^* . Mínimo global: um ponto $x^* \in \Omega$ é chamado de minimizador global se $f(x) \geq f(x^*)$ para todo x (CHONG e ŽAK, 2001).

3.5.2 Estimação dos parâmetros

Quando uma função objetivo é utilizada para descrever a habilidade do modelo em reproduzir os dados experimentais, a estimação dos parâmetros é obtida através da localização do valor ótimo desta função. Isto é realizado por diferentes formas de procura interativa através do espaço dos parâmetros, geralmente restrições dos parâmetros são levadas em consideração, e existe um amplo número de algoritmos que podem ser utilizados para esta tarefa (ALMQUIST et al., 2014).

O problema de estimação de parâmetros se torna complexo pelo fato de que a maioria dos modelos que descrevem sistemas biológicos contém não-linearidades e muitos desses modelos apresentam um número grande de parâmetros a serem estimados. Um espaço de parâmetros com alto número de dimensões em combinação com a forte não-linearidade resulta em uma forma complexa para a função objetivo, apresentando diversos ótimos locais. Desta forma, se torna difícil descobrir se o valor ótimo encontrado pelo algoritmo é um ótimo local ou global.

A função objetivo não é representada por uma equação explícita dos parâmetros do modelo, seus valores para certo vetor de parâmetros devem ser determinados a partir da resolução das equações do modelo (ALMQUIST et al., 2014).

No Apêndice encontra-se o algoritmo empregado neste trabalho para a estimação dos parâmetros utilizando o software Matlab R2013b.

3.5.3 Resolução do modelo

A avaliação da cinética do processo, assim como o estudo das formas de representar matematicamente as principais influências sobre os componentes de interesse (a partir de relações empíricas ou com o desenvolvimento de teorias) fornecem suporte para propor modelos matemáticos não-estruturados. O desenvolvimento de modelos mais complexos requer um conhecimento mais específico dos mecanismos envolvidos e apesar de representarem melhor o

processo exigem informações de difícil acesso. No entanto, modelos simples ou complexos apresentam diversos parâmetros que podem ser estimados com experimentos específicos, obtidos através de dados da literatura e/ou estimados através de um ajuste dos modelos em relação aos dados experimentais utilizando algoritmos.

Basicamente, quando equações diferenciais ordinárias (EDO) são empregadas para representar o processo, a resolução destas equações e a estimação dos parâmetros exigem duas principais funções: uma função para resolver as equações; e uma função para minimizar a função objetivo.

A função objetivo calcula o resíduo entre os dados experimentais e as soluções das equações que representam o processo. Cada ponto experimental está em um determinado tempo, e para que a solução das equações seja calculada deste tempo, pode-se realizar uma interpolação. Outra possibilidade é representar os dados experimentais por equações dependentes apenas do tempo através de um ajuste de uma função específica utilizando um software como o OriginPro 8.0. Neste caso o resíduo pode ser calculado no tempo correspondente ao tempo de integração das EDOs.

Existem diversas linguagens computacionais em que os algoritmos podem ser escritos. A linguagem Fortran é uma das mais empregadas. A subrotina DLSODE pode ser utilizada para resolver o conjunto de EDOs. A subrotina PIKAIA (NETO, 2011) e AMOEBA (PRESS et al.,1992) são algoritmos que podem ser utilizados para realizar a busca do valor ótimo para a função objetivo.

Este tipo de problema também pode ser resolvido utilizando o software Excel 2007 sem recorrer à linguagem *Visual Basic*. Com o auxílio de um suplemento (*Xnumbers*), as EDO de primeira ordem podem ser resolvidas utilizando método de Runge-Kutta de quarta ordem. A função objetivo pode ser minimizada utilizando a ferramenta *Solver* que pode empregar o método Quasi-Newton.

O software Matlab R2013b é outra ferramenta que pode ser utilizada para esta finalidade. O conjunto de equações diferenciais pode ser resolvido através da função *ode45* que utiliza o método Runge-Kutta quarta/quinta ordem, a função objetivo pode ser minimizada pela função *fmincon*, e para a interpolação pode-se usar a função *interp1* (interpolação em uma dimensão).

A função *fmincon* busca um mínimo de uma função objetivo que pode conter diversas variáveis e restrições. Os principais argumentos de entrada estão descritos a seguir (MathWorks, 2014a):

$$\min_x f(x) \begin{cases} c(x) \leq 0 \\ ceq(x) = 0 \\ A \cdot x \leq b \\ Aeq \cdot x = beq \\ lb \leq x \leq ub \end{cases}$$

Onde b e beq são vetores, A e Aeq são matrizes, $c(x)$ e $ceq(x)$ são funções que retornam vetores, e $f(x)$ é a função que retorna um escalar. Onde $f(x)$, $c(x)$ e $ceq(x)$ podem ser funções não lineares. x , lb e ub podem ser vetores ou matrizes.

Os argumentos lb e ub correspondem aos limites inferiores e superiores em que o vetor ou matriz x (parâmetros) podem assumir respectivamente. $A \cdot x \leq b$ representam as restrições lineares de desigualdade onde A é uma matriz de dimensão m por n , representando m restrições para uma dimensão n do vetor x . b apresenta a dimensão m . $Aeq \cdot x = beq$ representam as restrições lineares de igualdade e possuem a mesma forma das restrições lineares de desigualdade. Os termos $c(x) \leq 0$ e $ceq(x) = 0$ descrevem as restrições não lineares.

Essa função apresenta quatro algoritmos que podem ser escolhidos para minimizar $f(x)$: *interior-point*; *sqt (sequential quadratic programming)*; *trust-region-reflective*; e *active-set*. O algoritmo *interior-point* é a primeira opção recomendada por MathWorks (2014b). Este algoritmo lida com grandes e pequenos problemas, satisfaz os limites em todas as interações e consegue se recuperar de resultados infinitos (ex. divisões pelo número 0) ou de valores que não são reais ou complexos. Para *fmincon* pode-se incluir as derivadas parciais de primeira (gradiente) e segunda ordem. Caso os gradientes não forem adicionados, o algoritmo os estima pelo método das diferenças finitas.

Neste trabalho, a estimação dos parâmetros e a simulação dos modelos foram realizadas utilizando o Matlab e as funções já mencionadas.

3.6 Modelos matemáticos

O modelo de Bader et al. (1993) (Tabela 1) descreve a produção de três enzimas (exoglicanase, endo-glicanase e xilanase) do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* Rut C30 baseando-se em velocidades específicas de sínteses para cada enzima (r_e). Trata-se de um modelo que considera a repressão da síntese das enzimas devido à concentração de glicose (G) e xilose (Xy). As constantes de repressão pela glicose e xilose foram adicionadas ao modelo de forma análoga aos coeficientes de

inibição na hidrólise enzimática (R_G e R_X , respectivamente). O modelo para enzimas está descrito de forma genérica (Tabela 1).

Os ensaios foram realizados utilizando um substrato insolúvel (*potato pulp*) considerando a adsorção e hidrólise. O modelo para o crescimento segregava a população em células novas (X) e velhas (X_a), onde apenas as novas são capazes de sintetizar enzimas. A velocidade específica de crescimento (μ) depende da concentração de glicose e xilose.

O balanço de massa para o substrato apresenta dois termos, um relacionado à geração dos açúcares através de uma taxa de hidrólise (r_G e r_X) e outro descreve o consumo. O consumo de glicose foi considerado preferencial e adicionou-se uma constante de repressão do consumo de xilose pela glicose (R_{iG}). Na Tabela 1 os modelos estão apresentados para processo em batelada.

Tabela 1 – Modelos de Bader et al. (1993)

Modelos de enzimas, substrato e células, respectivamente
$\frac{dE_t}{dt} = \frac{r_E f(L) \mu X}{1 + \frac{G}{R_G} + \frac{Xy}{R_X}} - k_{DE} E_t$
$\frac{dG}{dt} = r_G - \frac{q_{GTm} G}{K_{GT} + G} X$
$\frac{dXy}{dt} = r_X - \frac{q_{XTm} Xy}{K_{XT} + Xy + \frac{G}{R_{iG}}} X$
$\frac{dX}{dt} = \mu f(L) X - k_{Xa} X$
$\frac{dX_a}{dt} = k_{Xa} X - \mu_a X_a$
$\mu = \left(\frac{q_{GTm} G}{K_{GT} + G} + \frac{q_{XTm} Xy}{K_{XT} + Xy + \frac{G}{R_{iG}}} \right) Y_{XTS}$

Velkovska et al. (1997) (Tabela 2) propuseram que a síntese enzimática utilizando um substrato insolúvel (celulose) para o fungo filamentosso *Trichoderma reesei* Rut C30 é não associada ao crescimento celular, havendo uma fase de crescimento onde se forma o que foi denominado micélio primário (X_p) (longo e pouco ramificado), que é acompanhado de uma alta velocidade de

consumo de substrato; assim como uma fase de produção das enzimas, com baixa velocidade de consumo de substrato e formação do micélio secundário (X_S) (curto, muito ramificado, presença intensa de clamidosporos).

Assim, o micélio primário cresce com o consumo do substrato S segundo *Monod* e se transforma no micélio secundário segundo uma equação de 1ª ordem em relação à concentração do micélio primário. O modelo também contém o termo de morte do micélio secundário ($k_d X_S$). O modelo que descreve a atividade enzimática considera que apenas os micélios secundários são capazes de gerar enzimas

O consumo de substrato foi representado por uma velocidade de hidrólise considerando que essa é igual à velocidade de consumo de substrato. O modelo de hidrólise descreve adsorção de enzimas segundo o modelo de *Langmuir*.

Tabela 2 – Modelos de Velkovska et al. (1997)

Modelos de enzimas, substrato e células, respectivamente
$\frac{dE_t}{dt} = K_2 X_S - K_3 E_t$
$\frac{dS}{dt} = -[k_4(1-x)^{k_s} + k_6] \frac{SE_f K_{ad}}{1 + E_f K_{ad}}$
$\frac{dX}{dt} = \mu X_P - k_d X_S$ $\mu = \mu_{xm} \frac{S}{S + K_S}$

O modelo de Lo et al. (2010) (Tabela 3) descreve a síntese de celulasas e lactases utilizando o fungo filamentosso *Trichoderma reesei* Rut C30 em um substrato solúvel (lactose). As velocidades específicas de sínteses de enzimas são relacionadas à cinética de Luedeking-Piret que inclui a velocidade específica de síntese associada e a não-associada ao crescimento (β). A síntese de celulasas foi considerada como não sendo associada ao crescimento do fungo. A lactose (L) foi incluída no modelo como indutor, a glicose (Glu) e a galactose (Gal) foram consideradas causadoras da repressão. A indução foi modelada com dependência do tipo *Monod*.

Para o consumo de substrato foram consideradas três equações, uma descrevendo o consumo de peptona adicionada no meio (Pep) e as outras duas para o consumo de glicose e

galactose, contendo dois termos, o primeiro é a geração a partir da hidrólise da lactose e o outro descreve o consumo.

A velocidade específica de crescimento depende preferencialmente do consumo de peptona, glicose e galactose respectivamente. Na Tabela 3 o modelo está apresentado para processo em batelada.

Tabela 3 – Modelos de Lo et al. (2010)

Modelos de enzimas, substrato e células, respectivamente
$\frac{dFPU}{dt} = \beta \frac{LX}{K_L + L \left(1 + \left(\frac{Glu}{K_{Glu}} \right) + \left(\frac{Gal}{K_{Gal}} \right) \right)}$
$\frac{dGlu}{dt} = R_H \left(\frac{180}{342} \right) - \frac{\mu_{Glu}}{Y_{X/Glu}} X$ $\frac{dGal}{dt} = R_H \left(\frac{180}{342} \right) - \frac{\mu_{Gal}}{Y_{X/Gal}} X$ $\frac{dPep}{dt} = - \frac{\mu_{Pep}}{Y_{X/Pep}} X$
$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) X$ $\mu = \frac{\mu_{Pep} Pep}{K_{Pep} + Pep} + \frac{\mu_{Glu} Glu}{K_{Glu} + Glu \left(1 + \left(\frac{Pep}{K_{iPep}} \right) \right)} +$ $\frac{\mu_{Gal} Gal}{K_{Gal} + Gal \left(1 + \left(\frac{Pep}{K_{iPep}} \right) + \left(\frac{Glu}{K_{iGlu}} \right) \right)}$

O modelo de Shahriarinnour et al. (2011) (Tabela 4) descreve o crescimento e a produção de celulasas (FPase, CMase) e da β -glicosidase pelo fungo *Aspergillus terreus* utilizando equações logísticas e a cinética de Luedeking-Piret. A FPase (atividade de papel filtro) corresponde a atividade de uma mistura de exo-glicanases e endo-glicanases e a CMase corresponde a atividade de endo-glicanase. Os ensaios foram realizados utilizando um resíduo da produção de óleo de palma como fonte de carbono. Não foi descrito um modelo para o consumo de substrato.

Tabela 4 – Modelos de Shahriarinour et al. (2011)

Modelos de enzimas, substrato e células, respectivamente
$\frac{dFPase}{dt} = a \left(\frac{dX}{dt} \right) + bX$
--
$\frac{dX}{dt} = \mu X$ $\mu = \mu_{xm} \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Fermentador BioFlo 115 de 3 L, marca New Brunswick Scientific;
- Banho termostático modelo ED marca Julabo;
- Estufa 502 marca Fanem;
- Espectrômetro de massa HPK20 marca Hiden;
- Autoclave vertical AV 225 marca Phoenix;
- Centrífuga 5810R marca Eppendorf;
- Espectrofotômetro UV-1800 marca Shimadzu;
- Medidor de pH 827pH lab marca Metrohm;
- Dessecador marca J. Prolab;
- Balança analítica marca Sartorius;
- Estufa marca Binder;
- Leitor de placas Spectra Max M3 marca Molecular Devices;
- Termociclador Veriti 96 well marca Applied Biosystems;
- Microscópio H550S com câmera digital sight DS fi2 marca Nikon;
- Shaker innova44 marca New Brunswick Scientific.

4.2 Micro-organismo

Foi empregado o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* P49P11 isolado da floresta amazônica (DELABONA et al., 2013), armazenado em geladeira em PDA (Potato Dextrose Agar) e repicado periodicamente a cada 2 meses.

4.3 Bagaço de cana-de-açúcar (BED)

O bagaço de cana-de-açúcar recebeu um pré-tratamento por explosão e deslignificação (ROCHA et al., 2012). O bagaço de cana-de-açúcar, contendo aproximadamente 50 % de umidade, foi

transferido em um reator de tanque de aço inox de 200 L e selado. Vapor foi injetado até uma pressão de quase 1,3 MPa e mantido por 15 min. Após esse tempo o reator foi subitamente despressurizado, depois o material foi transferido para um ciclone de 1000 L e coletado em barril de plástico. Em seguida foi lavado em uma centrífuga de 100 L a 1100 rpm.

A deslignificação foi realizada utilizando uma solução de NaOH de 1% (m/v). A reação foi realizada em um reator de aço inox de 350 L de capacidade e com um sistema de agitação e aquecimento, utilizando uma razão sólido-líquido de 1:10 (m/v). A operação foi conduzida a 100 °C durante 1 h. Em seguida o material foi lavado até atingir pH neutro. O sólido foi seco em temperatura ambiente e moído em moinho de facas utilizando uma abertura da peneira de 2mm.

4.4 Meios de cultura e condições experimentais

Os meios de cultura base para preparação de inóculo e para experimentos em biorreator estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição dos meios de cultura (base 1L) (PEREIRA e PRADELLA, 2010).

Composição	Meio de inóculo	Meio de cultivo 1 ¹	Meio de cultivo 2
Bagaço pré-tratado (BED)	-	-	5, 10, 15, 20 , 30 e 40 g
Celulose	10 g	-	-
Peptona	1 g	1 g	1 g
Sacarose	-	24 g	-
Solução salina	50 mL	50 mL	50 mL
Tween 80	1 mL	1 mL	1 mL

¹ Meio para teste da sonda de capacitância.

O fungo foi inoculado em meio PDA e mantido em estufa a 29 °C. Após, uma suspensão de esporos (em 20 mL Tween 80 (0,1 % v/v)) foi preparada e transferida para o Meio de Inóculo (Tabela 5). A solução salina empregada foi a solução de Mandels concentrada (MANDELS, 1957), em g/L: KH₂PO₄ 20; (NH₄)₂SO₄ 14; uréia 3; MgSO₄.7H₂O 3; CaCl₂ 3; FeSO₄.7H₂O 0,05; ZnSO₄.7H₂O 0,014; MnSO₄.H₂O 0,016; CoCl₂ 0,02. Em seguida o meio contendo o inóculo foi mantido a 29 °C, 200 rpm em *Shaker* (New Brunswick Scientific) durante 60 h.

Os ensaios foram realizados em batelada utilizando um fermentador de 3L (New Brunswick Scientific) com um impelidor *pitched blade* e um volume de inóculo de 10 % (v/v). O meio foi

esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 minutos. As condições operacionais estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições operacionais para os ensaios em biorreatores de 3L

Condições operacionais	Valores
Frequência de agitação	200 – 350 rpm
pH	5
O ₂ dissolvido	30 %
Temperatura	29°C
Fluxo de ar	0,48 – 0,7 vvm
O ₂	0 – 100 % (v/v)
Volume	1,9 L

A frequência de agitação, fluxo de ar e a porcentagem de O₂ no fluxo de ar da entrada são mantidos dentro de um intervalo para que o oxigênio dissolvido não diminua além de 30 %.

O controle de pH foi realizado automaticamente utilizando uma solução aquosa ácida de H₂SO₄ 0,4M e básica de NH₄OH na proporção 1:3 (v/v). Um agente anti-espumante de polipropilenoglicol (P2000, Dow Chemical, Brasil) foi adicionado no início de cada fermentação com uma concentração de 1 mL L⁻¹.

Os ensaios para a modelagem matemática e validação foram realizados em duplicata. O tempo de ensaio foi de 96 h.

4.5 Metodologias analíticas

4.5.1 Concentração de celulose e massa seca total

A concentração de celulose residual foi estimada segundo Ahamed e Vermette (2009). 10 mL de amostra do meio de cultivo foram centrifugados (3000 g por 20 min) e o sobrenadante removido para análise das atividades enzimáticas. A amostra sólida foi então lavada com água destilada e seca em estufa a 70 °C até massa constante. O resultado dessa etapa corresponde à massa seca total.

Em seguida a amostra foi suspensa em 3 mL de um solução de ácidos (ácido acético 80 % (v/v) e ácido nítrico puro na proporção de 10:1) e fervida por 30 min em banho de água termostaticado. Após, a amostra ser resfriada e centrifugada (3000 g por 20 min), esta foi lavada novamente com água destilada, centrifugada (3000 g por 20 min) e seca em estufa a 70 °C até massa

constante, sendo o sólido resultante composto principalmente por celulose. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.5.2 Concentração de células

A concentração de células foi estimada on-line utilizando uma sonda de capacitância (Aber Instruments, UK) que polariza as células através de um campo elétrico de radio frequência, transformando-as em pequenos capacitores. A capacitância é então mensurada por um processo eletrônico e convertida em grama de células por litro (segundo o fabricante a capacitância é proporcional à concentração de células viáveis).

A concentração de células foi estimada também pela diferença entre a massa seca total e a celulose (estimação descrita na seção 4.5.1). Apesar desse cálculo resultar em uma mistura de células, resíduos de lignina e hemiceluloses, esta massa foi considerado como contendo predominantemente células.

4.5.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática do complexo celulolítico foi dosada no sobrenadante de cultura pelo método da atividade de papel de filtro (Filter Paper Activity – FPA, GHOSE, 1987) e expressa em FPU (Filter Paper Units) por volume da enzima original, onde a escala de reação foi reduzida em 10 vezes, visando minimizar o tempo e o uso de reagente. Três discos de papel filtro Whatman Nº. 1, totalizando 5 mg, foram adicionados em tubos de ensaio contendo 100 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L (pH 4,8) juntamente com 50 µL de sobrenadante de cultura (diluído conforme necessário). As amostras foram incubadas a 50 °C por 1 hora. A reação foi cessada pela adição de 300 µL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e mantidas em banho a 95 °C por 5 minutos. Após resfriamento, 2 mL de água destilada foram adicionados aos tubos, e a absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm. O açúcar redutor foi medido pelo método de Miller (1959), empregando glicose como açúcar padrão.

A atividade da enzima β-glicosidase foi dosada empregando como substrato p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (pnpG) (SIGMA-ALDRICH), 5 mM dissolvido em tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8). O ensaio foi realizado com 80 µL de substrato e 20 µL de enzima diluída, incubados por 10 min a

50 °C. A reação foi paralisada com adição de 100 µL de 1 M de Ca₂CO₃, e a absorbância foi determinada na faixa de 400 nm em microplaca transparente (ZHANG et al., 2009).

A atividade de xilanase foi determinada empregando xilana de *birchwood* como substrato. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços como descrito: 10 µL do sobrenadante (diluído conforme necessário) foram adicionados a 40 µL de tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e 50 µL do substrato na concentração de 0,5 % em solução aquosa. A mistura foi mantida a 50 °C por 10 minutos (BAILEY e POUTANEN, 1989). O açúcar redutor foi medido pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959), pela adição de 100 µL de reagente. A xilose foi empregada como açúcar padrão.

A atividade foi calculada como recomendado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, sigla em inglês, IUPAC (GHOSE, 1987). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar um µmol de açúcar redutor por minuto, nas condições do ensaio.

Neste trabalho apenas as enzimas na fase líquida foram quantificadas.

4.5.4 Observações microscópicas

Para as observações microscópicas, 20 µL de amostra do cultivo foi inserida sob uma lâmina para microscopia e prensada por uma lamínula. As observações foram realizadas em um microscópio óptico em lâminas a fresco munido de câmara digital com software para tratamento de imagem para verificar a estrutura do micélio durante as fermentações.

4.6 Métodos Matemáticos

A estimação dos parâmetros e a simulação do modelo foram realizadas utilizando o software Matlab R2013b. O conjunto de equações diferenciais foi resolvido através da função *ode45*, a função objetivo (Equação 17) foi minimizada pela função *fmincon*, e para a interpolação foi usada a função *interp1*. A função *ode45* utiliza o método Runge-Kutta quarta/quinta ordem. O algoritmo utilizado pela função *fmincon* foi o *interior-point* e o *interp1* realiza interpolação em uma dimensão. Os ensaios contendo 5, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED foram empregados na estimação dos parâmetros e o ensaio contendo 10 g L⁻¹ foi utilizado para a validação do modelo.

4.7 Função objetivo

A função a ser minimizada pela subrotina de otimização está descrita a baixo, onde X , P e S são as concentrações de células, produtos e substrato obtidos pelo modelo, respectivamente. X_e , P_e e S_e são as concentrações de células, produtos e substrato experimentais. X_{e_m} , P_{e_m} e S_{e_m} são as maiores concentrações de células, produtos e substrato obtidos experimentalmente, n corresponde ao ponto que está sendo analisado e np é o número total de pontos a serem analisados (ANDRADE, 2009).

$$f = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - X_{e_n})^2}{X_{e_m}^2} + \frac{(P_{1n} - P_{e_{1n}})^2}{P_{e_{1m}}^2} + \frac{(P_{2n} - P_{e_{2n}})^2}{P_{e_{2m}}^2} + \frac{(P_{3n} - P_{e_{3n}})^2}{P_{e_{3m}}^2} + \frac{(S_n - S_{e_n})^2}{S_{e_m}^2} \right] \quad 17$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Células

A estimativa da concentração de células no meio de cultivo é essencial para a compreensão da cinética do processo, para cálculos de parâmetros como a velocidade específica máxima de crescimento e fatores de conversão. A análise da sua relação com produtos e substratos fornece informações sobre as velocidades específicas de formação do produto e consumo de substrato, e indica se os produtos estão associados ou não ao crescimento celular.

Em um meio de cultivo submerso contendo substâncias insolúveis, como é o caso deste estudo que utiliza bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono, torna-se impraticável a estimativa direta da concentração de células através da massa seca. Neste caso, métodos indiretos podem ser utilizados, onde se relaciona algum componente que seja mensurável e proporcional com a concentração de células através de uma equação matemática. A quantificação do consumo de O₂ ou liberação de CO₂, assim como a estimativa de DNA ou RNA são exemplos de métodos para determinar indiretamente a concentração de células (KOUTINAS et al., 2003).

Outro método indireto para a estimativa de células é através da utilização de sondas de capacitância. Em baixas frequências de rádio (0,1 – 10 MHz), a membrana celular de um micro-organismo se comporta como um capacitor elétrico, se tornando polarizada por um efeito chamado dispersão β (SCHWAN, 1957 apud NEVES et al., 2000). A magnitude do efeito é linearmente proporcional à fração de volume de células (KELL et al., 1987 apud NEVES et al., 2000). Para a medição on-line da concentração de células, utiliza-se um instrumento que mede a permissividade dielétrica do meio, sendo esta diretamente proporcional à capacitância (KELLET al., 1987 apud NEVES et al., 2000).

Algumas das principais vantagens da utilização desta sonda de capacitância incluem a obtenção on-line de dados experimentais e a possibilidade do cálculo instantâneo da velocidade específica de crescimento. Essas informações podem ajudar na elaboração de estratégias de controle automático de alimentação para estender o processo de batelada para batelada alimentada visando o aumento da produção de enzimas.

Além disso, não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizem esta sonda para estimacão da concentraão de células de fungos filamentosos, apenas para bactérias e leveduras (micro-organismos unicelulares).

Para verificar a proporcionalidade entre o sinal da sonda e a concentraão de células do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, realizou-se uma fermentaão em batelada (Meio de cultivo 1, descrito na Tabela 5), em meio solúvel contendo sacarose (24 g L^{-1}) como substrato para ser possível a estimacão direta da concentraão de células por massa seca. Depois o valor encontrado foi relacionado com o sinal da sonda.

A Figura 2 apresenta os perfis das curvas de concentraão de células obtidas por determinaão de massa seca e o sinal da sonda de capacitância em funão do tempo. Observa-se que os dois perfis são semelhantes e relacionando as duas curvas (Figura 3), obtêm-se uma reta ($y = 2,766x + 1,71$) com bom ajuste ($r^2 = 0,972$). Esse resultado indica que o sinal da sonda é linearmente proporcional à concentraão de células.

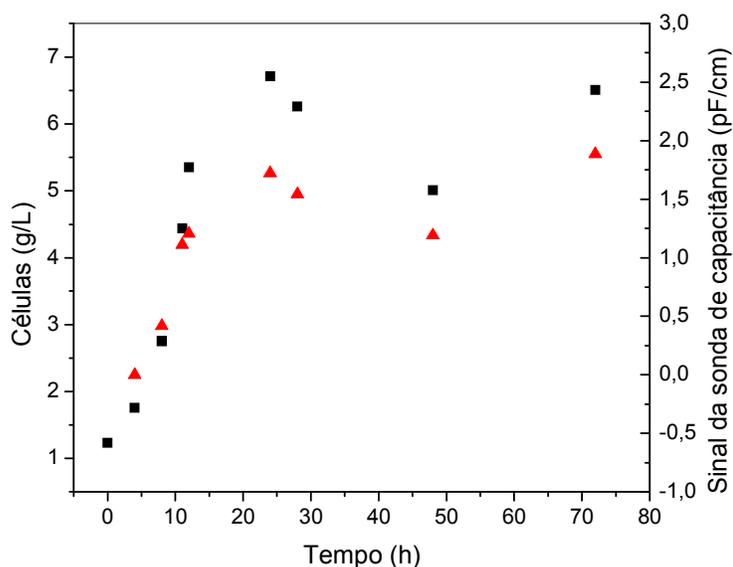


Figura 2 – Concentraão de células (■) e sinal da sonda de capacitância (▲) em funão do tempo

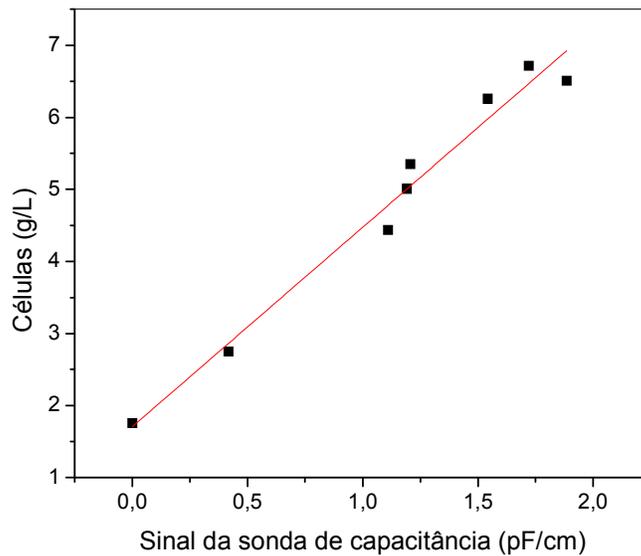


Figura 3 – Relação entre a concentração de células e sinal da sonda de capacitância

Para verificar se a variação de substrato insolúvel (BED) causaria alguma interferência no sinal da sonda, foram realizados dois testes contendo apenas o substrato. Variou-se a quantidade de substrato no meio durante certo período, aumentando (Figura 4A) e diminuindo (Figura 4B) sua concentração. Para aumentar a concentração de sólido insolúvel adicionou-se o substrato e para diminuir adicionou-se água, ambos periodicamente.

O aumento e a diminuição da concentração de substrato nas condições analisadas causaram interferências no sinal da sonda de capacitância; o sinal diminuiu com o aumento da concentração e aumentou com a diminuição da concentração, resultado indesejável, já que se esperava que a sonda medisse apenas a concentração de células viáveis.

Além disso, foram realizadas duas fermentações contendo 10 e 15 g L⁻¹ de BED (Meio de cultivo 2) (Figura 4C e 4D, respectivamente). O crescimento celular foi avaliado com auxílio da sonda de capacitância. As células também foram estimadas através da diferença entre a concentração de sólidos totais e a concentração de celulose desconsiderando os resíduos de lignina, hemiceluloses e cinzas (outros) através da Equação 18. A concentração de sólidos totais e celulose foram determinadas pela metodologia descrita na sessão 4.5.1.

$$\text{células} + \text{outros} = \text{sólidos totais} - \text{celulose}$$

18

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4C e 4D, os valores estimados utilizando a sonda de capacitância foram superiores aos valores estimados pela Equação 18, principalmente no ensaio contendo 10 g L⁻¹ de BED. A sonda de capacitância demonstrou ser coerente no ensaio contendo substrato solúvel; no entanto, a presença de material insolúvel (BED) pode causar interferências na estimativa da concentração de células (superestimação). Devido a isso, a Equação 18 foi utilizada para estimar a concentração de células dos demais ensaios.

Apesar das interferências, a sonda de capacitância pode ser empregada para análise qualitativa do crescimento celular em meio insolúvel.

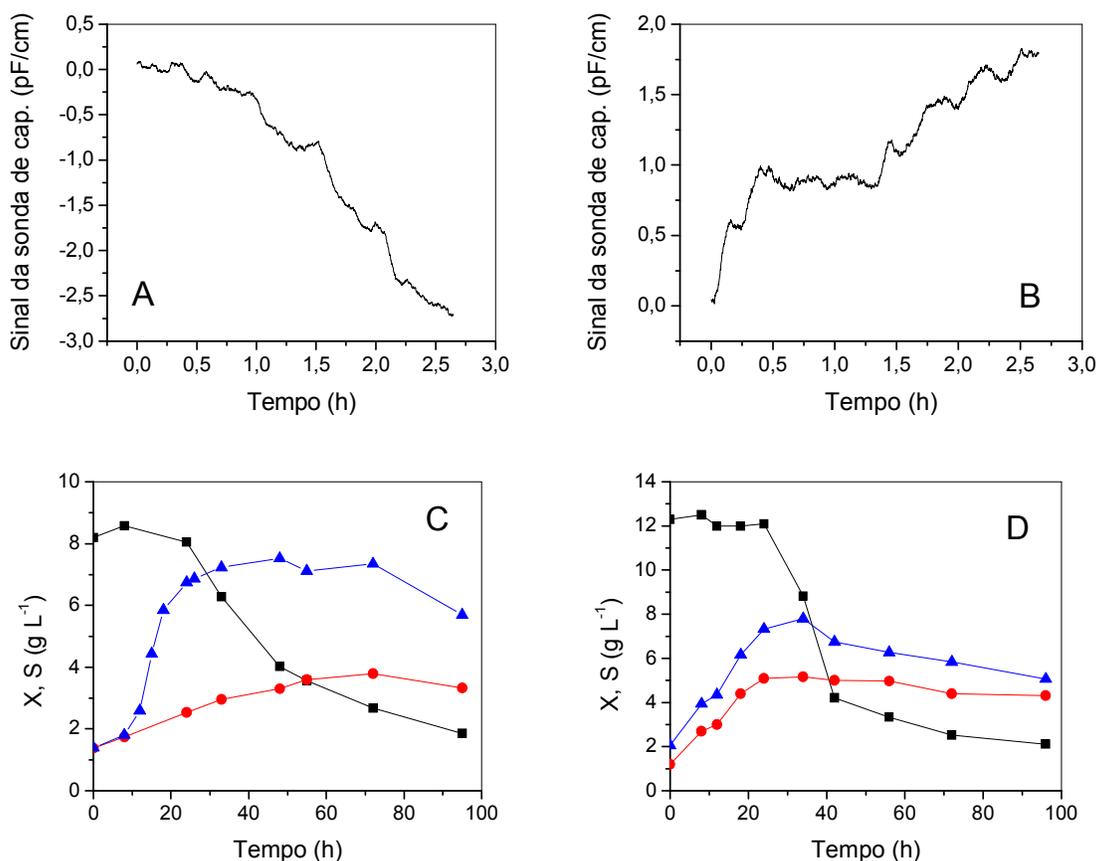


Figura 4 – Interferência no sinal da sonda de capacitância devido ao aumento da concentração de BED (A), e a redução da concentração de BED (B). Variação das concentrações de celulose - S (■), concentração de células estimada com auxílio da sonda de capacitância - X (▲) e pela Equação 18 - X (●) em função do tempo (C – 10 g L⁻¹ e D – 15 g L⁻¹ de BED).

Outra forma de quantificar o crescimento é através da estimativa do CO₂ liberado pelas células. A Figura 5 apresenta o perfil de porcentagem de CO₂ liberado pelas células nos cultivos utilizando 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED. O CO₂ foi estimado por um espectrômetro de massas (seção 4.1) com aquisição on-line dos dados

Observa-se que o aumento da concentração de substrato proporcionou um aumento na liberação de CO₂. O pico máximo de liberação de CO₂ para os cultivos ficou entre 22 e 38 h. À medida que se aumenta a concentração de BED esse pico é deslocado da esquerda para direita sugerindo que quanto maior a concentração de BED maior o atraso no crescimento.

A estimação do crescimento através da liberação de CO₂ torna-se uma alternativa interessante, pois os perfis de crescimento celular parecem ser proporcionais a liberação de CO₂ (Figuras 5 e 8). Para estimar a concentração de células a partir da liberação de CO₂ pode-se construir uma curva de calibração como foi realizado com a sonda de capacitância conforme descrito anteriormente. Neste trabalho não foi definida uma relação entre células e CO₂, mas essa ideia pode ser explorada no futuro.

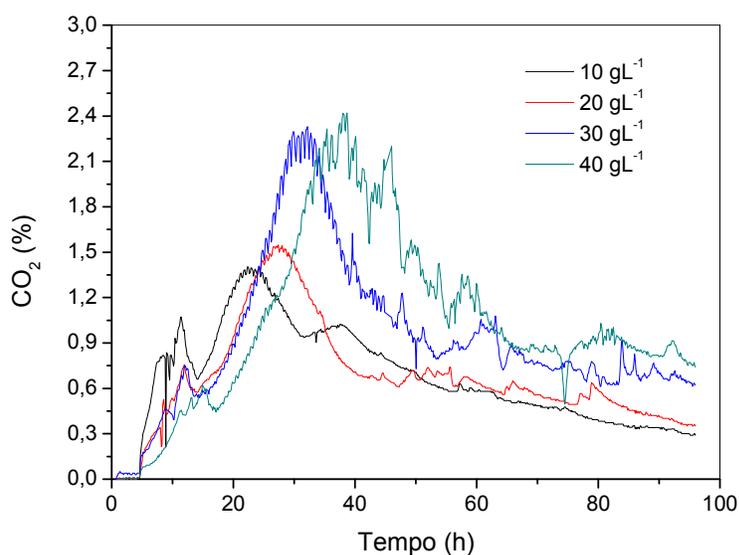


Figura 5 – Perfis de CO₂ liberado durante as fermentações utilizando 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED

5.1.1 Micrografias

No trabalho de Velkovska et al. (1997) há a descrição de duas estruturas de micélio para cultivo de *Trichoderma reesei* Rut C30. No início do cultivo o micélio é pouco ramificado e foi denominado como micélio primário. Após algum tempo de cultivo esse micélio foi se tornando mais ramificado, sendo denominado de micélio secundário (Figura 6). Essa estrutura de micélio foi considerada como sendo a principal responsável pela produção de enzimas.

Fonte: Velkovska et al., (1997)

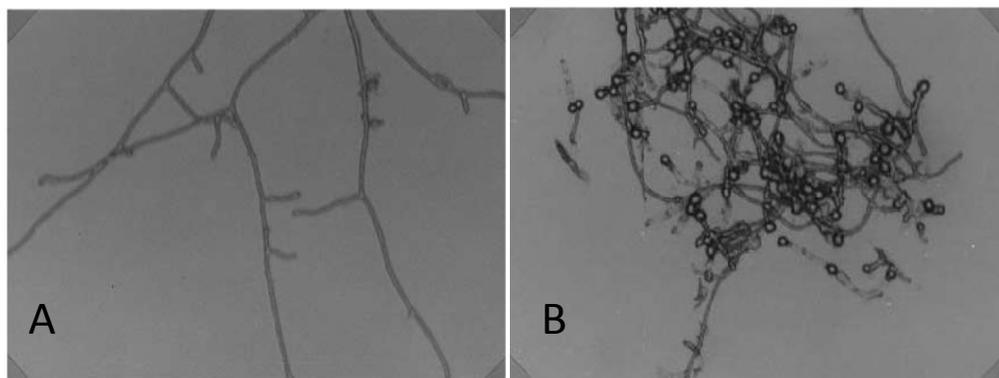


Figura 6 – Micrografias do fungo *Trichoderma reesei* RUT C30 (A) micélio primário, (B) micélio secundário

Durante o cultivo utilizando BED (Meio de cultivo 2, Tabela 1) foram observadas algumas micrografias do meio para tentar identificar se ocorre a formação de micélio secundário.

As micrografias A, B, C e D correspondem aos tempos 0, 28, 48 e 72 h de fermentação respectivamente (Figura 7). Micélios longos e pouco ramificados foram observados durante todo o cultivo, indicando que, aparentemente, não há formação de uma estrutura semelhante ao micélio secundário.

Caso houvesse a formação de micélio primário e secundário as equações para crescimento celular descritas na Tabela 2 poderiam ser utilizadas.

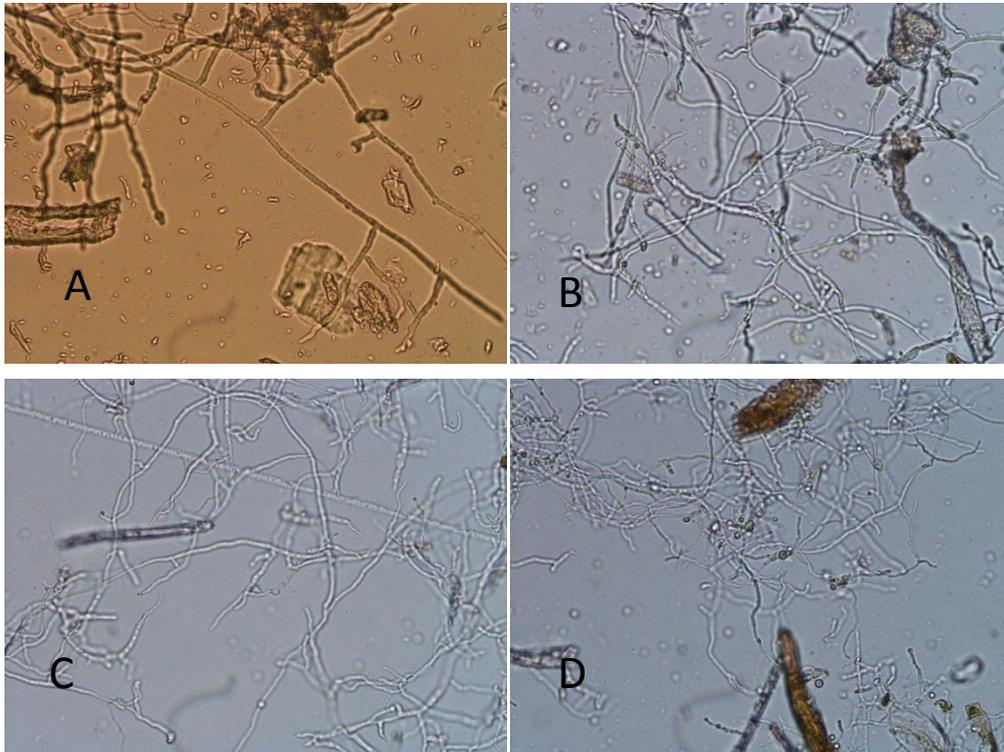


Figura 7 – Micrografias do fungo *Trichoderma harzianum* em meio contendo BED (aumento de 400 X). A – 0 h, B – 28 h, C 48 h e D – 72 h de cultivo utilizando 30 g L⁻¹ de BED.

5.2 Cinética

O estudo da cinética deste processo de fermentação foi avaliado em relação à variação da concentração inicial de substrato (BED) em 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹. A Figura 8 apresenta a variação da concentração de células em função do tempo. O aumento da concentração de BED proporcionou um aumento da concentração de células.

Observa-se que os ensaios iniciaram na fase onde há a velocidade específica máxima de crescimento celular. O período de crescimento ocorre até aproximadamente 30 h, após esse tempo, a taxa de perda de massa celular torna-se superior ao crescimento, sendo mais acentuada à medida que se aumenta a concentração de substrato.

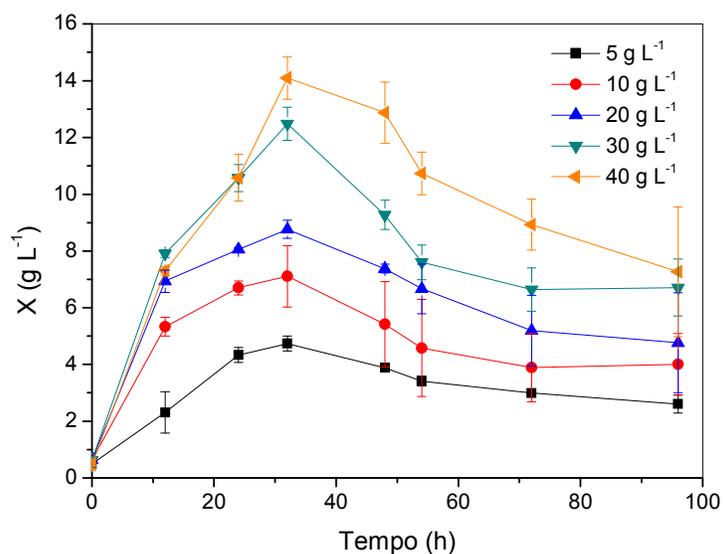


Figura 8 – Variação da concentração de células em função do tempo para os ensaios contendo 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED

A Figura 9 mostra a variação da concentração de celulose para os ensaios analisados. Nas primeiras 12 horas de cultivo não são observadas grandes variações na sua concentração. Em seguida ocorre o período correspondente ao máximo consumo de substrato entre 25 e 45 h. Após 45 h o consumo de substrato tende a estabilizar. À medida que se aumenta a concentração de substrato, o resíduo desta concentração também aumenta no final dos cultivos. A porcentagem de celulose não consumida no final dos ensaios ficou em torno de 16 % (m/m) em relação à concentração inicial.

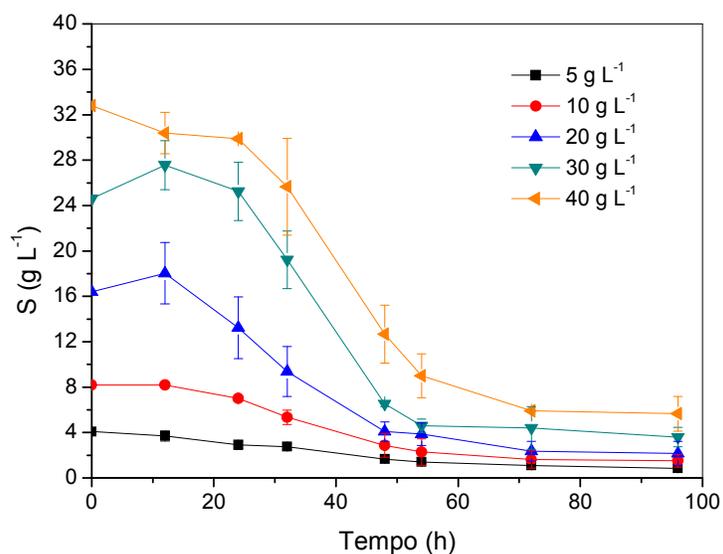


Figura 9 – Variação da concentração de celulose em função do tempo para os ensaios contendo 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam a variação da atividade de celulase (FPase), beta-glicosidase e xilanase em função do tempo, respectivamente. Nas primeiras horas de cultivo também não são observadas grandes variações na atividade das enzimas.

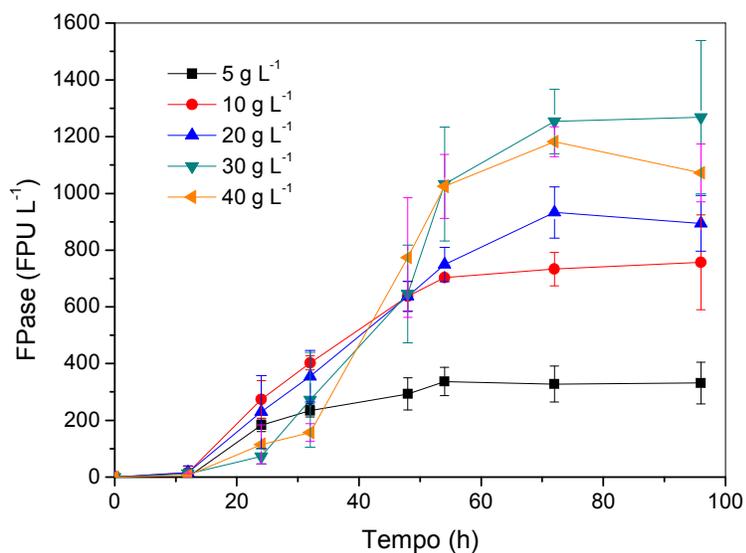


Figura 10 – Variação da atividade de celulase (FPase) em função do tempo para os ensaios contendo 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED

O aumento da concentração de BED de 5 a 30 g L⁻¹ proporcionou um aumento na atividade das enzimas avaliadas. Quando 40 g L⁻¹ de BED foi empregado, a atividade de beta-glicosidase diminuiu (Figura 11) e as atividades de FPase e xilanase (Figura 10 e 12, respectivamente) ficaram semelhantes a condição de 30 g L⁻¹ de BED, indicando que ocorreu inibição pelo substrato.

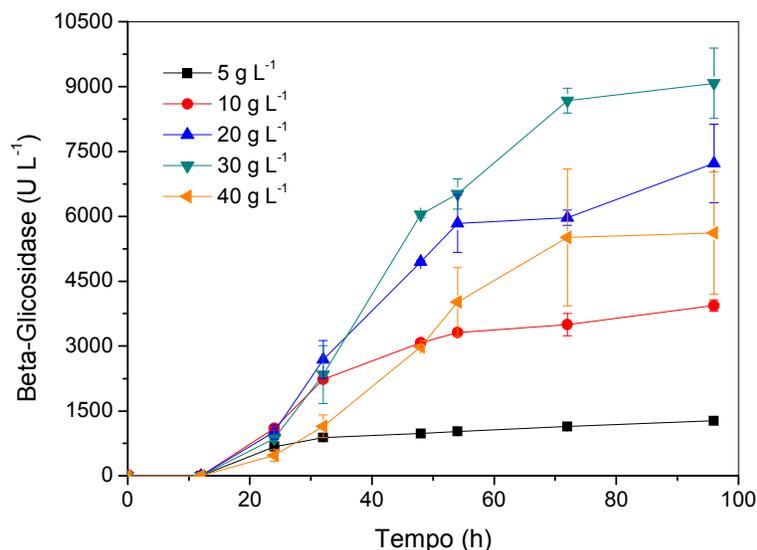


Figura 11 – Variação da atividade de Beta-glicosidase em função do tempo para os ensaios contendo 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED

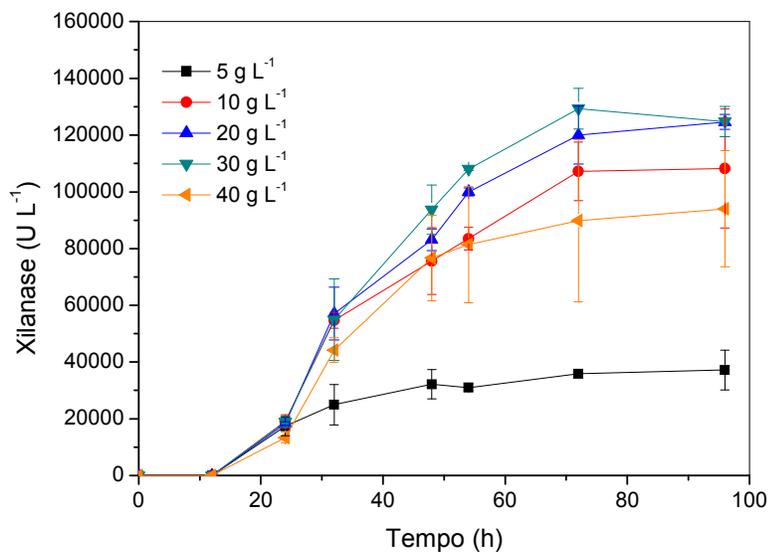


Figura 12 – Variação da atividade de Xilanase em função do tempo para os ensaios contendo 5, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED

Observa-se que o período onde ocorre a variação da atividade das enzimas equivale ao período em que ocorre a variação da concentração de substrato. A Figura 13 apresenta a velocidade da variação de celulases (FPase) e celulose para o ensaio contendo 20 g L⁻¹ de BED. De acordo com a Figura 13, a variação semelhante das duas velocidades indica proporcionalidade.

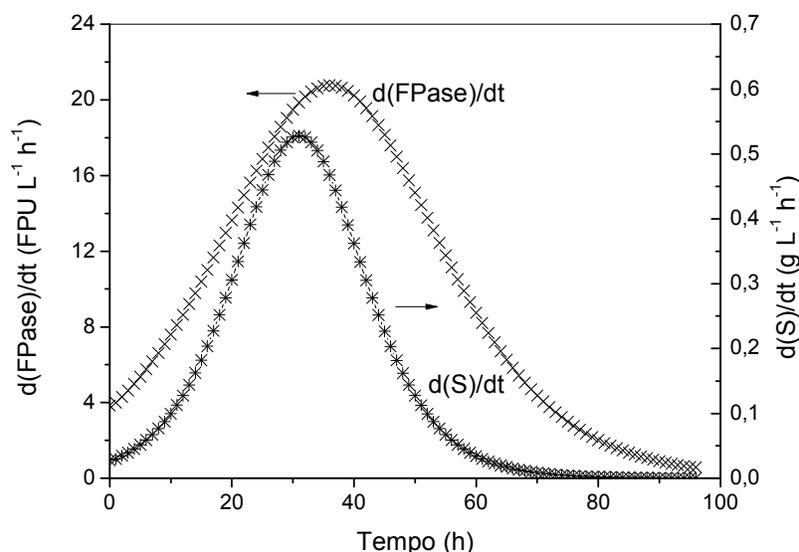


Figura 13 – Variação das velocidades $d(\text{FPase})/dt$ e $d(\text{S})/dt$ em função do tempo para o 20 g L⁻¹ de BED. Valores estimados utilizando o software OriginPro 8.0

Nas primeiras horas de cultivo houve pouco consumo de substrato e produção de enzimas, contudo, ocorre um aumento da massa celular. Nesse período as células podem estar consumindo a peptona e também açúcares que podem ter sido liberados durante o período de esterilização (121 °C durante 30 min.). Para tentar explicar a baixa atividade de enzimas no início do processo pode-se supor que as primeiras horas correspondem a um período de produção das enzimas, onde a velocidade de produção supera a de secreção (até 16 h), em seguida ocorre produção e secreção (entre 16 e 55 h), e no final de cultivo não há mais produção, apenas secreção. Nos modelos matemáticos propostos não foi feita distinção entre produção e secreção de enzimas, no entanto essa ideia pode ser melhor explorada em estudos futuros.

5.3 Modelos matemáticos

5.3.1 Fase inicial

Nas primeiras horas não foram observadas grandes variações no consumo de substrato e produção de enzimas. Para representar esse atraso foi adicionada uma expressão proposta por Bergter e Knorre (1972) (BADER et al., 1993):

$$f(t) = \left(1 - e^{\left(-\frac{t}{T_L}\right)}\right) \quad 19$$

No início do processo, quando o tempo tende a zero, esta equação também tende a zero. Quando adicionada nas velocidades de consumo de substrato e formação dos produtos, esta equação garante que no início da fermentação as concentrações de substrato e produtos (enzimas) não variem consideravelmente.

5.3.2 Células

A Equação 6 representa o balanço de massa para células, sendo composta por duas parcelas, uma descreve o crescimento e a outra a perda de massa celular. A velocidade de crescimento é considerada dependente da velocidade específica de crescimento (μ_x) e proporcional à concentração de células (Equação 1). De acordo com a Figura 8, o aumento da concentração de substrato proporciona um aumento na concentração de células, portanto a velocidade de crescimento deve ser considerada dependente da concentração de substrato.

A equação de Monod (Equação 2) foi empregada para descrever a velocidade específica de crescimento devido a sua simplicidade e dependência de S.

Os valores semelhantes para as maiores concentrações de células nos ensaios contendo 30 e 40 g L⁻¹ de BED sugere que pode haver um valor de concentração máximo à medida que se aumenta a concentração de substrato. Por isso, foi adicionado um termo de repressão do crescimento celular análogo ao termo de inibição por produto descrito em Levenspiel (1999) $\left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r$. A Equação 20 representa a velocidade de crescimento e a Equação 21, a velocidade específica de crescimento.

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_c = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r X \quad 20$$

$$\mu_X = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r \quad 21$$

A velocidade de perda de massa celular foi também considerada dependente de uma velocidade específica e proporcional a X . De acordo com a Figura 8, quanto maior a concentração de substrato empregada, maior é o decréscimo da concentração de células após 30 h. Desta forma, a velocidade específica de perda de massa celular também foi descrita dependente da concentração de substrato utilizando a equação de *Monod*.

Adicionou-se a Equação 19 para que esta velocidade tenha pouca influência no início, já que se espera que haja pouca perda de massa celular no começo na fermentação. As Equações 22, 23 e 24 correspondem à velocidade de perda de massa celular, velocidade específica de perda de massa celular, e o balanço de massa para o crescimento, respectivamente.

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_d = f(t)\mu_{md} \left(\frac{S}{K_{Sd} + S}\right) X \quad 22$$

$$\mu_{Xd} = f(t)\mu_{md} \left(\frac{S}{K_{Sd} + S}\right) \quad 23$$

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu_X - \mu_{Xd}) \quad 24$$

5.3.3 Enzimas

A Equação 9 representa a velocidade de formação do produto que contém um termo associado ao crescimento ($Y_{pX}\mu_X$) e outro não associado ao crescimento (m_p). Analisando a cinética de atividade das enzimas e concentração de células, observa-se que o crescimento ocorre no início do processo onde há baixa atividade enzimática. Isso sugere que durante o crescimento pode haver pouca formação de enzimas e por isso apenas o termo não associado ao crescimento foi utilizado nos modelos de formação dos produtos. Os balanços de massa para atividades de FPase, beta-glicosidase e xilanase estão representados pelas Equações 25, 26 e 27, respectivamente.

A perda de atividade enzimática foi representada por uma equação de primeira ordem de acordo com a Equação 11.

$$\frac{dF}{dt} = f(t)m_F X \left(1 - \frac{F}{F_m}\right)^n \left(-K_{FS} \frac{dS}{dt}\right) \left(\frac{1}{1 + S/K_{iF}}\right) - FK_{Fd} \quad 25$$

$$\frac{dB}{dt} = f(t)m_B X \left(1 - \frac{B}{B_m}\right)^o \left(-K_{BS} \frac{dS}{dt}\right) \left(\frac{1}{1 + S/K_{iB}}\right) - BK_{Bd} \quad 26$$

$$\frac{dXy}{dt} = f(t)m_{Xy} X \left(1 - \frac{Xy}{Xy_m}\right)^p \left(-K_{Xys} \frac{dS}{dt}\right) \left(\frac{1}{1 + S/K_{iXy}}\right) - XyK_{Xyd} \quad 27$$

Para tentar representar a indução e repressão da formação de enzima, três termos foram empregados, um relacionado à indução e os outros dois relacionados à repressão catabólica:

- *Termo de indução*

$$\left(-K_{PS} \frac{dS}{dt}\right)$$

O termo de indução foi adicionado a partir das observações dos resultados da cinética. A velocidade de consumo de substrato (celulose) mostrou ser proporcional a velocidade de formação das enzimas (Figuras 13). Quanto maior a velocidade de consumo de substrato, maior foi a velocidade de formação das enzimas. A celulose é considerada como um indutor indireto que a partir de sua degradação, por enzimas constitutivas, pode formar substratos indutores (ARO, 2003; SUTO e TOMITA, 2001), e quanto maior a velocidade de consumo de celulose, maior pode ser a formação desses indutores, assim contribuindo com o aumento da velocidade de formação de enzimas.

- *Termos de repressão*

$$a) \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^y$$

$$b) \left(\frac{1}{1 + S/K_{iP}} \right)$$

O primeiro (a) é um termo de repressão da formação de enzimas análogo ao termo de inibição por produto descrito em Levenspiel (1999). Esse termo indica que quanto maior a atividade de enzimas menor será seu valor, ou seja, quanto mais próximo P (atividade enzimática) estiver de P_m (atividade enzimática máxima) menor será a velocidade de síntese da enzima. O expoente y controla a influência dessa repressão, quanto menor seu valor ($y \rightarrow 0$) menor vai ser a contribuição desse termo na velocidade de formação das enzimas.

Pode-se dizer que as atividades próximas do valor de P_m indicam atividades consideradas suficientes pelo fungo. Quando P está próximo de P_m não há mais necessidade de gastar energia para produzir enzimas, ou porque as enzimas presentes já são suficientes para a liberação dos açúcares (repressão catabólica) ou o substrato indutor está acabando. Segundo Suto e Tomita (2001), o processo de síntese de enzimas consome energia e por isso a transcrição dos genes de celulasas e hemicelulasas é cuidadosamente regulado, assim o fungo pode reagir e se beneficiar das mudanças do ambiente para obter energia e carbono dos substratos mais suscetíveis e evitar a produção desnecessária dessas enzimas.

O segundo termo de repressão (b) foi adicionado ao modelo de acordo com as observações experimentais. O aumento da concentração de substrato de 30 g L^{-1} para 40 g L^{-1} de BED não proporcionou um aumento na atividade enzimática, sugerindo que pode ter ocorrido inibição da formação de enzimas pelo substrato. Quanto maior a concentração de substrato maior a contribuição desse termo de repressão e menor será a velocidade de formação da enzima.

5.3.4 Substrato

A Equação 15 descreve o consumo de substrato para o crescimento (μ_X/Y_{XS}), formação de produto (μ_P/Y_{PS}) e manutenção das células (m_S). Para simplificar o modelo apenas o consumo relacionado ao crescimento celular foi considerado (Equação 28).

$$\frac{dS}{dt} = -f(t) \frac{\mu_X}{Y_{XS}} X \quad 28$$

5.4 Estimação dos parâmetros

Para a estimação dos parâmetros foram empregados os ensaios contendo 5, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED e as cinco equações representando o crescimento celular, consumo de substrato e formação de enzimas (descritas na seção 5.3) contendo um total de 26 parâmetros. Os parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 8. A estimação de alguns parâmetros a partir dos dados experimentais (Tabela 8 - valor estimado) foi realizada para servir como base no chute inicial para estimação dos parâmetros pelo software Matlab (Tabela 8 - valor modelo).

A Tabela 7 mostra a forma que alguns parâmetros foram estimados utilizando os dados experimentais. A velocidade específica de formação do produto (enzimas) não associada ao crescimento (m_p) foi considerada como uma velocidade específica máxima (μ_{pm}). A velocidade específica de crescimento aumenta à medida que o tempo tende à zero de acordo com a análise da cinética de crescimento, desta forma a velocidade específica máxima de crescimento se localiza no início da fermentação. As derivadas foram calculadas utilizando o software OringinPro 8.0. Os demais parâmetros não indicados na Tabela 7 e presentes na Tabela 8 (valores estimados) foram estimados a partir de observações dos resultados da cinética.

Tabela 7 – Estimação de parâmetros a partir dos dados experimentais

Parâmetro	Considerações
μ_m	$\lim_{t \rightarrow 0} (\mu_x) \cong \mu_m$ $\mu_x = \left(\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \right)_c$
$m_p = \mu_{pm}$	$\lim_{\left(\frac{d\mu_p}{dt} \right) \rightarrow 0} (\mu_p) \cong \mu_{pm}$ $\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$
Y_{XS}^1	$Y_{XS} \cong \frac{\Delta X}{\Delta S}$

¹ estimado entre 0 e 32 h, período de crescimento.

Tabela 8 – Estimação dos parâmetros

Parâmetros	Valor Modelo	Valor Estimado	Unidades
μ_m	0,444	0,31 – 1,21	h^{-1}
K_S	6,932	-	$g L^{-1}$
X_m	16,873	> 16	$g L^{-1}$
r	1,468	-	-
μ_{md}	0,104	-	h^{-1}
K_{Sd}	1,031	-	$g L^{-1}$
T_L	15,87	< 24	h
Y_{XS}	1,986	1,2 – 3, 4	$g g^{-1}$
m_F	4,184	2,4-5,1	FPU $g^{-1} h^{-1}$
F_m	1998,32	> 1300	FPU L^{-1}
n	1,662	-	-
K_{FS}	14,380	-	$L h g^{-1}$
K_{iF}	3,382	-	$g L^{-1}$
K_{Fd}	0,004	-	h^{-1}
m_B	23,644	12-20	$U g^{-1} h^{-1}$
B_m	10119,27	> 9100	$U L^{-1}$
o	0,970	-	-
K_{BS}	6,492	-	$L h g^{-1}$
K_{iB}	7,960	-	$g L^{-1}$
K_{Bd}	0,001	-	h^{-1}
m_{XY}	549,916	288-450	$U g^{-1} h^{-1}$
Xy_m	180000,23	> 170000	$U L^{-1}$
p	2,101	-	-
K_{XyS}	10,213	-	$L h g^{-1}$
K_{iXy}	6,006	-	$g L^{-1}$
K_{Xyd}	0,001	-	h^{-1}

A comparação de alguns parâmetros está apresentada na Tabela 9. Não foram encontrados na literatura modelos matemáticos que descrevem a cinética do processo de fermentação utilizando o *Trichoderma harzianum*. No entanto, alguns parâmetros foram comparados com os do trabalho de Velkovska et al. (1997) e Ma et al. (2013), que utilizaram o *Trichoderma reesei* e celulose como fonte de carbono e também com o trabalho de Shahriarinnour et al. (2011) que utilizou o fungo *Aspergillus terreus* e um resíduo da produção de óleo de palma como fonte de carbono, todos para a produção de celulases.

Observa-se que o maior valor para a velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) foi obtido pelo *Trichoderma harzianum* em relação aos outros trabalhos indicando maior velocidade de geração de células por grama de células presente no meio. O fator de conversão de células em relação ao substrato (Y_{XS}) também foi maior em comparação com o trabalho de Ma et al. (2013), mostrando que o crescimento celular foi proporcionado por um consumo menor de substrato. A constante da velocidade específica de formação de celulases (representada pela atividade de FPase) não associada ao crescimento (m_F) foi maior que a do trabalho de Velkovska et al. (1997), indicando maior produtividade de celulases em relação a concentração de células. A produção de celulases pelo fungo *Aspergillus terreus* (SHAHRIARINOUR et al., 2011) foi considerada associada apenas ao crescimento celular por isso $m_F = 0$

Tabela 9 – Comparação de parâmetros

Parâmetros						Referências
μ_m (h ⁻¹)	K_S (g L ⁻¹)	X_m (g L ⁻¹)	k_{Fd} (h ⁻¹)	Y_{XS} (g g ⁻¹)	m_F (FPU g ⁻¹ h ⁻¹)	
0,06 – 0,125	3,6-5,5	-	3,5E-4 – 3,9 E-4	-	0,67-2,18	VELKOVSKA et al. (1997)
0,096	11,27	-	0,018	1,19	-	MA et al. (2013)
4,1E-3-7,1E-3	-	7,15-11,54	-	-	0	SHAHRIARINOUR et al. (2011)
0,44	6,93	16,88	0,004	1,99	4,18	Neste trabalho

5.5 Resultados dos modelos

As Figuras 14, 16, 18 e 20 apresentam os dados experimentais e os resultados dos modelos para as concentrações de células, celulose e atividade de FPase. Já as Figuras 15, 17, 19 e 21 mostram os dados experimentais de atividade de beta-glicosidase, xilanase e o ajuste dos modelos.

Os modelos conseguiram representar bem os perfis das curvas experimentais com um bom ajuste para a maioria dos ensaios. Os modelos propostos para crescimento celular, atividade de FPase e xilanase parecem descrever bem os dados experimentais para esses ensaios. O modelo para descrever a concentração de celulose se ajustou bem aos dados, exceto para a condição de 5 g L⁻¹ de BED (Figura 14) onde houve uma superestimação do consumo de substrato. As simplificações neste modelo podem ter contribuído para a falta de ajuste nesta condição.

A atividade de beta-glicosidase foi bem descrita pelo modelo, apenas na condição de 30 g L⁻¹ de BED (Figura 19) o modelo proporcionou um ajuste ruim. A adição do termo de inibição pelo substrato pode ter influenciado no decréscimo dos valores do modelo, pois esse modelo considera que em altas

concentrações de substrato ocorre inibição da produção de enzimas, no entanto a inibição prevista pelo modelo para beta-glicosidase parece ser maior do que realmente acontece nesta condição.

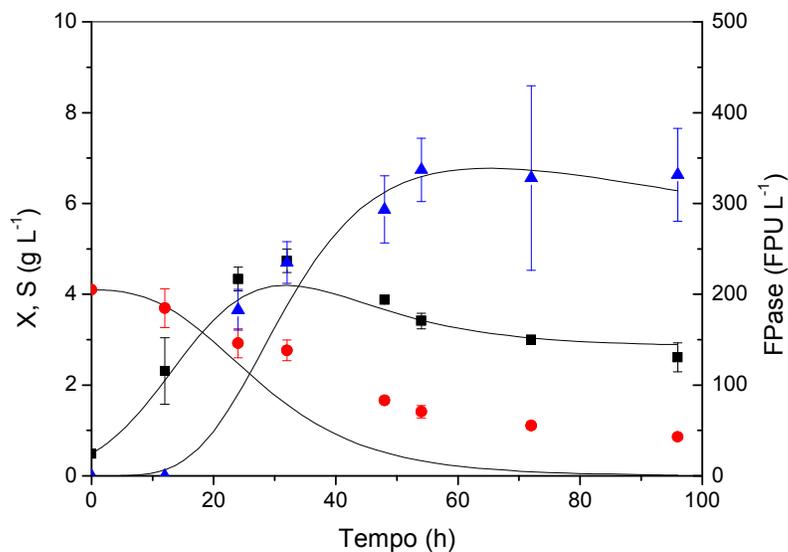


Figura 14 – Perfis das concentrações de celulose (●), células (■), atividade de FPase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 5 g L⁻¹ de BED

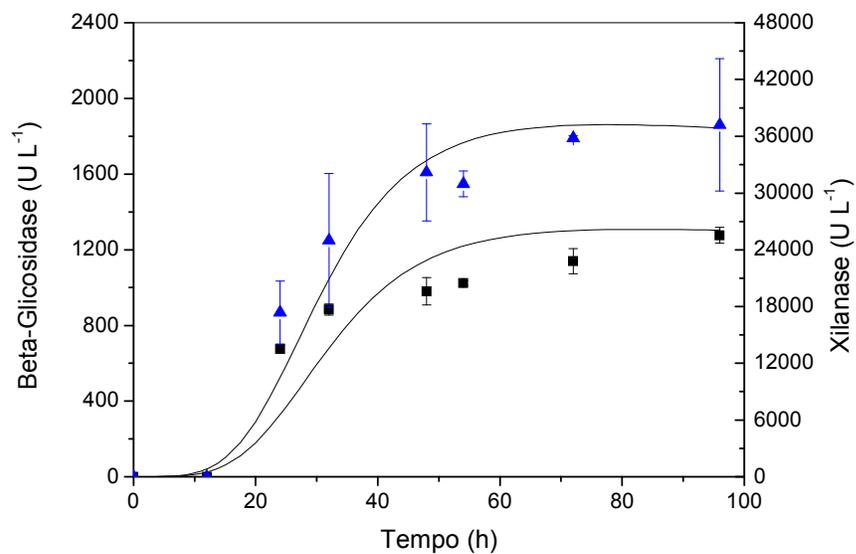


Figura 15 – Perfis das atividades de Beta-glicosidase (■) e Xilanase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 5 g L⁻¹ de BED

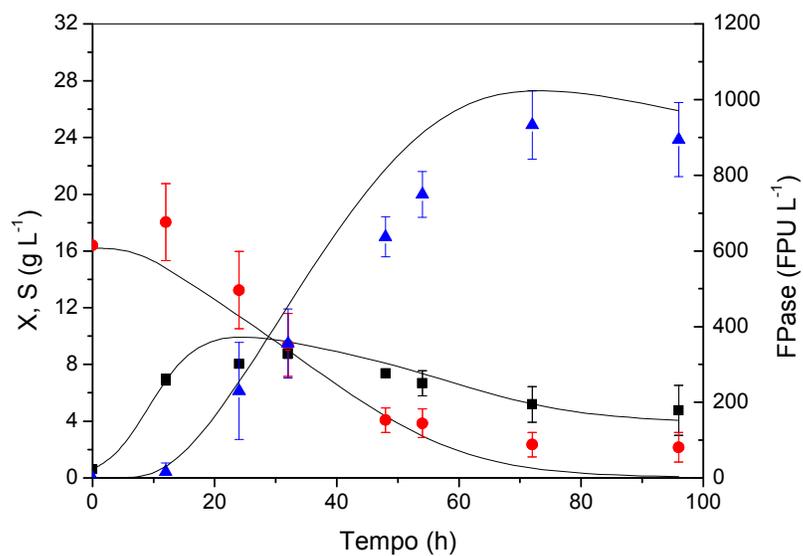


Figura 16 – Perfis das concentrações de celulose (●), células (■), atividade de FPase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 20 g L⁻¹ de BED

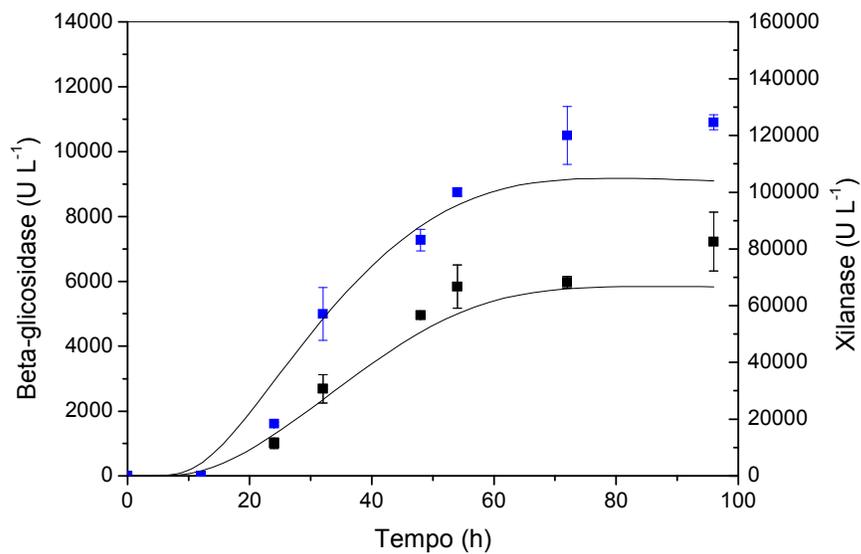


Figura 17 – Perfis das atividades de Beta-glicosidase (■) e Xilanase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 20 g L⁻¹ de BED

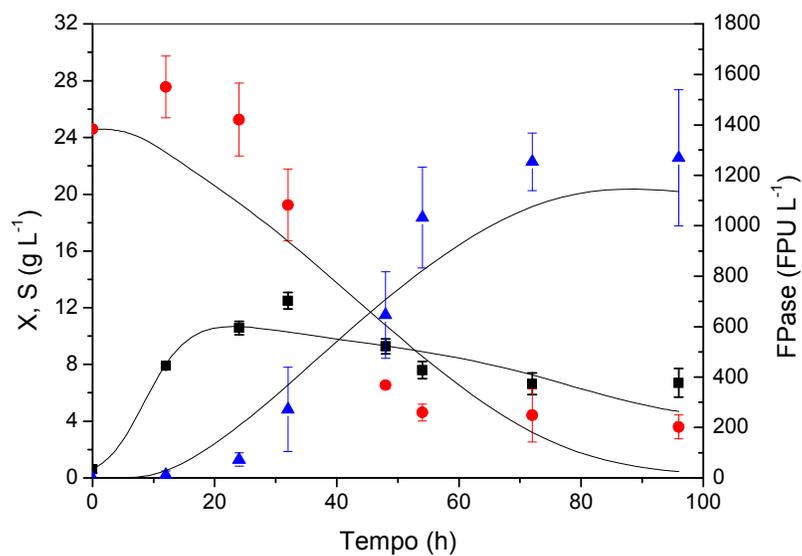


Figura 18 – Perfis das concentrações de celulose (●), células (■), atividade de FPase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 30 g L⁻¹ de BED

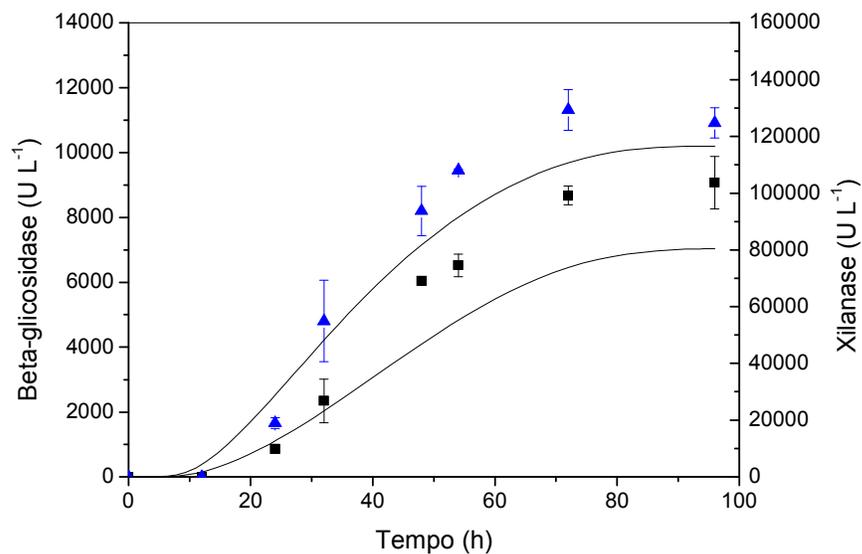


Figura 19 – Perfis das atividades de Beta-glicosidase (■) e Xilanase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 30 g L⁻¹ de BED

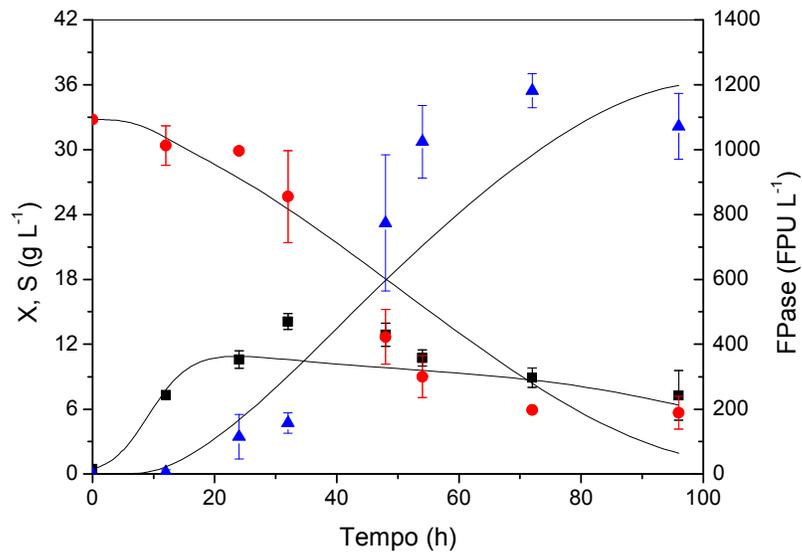


Figura 20 – Perfis das concentrações de celulose (●), células (■), atividade de FPase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 40 g L⁻¹ de BED

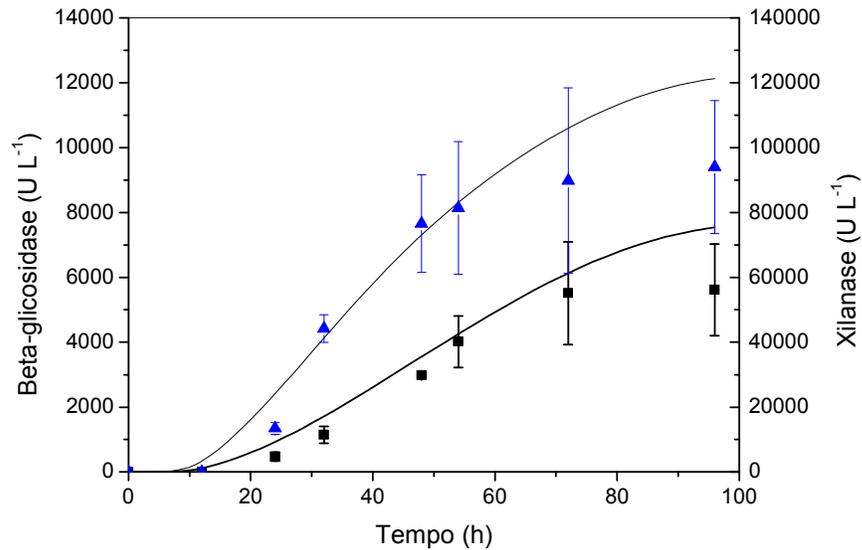


Figura 21 – Perfis das atividades de Beta-glicosidase (■) e Xilanase (▲) e o resultado do modelo (–) para o ensaio contendo 40 g L⁻¹ de BED

Esses resultados demonstram que os modelos de consumo de substrato e atividade de beta-glicosidase precisam ser melhorados. No modelo de beta-glicosidase, novos termos de inibição pela concentração de substrato podem ser testados para melhor representar esta influência. Já no modelo

de consumo de substrato os termos de consumo para manutenção das células e para a formação de produtos podem ser analisados.

A falta de ajuste de alguns dados pode estar também relacionada à complexidade do ajuste simultâneo dos ensaios para estimação dos 26 parâmetros utilizando 5 equações diferenciais ordinárias e 4 conjuntos de dados experimentais (5, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de BED) onde cada conjunto contém 5 variáveis de estado (concentrações de células e celulose; atividades de FPase, xilanase e beta-glicosidase).

5.6 Validação

O ensaio contendo 10 g L⁻¹ de BED não foi empregado para a estimação dos parâmetros. Com esses dados pôde-se avaliar a capacidade dos modelos para predição dos dados experimentais em uma concentração de substrato diferente. A Figura 22 e a 23 apresentam os resultados da simulação e os dados experimentais para este ensaio.

Observa-se que os modelos descrevem bem os dados experimentais para concentração de células, atividades de FPase e beta-glicosidase; no entanto os modelos para predizer a atividade de xilanase e concentração celulose proporcionaram um ajuste ruim.

O modelo para substrato superestima o consumo, assim como no ensaio contendo 5 g L⁻¹ de BED (Figura 14). Já o modelo para xilanase descreve bem os dados até 60 h, após esse tempo, o modelo prediz valores inferiores aos dados experimentais.

As atividades experimentais finais de xilanase nesta condição atingiram valores superiores a condição de 5 g L⁻¹ de BED (Figura 15) e semelhantes à condição de 20 g L⁻¹ de BED (Figura 17). No entanto a simulação do modelo na condição de 10 g L⁻¹ de BED gerou valores intermediários da atividade de xilanase (entre a condição de 5 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹ de BED). Isso sugere que o aumento da concentração de substrato não aumentou de forma proporcional a atividade de xilanase (para essas condições).

A qualidade de predição dos modelos matemáticos pode ser caracterizada usando o desvio padrão residual (RSD), Equação 29, que fornece uma indicação de precisão dos modelos (ATALA et al., 2001).

$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}}{n}$$

$$RSD (\%) = \frac{RSD}{\bar{y}_i} 100$$

29

Onde y_i e y_{pi} correspondem aos dados experimentais e os valores preditos pelo modelo respectivamente, n é o número de pontos experimentais e \bar{y}_i é a média dos valores experimentais. Segundo Atala et al. (2001), valores de RSD (%) menores que 10 % são aceitáveis para processos biotecnológicos.

A qualidade de predição do modelo também pode ser avaliada utilizando um coeficiente de correlação (COR (%)), Equação 30 (NETO, 2011).

$$COR(\%) = \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2} \right) 100$$

30

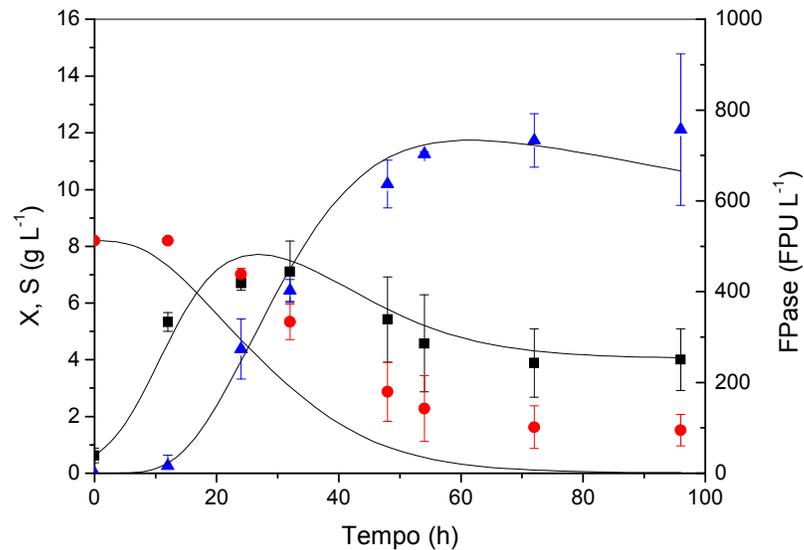


Figura 22 – Perfis das concentrações de celulose (●), células (■), atividade de FPase (▲) e o resultado do modelo (—) para o ensaio contendo 10 g L⁻¹ de BED

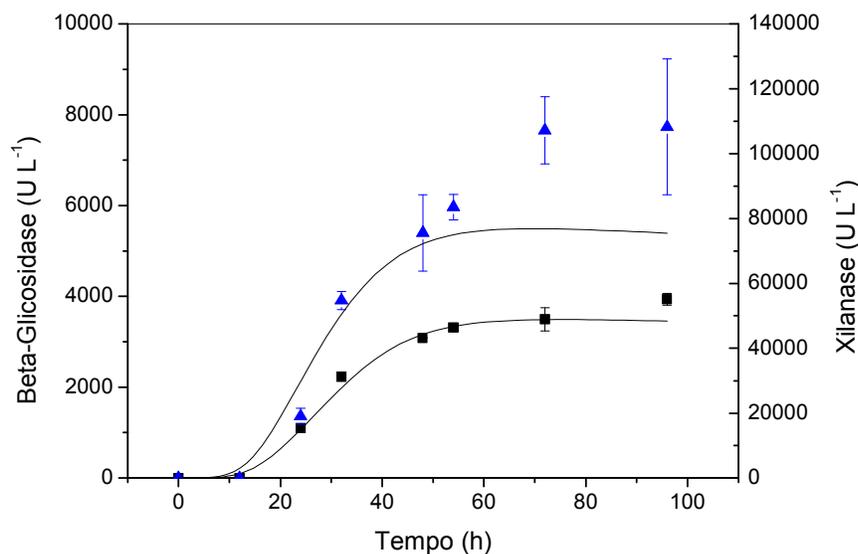


Figura 23 – Perfis das atividades de Beta-glicosidase (■) e Xilanase (▲) e o resultado do modelo (—) para o ensaio contendo 10 g L⁻¹ de BED

Os resultados de RSD (%) e COR (%) para todos os ensaios estão apresentados na Tabela 10. Observa-se que a maioria dos valores de RSD (%) estão abaixo de 10 % indicando que os modelos conseguem representar bem os dados experimentais para processos biotecnológicos. Em relação ao COR (%), a maioria dos valores ficaram acima de 84 %, sendo que 56 % ficaram acima de 90 %, indicando boa correlação. No entanto duas condições experimentais (5 e 10 g L⁻¹ de BED) proporcionaram valores de RSD (%) acima de 10 % e valores baixos para COR (%) na predição da concentração de celulose (S).

Esses valores sugerem que o modelo para predição da concentração de celulose pode ser melhorado para descrever a cinética deste componente, principalmente em baixas concentrações de substrato. Alterações no modelo, como adição de um termo que represente o consumo de substrato para a manutenção das células e formação de produto se tornam uma alternativa interessante, tendo em vista que o maior consumo de substrato ocorre em um período de pouco crescimento e grande formação dos produtos.

Novos ensaios com concentrações diferentes de substrato também precisam ser realizados com a finalidade de aumentar a confiabilidade dos modelos.

Tabela 10 – Desvio padrão residual (RSD) e coeficiente de correlação (COR)

Ensaio (gL ⁻¹ BED)	RSD (%)					COR (%)				
	F	B	Xy	X	S	F	B	Xy	X	S
5	6,34	8,44	5,22	3,29	13,08	91,70	85,07	94,58	94,72	43,93
10	3,50	3,23	10,52	4,04	14,11	97,82	98,25	84,26	91,86	60,58
20	7,56	6,43	6,17	4,93	6,74	91,65	94,62	94,88	87,66	92,57
30	7,76	11,90	5,94	5,37	8,95	94,18	84,49	95,29	87,15	86,44
40	8,17	11,32	8,50	7,48	8,11	93,47	87,44	90,04	74,91	86,67

6. CONCLUSÕES

A estimação da concentração de células utilizando a sonda de capacitância mostrou ser uma alternativa interessante indicando que há boa correlação entre o sinal da sonda e a concentração de células para o *Trichoderma harzianum* em meio solúvel. No entanto, as possíveis interferências em meio insolúvel (contendo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado) impede seu uso para uma análise quantitativa.

Modelos matemáticos para descrever a cinética do processo foram construídos. Os modelos parecem representar bem a cinética dos dados experimentais no intervalo de concentrações de BED analisado com um bom ajuste para a maioria dos ensaios. A falta de ajuste de alguns dados pode ser resultado da complexidade da estimação de parâmetros utilizando diversos ensaios simultaneamente.

Alterações nos modelos e novos ensaios com concentrações diferentes de substrato precisam ser realizados com a finalidade de melhorar o ajuste e aumentar confiabilidade dos modelos.

Perspectivas

O estudo do processo de adsorção das enzimas no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e deslignificado é uma das etapas a ser considerada em trabalhos futuros para estimar a concentração total de enzimas. Neste trabalho apenas as enzimas na fase líquida foram quantificadas; no entanto, pode haver uma quantidade considerável no material adsorvente (bagaço de cana-de-açúcar).

Métodos para quantificação de enzima intracelular podem ser avaliados para verificar se há acúmulo de enzimas do interior das células ou se todas as enzimas geradas são secretadas. Caso haja acúmulo, o modelo para enzimas pode ser dividido em duas velocidades, uma para síntese e a outra para secreção de enzimas.

Mecanismos de síntese considerando termos de indução e repressão, assim como a estruturação dos modelos de crescimento celular podem ser desenvolvidos para deixar os modelos mais representativos.

Verificar a influência de outros componentes do sistema variando, por exemplo, o oxigênio dissolvido, outras fontes de carbono e nitrogênio e com isso ampliar o número de variáveis que poderão ser manipuladas nas simulações dos modelos buscando maximizar a produção das enzimas.

A modificação dos modelos para prever o processo em batelada alimentada e o desenvolvimento de estratégias de alimentação se tornam uma alternativa interessante tendo em vista que esse tipo de processo tem maior produtividade que os processos em batelada.

7. REFERÊNCIAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5979 – 5987, 2009.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 379–387, 2010.

ALMQUIST, J.; CVIJOVIC, M.; HATZIMANIKATIS, V.; NIELSEN, J.; JIRSTRAND, M. Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. **Metabolic Engineering**, v. 24, p. 38 – 60, 2014.

ANDRADE, R. R. **Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células**. 2012. 284 f. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

ARO, N. Characterization of Novel Transcription Factors ACEI and ACEII Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes in *Trichoderma Reesei*. 2003. Disponível em: <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2003/P488.pdf>>. Acesso em 28 jun. 2014.

BADER, J.; KLINGSPOHN, U.; BELLGARDT, K.H.; SCHUGERL, K. Modeling and simulation of the growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C30. **Journal of Biotechnology**, v. 29, n. 1-2, p. 121–135, 1993.

BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 5 – 10, 1989.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n 5, p. 551 – 573, 2008.

BONOMI, A; SHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL W. et al. **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blucher, 2001, p. 123 – 174.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248 – 54, 1976.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n 13, p. 4754 – 4766, 2010.

CONESA, A.; PUNT, P. J.; VAN LUIJK, N., VAN DEN HONDEL, C. A. The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. **Fungal Genetics and Biology**, v. 33, n. 3, p. 155-171, 2001.

CHONG, E. K. P.; ŽAK, S. H. **An introduction to optimization**. 2. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2001, p. 73 – 74, 237 – 238.

DELABONA, P. S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; PAIXÃO, D. A. A.; FARIAS, C. S.; CAIRO, J. P. L. F.; LIMA, D. J.; SQUINA, F. M.; RULLER, R.; PRADELLA, J. G. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500-507, 2013.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. Improving bioethanol production – Comparison between extractive and low temperature fermentation. **Applied Energy**, v. 98, p. 548–555, 2012.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic, 1995, p. 257-289.

EL-ENSHASY, H. A., Chapter 9 - Filamentous Fungal Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications, In: **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, editado por Shang-Tian Yang, Elsevier, 2007, p. 225-261.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

HOFSETZ, K., SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564 – 573, 2012.

HUI, Y.S.; AMIRUL, A.A.; YAHYA, A.R.M.; AZIZAN, M.N.M. Cellulase production by free and immobilized *Aspergillus terreus*, **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 79–84, 2010.

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 56, n. 4, p. 679 – 689, 2013.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B.A., BLANCH, H.W. The Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083 – 1087, 2012.

KOUTINAS, A. A.; R. WANG, C. W. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 2, p. 93 – 100, 2003.

LAGO, A. C.; BONOMI, A.; CVALETT, O.; CUNHA, M. P.; LIMA, M. A. P. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 5 – 12, 2012.

LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. 3. ed. New York, NY: John Wiley, 1999, p. 623 – 629.

LO, C.-M.; ZHANG, Q.; CALLOW, N. V.; JU, L.-K. Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1494 – 1503, 2010.

LOH, Y. R.; SUJAN, D.; RAHMA, M. E.; DAS, C. A. Sugarcane bagasse—The future composite material: A literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 75, p. 14 – 22, 2013.

MA, L.; LI, C.; YANG, Z.; JIA, W.; ZHANG, D.; CHEN, S. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 192 – 197, 2013.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73, n. 2, p. 269 – 278, 1957.

MathWorks. Fmincon. 2014a. Disponível em: <<http://www.mathworks.com/help/optim/ug/fmincon.html>>. Acesso em 28 jun. 2014.

MathWorks. Choosing a solver. 2014b. Disponível em: <<http://www.mathworks.com/help/optim/ug/choosing-a-solver.html#bsbqd7i>>. Acesso em 28 jun. 2014.

MERINO, S.T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization In: OLSEN, L. Biofuels. **Springer-Verlag**, v. 108, p. 95 – 120, 2007.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673 – 686, 2005.

MUSSATTO, S. I; TEIXEIRA, J. A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. 2010. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microbiology2/897-907.pdf>>. Acesso em 28 jun. 2014.

NETO, J. M. **Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos**. 2011. 213 f. – Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

NEVES, A. A.; PEREIRA, D. A; VIEIRAL, M.; MENEZES, J. C.; Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n 1, p. 45 – 52, 2000.

PAN, X.; ARATO, C.; GILKES, N.; GREGG, D.; MABEE, W.; PYE K.; XIAO, Z.; ZHANG, X.; SADDLER J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology Bioengineering**, v. 20, n. 4, p. 473 – 481, 2005.

PEREIRA, B. M. P.; PRADELLA, J. G. C. Produção de enzimas por *Penicillium chesnutatum* para hidrólise de material lignocelulósico. In: V Congresso Internacional de Bioenergia, 2010, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2010.

PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P. **Numerical recipes in Fortran 77: the art of scientific computing**. 2. ed. Cambridge, MA: Cambridge University Press, 1992, p. 402 – 406.

RIVERA, E. C.; RABELO, S. C.; GARCIA, D. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 7, p. 983 – 992, 2010.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274 – 279, 2012.

SANTOS, T. C.; AMORIN, G. M.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Determinação da Atividade de CMCase e FPase da Estipe Fúngica *Rhizopus sp.* Através da Bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias purpurea L.*). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 3, 2011.

SEIBOTH, B.; IVANOVA, C.; SEIDL-SEIBOTH V. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. 2011. Disponível em : <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/trichoderma-reesei-a-fungal-enzyme-producer-for-cellulosic-biofuels>>. Acesso em 28 jun. 2014.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541 – 549, 2010.

SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M.N.A.; ARIFF, A.B.; MOHAMAD, Rosfariza; MUSTAFA, Shuhaimi. Kinetics of cellulase production by *Aspergillus terreus* at various levels of dissolved oxygen tension in a stirred tank bioreactor, **Bio Resources**, v. 6, n. 4, p. 4909 – 4921, 2011.

SRIVASTAVA, A.K.; GUPTA, S. Fed-Batch Fermentation – Design Strategies. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**, 2 ed, Academic Press, Burlington, 2011, p. 515 – 526.

STRAKOWSKA, J.; BŁASZCZYK, L.; CHEŁKOWSKI, J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. **Journal of Basic Microbiology**, 2014.

SUTO, M; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305 – 311, 2001.

THILAKAVATHI, M.; BASAK, T.; PANDA, T. Modeling of enzyme production kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 991 – 1007, 2007.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458 – 1480, 2012.

VELKOVSKA, S.; MARTEN, Mark R.; OLLIS, David F. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. **Journal of Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 83 – 94, 1997.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 4, 1999, p. 482 – 487.

ZHANG, Y. -H. P.; HONG, J.; YE, X. Cellulase assays. **Methods in Molecular Biology**, v.581, p. 213–231, 2009.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese de doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

8. APÊNDICE

Programa principal para a estimação dos parâmetros utilizando o Matlab R2013b.

```
function Master

global X1 S1 F1 B1 Xy1 t1 y01
global X2 S2 F2 B2 Xy2 t2 y02
global X3 S3 F3 B3 Xy3 t3 y03
global X4 S4 F4 B4 Xy4 t4 y04
global exp1 texp1 exp2 texp2 exp3 texp3 exp4 texp4 Soma1 Soma2 Soma3 Soma4

options=optimoptions('fmincon','Algorithm','interior-
point','MaxFunEvals',25000);

%


---


    % Experimento 1

    t1 = xlsread('5gL.xlsx','A1:A9');
    F1 = xlsread('5gL.xlsx','B1:B9');
    B1 = xlsread('5gL.xlsx','C1:C9');
    Xy1 = xlsread('5gL.xlsx','D1:D9');
    X1 = xlsread('5gL.xlsx','E1:E9');
    S1 = xlsread('5gL.xlsx','F1:F9');

    % cond. iniciais

    y01 = [0.49,4.1,0,0,0];
%


---


    % Experimento 2

    t2 = xlsread('20gL.xlsx','A1:A11');
    F2 = xlsread('20gL.xlsx','B1:B11');
    B2 = xlsread('20gL.xlsx','C1:C11');
    Xy2 = xlsread('20gL.xlsx','D1:D11');
    X2 = xlsread('20gL.xlsx','E1:E11');
    S2 = xlsread('20gL.xlsx','F1:F11');

    y02 = [0.63,16.4,0,0,0];
%


---


    % Experimento 3

    t3 = xlsread('30gL.xlsx','A1:A11');
    F3 = xlsread('30gL.xlsx','B1:B11');
    B3 = xlsread('30gL.xlsx','C1:C11');
```

```

Xy3 = xlsread('30gL.xlsx','D1:D11');
X3 = xlsread('30gL.xlsx','E1:E11');
S3 = xlsread('30gL.xlsx','F1:F11');

y03 = [0.63,24.6,0,0,0];

%


---


% Experimento 4

t4 = xlsread('40gL.xlsx','A1:A11');
F4 = xlsread('40gL.xlsx','B1:B11');
B4 = xlsread('40gL.xlsx','C1:C11');
Xy4 = xlsread('40gL.xlsx','D1:D11');
X4 = xlsread('40gL.xlsx','E1:E11');
S4 = xlsread('40gL.xlsx','F1:F11');

y04 = [0.45,32.8,0,0,0];

%


---


% chute inicial dos parâmetros

b = xlsread('par8.xlsx','A1:A27');
lb = xlsread('par8.xlsx','B1:B27');
ub = xlsread('par8.xlsx','C1:C27');

[Bmi,fval,flag] = fmincon(@M8,b,[],[],[],[],lb,ub,[],options);

%


---


% Outputs

disp(fval)
disp(flag)
disp(Soma1)
disp(Soma2)
disp(Soma3)
disp(Soma4)

d = texp1;
e = exp1;
f = texp2;
g = exp2;
h = texp3;
n = exp3;
hh = texp4;
nn = exp4;
m = Bmi;

warning('off','MATLAB:xlswrite:AddSheet');
xlswrite('data.xlsx', d, 'Ensaio 5 gL', 'A1');
xlswrite('data.xlsx', e, 'Ensaio 5 gL', 'B1');
xlswrite('data.xlsx', f, 'Ensaio 20 gL', 'A1');

```

```

xlswrite('data.xlsx', g, 'Ensaio 20 gL', 'B1');
xlswrite('data.xlsx', h, 'Ensaio 30 gL', 'A1');
xlswrite('data.xlsx', n, 'Ensaio 30 gL', 'B1');
xlswrite('data.xlsx', hh, 'Ensaio 40 gL', 'A1');
xlswrite('data.xlsx', nn, 'Ensaio 40 gL', 'B1');
xlswrite('data.xlsx', m, 'parâmetros', 'A1');

end

```

Programa com a função a ser minimizada utilizando o Matlab R2013b.

```

function M=M8 (b)

global exp1 texp1 exp2 texp2 exp3 texp3 exp4 texp4 Soma1 Soma2 Soma3 Soma4

%


---


%Experimento 1

global X1 S1 F1 B1 Xy1 t1 y01

% Resolver EDOs

tspan=[0 96];

[t,y]=ode45(@EDO,tspan,y01);

exp1 = y;
texp1 = t;

%Interpolar

Xpred1 = interp1(t,y(:,1),t1);
Spred1 = interp1(t,y(:,2),t1);
Fpred1 = interp1(t,y(:,3),t1);
Bpred1 = interp1(t,y(:,4),t1);
Xypred1 = interp1(t,y(:,5),t1);

% Minimizar

S = 0;

for i = 1:length(t1)

    S = S + Função Objetivo
end

Soma1 = S;

%


---


%Experimento 2

```

```

global X2 S2 F2 B2 Xy2 t2 y02

% Resolver EDOs

tspan=[0 96];

[t,y]=ode45(@EDO,tspan,y02);

exp2 = y;
texp2 = t;

% Interpolar

Xpred2 = interp1(t,y(:,1),t2);
Spred2 = interp1(t,y(:,2),t2);
Fpred2 = interp1(t,y(:,3),t2);
Bpred2 = interp1(t,y(:,4),t2);
Xypred2 = interp1(t,y(:,5),t2);

% Minimizar

S = 0;

for i = 1:length(t2)

    S = S + Função Objetivo
end

Soma2 = S;

%

```

```

%Experimento 3

global X3 S3 F3 B3 Xy3 t3 y03

% Resolver EDOs

tspan=[0 96];

[t,y]=ode45(@EDO,tspan,y03);

exp3 = y;
texp3 = t;

% Interpolar

Xpred3 = interp1(t,y(:,1),t3);
Spred3 = interp1(t,y(:,2),t3);
Fpred3 = interp1(t,y(:,3),t3);
Bpred3 = interp1(t,y(:,4),t3);
Xypred3 = interp1(t,y(:,5),t3);

```

```

% Minimizar

S = 0;

for i = 1:length(t3)

    S = S + Função Objetivo
end

Soma3 = S;

%


---


%Experimento 4

global X4 S4 F4 B4 Xy4 t4 y04

% Resolver EDOs

tspan=[0 96];

[t,y]=ode45(@EDO,tspan,y04);

exp4 = y;
texp4 = t;

% Interpolar

Xpred4 = interp1(t,y(:,1),t4);
Spred4 = interp1(t,y(:,2),t4);
Fpred4 = interp1(t,y(:,3),t4);
Bpred4 = interp1(t,y(:,4),t4);
Xypred4 = interp1(t,y(:,5),t4);

% Minimizar

S = 0;

for i = 1:length(t4)

    S = S + Função Objetivo
end

Soma4 = S;

%


---


%EDOs

function l = EDO(t,y)

```

Conjunto de Equações

end

%

```
M = Soma1+Soma2+Soma3+Soma4;
```

end

Programa para validação dos modelos usando o Matlab R2013b.

```
function Validação

tspan=[0 96];
y0 = [0.63,8.2,0,0,0];

b = xlsread('parâmetros.xlsx','A1:A27');

[t,y]=ode45(@EDO,tspan,y0);

expl = y;
texpl = t;

% Experimento 1

t1 = xlsread('10gL.xlsx','A1:A9');
F1 = xlsread('10gL.xlsx','B1:B9');
B1 = xlsread('10gL.xlsx','C1:C9');
Xy1 = xlsread('10gL.xlsx','D1:D9');
X1 = xlsread('10gL.xlsx','E1:E9');
S1 = xlsread('10gL.xlsx','F1:F9');

%Interpolar

Xpred1 = interp1(t,y(:,1),t1);
Spred1 = interp1(t,y(:,2),t1);
Fpred1 = interp1(t,y(:,3),t1);
Bpred1 = interp1(t,y(:,4),t1);
Xypred1 = interp1(t,y(:,5),t1);

S = 0;

for i = 1:length(t1)

    S = S + Função Objetivo
end

Soma1 = S;
```

```
%  
%EDOs  
  
function l = EDO(t,y)  
  
Conjunto de Equações  
  
end  
%  
d = texp1;  
e = exp1;  
warning('off','MATLAB:xlswrite:AddSheet');  
xlswrite('Val.xlsx', d, 'Ensaio 10 gL', 'A1');  
xlswrite('Val.xlsx', e, 'Ensaio 10 gL', 'B1');  
disp(Soma1)  
  
end
```