PRODUÇÃO DE FLAVONÓIDES EM MEIOS COMPLEXOS PELO FUNGO *Phellinus Sp.*: ESTEQUIOMETRIAS MÍNIMAS E MODELAGEM CINÉTICA E SIMULAÇÃO PARA CULTIVOS EM BATELADA E BATELADA ALIMENTADA

Gustavo Batista^{1*}, Ivan Ilich Kerbaudy Veloso¹, Antonio José Gonçalves Cruz¹

1 – Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UFSCar – SP, São Carlos – SP, batistagustavo@live.com

Resumo – Este trabalho emprega dados experimentais obtidos por Ma *et al.* [1] para propor estequiometrias mínimas simplificadas da síntese de flavonóides pelo fungo *Phellinus sp.* em dois diferentes meios de cultura. Os processos foram simulados através do software AnaBioPlus® para operação nos modos batelada e batelada alimentada. Os resultados mostraram que as equações estequiométricas em fórmulas mínimas foram capazes de prever o consumo de nutrientes e a formação de produtos de forma satisfatória. A abordagem cinética utilizando as expressões de Contois e Luedeking-Piret foi capaz de representar bem os dados experimentais, mostrando-se uma alternativa ao modelo cinético logístico proposto na literatura.

Palavras-chave: *Phellinus sp.*, flavonóides, estequiometria mínima, batelada alimentada, modelagem e simulação.

Introdução

Flavonóides são um grupo de substâncias polifenólicas naturais com propriedades medicinais anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais comprovadas. Aplicações diversas envolvendo estas substâncias vem sendo estudadas. Porém, ineficiências na produção, seja esta através de extração em plantas ou rotas sintéticas, limitam atualmente o potencial desta tecnologia. Para o advento da produção em larga escala, são importantes o desenvolvimento e a melhoria na eficiência dos processos metabólicos existentes. Um possível biossintetizador é o fungo *Phellinus sp.* [1].

No trabalho de Ma *et al.* [1], três meios de cultura foram comparados em biorreator de bancada com volume útil de 5 litros: o meio A, composto por 20,0 g/L de glicose, 0,6 g/L de MgSO₄, 1,0 g/L de KH₂PO₄, e 4 g/L de peptona; o meio B, com a mesma composição do anterior e suplementado por 0,02 g/L de ácido naftalenoacético (NAA); e o meio C, com a mesma composição do meio A e adição de 0,03 g/L de cumarina. Nestes meios, o cultivo do fungo *Phellinus sp.* P0988 teve por objetivo a biossíntese de flavonóides, sendo a concentração deste produto empregada para comparação dos três meios de cultura propostos. No presente estudo, serão utilizados os dados experimentais obtidos para os meios de cultura A e B para proposição de estequiometrias mínimas de reação e simulação de cultivos nos modos de operação em batelada e batelada alimentada.

Metodologia

Determinação da Estequiometria Mínima de Reação

Para representar as reações bioquímicas apresentadas por Ma *et al.* [1] nos meios A e B, ou seja, os meios de cultura inicial e suplementado com NAA, foram propostas,

respectivamente, as Equações estequiométricas em fórmulas mínimas 1 e 2, baseadas nas seguintes simplificações:

- Na falta de informações mais claras sobre a composição das peptonas utilizadas nos meios de cultura, foi considerada a fórmula molecular da glicina ($C_2H_5NO_2$) como representante deste composto (conforme composição de peptona comercial 82962 disponível no catálogo do fornecedor SIGMA-ALDRICH);
- Os compostos $MgSO_4$ e KH_2PO_4 foram desconsiderados por apresentarem-se em baixas concentrações nos meios de cultura, de modo que toda a reação bioquímica foi representada através dos compostos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio;
- A representação do fungo *Phellinus sp.* se deu por meio da fórmula mínima $CH_{1,81}O_{0,52}N_{0,21}$ (SHULER);
- Dentre os flavonóides sintetizados pelo fungo *Phellinus sp.* foi selecionada a rutina ($C_{27}H_{30}O_{16}$) para representação destes compostos.

Um balanço dos elementos de reação C, H, O e N entre reagentes e produtos pode ser aplicado para as Eq. 1 e 2. No caso do meio de cultivo A, por exemplo, os balanços são dados pelas Eqs. 3, 4, 5 e 6, respectivamente:

$$1 + a = c + d + f \quad (3)$$

$$2 + 2,5 * a = 1,81 * c + 2 * e + 10 * f / 9 \quad (4)$$

$$1 + a + 2 * b = 0,52 * c + 2 * d + e + 16 * f / 27 \quad (5)$$

$$0,5 * a = 0,21 * c \quad (6)$$

Considerando os estados de oxidação intrínsecos dos elementos químicos constituintes das biorreações em estudo (Tabela 1), é possível obter uma equação de balanço adicional para cada meio de cultura avaliado (a Eq. 7 representa o balanço de estados de oxidação entre reagentes e produtos para o meio de cultura A).

$$4 + 3 * a - 4 * b = 4,14 * c + 3,926 * f \quad (7)$$

Além disso, é conveniente lançar mão das relações de rendimento estequiométrico $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ nos equacionamentos, uma vez que, simplificando as definições matemáticas para reatores que operam em batelada, e considerando as massas fúngica e de flavonóides iniciais iguais a zero [2], estes valores são numericamente iguais a determinados coeficientes do balanço estequiométrico. No caso do balanço equacional em fórmulas mínimas para o meio de cultura A, são simplificadas as relações nas Eqs. 8 e 9.

Tabela 1 – Somatório dos estados de oxidação dos compostos e moléculas envolvidos nas estequiometrias das Eq. 1 e 2

Fórmula mínima do comp./moléc.	Somatório dos est. de oxidação
CH ₂ O	4
CH _{5/2} N _{0,5} O	3
O ₂	-4
CH _{1,81} O _{0,52} N _{0,21}	4,14
CO ₂	0
H ₂ O	0
CH _{10/9} O _{16/27}	3,926
CH _{5/6} O _{1/6}	4,50
CH _{2/3} O _{2/9}	4,22

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\Delta C_X}{-\Delta C_S} = \frac{c}{1} = c \quad (8)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\Delta C_P}{-\Delta C_S} = \frac{f}{1} = f \quad (9)$$

Os coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ para os dois meios de cultivo foram obtidos, respectivamente, por meio do coeficiente angular das retas geradas nos gráficos de ΔC_X versus $-\Delta C_S$ e de ΔC_P versus $-\Delta C_S$, a partir dos valores extraídos do artigo de Ma *et al.*[1].

Modelagem e Simulação da Produção de Flavonóides em Batelada e em Batelada Alimentada

Ma *et al.* [1] utilizaram um modelo logístico (Eq. 10), com cinética independente do substrato, para caracterizar o crescimento da concentração celular C_x nos diferentes meios de cultivo dos experimentos operados em batelada. As cinéticas de formação de produto e de consumo de substrato foram baseadas na Equação de Luedeking-Piret (Eq. 11).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} * (1 - \frac{C_x}{C_{xm\acute{a}x}}) \quad (10)$$

$$\mu_p = \alpha * \mu + \beta \quad (11)$$

Este trabalho propõe a utilização do modelo cinético de Contois (Eq. 12) para a representação da cinética de crescimento celular. Tal modelo leva em conta as influências das concentrações de substrato e de células na velocidade específica de crescimento considerando os parâmetros cinéticos $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_{Sx} . Uma linearização possível para obtenção simplificada destes parâmetros está apresentada na Eq. 13.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * C_S}{C_S + K_{Sx} * C_x} \quad (12)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{K_{Sx}}{\mu_{m\acute{a}x}} * \frac{C_x}{C_S} \quad (13)$$

A modelagem dos meios de cultura A e B, para cultivos realizados no modo batelada a volume constante, é expressa pelo sistema de equações diferenciais ordinárias das Eqs. 14, 15 e 16. Estas representam, respectivamente, os balanços de massa para células, produtos (empregando a Eq. 11) e substrato (considerando manutenção celular desprezível), utilizando o modelo cinético de Contois (Eq. 12).

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu * C_x \quad (14)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = (\alpha * \mu + \beta) * C_x \quad (15)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{\mu C_x}{Y_{x/s}} - \frac{(\alpha * \mu + \beta) * C_x}{Y_{p/s}} \quad (16)$$

A modelagem matemática do processo operado no modo batelada alimentada, com vazão de alimentação constante F para produção de flavonóides por *Phellinus sp.*, será proposta neste trabalho. Nesse modo de operação é possível manipular a concentração de substrato C_s e assim a velocidade específica de crescimento μ , possibilitando a obtenção de elevados valores de C_x e de C_p , e também há redução dos riscos de contaminação e mutação inerentes ao processo. Na batelada alimentada, há variação do volume (conforme Eq. 17) após um período inicial de operação em batelada comum. As Eq. 18, 19 e 20 representam, respectivamente, os balanços materiais para a massa de células, de produtos (empregando a Eq. 11) e de substrato (considerando manutenção celular desprezível). Nas equações descritas, D é a taxa de diluição da batelada alimentada, definida como F/V , e C_{SF} é a concentração de substrato na corrente de alimentação.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (17)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = C_x * (\mu - D) \quad (18)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = (\alpha * \mu + \beta) * C_x - D * C_p \quad (19)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = D * (C_{SF} - C_s) - \frac{\mu * C_x}{Y_{x/s}} - \frac{(\alpha * \mu + \beta) * C_x}{Y_{p/s}} \quad (20)$$

Os valores das produtividades globais em células e em produto estão expressas, respectivamente, pelas Eq. 21 e 22. Nestas equações, C_{x0} indica a concentração de células no início do cultivo, e t_{OCIOSO} indica o somatório dos tempos de descarga, lavagem, esterilização e carga do reator, fixado em 3 h para todos os casos. O tempo de cultivo foi considerado o mesmo dos experimentos realizados por Ma *et al.* [1], sendo para batelada 216 h e para o cultivo em batelada alimentada o tempo total de 432 h, com 216 h iniciais de batelada simples. As simulações foram realizadas no software *AnaBioPlus*® [3].

$$P_{rx}^G = \frac{C_x - C_{x0}}{t_{OCIOSO} + t_{CULTIVO}} \quad (21)$$

$$P_{rp}^G = \frac{C_p}{t_{OCIOSO} + t_{CULTIVO}} \quad (22)$$

Resultados e Discussão

Determinação da Estequiometria Mínima de Reação

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos e os respectivos coeficientes múltiplos de determinação para $Y_{X/S}$. Os valores de $Y_{P/S}$, por sua vez, foram obtidos através do ponto experimental com maior concentração de flavonóides formados. Tal como Ma *et al.*[1] havia proposto, a adição de NAA ao meio é capaz de aumentar substancialmente a produção de flavonóides por unidade de glicose consumida, sendo um aumento proporcionalmente superior ao apresentado para o crescimento celular.

Tabela 2 – Coeficientes de rendimento calculados $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ nas bases mássica e molar

Meio de cultura	$Y_{X/S}$ (gX/gS)	$Y_{X/S}$ (C-molX/C-molS)	R^2	$Y_{P/S}$ (gP/gS)	$Y_{P/S}$ (C-molP/C-molS)
A (inicial)	0,322	0,385	0,995	0,121	0,160
B (suplem. com NAA)	0,341	0,408	0,979	0,198	0,263

Dispondo dos valores de dois parâmetros de forma direta (Eq. 8 e 9) e resolvendo o sistema de equações estequiométricas em fórmulas mínimas para cada um dos meios de cultura, é possível a obtenção dos coeficientes estequiométricos das Eq. 1 e 2. Os valores estão ilustrados na Tabela 3:

Tabela 3 – Coeficientes estequiométricos obtidos para os meios de cultura

A (Meio Inicial)		B (Meio Suplementado com NAA)	
Coeficiente estequiométrico	Valor obtido	Coeficiente estequiométrico	Valor obtido
a	0,162	r	0,171
b	0,566	s	0,470
c	0,385	t	0,0195
d	0,617	u	0,408
e	0,765	x	0,520
f	0,160	y	0,707
-	-	z	0,263

Os coeficientes estequiométricos apresentados na Tabela 3 foram então confrontados com as composições químicas originais dos meios de cultivo celular e também com as concentrações de flavonóides obtidas em cada caso, sempre considerando a presença de cinzas na biomassa formada (5,5 % em massa) e que a glicose é o reagente limitante das reações [2]. Verifica-se nas Tabelas 4 e 5 que os valores experimentais e calculados para as concentrações de peptona foram bastante próximos, de modo que se pode afirmar que a glicina representou bem o conteúdo das peptonas utilizadas. Já os desvios observados para a rutina foram maiores, de forma que a composição dos flavonóides produzidos pelo microrganismo *Phellinus sp.*, nas condições de cultivo, provavelmente tenha sido bastante diversificada.

Na Tabela 5 verifica-se também que a ordem de grandeza para o coeficiente estequiométrico do NAA calculado para o meio de cultivo B apresenta valores não condizentes. Isso se deve possivelmente ao sistema mal-condicionado de equações estequiométricas (proximidade a uma matriz singular, já que o determinante calculado é muito próximo a zero). Neste caso, pequenas variações nos coeficientes da matriz

estequiométrica de entrada acarretam em grandes variações na solução do sistema, isto é, a matriz de equações tem um elevado número de condicionamento [4].

Tabela 4 – Comparação entre as concentrações calculadas e experimentais para os compostos do meio de cultura A

Composto	Coefficiente Estequiométrico	Equiv. Conc. (g/L)	Conc. Exper. (g/L)	Desvio (%)
Glicose	1	20,00	20	0
Glicina (peptona)	0,162	4,04	4	1,06
Oxigênio	0,566	12,07	-	-
<i>Phellinus sp.</i> (fungo)	0,385	6,79*	6,18	9,85
Dióxido de Carbono	0,617	18,09	-	-
Água	0,765	9,18	-	-
Rutina (flavonóide)	0,160	2,41	2,09	15,29

Tabela 5 – Comparação entre as concentrações calculadas e experimentais para os compostos do meio de cultura B

Composto	Coefficiente Estequiométrico	Equiv. Conc. (g/L)	Conc. Exper. (g/L)	Desvio (%)
Glicose	1	20,00	20	0
Glicina (peptona)	0,171	4,28	4	6,88
Oxigênio	0,47	10,03	-	-
Ácido Naftalenoacético	0,0195	0,202	0,02	Ordem Grandeza
<i>Phellinus sp.</i> (fungo)	0,408	7,19*	6,29	14,37
Dióxido de Carbono	0,520	15,25	-	-
Água	0,707	8,48	-	-
Rutina (flavonóide)	0,263	3,96	3,52	12,52

* Considerando presença de 5,5 % de cinzas na massa seca

Modelagem e Simulação da Produção de Flavonóides em Batelada e em Batelada Alimentada

Os valores dos parâmetros $\mu_{\text{máx}}$ e K_{sx} da Eq. 13 foram obtidos por regressão linear, empregando os dados experimentais obtidos por Ma *et al.* [1], para os meios de cultura A e B. Estes valores estão ilustrados na Tabela 6 e são estatisticamente significativos.

Tabela 6 – Valores de K_{sx} e $\mu_{\text{máx}}$ obtidos por regressão linear do modelo de Contois

	$K_{\text{sx}}(\text{g/l})$	Erro K_{sx} (conf. 95%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Erro $\mu_{\text{máx}}$ (conf. 95%)	R^2	F ANOVA	F de signif. ANOVA
A (inicial)	6,54	1,84	0,0485	0,0265	0,960	97,02	$6 \cdot 10^{-4}$
B (supl. NAA)	4,46	0,34	0,0296	0,0088	0,997	1346,66	$3,29 \cdot 10^{-6}$

Os dados da Tabela 6 foram utilizados nas simulações realizadas no software *AnaBioPlus*[®]. A formação de flavonóides foi modelada por meio da Eq. 11 para os dois meios de cultura, e foi possível verificar que a formação deste produto é parcialmente associada ao crescimento celular (α e β significativos), sendo os resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros da Equação de Luedeking-Piret obtidos para os diferentes casos avaliados no *AnaBioPlus*[®]

Meio de cultura	α	β
A (meio original)	0,028	0,0045
B (suplem. NAA)	0,0616	0,0070

A simulação da operação no modo batelada, empregando o modelo cinético de Contois e os valores dos parâmetros obtidos pela equação de Luedeking-Piret, é apresentada nas Figs. 1 e 2 para os meios de cultura A e B.

Figura 1 – Concentrações de substrato (C_s), de células (C_x) e de produto (C_p) ao longo do cultivo operado em batelada para o meio de cultura A

Figura 2 – Concentrações de substrato (C_s), de células (C_x) e de produto (C_p) ao longo do cultivo operado em batelada para o meio de cultura B

A simulação do cultivo no modo batelada alimentada para os dois meios de cultura está ilustrada nas Figs 3 e 4. É possível verificar o aumento na concentração de flavonóides produzidos frente à batelada simples, mantendo a concentração de substrato constante (na batelada alimentada o substrato na alimentação é imediatamente consumido). O efeito da diluição faz com que C_x decresça após 216 h.

Figura 3 - Concentrações de substrato (C_s), de células (C_x) e de produto (C_p) ao longo do cultivo no modo batelada alimentada com o meio de cultura A ($V_0 = 3$ litros, $V_{\text{final}} = 5$ litros, $D = 0,0024 \text{ h}^{-1}$, $C_{S_F} = 10 \text{ g/l}$ de substrato puro)

Figura 4 - Concentrações de substrato (C_s), de células (C_x) e de produto (C_p) ao longo do cultivo no modo batelada alimentada com o meio de cultura B ($V_0 = 3$ litros, $V_{\text{final}} = 5$ litros, $D = 0,0024 \text{ h}^{-1}$, $C_{SF} = 19 \text{ g/l}$ de substrato puro)

Os valores calculados das produtividades em células e em flavonóides, já considerando o somatório dos tempos ociosos, estão apresentados na Tabela 8. Além das produtividades para o meio B (suplementado por NAA) serem superiores às obtidas para o meio A (como proposto originalmente pelo artigo de Ma *et al.* [1]), verifica-se que há um aumento de produtividade em produto através da operação em batelada alimentada, quando comparada à operação em batelada simples.

Tabela 8 – Produtividades em células e em produto para diferentes casos avaliados

	Batelada / Meio A	Bat. Alimentada Meio A	Batelada / Meio B	Bat. Alimentada Meio B
Prod. células ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,028	0,011	0,028	0,013
Prod. produto ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,012	0,014	0,021	0,024

Conclusões

A determinação dos coeficientes das equações estequiométricas mínimas para a produção de flavonóides, empregando os dados experimentais de Ma *et al.* [1], teve resultados satisfatórios quando o sistema de equações estequiométricas não se apresentou mal-condicionado. A simulação das operações nos modos batelada e batelada alimentada para dois diferentes meios de cultura e empregando cinéticas de Contois e de Luedeking-Piret mostrou-se plausível para a biossíntese estudada, sendo a produtividade em flavonóides da batelada alimentada um diferencial quando comparada à operação por batelada.

Referências

- [1] MA, X.; PETERSON, E. C.; RUAN, T.; DUAN, X. The influence of naphthaleneacetic acid (NAA) and coumarin on flavonoid production by fungus *Phellinus* sp.: modeling of production kinetic profiles. **Biotechnological Products and Process Engineering**, p. 9417-9426, 2015.
- [2] SHULER, M. L. KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. Prentice Hall Inc., 2ª Ed., 2002.

- [3] OLIVEIRA, C. M. JESUS, C. D. F. CENEVIVA, L. V. S. SILVA, F. H. CRUZ, A. J. G. COSTA, C. B. B. BADINO, A. C. AnaBioPlus: a new package for parameter estimation and simulation of bioprocesses. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 34: 1065-1082, 2017.
- [4] BOLDRINI, J. L. COSTA, S. I. R. FIGUEIREDO, V. L. WETZLER, H. G. **Álgebra Linear**. Editora Harbra, 3^a Ed., 1986.