

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Rodrigo Souza Aguiar

**ANÁLISE DO CONTROLE METABÓLICO *IN SILICO* DA
VIA GLICOLÍTICA DA *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

Florianópolis – SC
2015

Rodrigo Souza Aguiar

**ANÁLISE DO CONTROLE METABÓLICO *IN SILICO* DA
VIA GLICOLÍTICA DA *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Engenharia
Química para obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Agenor Furigo Junior
Co-orientador: Luismar Marques
Porto

Florianópolis – SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Aguiar, Rodrigo Souza

Análises sensitivas da lógica metabólica em *Saccharomyces cerevisiae* via experimento in silico / Rodrigo Souza Aguiar ; orientador, Agenor Furigo Junior ; coorientador, Luismar Marques Porto. - Florianópolis, SC, 2015.

p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Bioinformática. 3. Análise de Controle Metabólico. 4. Análise Dinâmica. I. Furigo Junior, Agenor. II. Porto, Luismar Marques. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Rodrigo Souza Aguiar

**ANÁLISE DO CONTROLE METABÓLICO *IN SILICO* DA
VIA GLICOLÍTICA DA *SACCHAROMYCES*
*CEREVISIAE***

Esta Dissertação foi julgada aprovada para a obtenção do título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química .

Florianópolis – SC, 23 de Abril de 2015.

Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Agenor Furigo Junior
Orientador

Luismar Marques Porto
Co-orientador

Banca Examinadora:

Agenor Furigo Junior
Presidente

Ricardo Antônio Francisco Machado

Leonel Teixeira Pinto

Eugênio Simão

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter efetuado em mim tanto o querer quanto o realizar. Aos meus pais, Cândido e Beth, e a minha irmã, Maria Fernanda, por compreender a minha ausência em casa. À família Vaz, Leila e Miguel, pelo carinho, ajuda e suporte e a André Vaz, pelo companheirismo, amizade e irmandade em Cristo. Aos demais amigos e irmãos em Cristo, pelas orações.

Eu, a sabedoria, habito com a prudência; eu possuo conhecimento e discrição.

– Provérbios 8:12

Resumo

Saccharomyces cerevisiae é o principal micro-organismo produtor de etanol, empregado no Brasil. Devido a alta capacidade de adaptação a processos contínuos de produção, esse fungo possui caracterização genética muito bem definida, viabilizando otimizações de isoenzimas. Uma vez que alta concentração de glicose no meio reacional inibe-o, modificações genéticas foram realizadas a fim de que a sacarose fosse incorporada e submetida à hidrólise enzimática intracelular, obtendo glicose e frutose, evitando também contaminações e reduzindo a produção de células. Quantificou-se tais modificações pela *Análise de Controle Metabólico* (MCA). As entradas de glicose, via difusão facilitada (HXT) ou pelo simporte de sacarose (ATPase) e posterior hidrólise desta, foram avaliadas pelos coeficientes de controle dessas respectivas enzimas. Através das elasticidades de glicose intracelular, frutose-6-fosfato, quantificou-se localmente a influência de NAD e ATP em enzimas reguladoras e produtoras de compostos de interesse. Logo, a preferência entre rotas metabólicas foi identificada pela relação entre tais influências globais e locais, através dos coeficientes de resposta particionado, revelando quantitativamente a contribuição da permease no saldo energético e seu efeito conseqüente na rede metabólica. A interdisciplinaridade realizada entre MCA e *Análise Dinâmica* revelou o ganho de processo como uma elasticidade dimensional discreta. Dessa forma, perturbações em degrau na glicose extracelular revelaram as contribuições locais do substrato em cada reação do modelo estruturado, provando que esse recurso *in silico* deve ser usado paralelamente a análises cinéticas microbianas, para orientar a pesquisa e descrever a lógica metabólica pela técnica da MCA.

Palavras-chave: Bioinformática, Análise de Controle Metabólico, Análise Dinâmica.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is the most useful microorganism in Brazilian ethanol production. Because of its great ability in adaptation to continuous process, this fungus has a complete genetic characterization, allowing optimization of isoenzymes. Once high glucose concentration on reaction media inhibits it, genetic modifications were done in order to embody sucrose and hydrolyze it, freeing glucose and fructose, also avoiding contamination and reducing cell production. Such modifications were quantified by *Metabolic Control Analysis* (MCA). Glucose incomings, through facilitated diffusion (HXT) or sucrose symport (ATPase) and then its hydrolysis, were evaluated by their respective control coefficients. Through elasticities of intracellular glucose, fructose 6-phosphate, local influences of NAD and ATP over regulatory enzymes and high-value metabolite production were quantified. Therefore, the preference among metabolic routes was identified by the partitioned response coefficients, which are relations between local and global influences, uncovering quantitatively the permease contribution to energetic balance and then its effect at metabolic web. The interdisciplinarity between MCA and *Dynamic Analysis* defines the static gain as a dimensional and discrete elasticity. In order that, degree perturbations at extracellular glucose reveal the substrate local contributions at each reaction defined on the estructured model, proving that *in silico* source must be used with microbial kinetic analysis, guiding the research and unveil the metabolic logic through MCA principles.

Keywords: Bioinformatics, Metabolic Control Analysis, Dynamic Analysis.

Lista de Figuras

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Atuação central do ATP e do NADH no metabolismo (1). | 32 |
| 2.2 | Representação da sacarose, salientando a ligação <i>O</i> -glicosídica entre glicose e frutose (1). | 33 |
| 2.3 | Difusões simples (A) e facilitada (B) de solutos através da bicamada lipídica celular. | 35 |
| 2.4 | Simporte de soluto e transporte ativo de H^+ através da bicamada lipídica celular. ■ representa frutose e sacarose. | 36 |
| 2.5 | Estratégia para produzir e testar modelos biológicos, (adaptado) (2). | 40 |
| 2.6 | Rede metabólica da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> definida no modelo bioquímico estruturado (2). | 43 |
| 2.7 | Perturbação em degrau e resposta de primeira ordem no domínio do tempo. | 50 |
| 2.8 | Respostas de segunda ordem a perturbação em degrau, variando ζ , no domínio do tempo. | 51 |
| 2.9 | Perturbação em impulso e resposta de primeira ordem no domínio do tempo. | 52 |
| 3.1 | Estrutura do modelo no COPASI (3). | 58 |
| 3.2 | Ferramenta <i>slider</i> no COPASI (3). | 60 |
| 3.3 | Rota de cálculo dos coeficientes elasticidade, ganho estático e tempo de resposta, através da análise dinâmica do processo <i>P</i> . Perturbação conhecida em (1), variáveis mensuráveis em (2), calculáveis em (3–6), de acordo com a restrição experimental definida pelo algoritmo. | 62 |
| 4.1 | Elasticidades significativas na conversão de glicose a glicerol e etanol. □ representa reações, ○, interferentes, sendo que $--\rightarrow$ indica contribuição da elasticidade e \rightarrow , participação no processo. | 67 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.2 | Elasticidades qualitativamente significativas na rota de conversão de glicerol a glicerol e etanol em cada condição experimental. Efeitos de GLCc em HXT e HXK2; F6P em PGI; ATP em PFK, CDC19 e ATPase; NAD em G3PDH, TDH e ADH1. | 68 |
| 4.3 | Coefficientes de Resposta Particionado do ATP nas reações CDC19 e PFK. Nas curvas tracejadas considera-se a contribuição de HXT. | 73 |
| 4.4 | Coefficientes de Resposta Particionado do NAD nas reações G3PDH e ADH1. Nas curvas tracejadas considera-se a contribuição de HXT. | 73 |
| 4.5 | Vista positiva dos coeficientes de controle de fluxo adimensionais, em destaque os efeitos das isoenzimas HXT, PFK, HXK2 e ATPase no fluxo reacional de GLK1, gerados pelo COPASI (3). | 74 |
| 4.6 | Vista negativa dos coeficientes de controle de fluxo adimensionais da isoenzima ATPase, em destaque o fluxo reacional de GLK1, gerados pelo COPASI (3). | 74 |
| 4.7 | Comparação entre a elasticidade dimensional e o ganho estático de ATP em ATPase e de NAD em ADH1. | 75 |
| 4.8 | $K \left(\frac{mmol\ s^{-1}}{mmol\ L^{-1}} \right)$ das reações com resposta em primeira ordem à perturbação degrau em [GLCe]. | 77 |
| 4.9 | τ (s) das reações com resposta em primeira ordem à perturbação degrau em [GLCe]. | 78 |

Lista de Tabelas

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Reações da glicólise e os respectivos $\Delta G'^{\circ}$ (1). | 34 |
| 2.2 | Reações de conversão do piruvato a etanol e os respectivos $\Delta G'^{\circ}$ (1). | 35 |
| 2.3 | Características de algumas permeases de hexoses em <i>S. cerevisiae</i> (4). | 38 |
| 2.4 | Identificação das isoenzimas definidas no modelo estruturado (2), de acordo com o código apresentado na rede metabólica, revelada na Figura 2.6. | 44 |
| 4.1 | Comparações entre fatores de conversão em biomassa, etanol e glicerol, ($g\ g^{-1}$), calculados e da literatura. . . | 66 |
| 4.2 | Características das linhagens CAT-1, GMY15 e GMY16wo (5). | 66 |
| 4.3 | Principais elasticidades, adimensionais e dimensionais, com [GLCe] igual a 74 e 0,1, sendo esta a menor concentração viável desse composto no COPASL. | 70 |
| 4.4 | Subseqüências BLAST e comprimento das isoenzimas HEX1: GLK1, HXK1 e HXK2 (6). | 79 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|--------|----------------------------------|
| 13DPG | 1,3-bifosfoglicerato |
| 2PG | 2-fosfoglicerato |
| 3PG | 3-fosfoglicerato |
| AcAld | Acetaldeído |
| ADH | Álcool desidrogenase |
| ADP | Difosfato de adenosina |
| AK | Adenilato quinase |
| ALD | Aldolase |
| ALDD2Y | Aldeído desidrogenase |
| AMP | Monofosfato de adenosina |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| ATPase | Decomposição de ATP em ADP |
| DHAP | Diidroxiacetona-fosfato |
| ENO | Enolase |
| EtOH | Etanol |
| F6P | Frutose-6-fosfato |
| FDP | Frutose-1,6-bifosfato |
| G1P | Glicose-1-fosfato |
| G3P | Gliceraldeído-3-fosfato |
| G3PDH | Glicerol-3-fosfato desidrogenase |
| G3PT | Glicerol-3-fosfatase |
| G6P | Glicose-6-fosfato |

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| GLC | Glicose |
| GLYC | Glicerol |
| GLYC3P | Glicerol-3-fosfato |
| HEX1 | Hexoquinase |
| HXT | Permease de glicose |
| NAD ⁺ | Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina |
| NDPK2 | Nucleósido-difosfato quinase |
| PDC | Piruvato descarboxilase |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| PFK | Fosfofrutoquinase |
| PGI | Glicose-6-fosfato isomerase |
| PGK | Fosfoglicerato quinase |
| PGM | Fosfoglicerato mutase |
| PGMT | Fosfoglucomutase |
| P _i | Fosfato inorgânico |
| Pyr | Piruvato |
| PYR | Piruvato quinase |
| SUCC | Succinato |
| TDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| TPI | Triose fosfato isomerase |
| TRE | Trealose |
| TRE6P | Trealose-6-fosfato |
| TRE6PS | T6P sintase |
| UGLT | Glicose UDP fosforilase |

Lista de Símbolos

| | |
|------------------------------|---|
| C_i^α | Coefficiente de controle adimensional da reação i na grandeza α |
| \bar{C}_i^α | Coefficiente de controle dimensional da reação i na grandeza α |
| ε_γ^i | Elasticidade adimensional do parâmetro γ na reação i |
| $\bar{\varepsilon}_\gamma^i$ | Elasticidade dimensional do parâmetro γ na reação i |
| K | Ganho estático |
| k_{cat} | <i>Turnover</i> enzimático |
| K_i | Grau de afinidade enzima-inibidor |
| K_p | Grau de afinidade enzima-produto |
| K_s | Grau de afinidade enzima-substrato |
| μ | Velocidade ou taxa específica |
| R_X^ω | Coefficiente de resposta particionado do parâmetro X na grandeza ω |
| τ | Tempo de resposta |
| X^{ss} | Grandeza X no estado estacionário |
| ζ | Fator de amortecimento |
| $Y_{\frac{B}{A}}$ | Fator de conversão de A em B |

Sumário

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 25 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 29 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 29 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 29 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 31 |
| 2.1 | BIOENERGÉTICA E METABOLISMO | 31 |
| 2.1.1 | Açúcares: fontes de energia livre | 33 |
| 2.1.2 | Transporte transmembrana de açúcares | 35 |
| 2.2 | FERRAMENTAS PARA ENGENHARIA METABÓLICA | 37 |
| 2.2.1 | Análise do Fluxo Metabólico (MFA) | 41 |
| 2.2.2 | Análise do Controle Metabólico (MCA) | 42 |
| 2.3 | ANÁLISE DINÂMICA | 49 |
| 2.3.1 | Dinâmicas de primeira e de segunda ordem | 49 |
| 2.3.2 | Teorema do Valor Final | 52 |
| 2.3.3 | Propriedades das funções de transferência | 53 |
| 2.3.4 | Relação entre MCA e análise dinâmica | 54 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 57 |
| 3.1 | MATERIAIS | 57 |
| 3.1.1 | Modelo bioquímico estruturado | 57 |
| 3.1.2 | Programa computacional | 57 |
| 3.2 | MÉTODOS EXPERIMENTAIS | 58 |
| 3.2.1 | Experimentos <i>in silico</i> | 59 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 4.1 | CONSISTÊNCIA DO MODELO BIOQUÍMICO | 65 |
| 4.2 | RELAÇÃO ENTRE AS ANÁLISES DINÂMICA E DE CONTROLE METABÓLICO | 67 |
| 4.2.1 | Resposta da rede metabólica às alterações em [GLCe] | 67 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2 | Consequências da perturbação em degrau | 74 |
| 5 | CONCLUSÃO | 81 |
| 5.1 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 82 |
| | Referências | 83 |

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A Lei da Oferta e Procura define a concorrência por recursos naturais. A crescente população global necessitará de abastecimento alimentar, de forma segura e saudável. Ainda, mudanças climáticas impactarão nos sistemas de produção primários, como agricultura, florestamento, apicultura e aquicultura. Dessa forma, necessita-se de uma transição para o perfil sustentável na cadeia produtiva de alimentos e demais bio-produtos, utilizando menos matéria-prima, causando menor impacto ambiental e reduzindo emissões de gases nocivos (7, 8).

Ecossistema e recursos biológicos devem ser usufruídos de forma integrada, com maior responsabilidade e eficiência. *E.g.*, desperdício de alimento é um agravante, pois estima-se que 30% de todo o alimento produzido em países desenvolvidos são descartados (7, 8). O impacto de uma nação nesse cenário pode ser quantificado pelo seu desenvolvimento econômico, que está intimamente associado ao investimento realizado em ciência e tecnologia.

O aumento da participação empresarial de pesquisadores brasileiros é crucial para firmar a competitividade do país no cenário da Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I). De acordo com o professor Gregory Stephanopoulos, líder do Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioinformática do MIT (Massachusetts Institute of Technology) (9), um dos maiores especialistas mundiais do setor, a biotecnologia é o caminho mais seguro para o Brasil se inserir na economia globalizada do século XXI (10, 11). Isso exige, porém, planejamento e políticas assertivas, que busquem melhores alternativas no uso de recursos naturais e tecnológicos, e na organização da atividade econômica, sem comprometer a sustentabilidade do ecossistema (8).

Assim, em 29 de abril de 2014, foi oficializada a criação da Associação Brasileira de Biotecnologia Industrial (ABBI), entidade formada

pelas empresas Basf, Biochemtex, BP, CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), Dow, DSM, GranBio, Dupont, Novozymes e Rhodia. A associação representa as indústrias de biotecnologia com foco em produtos bioquímicos e biocombustíveis com atuação no Brasil. Um dos principais objetivos é contribuir para o avanço do marco regulatório do setor e discutir políticas públicas de incentivo às indústrias brasileiras (10, 11, 12).

De acordo com Luciano Coutinho, presidente do BNDES (Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social), “A organização da ABBI é importante para o governo, pois é um interlocutor confiável na formulação coerente de uma agenda positiva, com propostas para o avanço das empresas e da tecnologia” (11).

Para o Brasil, a captura das oportunidades advindas deste novo paradigma de desenvolvimento exige um compromisso do governo com uma Política Nacional para a Bioeconomia. São necessários um coerente alinhamento de prioridades, investimento e modernização do marco regulatório que efetivamente promova e desenvolva ações de impactos na ciência, tecnologia e inovação. Ainda necessita-se de políticas de suporte ao desenvolvimento empresarial nas áreas abrangidas pela chamada Bioeconomia. Torna-se necessário fortalecer e ampliar a base de recursos humanos e a infraestrutura laboratorial para perseguir linhas de pesquisas avançadas principalmente no campo da biologia sintética, genômica, proteômica e biomateriais. Tudo isso deve seguir os interesses do Estado Brasileiro, alinhados com os setores empresarial, acadêmico e a sociedade civil, pautando-se pelo respeito à sustentabilidade e a conservação dos recursos naturais, além de garantir a competitividade da indústria nacional no mercado global (8).

Assim, a Bioeconomia precisa do pesquisador empreendedor-inovador, da formação de grupos científicos multidisciplinares capazes de se relacionar eficaz e eficientemente com o mundo empresarial. É preciso remover as barreiras de transferência do conhecimento científico-tecnológico entre o ambiente acadêmico e o empresarial, principalmente a burocracia excessiva e a falta de comunicação (8). Também é preciso ampliar o conhecimento sobre estratégias de proteção, comercialização e gestão de bens de propriedade intelectual, com destaque para as patentes. Em síntese, a ambição de construir um vibrante setor de bioeconomia no Brasil – com base nas suas vantagens comparativas – será modulada pelas restrições no plano do conhecimento; pelo desafio de estabelecer um marco regulatório avançado, pró-ciência, inovação e produção; e pelas condições de entorno capazes de impulsionar uma base ainda frágil de cientistas e tecnólogos empreendedores e inovadores

(8).

Porém, esse aprimoramento deve ser o quanto antes implementado, porque a atual situação é de rápidas mudanças tecnológicas, visto que não só se conhece o código genético, como também as técnicas de clonagem. Logo, é possível reproduzir bactérias, algas ou animais, repetidas vezes, com o intuito de produzir vacinas, biocombustíveis, produtos químicos, dentre outros compostos com alto valor agregado. O código genético deverá ser, nas próximas décadas, a base da criação de riqueza econômica das nações. A diversidade e a variabilidade gênica natural, consequência das inúmeras possibilidades recombinatórias dos genes, aliada às modernas técnicas da biologia molecular para a programação gênica, oferecem ao mundo uma fonte praticamente inesgotável para a engenharia e manufatura de novos produtos biológicos. Esta nova revolução muda mais uma vez o paradigma da economia: a linguagem do mundo moderno migra do código digital binário para o código genético (8).

Nesse cenário é que se desenvolve a Bioinformática – uma área interdisciplinar e em rápida evolução. Exige-se conhecimentos da biologia, estatística, engenharia e ciência computacional, bem como treinamento paralelamente ao avanço tecnológico (13). Disponibiliza-se rapidamente grande quantidade de informação genética e bioquímica, contendo informações completas principalmente de organismos celulares. Bactérias e fungos são alvos de tais pesquisas, com o intuito de se conhecer a relação entre a genética e a fisiologia celular. No reino *Fungi*, a espécie *Saccaromyces cerevisiae* possui propriedades de interesse para a indústria química, como a capacidade em atingir o estado estacionário em variadas condições de cultura contínuas (2). Por isso, tal micro-organismo recebeu uma atenção especial no âmbito da bioinformática.

O primeiro modelo metabólico da *Saccaromyces cerevisiae* foi publicado em 1995 e posteriormente, em 2003, surgiu o primeiro em escala genômica. Desde então, oito destes modelos foram publicados, sendo extensivamente empregados como ferramentas versáteis para compreender a fisiologia do micro-organismo, bem como avançar nas aplicações biotecnológicas (14).

Aplicações de modelos metabólicos em escala genômica estão agrupados em quatro grandes áreas: 1) orientação em engenharia metabólica e melhoramento microbiológico, 2) descoberta e interpretação biológicas, 3) aplicações de novas estruturas computacionais e 4) elucidação da evolução. Esse tipo de modelo têm-se revelado como uma ferramenta versátil para realizar experimentos *in silico* na engenharia

metabólica, fornecendo a conversão teórica máxima de um metabólito específico, sob diferentes condições de crescimento celular. Ainda, essa técnica pode sugerir alvos para uma super-expressão ou supressão gênica, com o intuito de otimizar a habilidade do micro-organismo em produzir determinado composto (14).

A reprogramação de funções gênicas, dentre todas as descobertas e inovações na bioquímica, possivelmente é a de maior impacto. A reprogramação funcional de componentes ou seções do genoma e do metabolismo celular pode ser obtida por meio do desenvolvimento de linguagens de programação biológica. Aqui, certamente encontra-se o mais impactante campo de estudos e aplicações em biotecnologia industrial. Essa linguagem de programação, influente tanto em organismos naturais quanto nos obtidos da biologia sintética, seja *in vivo* ou *in silico*, é capaz de definir, interligar, editar e operar processos celulares em escala genômica (8), sendo essa estrutura experimental conhecida como *in silico*.

O desenvolvimento de modelos em escala genômica tem elevado o número de publicações de métodos e estruturas computacionais direcionadas a análises *in silico* de sistemas metabólicos. O principal alvo desse avanço vem sendo a *Saccaromyces cerevisiae*. O estudo realizado por Mendes *et al.* (2013) (2) revela que a técnica *in silico* é representativa para o comportamento celular desse micro-organismo, visto que as atuações enzimáticas são avaliadas sob condições experimentais mais próximas da realidade celular. Técnicas analíticas sensíveis viabilizam esse trabalho e, dentre as mais conhecidas, a Análise de Controle Metabólico (MCA) tem destaque. Trata-se de uma análise sensível fenomenológica quantitativa de fluxos reacionais e de concentrações dos metabólitos. Dessa forma, interferências em compostos, fluxos reacionais ou parâmetros cinéticos são viáveis com a praticidade inerente da programação.

Ainda no campo da análise sensível, interpretações de perturbações na rede metabólica podem ser avaliadas no âmbito da Dinâmica e Controle de Processo. Após a rede ter alcançado o estado estacionário, determinada perturbação pode deflagrar uma resposta tal que é prevista nos princípios comportamentais de primeira ou de segunda ordem, por exemplo. De acordo o perfil comportamental do fluxo reacional ou da concentração do composto ao longo do tempo experimental, interpretações são realizadas via análise dinâmica, empregando transformadas de Laplace e, se possível, deduzindo as funções de transferência que caracterizam a reação sob análise.

Uma vez que a análise sensível é a estrutura fundamental da

MCA e da Dinâmica e Controle de Processo, a interdisciplinaridade auxilia no entendimento da rede metabólica, tanto no aspecto bioquímico como processual.

Para viabilizar tais análises computacionais, é necessário um modelo baseado na interação entre os compostos para garantir uma certa fidelidade à realidade metabólica. Esses são reconhecidos como modelos químicos estruturados. Para se obter resultados com relevantes ajustes, interações entre pelo menos três compostos são necessárias. Já os modelos mais robustos, comumente utilizados, apresentam de vinte a quarenta compostos (15). Portanto, este trabalho emprega o modelo bioquímico estruturado apresentado em (2).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar a interdisciplinaridade entre as análises de controle metabólico e dinâmica na lógica metabólica do micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae*, via experimento *in silico*.

1.1.2. Objetivos Específicos

A partir do objetivo geral, trabalhos em específico são desenvolvidos:

- Avaliar a consistência do modelo estruturado em diferentes meios reacionais;
- Apresentar a relação entre as análises dinâmica e de controle metabólico;
- Identificar as isoenzimas mais relevantes, dentre as apresentadas no modelo estruturado, para propor estudos e manipulações genéticas;
- Quantificar o efeito da hidrólise intracelular da sacarose, devido à desativação da invertase extracelular, na rede metabólica.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOENERGÉTICA E METABOLISMO

Bioenergética é a ciência relacionada às transduções energéticas em células vivas, como também a natureza e a função dos processos químicos envolvidos.

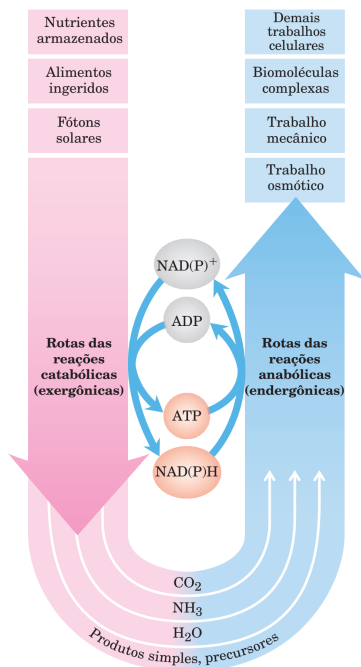
... em geral, a respiração é nada mais que a combustão lenta de carbono e hidrogênio, semelhante à que ocorre em uma lâmpada ou vela acesa, e, desse ponto de vista, animais que respiram são corpos combustíveis que queimam e consomem a si próprios... Alguém poderia dizer que esta analogia entre combustão e respiração não passou despercebida pelos poetas, ou ainda pelos filósofos da antiguidade, já tendo sido relatada e interpretada por eles. Esse fogo roubado dos céus, essa tocha de Prometeu, não representa apenas uma ideia engenhosa e poética, ela é um retrato fiel das operações da natureza, pelo menos para os animais que respiram; portanto, alguns podem dizer, com os antigos, que a tocha da vida ilumina a si mesma no momento em que a criança respira pela primeira vez, e ela só se extingue na morte.¹

Através dessa ciência, é possível entender como os microrganismos mantêm-se sem vivos, realizando troca mássica e energética com o meio, sem atingir o equilíbrio químico. São, portanto, sistemas abertos envolvendo gasto energético para se manterem com menor entropia que o meio, a determinadas temperatura e pressão.

¹De uma autobiografia de Armand Seguin e Antonie Lavoisier, de 1789, citada em Lavoisier, A. (1862) *Oeuvres de Lavoisier*, Imprimerie Impériale, Paris (1).

Os microrganismos quimiotróficos obtêm essa energia livre (ΔG) pelo catabolismo de nutrientes, a fim de produzir ATP a partir de ADP e P_i . Assim, o ATP doa parte de sua energia química para processos endergônicos como a síntese de intermediários metabólicos e de macromoléculas a partir de precursores, para o transporte de compostos através da membrana citoplasmática contra gradientes de concentração, movimentos mecânicos. Para a hidrólise de ATP em condições intracelulares, a energia livre frequentemente é chamada de potencial de fosforilação, ΔG_p . Esse mecanismo é apresentado na Figura 2.1 (1).

Figura 2.1: Atuação central do ATP e do NADH no metabolismo (1).



Talvez nada seja mais importante para uma célula, após a proteção de seu DNA contra danos, do que a manutenção de um suprimento e de uma concentração molar de trifosfato de adenosina, [ATP], constantes. Se a [ATP] diminuir significativamente, estas enzimas não estarão totalmente saturadas por esse composto, e a velocidade de centenas de reações que envolvem ATP seria reduzida. A célula provavelmente não sobreviveria a este efeito cinético sobre tantas reações. Ainda existe

o efeito termodinâmico na redução de [ATP]. Uma vez que esse composto é convertido em ADP ou AMP, quando é consumido para realizar trabalho celular, a relação [ATP]/[ADP] afeta profundamente todas as reações que utilizam estes cofatores, cujo princípio também é válido para $[NADH]/[NAD^+]$ e $[NADPH]/[NADP^+]$.

A [AMP] é um indicador ainda mais sensível do estado energético da célula do que a [ATP]. As células normalmente possuem concentração muito mais alta de ATP (5 a 10 mmol/L) do que de AMP ($< 0,1$ mmol/L). Quando alguns processos consomem ATP, o AMP é produzido em duas etapas. Inicialmente a hidrólise do ATP produz ADP, e em seguida a reação catalisada pela adenilato-cinase produz AMP, de acordo com a Eq.(2.1):

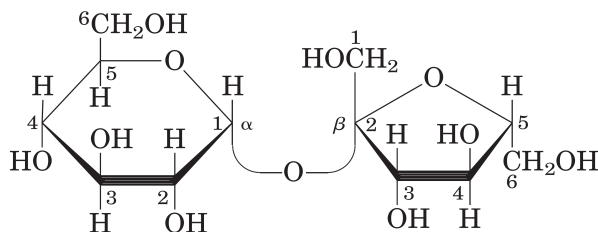


Se o ATP for consumido de forma que sua concentração diminua 10%, o aumento relativo na [AMP] é muito maior do que na [ADP]. Por isso, não é surpreendente que muitos processos reguladores sejam comandados por alterações na [AMP].

2.1.1. Açúcares: fontes de energia livre

Dentre os nutrientes disponíveis, os açúcares ou sacarídeos, são os mais abundantes na natureza. *E.g.*, composto pelos monossacarídeos glicose e frutose, unidos covalentemente por ligações *O*-glicosídicas, o dissacarídeo sacarose é formado por plantas ao longo da fotossíntese. A Figura 2.2 apresenta a estrutura $\text{Glc}(\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta)\text{Fru}$, em que salienta-se os carbonos $\alpha 1$ e 2β da glicose e frutose, respectivamente, responsáveis pela ligação característica (1).

Figura 2.2: Representação da sacarose, salientando a ligação *O*-glicosídica entre glicose e frutose (1).



Uma vez que os polissacarídeos glicogênio e amido, e o dissa-

carídeo sacarose são reservas de açúcares, tais compostos devem ser desestruturados aos seus monossacarídeos, a fim de serem utilizados no metabolismo celular. As enzimas responsáveis pela degradação da sacarose são conhecidas como sacarases ou invertases.

De acordo com o banco de dados BRENDA – *The Comprehensive Enzyme Information System* – (16), o código EC 3.2.1.26 refere-se à β -frutofuranosidase, ou invertase, existindo em duas diferentes formas nos fungos, as intra- e extracelulares. A faixa de estabilidade dessas enzimas é essencialmente idêntica, indicando que alta concentração de açúcares não afeta significativamente a estabilidade da invertase externa (17).

Uma vez obtida a glicose, a molécula é degradada por uma série de reações enzimaticamente catalizadas até duas moléculas de piruvato, cujo processo é conhecido como glicólise. A Tabela 2.1 apresenta as dez reações dessa série, os códigos de identificação (ID) e os respectivos $\Delta G' ^\circ$. As cinco primeiras reações compõem a fase preparatória, em que ocorre consumo de duas moléculas de ATP e a quebra da glicose em dois gliceraldeído-3-fosfatos (G3P). As demais reações representam a fase de pagamento, em que se obtém 2 piruvatos e quatro ATPs, cujo saldo final energético é de 2 ATPs por molécula de glicose consumida (1).

Tabela 2.1: Reações da glicólise e os respectivos $\Delta G' ^\circ$ (1).

| ID | Reação | [kJ mol ⁻¹] |
|------|---|-------------------------|
| HEX1 | GLC + ATP → G6P + ADP | -16,7 |
| PGI | G6P ⇌ F6P | -1,70 |
| PFK | F6P + ATP → FDP + ADP | -14,2 |
| ALD | FDP ⇌ DHAP + GAP | 23,8 |
| TPI | DHAP ⇌ G3P | 7,50 |
| TDH | G3P + NAD ⁺ + P _i ⇌ 13DPG + NADH + H ⁺ | 6,30 |
| PGK | 13DPG + ADP ⇌ 3PG + ATP | -18,5 |
| PGM | 3PG ⇌ 2PG | 4,40 |
| ENO | 2PG ⇌ PEP + H ₂ O | 7,50 |
| PYK | PEP + ADP → PYR + ATP | -31,4 |

A glicólise é praticamente uma rota central universal do catabolismo de glicose, no qual ocorre o maior fluxo de carbono na maioria das células. Muitos micro-organismos anaeróbicos, como o *Saccharomyces cerevisiae*, é totalmente dependente da glicólise. Sob condição hipóxica ou anaeróbica, a obtenção de energia é por via fermentativa, produzindo

etanol a partir do piruvato. A Tabela 2.2 apresenta a descarboxilação do piruvato (PYR) a acetaldeído (AcAld) e a redução deste a etanol (EtOH), bem como seus respectivos $\Delta G' ^\circ$.

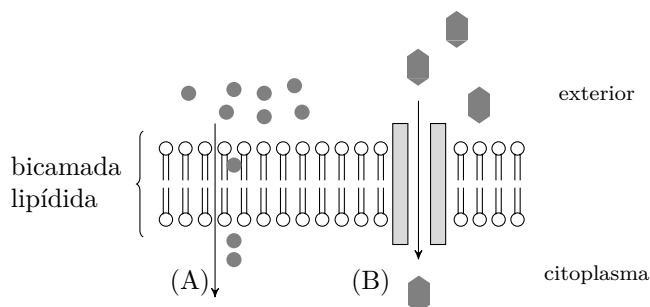
Tabela 2.2: Reações de conversão do piruvato a etanol e os respectivos $\Delta G' ^\circ$ (1).

| Reação | $[kJ\ mol^{-1}]$ |
|--|------------------|
| $PYR \rightarrow AcAld + CO_2$ | -19,8 |
| $AcAld + NADH + H^+ \rightleftharpoons EtOH + NAD^+$ | -23,7 |

2.1.2. Transporte transmembrana de açúcares

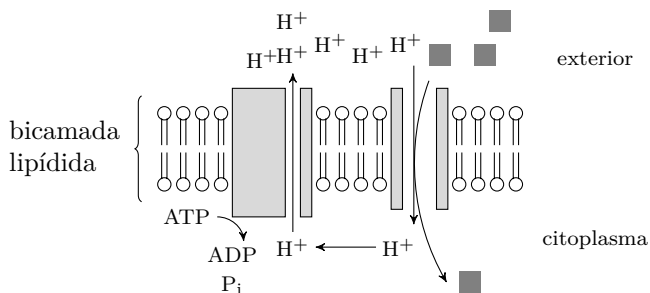
A existência das invertases intra- e extracelular viabiliza a hidrólise da sacarose a glicose e frutose nos respectivos meios reacionais. O aumento da concentração de monossacarídeos extracelulares intensificaria a força-motriz de difusão simples através da membrana celular. Porém, esse transporte é virtualmente inviável para compostos polares e iônicos, devido à alta resistência da bicamada lipídica. Por isso, existem proteínas transportadoras, também conhecidas como *permeases*, viabilizando o transporte, agora denominado de difusão facilitada. O fenômeno (A) da Figura 2.3 é o transporte transmembrana de soluto sem resistência espacial, lipofóbica e iônica; o (B) revela que a difusão facilitada também não precisa de gasto energético, mesmo ocorrendo através de uma proteína. Este, portanto, representa o transporte transmembrana da glicose.

Figura 2.3: Difusões simples (A) e facilitada (B) de solutos através da bicamada lipídica celular.



Já o transporte de frutose e sacarose é conhecido como simporte, pois H^+ é incorporado simultaneamente com o açúcar, demonstrado na Figura 2.4. Caso os sentidos de transferência dos solutos fossem opostos, o fenômeno seria denominado de antiporte. Devido à entrada de prótons, a célula precisa regular o pH citoplasmático, enviando-os para o exterior, através da enzima ATPase, na qual ocorre consumo de uma molécula de ATP para cada próton transferido. Esse é o transporte ativo, termodinamicamente desfavorável, pois ocorre contra o gradiente de concentração hidrogeniônica, também apresentado na Figura 2.4 (1).

Figura 2.4: Simporte de soluto e transporte ativo de H^+ através da bicamada lipídica celular. ■ representa frutose e sacarose.



Cabe à dinâmica desses fenômenos a relevância de estudos proteômicos e cinéticos. Enzimas geneticamente distintas podem ser responsáveis pela mesma reação ou transporte transmembrana, conhecidas como isoenzimas. Cada uma dessas proteínas tem um grau de afinidade (K_s) com substratos, e uma capacidade intrínseca de convertê-los a produtos por uma unidade de tempo, propriedade conhecida como *turnover*, (k_{cat}). Ainda, caso a enzima sofra inibição, existe a afinidade com o inibidor, quantificada por (K_i).

A complexidade do consumo de substrato deve-se a um sistema múltiplo de transportes, devido a presença de isoenzimas, possibilitando a incorporação de compostos em uma ampla faixa de concentração. *E.g.*, *S. cerevisiae* é capaz de atuar sobre concentrações da ordem de 10^{-3} – 10^0 de açúcares. Isso pode mascarar o momento de saturação de uma isoenzima e revelar um perfil linear de consumo, comumente encontrado em fungos (18).

Outro fator agravante nesse fenômeno é identificar geneticamente a origem do K_s , visto que tal informação provém não necessariamente de genes distintos. Em *S. cerevisiae* foram identificadas famílias de

genes que codificam vinte tipos distintos de permeases para hexose – açúcar composto por seis carbonos, como a glicose – conhecidas como Hxt1p–Hxt17p, Gal2p, Snf3p, Rgt2p. Apresenta-se na Tabela 2.3 quão distintas afinidades com a glicose as isoenzimas podem apresentar, bem como as formas de indução e inibição da difusão facilitada. A constante K_m refere-se à afinidade enzima-substrato sob a perspectiva cinética de Michaelis-Menten (4, 18, 19).

O sistema de afinidade a glicose apresenta-se baixo quando o micro-organismo está submetido a um meio reacional com alta concentração de glicose extracelular, [GLCe]. Na situação inversa, a afinidade é alta, porém, culturas em quimiostatos já comprovaram frequentemente atividades de isoenzimas com baixa e alta afinidades em meio com baixa [GLCe] (18, 19).

Já em relação ao transporte ativo de H^+ , o gene PMA1 é o principal codificador da ATPase, essencial e limitante na taxa de crescimento celular. Caso ocorra uma alteração em PMA1, o controle do pH citoplasmático é comprometido, afetando a adequação do micro-organismo ao meio de cultura (20). O gene PMA2 também é responsável por essa codificação, porém com um sistema de controle diferenciado (21).

2.2. FERRAMENTAS PARA ENGENHARIA METABÓLICA

A modelagem cinética tradicional, no campo da bioquímica, é desenvolvida a partir de experimentos enzimáticos *in vitro* em condições ótimas de pH. Assim, obtém-se os parâmetros cinéticos em relação à melhor atividade enzimática, isoladamente. Porém, as enzimas da rede metabólica atuam em conjunto, submetidas ao pH celular, *i.e.*, não adequadas à atividade ótima de todas as enzimas simultaneamente. Dessa forma, os parâmetros anteriormente encontrados não são representativos para o sistema em estudo. Certamente existe uma discrepância reacional entre experimentos *in vitro* e *in vivo*. Assim, é necessário definir uma rota de análise coerente com o objetivo da pesquisa.

Modelos baseados na interação entre os componentes celulares favorecem a uma avaliação com maior fidelidade à realidade metabólica. Esses são reconhecidos como modelos quimicamente estruturados. Para se obter resultados com relevantes ajustes, interações entre pelo menos três componentes são necessárias. Já os modelos mais robustos, comumente utilizados, apresentam de vinte a quarenta componentes (15).

Para estruturar tais modelos, as reações devem ser expressas em

Tabela 2.3: Características de algumas permeases de hexoses em *S. cerevisiae* (4).

| Proteína | Propriedades | Regulação |
|----------|---|--|
| Hxt1p | baixa afinidade com glicose; $K_m = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ | induzida por alta [GLCe] via Rgt2p-Rgt1p e também por stress hiperosmótico; apresenta rota independente |
| Hxt2p | intermediária a alta afinidade com glicose, modulada pelo meio de cultura; $K_m = \frac{1,5}{60}$ ou 10 mmol L^{-1} | induzida por baixa [GLCe] via Snf3p-Grr1p; inibida por alta [GLCe] via Migp |
| Hxt3p | baixa afinidade com glicose; $K_m = 60 \text{ mmol L}^{-1}$ | induzida por glicose, independente da concentração |
| Hxt4p | afinidade intermediária com glicose; $K_m = 9 \text{ mmol L}^{-1}$ | induzida por baixa [GLCe] via Snf3p-Grr1p; inibição por alta [GLCe] depende da linhagem do micro-organismo |
| Hxt5p | permease de glicose | baixo nível de expressão |
| Hxt6p | alta afinidade com glicose; $K_m = 1.5 \text{ mmol L}^{-1}$ | expressão independente da fonte de carbono; inibida por alta [GLCe] |
| Hxt7p | alta afinidade com glicose; $K_m = 1.5 \text{ mmol L}^{-1}$ | expressão independente da fonte de carbono; inibida por alta [GLCe] |
| Hxt8p | permease de glicose | baixo nível de expressão |
| Hxt9p | envolvida em resistência pleiotrópica a drogas | induzida por drogas via Pdr1p e Pdr3p |
| Hxt11p | envolvida em resistência pleiotrópica a drogas; auxilia incorporação de glicose em <i>K. lactis</i> | induzida por drogas via Pdr1p e Pdr3p |
| Gal2p | alta afinidade com galactose e glicose | induzida por galactose via Gal1p-Gal3p-Gal4p |
| Snf3p | detecta baixa [GLCe]; repressor de Hxt6 | baixo nível de expressão; inibição por glicose |
| Rgt2p | detecta alta [GLCe] | baixo nível de expressão; constitutiva. |

termos de concentrações intrínsecas – concentração por massa ou volume citoplasmático – diluídas pelo crescimento celular . O modelo empregado (2) baseia-se no volume citoplasmático efetivo (k_{cell}), sendo

considerado o principal parâmetro do sistema. No modelo (2) as concentrações dos compostos são avaliadas a partir do número de moléculas por célula, de acordo com a Eq.(2.2) (2),

$$C_A = \frac{n_A}{k_{cell}NA} \quad (2.2)$$

em que C_A é a concentração do composto A em $mmol L^{-1}$, n_A é o número de compostos A dentro da célula com volume citoplasmático fixo igual a k_{cell} , em L . NA é a constante de Avogadro, em $mmol^{-1}$.

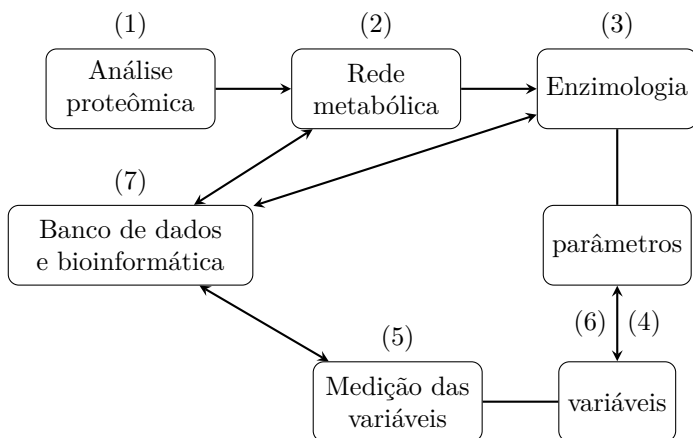
No modelo de referência (2) existem os compartimentos *extracellular* e *cell*, sendo ambos fixados em $1 L$. Trata-se de organização estrutural e útil para definição de transporte transmembrana. A diluição da concentração intrínseca é irrelevante em modelos que consideram números de compostos intracelulares, visto que a análise metabolômica revela o número de moléculas por célula.

Mesmo em modelos quimicamente estruturados, a representatividade enzimática deve ser alvo de maior atenção. Desconsiderar a atuação de isoenzimas pode mascarar o comportamento dinâmico real do metabolismo. Isso ocorre quando modelos cinéticos agrupam em uma mesma constante enzimática os valores referentes à atuação dessas isoenzimas (22). Estimou-se que existem 530 famílias de proteínas duplicadas na *Saccharomyces cerevisiae* (23). Dessa forma, para que uma caracterização cinética consistente fosse feita, o modelo de referência baseou-se em uma rede metabólica em escala genômica (2). Logo, a partir desse trabalho é possível inferir a respeito de divergências comportamentais do micro-organismo ao ser submetido em diferentes condições experimentais.

Essa complexa representatividade é atingida seguindo a estratégia do ciclo de conhecimento indutivo-dedutivo. Modelos matemáticos preditivos são usados para interpretar, organizar e integrar uma vasta quantidade de dados experimentais. Os modelos geram hipóteses sobre a complexa dinâmica do sistema, que são testadas experimentalmente. Em seguida, os modelos são validados e atualizados, continuando o ciclo (2). Essa estratégia foi realizada dezoito vezes pelos autores, cujo detalhe da rota é apresentada na Figura 2.5.

Smallbone et al. (2) estruturaram o modelo de tal forma que seguisse os padrões pré-estabelecidos pela *YEASTNET*, que se trata de um cumprimento às normas e às precisões bioquímicas (24), considerando o ciclo de conhecimento indutivo-dedutivo, cujas etapas são explicitadas nos itens de 1 a 7, demonstradas na Figura 2.5, bem como a finalização do trabalho, nos itens de 8 a 10.

Figura 2.5: Estratégia para produzir e testar modelos biológicos, (adaptado) (2).



1. Definição das condições externas do sistema biológico coerente com a cultura celular.
2. Construção da rede topológica, em que todas as reações metabólicas são definidas e associadas com todas as isoenzimas conhecidas. Esse processo é realizado extraíndo informações de uma rede metabólica em escala genômica ou compilando dados literários.
3. O modelo cinético é então construído de acordo com as informações definidas no item anterior. As leis das taxas reacionais, bem como os valores dos parâmetros, são obtidos por modelos anteriores ou estimados por dados experimentais de acesso livre.
4. O modelo é avaliado através do programa *COPASI* (25), em que se define os fluxos reacionais e as concentrações dos compostos no estado estacionário.
5. As propriedades que controlam o sistema são identificadas computacionalmente, *i.e.*, reações que exercem maior influência sobre a rede.
6. Uma vez identificadas tais propriedades, essas reações são experimentalmente reavaliadas. Particularmente, o *turnover* enzimático (k_{cat}) e as constantes de afinidade de cada isoenzima são medidos e aplicados ao modelo para refiná-lo.
7. Os pontos 3–5 são repetidos até caracterizar corretamente as reações, quando os parâmetros cinéticos determinados possuem a mesma ordem de grandeza daqueles encontrados nos bancos de

dados.

8. Com o modelo corretamente estruturado após esse ciclo de conhecimento, valores preditos no estado estacionário são comparados com os obtidos experimentalmente.
9. Ajuste final após essa comparação é feito para reduzir qualquer desvio entre valores preditos e mensurados.
10. Modelos e dados relevantes obtidos ao longo desse processo são depositados em banco de dados específicos, tais como *BioModels* (26), (2).

Entretanto, estudos de micro-organismos ainda não mapeados geneticamente carecem de parâmetros iniciais. Apesar de se conhecer a estequiometria de rotas metabólicas, em que produtos de interesse estão envolvidos, pouco se sabe a respeito do efeito de interferências nas reações e nos transportes enzimáticos. Isso dificulta a identificação enzimática, ou o conjunto delas, ao realizar uma alteração genética. Comumente, a maioria dessas enzimas é selecionada intuitivamente, ao analisar compostos facilmente quantificados, como NADPH, apontando para a via das pentoses-fosfato. Tal limitação experimental corrobora a necessidade de modelos matemáticos baseados em escala genômica, por conduzir análises e possibilitar inferências a respeito da rede metabólica (27).

Já a *Saccharomyces cerevisiae* possui duas vantagens, em particular, que favorecem a esse tipo de estudo: (1) a caracterização genética muito bem definida e (2) a capacidade em atingir o estado estacionário em variadas condições de cultura contínuas. Assim, O objetivo desse trabalho pode ser atingido com o modelo proposto por Smallbone et al. (2), através de experimentos *in silico*.

2.2.1. Análise do Fluxo Metabólico (MFA)

Em um mapa bioquímico, *fluxo* é definido como a taxa que um composto é processado ao longo de uma via reacional no estado estacionário. Emprega-se a metodologia conhecida como Análise de Fluxo Metabólico (MFA) para calcular fluxos intracelulares a partir do modelo estequiométrico da rede metabólica e dos balanços mássicos dos metabólitos envolvidos. Assim, o objetivo da MFA é determinar o mapa de fluxo metabólico, analisando inversamente os sistemas de balanços para atingir os valores dos fluxos extracelulares observados (27).

2.2.2. Análise do Controle Metabólico (MCA)

A avaliação de um sistema bioquímico requer inferências através parâmetros e variáveis. No modelo de Michaelis-Menten, e.g., avalia-se o parâmetros k_{cat} , K_s , K_p e K_i , caso exista inibição. Se for conhecida a concentração enzimática, $[E]$, também é considerada como um parâmetro, ou a avaliação do comportamento enzimático pode ser feita pela velocidade específica máxima da reação, v_{max} , definida como $k_{cat} \cdot [E]$. Já as variáveis são as espécies analisadas dinamicamente no processo.

Na rede metabólica definida pelo modelo (2) e apresentada na Figura 2.6, a complexidade da relação entre as sessenta e uma espécies, sendo 20 dinâmicas, é ditada por trinta e três reações, que são definidas por oitenta e seis funções, totalizando 167 parâmetros cinéticos e 13 variáveis globais. Assim, a avaliação da contribuição de todos os parâmetros torna-se complexa matematicamente, caso seja feita pelo método sensitivo tradicional.

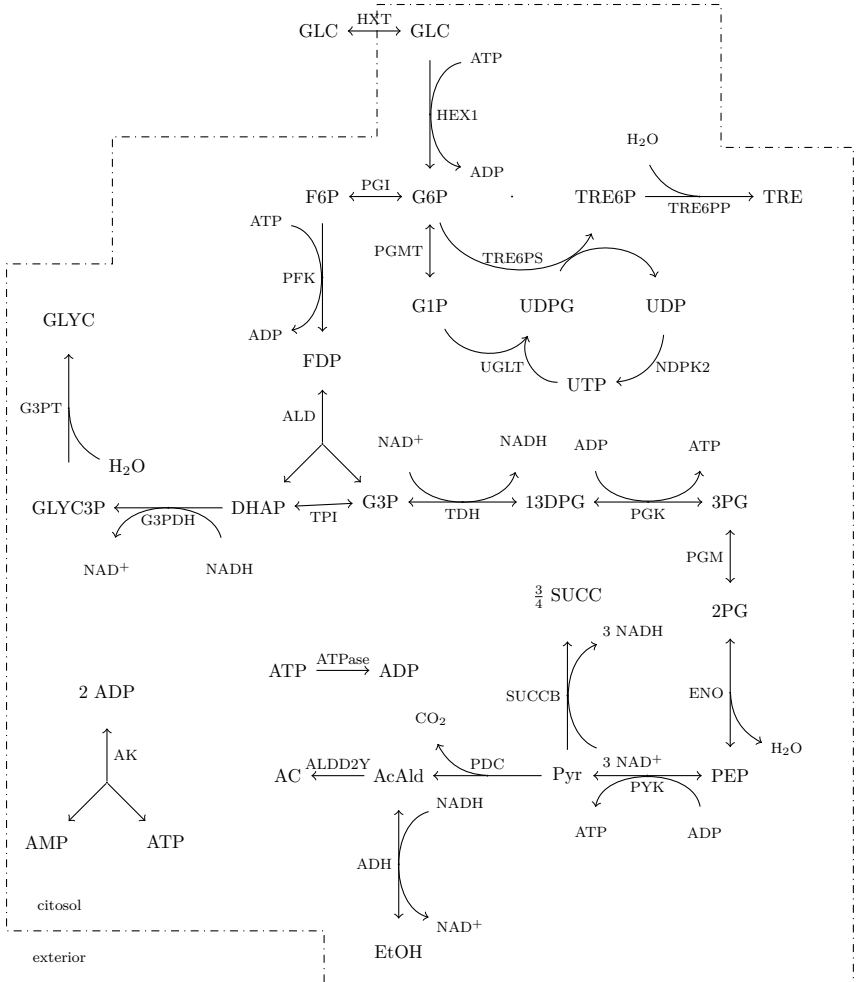
Algumas das reações foram representadas com isoenzimas, as quais são explicitadas na Tabela 2.4. *E.g.*, a reação de fosforilação da glicose (HEX1) ocorre via três tipos de enzimas: GLK1, HXK1 e HXK2, cujos parâmetros cinéticos são ajustados de acordo com a contribuição de cada uma.

Devido à essa complexidade metabólica, H. Kacser & J. A. Bruns (1973) (29) e R. Heinrich & T. A. Rapoport (1974) (30) propuseram uma análise sensitiva fenomenológica quantitativa de fluxos reacionais e de concentrações dos metabólitos, conhecida como Análise de Controle Metabólico (MCA). Trata-se de uma análise qualitativa através do mapa metabólico e quantitativa pelos princípios da enzimologia. Para tanto, dois coeficientes são necessários para realizar esse trabalho: coeficiente de controle e elasticidade (28).

Coefficiente de controle

Esse coeficiente é uma propriedade de todo o sistema metabólico, revelando a dimensão da sensitividade de uma variável em relação a um parâmetro. Normalmente, as variáveis consideradas são concentrações dos metabólitos (S) e fluxos reacionais (J) (28). Tal grandeza é definida nas Eqs.(2.3) e (2.4), sendo a barra sobre o coeficiente um destaque para a dimensionalidade (29, 30):

Figura 2.6: Rede metabólica da *Saccharomyces cerevisiae* definida no modelo bioquímico estruturado (2).



$$\bar{C}_i^\alpha = \frac{\partial \alpha}{\partial v_i} \quad (2.3)$$

$$C_i^\alpha = \frac{v_i}{\alpha} \frac{\partial \alpha}{\partial v_i} = \frac{\partial \ln(\alpha)}{\partial v_i}, \quad \alpha = S \text{ ou } J \quad (2.4)$$

Tabela 2.4: Identificação das isoenzimas definidas no modelo estruturado (2), de acordo com o código apresentado na rede metabólica, revelada na Figura 2.6.

| Código | Reagente | Isoenzimas |
|--------|----------|------------|
| HEX1 | GLCc | GLK1 |
| | | HXK1 |
| | | HXK2 |
| TDH | G3P | TDH1 |
| | | TDH2 |
| | | TDH3 |
| ENO | 2PG | ENO1 |
| | | ENO2 |
| PYK | PEP | CDC19 |
| | | PYK2 |
| PDC | PYR | PDC1 |
| | | PDC5 |
| | | PDC6 |
| ADH | AcAld | ADH1 |
| | | ADH5 |

em que α é uma variável perturbada pela reação v_i . Sendo $\alpha = S$, denomina-se coeficiente de controle de concentração; $\alpha = J$, coeficiente de controle de fluxo. Avaliação através de grandezas dimensionais assegura inferências independentes das magnitudes dos parâmetros.

Experimentalmente, velocidades reacionais não podem ser perturbadas diretamente. Por isso, as interferências são feitas nas concentrações enzimáticas, devido à linearidade que existe entre a velocidade reacional e um determinado intervalo da concentração enzimática. Por isso, as Eqs. (2.3) e (2.4) podem ser expressas como:

$$\bar{C}_i^\alpha = \frac{\partial \alpha}{\partial E_i} \quad (2.5)$$

$$C_i^\alpha = \frac{E_i}{\alpha} \frac{\partial \alpha}{\partial E_i} = \frac{\partial \ln(\alpha)}{\partial \ln(E_i)} \quad (2.6)$$

em que E_i é a concentração enzimática da reação i (29).

Os coeficientes dimensionais apresentam unidades de acordo com as variáveis avaliadas:

$$\bar{C}_i^S \quad [=] \quad \frac{\text{mmol/L [S]}}{\text{mmol/L [E}_i\text{]}}$$

$$\bar{C}_i^J \quad [=] \quad \frac{\text{mmol/s reacional}}{\text{mmol/L [E}_i\text{]}}$$

Uma vez que a perturbação em $[E]_i$ afeta todas as reações pertencentes à rede metabólica, esse coeficiente possui característica global.

Elasticidade

Já o coeficiente de elasticidade, ou simplesmente elasticidade, é uma propriedade local do sistema. Visto que nessa análise sensitiva v_i é a grandeza analisada a partir da perturbação em uma grandeza γ . Define-se as elasticidades dimensional e adimensional nas Eqs.(2.7) e (2.8), respectivamente (29):

$$\bar{\varepsilon}_\gamma^i = \frac{\partial v_i}{\partial \gamma} \quad (2.7)$$

$$\varepsilon_\gamma^i = \frac{\gamma}{v_i} \frac{\partial v_i}{\partial \gamma} = \frac{\partial \ln(v_i)}{\partial \ln(\gamma)} \quad (2.8)$$

Concentrações dos metabólitos podem ser perturbados, analisando a elasticidade de (v_i) . Logo, tal coeficiente pode ser também dinâmico, não sendo uma análise exclusiva do estado estacionário.

A unidade é definida de acordo com o parâmetro considerado:

$$\bar{\varepsilon}_\gamma^i [=] \frac{\text{mmol/s reacional}}{\text{mmol/L } [\gamma]}$$

Visto que uma perturbação em γ afeta somente as reações em que é participante, elasticidade possui natureza local.

Teorema da Soma

A teoria da cinética química revela que a velocidade de um processo multi-reacional em série é definida pela reação mais lenta. Assim, essa é o alvo de experimentos laboratoriais e estudos de mecanismos cinéticos, com o intuito de se apresentar um modelo coerente à realidade observada.

Entretanto, a estrutura de um sistema bioquímico é mais complexa e exige cuidados especiais nas considerações matemáticas. A

utilidade de um modelo cinético está principalmente em sua reprodutibilidade e conseqüentemente na previsibilidade reacional. A resposta a uma perturbação externa, o tempo necessário para se atingir o estado estacionário ou determinada concentração de um produto desejado são informações essenciais para que um modelo seja aceito. Por isso, restringir um mapa metabólico a uma única reação acarreta perdas de informações e incoerência com a realidade.

Por isso, em (29, 30) foi definido o Teorema da Soma, representado pelas Eqs.(2.9) e (2.10):

$$\sum_i C_i^J = 1 \quad (2.9)$$

$$\sum_i C_i^S = 0 \quad (2.10)$$

em que J representa o fluxo reacional e S a concentração do metabólito, avaliados em relação a todas as reações pelo índice i .

A Eq.(2.9) revela que o impacto de todas as reações sobre os fluxos reacionais é igual a 100%. Obviamente, isso era esperado, porque não houve restrição de nenhuma reação e todas compõem a rede metabólica. No instante em que esse coeficiente eleva-se em uma reação, em outra ele irá reduzir-se, mantendo esse somatório verdadeiro. Já a Eq.(2.10) demonstra que as interferências das concentrações enzimáticas no sistema se anulam em um equilíbrio dinâmico, pois encontra-se em estado estacionário e sem perturbações externas, inerente de um sistema isolado. Assim, esse teorema comprova a natureza global do coeficiente de controle (29).

Teorema da Conectividade

Os coeficientes de controle podem ser calculados a partir das elasticidades, visto que o conjunto de todas as contribuições locais definem a global. O Teorema da Conectividade revela que o somatório do produto entre coeficiente de controle de fluxo (C_i^J) e elasticidade (ε_S^i), da reação J , afetados pelo metabólito S é igual a zero, como apresentado na Eq.(2.11) (29):

$$\sum_i C_i^J \varepsilon_S^i = 0 \quad (2.11)$$

A Eq.(2.11) revela que o fluxo reacional J possui uma conectividade com a rede metabólica a partir de cada reação i , de acordo com

a perturbação em S . Cada efeito local de S , ε_S^i , afeta o fluxo J ponderadamente pelo efeito global de cada reação i , C_i^J . Como o sistema é isolado, o efeito geral é nulo.

Para os coeficientes de controle de concentração, aplica-se as Eqs.(2.12) e (2.13) (31),

$$\sum_i C_i^A \varepsilon_S^i = 0, \quad A \neq S \quad (2.12)$$

$$\sum_i C_i^S \varepsilon_S^i = -1 \quad (2.13)$$

em que A é um metabólito de referência e S é o que sofreu perturbação. Essas equações permitem verificar se A faz parte do sistema isolado, de acordo com a perturbação de S , quando $A \neq S$ e avaliando todas as reações.

Exemplificando, considere um sistema reacional definido pela Eq.(2.14):



em que S e P são espécies fixas e X um intermediário metabólico, em um sistema que atinge o estado estacionário. Cada reação tem sua enzima E e conseqüentemente uma velocidade reacional v . Nesse sistema, a perturbação é feita em X para verificar o impacto nas reações (27, 32).

Aplicando os Teoremas da Soma e da Conectividade com coeficientes de controle de fluxo,

$$\begin{aligned} C_1^J + C_2^J &= 1 \\ C_1^J \varepsilon_X^1 + C_2^J \varepsilon_X^2 &= 0 \end{aligned}$$

obtm-se a relação entre as elasticidades e tais coeficientes, para cada reação:

$$\begin{aligned} \therefore C_1^J &= \frac{\varepsilon_X^2}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \\ \therefore C_2^J &= \frac{-\varepsilon_X^1}{\varepsilon_X^2 - \varepsilon_X^1} \end{aligned}$$

Caso a primeira reação seja praticamente indiferente à perturbação em X , implica-se que $\varepsilon_X^1 \rightarrow 0$. Assim, os coeficientes resultam

em $C_1^J = 1$ e $C_2^J = 0$. Logo, todo o sistema é controlado pela primeira reação. Trata-se da consideração tradicional em análises cinéticas de sistemas multi-reacionais (32).

As expressões da elasticidade são obtidas através das equações das velocidades reacionais. Considere que no sistema da Eq.(2.14), a reação 1 seja de ordem n em relação a S e de ordem m em relação a X , já a reação 2 é definida pela expressão de Michaelis-Menten:

$$\begin{aligned} v_1 &= kS^n X^m \\ v_2 &= \frac{k_{\text{cat}} E_2 X}{K_X + X} \end{aligned}$$

assim, as elasticidades, de acordo com a definição na Eq.(2.8), são

$$\begin{aligned} \varepsilon_X^1 &= m \\ \varepsilon_X^2 &= \frac{K_X}{K_X + X} \end{aligned}$$

Isso implica que o impacto de X na primeira reação é igual a sua ordem m . Já o impacto na segunda reação revela que ε não é estritamente constante, pois depende de $[X]$ (29).

Coeficiente de Resposta Particionado

Todos os coeficientes e Teoremas até aqui apresentados revelam propriedades inerentes da rede metabólica. Porém, ela pode sofrer interferências externas, como compostos tóxicos, hormônios, outra fonte de carbono. Para analisá-las, definiu-se o coeficiente de resposta particionado. As Eqs.(2.11), (2.12) e (2.13) podem ser expandidas para compreender o feito no sistema ao ser perturbado por uma variável externa X , definido na Eq.(2.15) (29):

$$R_X^\omega = \sum_i C_i^\omega \varepsilon_X^i, \quad \omega = S \text{ ou } J \quad (2.15)$$

No momento em que X atuar no fluxo reacional J da reação HXT, *e.g.*, a perturbação terá uma intensidade igual a $C_{[E]_{\text{HXT}}}^{J_{\text{HXT}}} \varepsilon_{[X]}^{J_{\text{HXT}}}$. Dessa forma, interferências de espécies em transportes transmembrana podem ser quantificadas. Verifica-se como essa interferência se distribui nas reações de interesse aplicando a Eq.(2.15).

2.3. ANÁLISE DINÂMICA

A MCA consiste em uma análise quantitativa e fenomenológica de fluxos reacionais e concentrações das espécies químicas. Já uma análise dinâmica revela o perfil comportamental de uma reação frente a uma perturbação após seu estado estacionário. Em suma, ambas as técnicas são análises sensitivas. Os coeficientes resultantes da MCA representam a intensidade da perturbação. Já análise dinâmica apresenta dois coeficientes, o tempo de resposta, (τ), e o ganho estático, (K). Aquele é o tempo em que uma reação demora para responder à perturbação e este é a contribuição da perturbação no fluxo reacional.

O modelo bioquímico estruturado (2) é definido por um sistema de vinte equações diferenciais ordinárias não-lineares, do qual as concentrações dos metabólitos são numericamente determinadas. Devido à inviabilidade de solução analítica, por experimentos *in silico* realiza-se a análise dinâmica, obtendo o perfil comportamental das reações, através da função de transferência. Trata-se uma expressão algébrica que relaciona dinamicamente as variáveis de entrada e de saída de um processo, de tal forma que é possível prever o tipo das respostas reacionais, de acordo com as perturbações (33).

2.3.1. Dinâmicas de primeira e de segunda ordem

Existem várias técnicas experimentais de perturbação para determinar a função de transferência (33, 34), dentre as quais as do tipo degrau e impulso foram empregadas nesse trabalho. Matematicamente, no domínio de Laplace, as representações destas interferências são definidas nas Eqs.(2.16) e (2.17).

$$X(s) = \frac{A}{s} \quad (2.16)$$

$$X(s) = A \quad (2.17)$$

em que A é a intensidade da perturbação, calculada pela relação entre o valor final desejado do parâmetro a ser perturbado (p_f) e um valor de referência (p_{ref}), arbitrário, normalmente advindo de condições experimentais bem conhecidas.

Normalmente, um processo tem resposta dinâmica de primeira ou de segunda ordem, representadas respectivamente pelas Eqs.(2.18) e (2.19), no domínio de Laplace,

$$P_1(s) = \frac{K}{\tau s + 1} \quad (2.18)$$

$$P_2(s) = \frac{K}{\tau^2 s^2 + 2\zeta\tau s + 1} \quad (2.19)$$

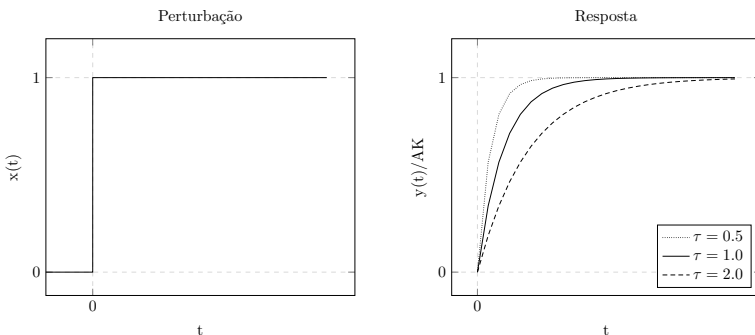
em que se apresenta o ganho estático K , constante de tempo τ do processo e o fator de amortecimento ζ . K apresenta a relação entre o valor inicial e final, atingido no estado estacionário, da variável analisada. Um alto valor de τ revela que a resposta é lenta, e o oposto é válido para pequenos valores, como demonstrado na Figura 2.7. Diante de um P_2 , τ é o período natural de oscilação e ζ , o grau de oscilação em uma resposta. Para pequenos valores de ζ , implica-se pouco amortecimento e muita oscilação, cujo efeito é revelado na Figura 2.8. Caso $\zeta = 0$, a resposta não é amortecida e o perfil gráfico é uma função senoidal (33).

Ao realizar uma perturbação do tipo degrau, os fluxos reacionais podem apresentar perfis dinâmicos semelhantes aos gráficos da Figura 2.7, sendo matematicamente representados pela Eq.(2.21). Obtém-se esta equação aplicando a transformada inversa de Laplace (33) na Eq.(2.20), que se trata do produto entre as Eqs.(2.16) e (2.18),

$$Y(s) = \frac{A}{s} \frac{K}{\tau s + 1} \quad (2.20)$$

$$y(t) = A K (1 - e^{-t/\tau}) \quad (2.21)$$

Figura 2.7: Perturbação em degrau e resposta de primeira ordem no domínio do tempo.



Caso o perfil seja semelhante aos apresentados na Figura 2.8, as expressões matemáticas podem ser as Eqs.(2.23), (2.24) ou (2.25),

obtidas pela transformada inversa de Laplace da Eq.(2.22), de acordo com o intervalo de ζ . Esta equação é o produto entre as Eqs.(2.16) e (2.19),

$$Y(s) = \frac{A}{s} \frac{K}{\tau^2 s^2 + 2\zeta\tau s + 1} \quad (2.22)$$

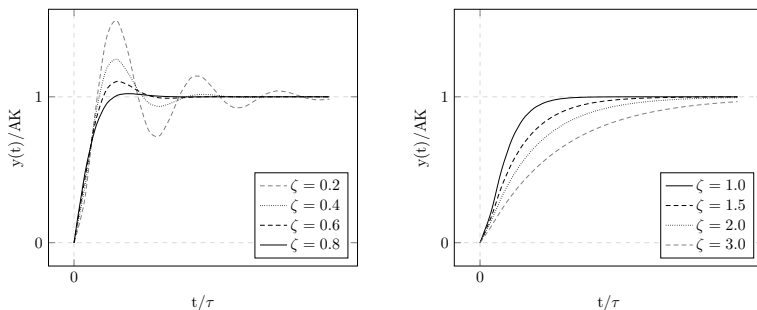
$$y(t) = KA \left\{ 1 - e^{-\zeta t/\tau} \left[\cos \left(\frac{\sqrt{1-\zeta^2}}{\tau} t \right) + \frac{\zeta}{\sqrt{1-\zeta^2}} \sin \left(\frac{\sqrt{1-\zeta^2}}{\tau} t \right) \right] \right\} \quad (2.23)$$

$$y(t) = KA \left[1 - \left(1 + \frac{t}{\tau} \right) e^{-t/\tau} \right] \quad (2.24)$$

$$y(t) = KA \left\{ 1 - e^{-\zeta t/\tau} \left[\cos \left(\frac{\sqrt{1-\zeta^2}}{\tau} t \right) + \frac{\zeta}{\sqrt{1-\zeta^2}} \sin \left(\frac{\sqrt{1-\zeta^2}}{\tau} t \right) \right] \right\} \quad (2.25)$$

sendo que a Eq.(2.23) representa o perfil gráfico com oscilação, quando $\zeta < 1$, característico de sistema subamortecido. Já a Eq.(2.24) descreve o perfil com $\zeta = 1$, o qual é definido como crítico, e a Eq.(2.25), com $\zeta > 1$, caracteriza um sistema sobreamortecido, nos quais não há oscilação.

Figura 2.8: Respostas de segunda ordem a perturbação em degrau, variando ζ , no domínio do tempo.



Por regressão não-linear e análise estatística dos dados experimentais no domínio do tempo, calcula-se as constantes K , τ e ζ , a partir

das equações características de cada perfil gráfico. Logo, define-se qual das Eqs.(2.18) ou (2.19) representa a função de transferência.

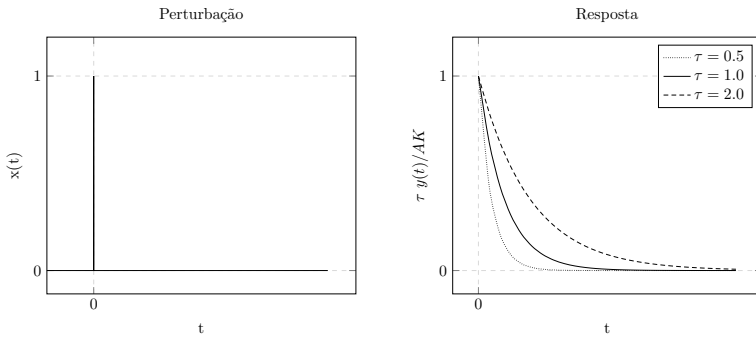
Por fim, as Eqs.(2.26) e (2.27) representam a resposta da perturbação em impulso, bem como os gráficos da Figura 2.9.

$$Y(s) = A \frac{K}{\tau s + 1} \quad (2.26)$$

$$y(t) = \frac{A K}{\tau} e^{-t/\tau} \quad (2.27)$$

Salienta-se que o impulso não altera o estado estacionário do processo, porque as curvas retornam para a condição inicial.

Figura 2.9: Perturbação em impulso e resposta de primeira ordem no domínio do tempo.



2.3.2. Teorema do Valor Final

O comportamento da rede metabólica é contínua ao longo do tempo. As Eqs.(2.20) e (2.22) são, portanto, contínuas por partes em s , bem como as equações definidas no domínio do tempo pela técnica de Laplace. Logo, é possível aplicar o Teorema do Valor Final (33) nas Eqs.(2.20) e (2.26) para se conhecer a condição reacional no estado estacionário, resultante da perturbação em degrau e em impulso, como apresentado respectivamente nas Eqs.(2.28) e (2.29),

$$\lim_{t \rightarrow \infty} y(t) = \lim_{s \rightarrow 0} \left[s \left(\frac{A K}{s \tau s + 1} \right) \right] = A K \quad (2.28)$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} y(t) = \lim_{s \rightarrow 0} \left[s \left(A \frac{K}{\tau s + 1} \right) \right] = 0 \quad (2.29)$$

graficamente representadas nas Figuras 2.7 e 2.9.

Este teorema estabelece que o valor assintótico de $y(t)$ para altos valores de tempo $y(\infty)$ pode ser encontrado pela Eq.(2.30), provando que $\lim_{s \rightarrow 0} [sY(s)]$ existe para todo $Re(s) \geq 0$ (33):

$$\lim_{t \rightarrow \infty} y(t) = \lim_{s \rightarrow 0} [s Y(s)] \quad (2.30)$$

A Eq.(2.30) pode ser provada usando a relação da transformada de Laplace para derivadas (33):

$$\int_0^{\infty} \frac{dy}{dt} e^{-st} dt = sY(s) - y(0) \quad (2.31)$$

Tomando o limite $s \rightarrow \infty$ e assumindo que dy/dt é contínua e $sY(s)$ tem um limite para todo $Re(s) \geq 0$ (33),

$$\int_0^{\infty} \frac{dy}{dt} = \lim_{s \rightarrow 0} [sY(s)] - y(0) \quad (2.32)$$

Integrando o lado esquerdo e simplificando, resulta em (33)

$$\lim_{t \rightarrow \infty} y(t) = \lim_{s \rightarrow 0} [sY(s)] \quad (2.33)$$

Esse teorema só é válido quando se conhece previamente a natureza assintótica da resposta, mesmo não conhecendo sua expressão matemática no domínio do tempo. *I.e.*, é necessário que exista $\lim_{t \rightarrow \infty} y(t)$ (33).

2.3.3. Propriedades das funções de transferência

Uma vez definida a função de transferência, é possível conhecer a variação da resposta no estado estacionário, caso exista, simplesmente igualando s a zero. Esse recurso é consequência do teorema do valor final, como demonstrado na Eq.(2.28). A Eq.(2.34) mostra que o ganho estático é a relação entre a variação na resposta e a variação no parâmetro responsável,

$$K = \frac{y^{ss} - y_{\text{ref}}^{ss}}{x^{ss} - x_{\text{ref}}^{ss}} \quad (2.34)$$

em que a entrada x_{ref}^{ss} define o estado estacionário de referência, cuja resposta é y_{ref}^{ss} . Essa relação é válida somente para processos contínuos (33).

Outra importante propriedade é a ordem polinomial do denominador (em s) da função de transferência, visto que é a mesma da

equação diferencial equivalente. Uma equação diferencial geral de ordem n possui a seguinte forma

$$\begin{aligned} a_n \frac{d^m y}{dt^n} + a_{n-1} \frac{d^{n-1} y}{dt^{n-1}} + \cdots + a_1 \frac{dy}{dt} + a_0 y = \\ b_m \frac{d^m x}{dt^m} + b_{m-1} \frac{d^{m-1} x}{dt^{m-1}} + \cdots + b_1 \frac{dx}{dt} + b_0 x \end{aligned} \quad (2.35)$$

em que y e x são saída e entrada do sistema, respectivamente. A função de transferência obtida por transformada de Laplace a partir da Eq.(2.35), com $y(0) = 0$ e todas as condições iniciais das derivadas de y e x nulas, é

$$P(s) = \frac{Y(s)}{X(s)} = \frac{\sum_{i=0}^m b_i s^i}{\sum_{i=0}^n a_i s^i} = \frac{b_m s^m + b_{m-1} s^{m-1} + \cdots + b_0}{a_n s^n + a_{n-1} s^{n-1} + \cdots + a_0} \quad (2.36)$$

demonstrando que os polinômios do numerador e do denominador tem ordens m e n , respectivamente, como das equações diferenciais (33).

O ganho estático K de $P(s)$ é b_0/a_0 , obtido ao definir $s = 0$ na Eq.(2.36). Dividindo o numerador e o denominador por a_0 , o polinômio característico (denominador) pode ser fatorado na forma de um produto, $\prod_i (\tau_i s + 1)$. Assim, τ e K informam sobre a velocidade e característica qualitativa da resposta do sistema (33).

As ordens m e n são fisicamente restritas à condição $n \geq m$. Caso $m > 0$, é dito que existe dinâmica no numerador (33). *E.g.*, o processo da Eq.(2.18) apresenta $n = 1$ e o da Eq.(2.19), $n = 2$, nomeando-os, ambos com $m = 0$. Em resumo, uma reação v_i com comportamento dinâmico em que $n \in N^*$ e $m = 0$, o fluxo reacional será sempre igual a $A K$ no estado estacionário, de acordo com o Teorema do Valor Final, a partir de uma perturbação em degrau, ou zero, sofrendo perturbação em impulso.

2.3.4. Relação entre MCA e análise dinâmica

Aplicando a definição de derivada na equação de K , Eq.(2.34), obtém-se a Eq.(2.37),

$$\begin{aligned} \lim_{A \rightarrow 0} K &= \lim_{A \rightarrow 0} \frac{v_i(x_{\text{exp1}}^{ss} + A) - v_i(x_{\text{exp1}}^{ss})}{A} = \frac{\partial v_i}{\partial x} \\ &= \tilde{\varepsilon}_x^i \end{aligned} \quad (2.37)$$

em que $A = x_{\text{exp}_2}^{ss} - x_{\text{exp}_1}^{ss}$. Verifica-se essa relação no momento da saturação enzimática, em que não há mais alteração no ganho estático de v_i , devido a perturbações em x . Logo, esse valor de K equivale ao coeficiente de elasticidade dimensional de x na reação i . De acordo com a Eq.(2.8),

$$\varepsilon_x^i = \frac{x_{\text{exp}_2}^{ss}}{v_i(x_{\text{exp}_2}^{ss})} \lim_{A \rightarrow 0} K \quad (2.38)$$

τ é o momento em que se atinge 63,21 % da variação obtida em v_i em um processo de primeira ordem, frente a uma perturbação degrau, como deduzido na Eq.(2.39) a partir da Eq.(2.21),

$$v_i(\tau) = v_i(0) + 0,6321 A K \quad (2.39)$$

Se τ for muito baixo, a sensibilidade reacional é alta, quantitativamente revelada pelos coeficientes da MCA.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Modelo bioquímico estruturado

O modelo representativo da *Saccharomyces cerevisiae*, desenvolvido por Smallbone *et a.* (2013) (2), foi obtido no banco de dados BioModels (26), um sistema de acesso livre para armazenagem, visualização, recuperação e análise de modelos quantitativos revisados de sistemas bioquímicos e celulares. A estrutura e a compilação de cada modelo incorporado ao banco de dados são avaliadas e palavras-chaves inerentes ao algoritmo são associadas a outras fontes relevantes de pesquisa. Os modelos podem ser visualizados *on line* ou copiados em vários formatos, como também os diagramas reacionais gerados pelos modelos. Os formatos disponibilizados são BioPAX, Octave, PDF, Scilab, VCML, XPP e SBML, sendo este conhecido como (*Systems Biology Markup Language*) (35, 36), empregado nesse trabalho. O código de identificação do modelo (2) no banco de dados BioModels é MODEL1303260018.

A estrutura das isoenzimas foram verificadas no banco de dados BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que encontra regiões de similaridade local entre sequências genéticas. Essa ferramenta pode ser usada para inferir a respeito de relações funcionais e evolutivas entre sequências, bem como ajudar a identificar membros de famílias genéticas (6).

3.1.2. Programa computacional

Uma vez copiado o arquivo MODEL1303260018 no site do BioModels no formato SBML, trabalha-se no modelo químico estruturado

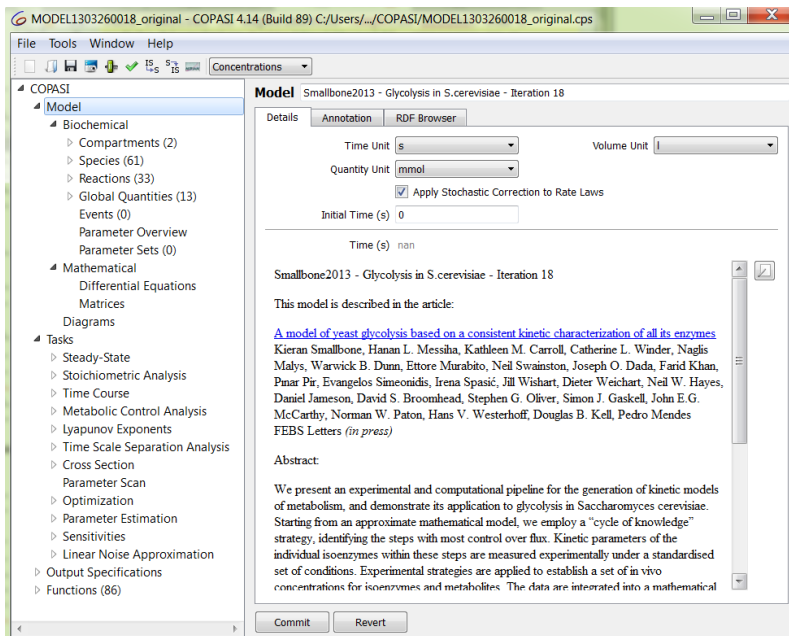
(2) através do programa computacional COPASI (3, 25), cuja interface gráfica com o usuário foi estruturada no aplicativo multi-plataforma Qt (37)..

Assim, os experimentos *in silico* no modelo estruturado (2) tornam-se viáveis, visto que o programa computacional foi desenvolvido para simular e analisar a dinâmica de redes bioquímicas, através de modelos estruturados em SBML. Os cálculos são realizados por sistema de equações diferenciais ordinárias ou pelo algoritmo estocástico de Gillespie (38). O COPASI está disponível para MS Windows, OS X, Linux (Intel) e Sun Solaris (SPARC) bem como todo o código fonte sob uma licença aberta em <http://www.copasi.org> (3, 25).

3.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

A estrutura do arquivo SBML é interpretada no COPASI de acordo com a Figura 3.1. O modelo fora construído basicamente com 2 compartimentos celulares, 61 espécies, 33 reações e 13 variáveis globais.

Figura 3.1: Estrutura do modelo no COPASI (3).



3.2.1. Experimentos *in silico*

Análise dinâmica

Para realizar os experimentos *in silico*, inicialmente, define-se a duração da análise dinâmica – *Time Course* – em 700 segundos, com intervalo de 0,5 segundos. Tais valores foram atingidos após avaliar a resposta da rede metabólica e o tempo decorrido para atingir o estado estacionário. Dessa forma, são obtidos 1400 pontos experimentais. Optou-se pelo algoritmo *LSODA* (39) como o método de integração (3).

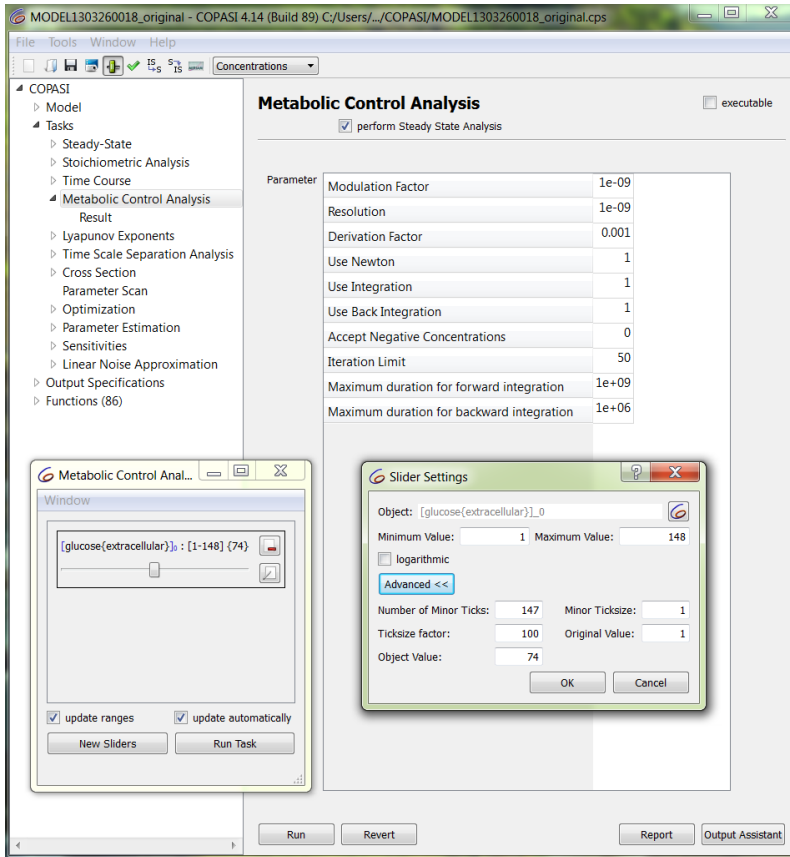
LSODA é o método determinístico padrão do COPASI, uma parte da biblioteca *ODEPACK* (40), adequado para resolver sistema de equações diferenciais do tipo $\frac{dy}{dt} = f(t, y)$. Uma vez identificada a robustez do sistema, o método emprega o algoritmo *Adams* (41) para não-rigoroso ou *BDF* (*Backward Differentiation Formula*) (42) para sistema rigoroso (3).

Faz-se necessário definir quatro parâmetros ao empregar o método *LSODA*, 1) modelo de integração reduzida, 2) tolerância relativa, 3) tolerância absoluta e 4) número máximo de etapas. Os valores padronizados são 0 , $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-12}$ e 10000 , respectivamente. O primeiro refere-se a um valor booleano, em que “1” instrui o COPASI a empregar a lei de conservação das massas, e o valor “0” propõe que todas as variáveis sejam determinadas pelo sistema de equações diferenciais. A tolerância relativa revela quão precisa deve ser a trajetória de integração e a absoluta está relacionada à precisão dos valores de concentrações calculados. Por fim, o número máximo de etapas define a quantidade máxima de passos permitidos ao algoritmo durante a compilação, antes de deflagrar qualquer erro de cálculo (3).

Como $[GLCe]$ é constante no modelo estruturado (2), emprega-se a barra de rolagem ou *slider*, para avaliar o sistema sob outras condições experimentais. A Figura 3.2 apresenta a janela com a barra de rolagem limitada em 1–148 e posicionada em 74 mmol L^{-1} , que é o valor padrão de $[GLCe]$, uma vez que foi o definido por Smallbone *et al.* (2013) (2). Logo, cada concentração equivalente a um experimento *in silico*.

Na janela *Slider Settings*, configurações avançadas da barra são determinadas, como valores mínimo e máximo, quantidade, dimensão e fator do intervalo, valor original e desejado. Com a opção *Update automatically* marcada, os coeficientes são recalculados de acordo com o valor definido na barra.

Figura 3.2: Ferramenta *slider* no COPASI (3).



Análise de Controle Metabólico

Em seguida, realizou-se a Análise de Controle Metabólico, inerente do COPASI, obtendo os coeficientes de controle, tanto de fluxo como de concentração, e elasticidade dimensionais e adimensionais, em cada [GLCe] avaliada na análise dinâmica.

O programa computacional calcula os coeficientes de elasticidade não-normalizados por derivação numérica com diferenças finitas. Já os coeficientes de controle são obtidos pelo método descrito por Reder (1988) (43), a partir das características do estado estacionário. Este trabalha com o sistema reduzido, em que algumas variáveis são elimi-

nadas através da técnica conhecida como relação de conservação. Todos os coeficientes são obtidos adimensionalmente por esse método e posteriormente são calculados dimensionalmente com as condições dos fluxos e das concentrações no estado estacionário (3).

Essa relação de conservação baseia-se no número de compostos na rede metabólica. *E.g.*, a glicose intracelular, $[GLCc]$, é calculada a partir da quantidade (n_{GLC}) inerente à célula, como apresentada na Eq.(2.2) e otimizada por Mendes *et al.* (2013) (2). A partir das concentrações, calcula-se os fluxos reacionais pelas funções cinéticas previamente definidas, sendo possível, portanto, obter a taxa de concentração para sistema com um compartimento ou taxa do número de compostos ao trabalhar com sistema multi-compartimentado.

Diante disso, as influências das glicoses intra- e extracelular foram avaliadas a partir de 148 experimentos, cada um contendo 1400 pontos de cada metabólito e fluxo reacional.

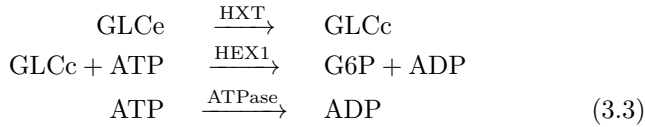
Modelagem matemática

Uma vez conhecidas as equações cinéticas, bem como todos os seus parâmetros, pelas definições nas Eqs.(2.6) e (2.8), é possível obter as expressões de $\epsilon_{[GLCe]}^{HXT}$ e $\epsilon_{[GLCe]}^{ATPase}$, $C_{HXT}^{[GLCe]}$ e $C_{ATPase}^{[GLCe]}$. Logo, é calculável a intensidade da perturbação causada pela glicose extracelular em qualquer fluxo reacional, bem como a perturbação na dinâmica desse composto ao afetar a concentração enzimática de qualquer reação da rede metabólica. Caso o metabólito não seja um parâmetro da equação cinética, *e.g.*, $[GLCe]$ na ATPase, a expressão é obtida pela regra da cadeia (44), como demonstrada na Eq.(3.2).

$$\epsilon_{[GLCe]}^{HXT} = \frac{\partial HXT}{\partial [GLCe]} \frac{[GLCe]}{HXT} \quad (3.1)$$

$$\begin{aligned} \epsilon_{[GLCe]}^{ATPase} &= \left(\frac{\partial ATPase}{\partial [ATP]} \frac{[ATP]}{ATPase} \right) \left(\frac{\partial HXK2}{\partial [ATP]} \frac{[ATP]}{HXK2} \right)^{-1} \\ &\quad \left(\frac{\partial HXK2}{\partial [GLCc]} \frac{[GLCc]}{HXK2} \right) \left(\frac{\partial HXT}{\partial [GLCc]} \frac{[GLCc]}{HXT} \right)^{-1} \\ &\quad \left(\frac{\partial HXT}{\partial [GLCe]} \frac{[GLCe]}{HXT} \right) = \frac{\partial ATPase}{\partial [GLCe]} \frac{[GLCe]}{ATPase} \quad (3.2) \end{aligned}$$

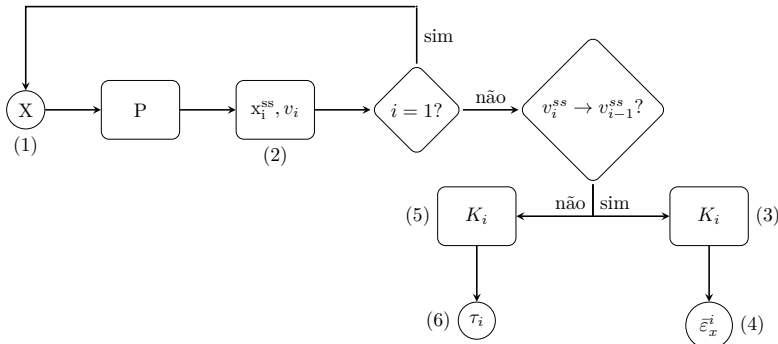
A perturbação de $[GLCe]$ deflagra-se pelas reações HXT, HEX1, que representa as isoenzimas HXK2, GLK1 e HXK1, nas quais há envolvimento de ATP, e ATPase, como expresso na Eq.(3.3):



Essa análise matemática trivial é possível para a elasticidade, o que não é verdadeiro para os coeficientes de controle. O programa computacional calcula tais grandezas a partir do Teorema da Conectividade, obtendo, assim, os coeficientes de controle em função das elasticidades. Devido à complexidade do sistema equacional, as expressões não são deduzidas nesse trabalho.

As elasticidades também podem ser calculadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 3.3, independente do tipo de experimento.

Figura 3.3: Rota de cálculo dos coeficientes elasticidade, ganho estático e tempo de resposta, através da análise dinâmica do processo P . Perturbação conhecida em (1), variáveis mensuráveis em (2), calculáveis em (3–6), de acordo com a restrição experimental definida pelo algoritmo.



Definindo $[\text{GLCe}]$ como o elemento perturbador X do sistema, o experimento 1, $[\text{GLCe}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, apresentar-se-á determinadas concentrações e velocidades reacionais. Sucessivamente, realiza-se quantos experimentos forem necessários. Relacionando as primeiras e as segundas informações experimentais, $x_2^{ss} - x_1^{ss}$ é a perturbação em v , dentre os experimentos. Assim, obtém-se

$$K_2 = \frac{v_2^{ss} - v_1^{ss}}{x_2^{ss} - x_1^{ss}}$$

$$v_2(\tau) = v_1(0) + (1 - e^{-1})(v_2^{ss} - v_1^{ss})$$

Se as velocidades estacionárias entre os experimentos não sofrerem variações significativas, o K_i calculado é a elasticidade dimensional. Logo,

$$\varepsilon_x^i = \frac{x_i}{v_i} K_i$$

Para verificar a consistência do modelo (2), calculou-se os fatores de conversão de substrato em biomassa, glicerol e etanol, a fim de compará-los com a literatura. A velocidade de crescimento celular específica, μ_X , e o fator de conversão de substrato em biomassa, $Y_{\frac{x}{\text{GLCe}}}$, foram calculados pelas relações matemáticas originadas do balanço mássico do processo contínuo em estado estacionário, como apresentadas nas seguintes equações:

$$[\text{EtOH}]_{\text{calc}} = \frac{n_{\text{cell}}^{\text{EtOH}_0}}{V_{\text{cell}} NA} + \frac{\text{ADH1}}{V_R} t \quad (3.4)$$

$$F = \frac{\text{ADH1}}{[\text{EtOH}]_{\text{calc}}} \quad (3.5)$$

$$\mu_X = \frac{F}{V_R} \quad (3.6)$$

$$\mu_{\text{GLCe}} = \frac{\text{HXT}}{[\text{GLCe}]} \quad (3.7)$$

$$Y_{\frac{x}{\text{GLCe}}} = \frac{\mu_X}{\mu_{\text{GLCe}}} \quad (3.8)$$

em que $n_{\text{cell}}^{\text{EtOH}_0}$ é o número de moléculas de etanol no momento inicial por célula, cujo volume é V_{cell} , NA é a constante de Avogadro em mmol^{-1} , ADH1 é o fluxo de produção do etanol, V_R é o volume reacional definido em $1,0 L$ e t , o tempo experimental. Visto que ADH1 é a produção de etanol em $(\text{mmol } s^{-1})$, da qual calcula-se $[\text{EtOH}]_{\text{calc}}$, obtém-se a vazão (F) em $(L s^{-1})$ e consequentemente a μ_X . Com a taxa de consumo específica de glicose extracelular, μ_{GLCe} , calcula-se o fator de conversão de substrato em biomassa.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSISTÊNCIA DO MODELO BIOQUÍMICO

No experimento *in silico* em que $[GLCe]_0 = 74 \text{ mmol L}^{-1}$, o estado estacionário é atingido em aproximadamente 400 s. Em $t = 700 \text{ s}$, o fluxo reacional de ADH1 encontra-se em $3,694 \text{ mmol s}^{-1}$ e $[EtOH]_{calc} = 2807,87 \text{ mmol L}^{-1}$. Assim, a vazão do processo em estado estacionário é de $F = 0,00132 \text{ L s}^{-1}$ e, conseqüentemente, μ_X é igual a $0,00132 \text{ s}^{-1}$, visto que o volume reacional é unitário. O cálculo do $Y_{\frac{x}{GLCe}}$, através da Eq.(3.8), resultou em $0,0487 \text{ g}_X \text{ g}_{GLCe}^{-1}$. Já os fatores $Y_{\frac{EtOH}{GLCe}}^{ADH1}$ e $Y_{\frac{GLYC}{GLCe}}^{ADH1}$ foram obtidos pelas relações mássicas ADH1/HXT e G3PT/HXT, cujos valores são 0,473 e 0,0137 g g^{-1} , respectivamente.

Na Tabela 4.1 são apresentados o fatores de conversão no intervalo da GLCe avaliada, 1–148 mmol L^{-1} , cuja representação está como Exp[1 : 148] e, especificamente o experimento 74, exposto como Exp[74]. Assim, são comparados com os valores revelados na literatura (5, 45, 46), provenientes de avaliações do micro-organismo *S. cerevisiae*.

O objetivo de Fernandes *et al.* (2013) foi avaliar o desempenho fermentativo das linhagens geneticamente modificadas GMY15 e GMY16wo, obtidas a partir da linhagem industrial CAT-1, em condições fermentativas e operacionais similares às utilizadas na indústria. As características sob análise de cada uma são apresentadas na Tabela 4.2 (5).

Verifica-se que para os experimentos em que $[GLCe]$ encontra-se mais elevada, o modelo (2) foi mais consistente para a linhagem CAT-1, na qual existe atividade de invertase extracelular. Dentre as linhagens com essa atividade inibida, quanto menor $[GLCe]$, GMY16wo torna-se mais semelhante ao modelo (2) do que GMY15, principalmente em relação a produção de etanol e glicerol, porque aquela possui alta

Tabela 4.1: Comparações entre fatores de conversão em biomassa, etanol e glicerol, ($g\ g^{-1}$), calculados e da literatura.

| Linagem | $Y_{\frac{x}{GLC_e}}$ | $Y_{\frac{EtOH}{GLC_e}}$ | $Y_{\frac{GLYC}{GLC_e}}$ |
|------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Exp(1 : 148) (2) | 0,00158–0,0961 | 0,480–0,472 | 0,0255–0,0134 |
| Exp(74) (2) | 0,0487 | 0,473 | 0,0137 |
| CAT-1 (5) | 0,084 | 0,412 | 0,087 |
| GMY15 (5) | 0,034 | 0,440 | 0,080 |
| GMY16wo (5) | 0,078 | 0,442 | 0,025 |
| KAM3 (46) | 0,048 | 0,477 | 0,0213 |
| KAM11 (46) | 0,050 | 0,501 | 0,0171 |
| KAM2 (46) | 0,058 | 0,441 | 0,028 |

Tabela 4.2: Características das linhagens CAT-1, GMY15 e GMY16wo (5).

| Linagem | Características |
|---------|---|
| CAT-1 | atividade de invertase intracelular e extracelular |
| | atividade de transporte de glicose e frutose |
| | atividade de transporte ativo de sacarose ausente ou não funcional. |
| GMY15 | ausência de atividade de invertase extracelular |
| | alta atividade de invertase intracelular |
| | atividade de transporte de glicose e frutose |
| GMY16wo | atividade de transporte ativo de sacarose. |
| | ausência de atividade de invertase extracelular |
| | atividade de invertase intracelular |
| | atividade de transporte de glicose e frutose |
| | alta atividade de transporte ativo de sacarose. |

atividade de transporte ativo de sacarose.

Por fim, Xiaojing *et al.* (2008) empregaram setenta e oito Modos de Fluxo Elementar (47, 48) na análise metabólica da *S. cerevisiae*, cujo experimento *in silico* representou fidedignamente as fermentações das linhagens geneticamente modificadas KAM3 e KAM11 a partir da KAM2, usada industrialmente, corroborando a validade da simulação na avaliação de conversão do substrato em etanol (46). Ainda, Os

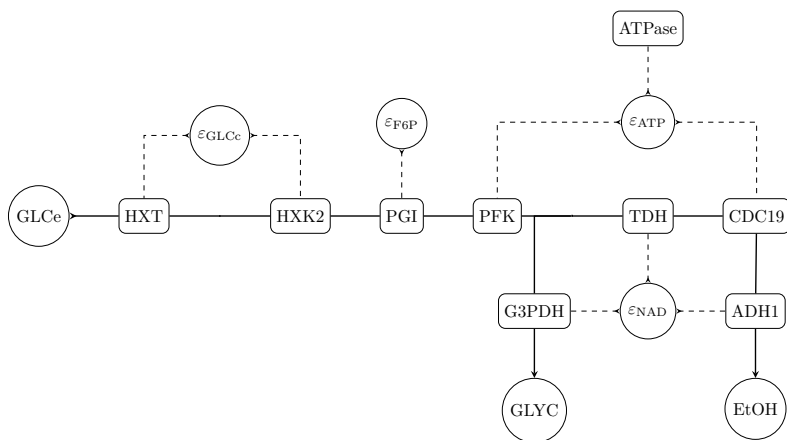
fatores de conversão apresentados neste trabalho de 2008 foram muito similares aos obtidos nos experimentos 70–80, em que está incluso a concentração padrão do modelo bioquímico, desenvolvido por Mendes *et al.* (2013) (2), representado pelo 74^o experimento e demonstrado na Tabela 4.1.

4.2. RELAÇÃO ENTRE AS ANÁLISES DINÂMICA E DE CONTROLE METABÓLICO

4.2.1. Resposta da rede metabólica às alterações em [GLCe]

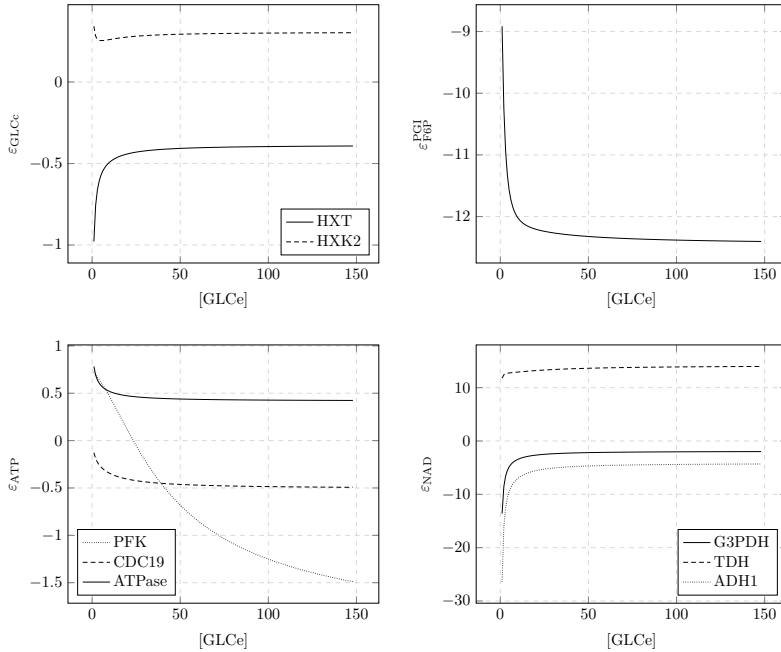
A MCA demonstrou o impacto da variação em [GLCe] nos âmbitos locais e globais da rede metabólica. A Figura 4.1 revela a principal estrutura de análise a partir da elasticidade, salientando os efeitos de [ATP] antes de depois da clivagem de frutose 1,6-bifosfato, bem como os efeitos de [NAD] nas rotas de produção de glicerol e etanol. Os gráficos da Figura 4.2 revelam tais coeficientes em cada experimento.

Figura 4.1: Elasticidades significativas na conversão de glicose a glicerol e etanol. \square representa reações, \circ , interferentes, sendo que $---$ indica contribuição da elasticidade e \rightarrow , participação no processo.

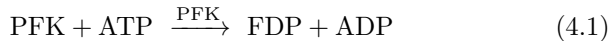


A enzima E_{PFK} catalisa a transferência do grupo fosfato do ATP para F6P, formando FDP, apresentado na Eq.(4.1). Trata-se do principal ponto de controle da glicólise, sendo o maior grau de complexidade

Figura 4.2: Elasticidades qualitativamente significativas na rota de conversão de glicerol a glicerol e etanol em cada condição experimental. Efeitos de GLCc em HXT e HXK2; F6P em PGI; ATP em PFK, CDC19 e ATPase; NAD em G3PDH, TDH e ADH1.



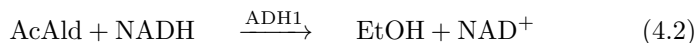
enzimático já estudado.



Sua atividade eleva-se quando o suprimento de ATP está baixo ou quando $[\text{ADP}]$ e $[\text{P}_i]$ estão altas, resultantes da quebra de ATP (1). De acordo com a Figura 4.2, $\varepsilon_{\text{ATP}}^{\text{PFK}} \approx 0$ no 23^o experimento, em que $[\text{ATP}] = 3,44 \text{ mmol L}^{-1}$ no estado estacionário, demonstrando que, a partir dessa concentração, a produção de ATP é alta o suficiente para inibir E_{PFK} localmente. As demais elasticidades apresentadas na Figura 4.2 apresentam baixas variações após esse experimento.

O efeito local negativo de $[\text{NAD}]$ sobre a produção de etanol é muito maior em relação a de glicerol, revelando quantitativamente a preferência do micro-organismo ao etanol em meio reacional com baixa concentração de substrato. Tais rotas são representadas, respectiva-

mente, por ADH1 e G3PDH, e explicitadas nas Eqs.(4.2) e (4.3).



O sinal negativo revela que o efeito é favorável ao sentido direto, visto que NAD é produto em ambas as reações. Já a elasticidade desse composto é positivo em TDH, por ser consumido na produção de 13DPG, demonstrado na Eq.(4.4).



O valor de $\varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{PGI}}$ confirma que a rota do metabolismo central é sempre prioridade em relação a produção de trealose, sendo com maior intensidade a [GLCe] baixa, ao comparar as rotas das Eqs.(4.5) e (4.6).



A Tabela 4.3 revela a diferença de suavidade da rede metabólica sob diferentes condições experimentais. Em [GLCe] alta, os efeitos locais estão distribuídos dentre as reações de tal forma que a resposta é suave e o estado estacionário é atingido sob uma perspectiva assintótica. Caso [GLCe] seja reduzida, os efeitos são concentrados em reações preferenciais, como a PGI e ADH1.

O modelo empregado (2) define HXT de acordo com a Eq.(4.7). Pela Eq.(2.7), pode-se definir a expressão da elasticidade dimensional, quando o parâmetro perturbado é [GLCc], apresentada na Eq.(4.8),

$$v_{\text{HXT}} = \frac{V_{\text{cell}} V_{\text{max}}(\text{GLCe} - \text{GLCc})}{K_{\text{glc}} \left(1 + \frac{\text{GLCc}}{K_{\text{glc}}} + \frac{\text{GLCe}}{K_{\text{glc}}} + \frac{K_i \text{GLCc} \text{GLCe}}{K_{\text{glc}}^2} \right)} \quad (4.7)$$

sendo V_{cell} o volume celular em L , V_{max} a velocidade máxima reacional em $\text{mmol } L^{-1} \text{ s}^{-1}$, K_{glc} a constante de afinidade enzima-substrato em $\text{mmol } L^{-1}$, bem como K_i a afinidade de enzima-inibidor, adimensional.

$$\varepsilon_{\text{GLCc}}^{\text{HXT}} = - \frac{V_{\text{cell}} V_{\text{max}} K_{\text{glc}} (2 \text{GLCe} K_{\text{GLC}} + K_{\text{glc}}^2 + K_i \text{GLCe}^2)}{[K_{\text{glc}} (\text{GLCe} + K_{\text{glc}}) + \text{GLCc} (K_{\text{glc}} + \text{GLCe} K_i)]^2} \quad (4.8)$$

Tabela 4.3: Principais elasticidades, adimensionais e dimensionais, com [GLCe] igual a 74 e 0,1, sendo esta a menor concentração viável desse composto no COPASI.

| Metabólitos | Reações | [GLCe] | |
|-------------|---------|-------------------|-------------------|
| | | 74 | 0,1 |
| GLCc | HXT | -0,3998 -1,2588 | -3,8333 -3,1477 |
| | HXK2 | 0,2979 0,8983 | 0,7198 0,5698 |
| F6P | PGI | -12,359 -71,817 | -15,946 -219,96 |
| | PFK | -1,0241 -0,4891 | 0,9696 1,1737 |
| ATP | CDC19 | -0,4772 -0,4494 | -0,0137 -0,0307 |
| | ATPase | 0,4316 0,3824 | 0,9830 1,9842 |
| NAD | G3PDH | -2,0839 -0,0791 | -16,515 -0,0949 |
| | TDH | 13,789 2,2770 | 9,3446 0,04936 |
| | ADH1 | -4,4969 -11,770 | -240,01 -17,505 |

A relevância da reação HXT deve-se à viabilidade experimental *in vivo* em mensurar a atividade enzimática da permease. Com a desativação da invertase extracelular, [GLCe] tende a zero, e o efeito desse composto sobre o transporte transmembrana certamente é nulo. Já [GLCc] tem o efeito representado pelas Eqs.(4.9) e (4.10),

$$\lim_{\text{GLCe} \rightarrow 0} \bar{\varepsilon}_{\text{GLCc}}^{\text{HXT}} = -\frac{K_{\text{glc}} V_{\text{cell}} V_{\text{max}}}{(\text{GLCc} + K_{\text{glc}})^2} \quad (4.9)$$

$$\begin{aligned} \lim_{\text{GLCe} \rightarrow 0} \varepsilon_{\text{GLCc}}^{\text{HXT}} &= -\frac{\text{GLCc} K_{\text{glc}} V_{\text{cell}} V_{\text{max}}}{v_{\text{HXT}} (\text{GLCc} + K_{\text{glc}})^2} \\ &= \frac{K_{\text{glc}}}{\text{GLCc} + K_{\text{glc}}} \end{aligned} \quad (4.10)$$

pois a permease realiza difusão facilitada em ambos os sentidos. A Eq.(4.10) revela que quanto maior [GLCc], $\varepsilon_{\text{GLCc}}^{\text{HXT}}$ tende a zero, demonstrando que não há influência de [GLCc] em HXT após a saturação da permease. Nessa situação, a influência máxima é deduzida pela

Eq.(4.9), obtendo,

$$\varepsilon_{\text{GLCc}}^{\text{HXT,max}} = -\frac{V_{\text{cell}} V_{\text{max}}}{K_{\text{glc}}} = -3,72 \frac{\text{mmol s}^{-1}}{\text{mmol L}^{-1}}$$

i.e., com $[\text{GLCc}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, o fluxo máximo ideal de HXT seria de $3,72 \text{ mmol s}^{-1}$ para fora da célula, que é o sentido inverso da difusão facilitada. Tal análise foi realizada no COPASI para as demais elasticidades significativas, apresentada na Tabela 4.3. O menor valor viável para o cálculo numérico nesse *software* é $[\text{GLCe}] = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Nessa concentração, $\varepsilon_{\text{GLCc}}^{\text{HXT}} = -3,1477 \frac{\text{mmol s}^{-1}}{\text{mmol L}^{-1}}$. Quanto maior a concentração do produto, menor o fluxo reacional no sentido direto, por isso o efeito de GLCc em HXT é negativo e o oposto é válido, GLCc em HXK2, como explicitado nas Eqs.(4.11) e (4.12).



Também, é necessário conhecer o efeito global reacional, principalmente nas rotas de produção demonstradas na Figura 4.1. ATP e NAD são úteis para conhecer o momento de preferência dentre as rotas, calculando os coeficientes de resposta particionados, como nas Eqs.(4.13) e (4.14),

$$R_{\text{ATP}}^J = \sum_i C_i^J \varepsilon_{\text{ATP}}^i \quad (4.13)$$

sendo :

$$i_{\alpha} = \{\text{HXT, HXK2, PFK, PGK, NDPK2, ATPase, CDC19}\}$$

$$i_{\beta} = \{\text{HXK2, PFK, PGK, NDPK2, ATPase, CDC19}\}$$

$$J = \{\text{CDC19, PFK}\}$$

em que HXK2 e CDC19 são isoenzimas das reações HEX1 e PYK, respectivamente,

$$R_{\text{NAD}}^J = \sum_i C_i^J \varepsilon_{\text{NAD}}^i \quad (4.14)$$

sendo :

$$i_{\alpha} = \{\text{HXT, G3PDH, TDH1, ALDD2Y, ADH1}\}$$

$$i_{\beta} = \{\text{G3PDH, TDH1, ALDD2Y, ADH1}\}$$

$$J = \{\text{G3PDH, ADH1}\}$$

e TDH1 e ADH1 das reações TDH e ADH, respectivamente. Os subíndices α e β equivalem a seqüências reacionais distintas, ao considerar HXT.

As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam esses coeficientes de resposta dos experimentos realizados, em que a curva tracejada representa a seqüência reacional i_α , e a contínua, i_β . A diferença entre R_{ATP}^{PFK} e R_{ATP}^{CDC19} , sem HXT, é muito pequena, porque essas reações fazem parte da mesma rota metabólica. No terceiro experimento, tais respostas são nulas, em que $[ATP] = 1,69 \text{ mmol L}^{-1}$. Essa concentração difere da $3,44 \text{ mmol L}^{-1}$ encontrada no experimento 23, porque este caso refere-se à interferência local de ATP na reação PFK, enquanto aquele, à perturbação que se deflagra ao longo da rota metabólica, como representada na Eq.(4.13).

O efeito absoluto de ATP em CDC19, considerando HXT, é maior, porque com a entrada de glicose via difusão facilitada, o micro-organismo tem saldo de 4 moléculas de ATP para cada glicose degradada. Considerando somente o simporte de sacarose como fonte nutricional, é necessário o gasto de 1 ATP para retirar o H^+ incorporado. Devido a essa diferença no saldo energético, a influência de $[ATP]$ na rota metabólica β é menor. A partir do experimento 11, a relação $(R_\alpha/R_\beta)_{ATP}^{CDC19}$ varia entre 3,7–2,2, para cada $[GLC]$ no estado estacionário.

A curva α de R_{ATP}^{PFK} revela que, nos experimentos 1–43, ATP reduz o fluxo reacional de PFK. Por ser uma etapa reguladora da glicólise, a degradação do açúcar é minimizada, visto que o suprimento nutricional está baixo. No 30º experimento, os coeficientes de resposta são iguais, revelando somente que o balanço de interferências nessas reações obtiveram a mesma intensidade. A partir do experimento 44, $[GLC]$ está alta o suficiente para que o sistema energético celular não iniba PFK, visto que a atividade da permease HXT está alta.

Já os coeficientes de resposta obtidos pelo NAD, através da Eq.(4.14), apresentam perfis gráficos distintos por serem rotas diferentes. O efeito global até G3PDH é positivo, em qualquer experimento, desfavorecendo a produção de glicerol. Quanto maior $[GLC]$, R_{NAD}^{G3PDH} tende ao valor unitário, atingindo sua influência mínima na produção de glicerol a partir do experimento 103, em que $R_{NAD}^{G3PDH} \rightarrow 1$.

O efeito global até a reação ADH1, sem HXT, apresenta um ponto de mínimo no experimento 21, apresentado na Figura 4.4, a partir do qual $[NAD] \approx 1,43 \text{ mmol L}^{-1}$. Mesmo assim, existe efeito global negativo em ADH1, favorecendo a produção de etanol.

A consideração de HXT afetou infimamente a produção de glice-

Figura 4.3: Coeficientes de Resposta Particionado do ATP nas reações CDC19 e PFK. Nas curvas tracejadas considera-se a contribuição de HXT.

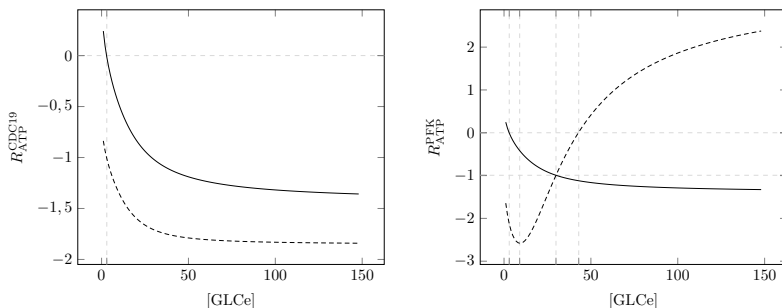
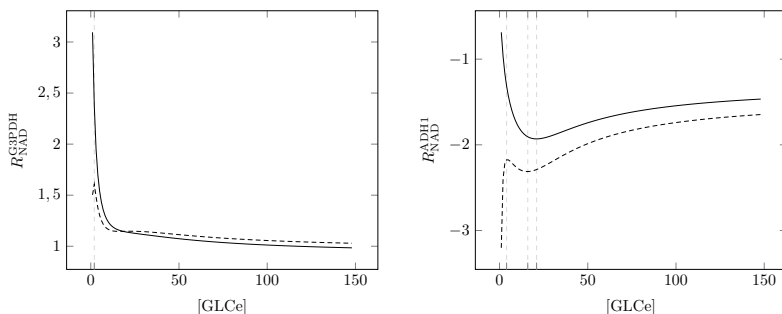


Figura 4.4: Coeficientes de Resposta Particionado do NAD nas reações G3PDH e ADH1. Nas curvas tracejadas considera-se a contribuição de HXT.



rol. Somente foi discrepante em $[GLCe]$ baixa para ADH1. A pequena diferença proporcional entre as curvas α e β de R_{NAD}^{ADH1} comprova a influência do saldo energético na produção de etanol.

As Figuras 4.5 e 4.6 apresentam qualitativamente os coeficientes de controle de fluxo em gráficos de barras tridimensionais, necessários para os cálculos dos R^J . Essa estrutura do *software*, associada à barra de rolagem para variar $[GLCe]$, revela diretamente essa perturbação na rede metabólica.

Em anexo, encontra-se os somatórios dos coeficientes de controle de fluxo e de concentração, cujos valores são, respectivamente, 1 e 0; as conectividades de fluxo e de concentração, ambos igual a zero, para as reações e metabólitos pertencentes à mesma rede metabólica; com-

Figura 4.5: Vista positiva dos coeficientes de controle de fluxo adimensionais, em destaque os efeitos das isoenzimas HXT, PFK, HXK2 e ATPase no fluxo reacional de GLK1, gerados pelo COPASI (3).

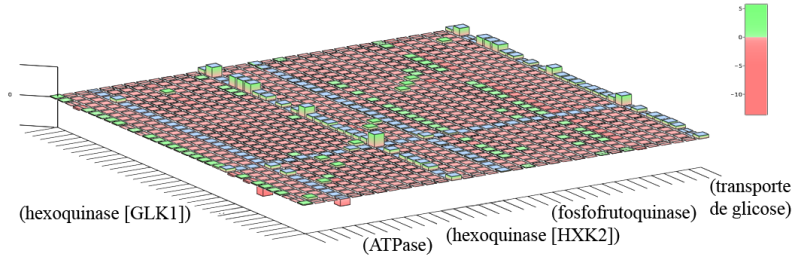
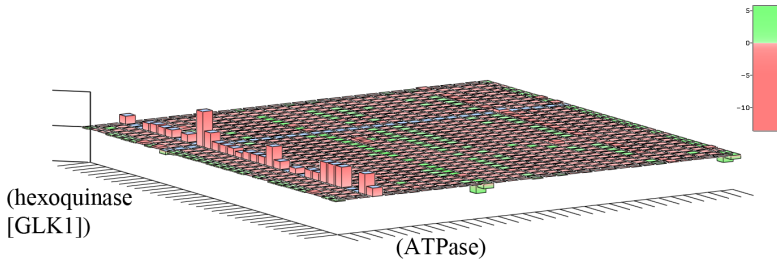


Figura 4.6: Vista negativa dos coeficientes de controle de fluxo adimensionais da isoenzima ATPase, em destaque o fluxo reacional de GLK1, gerados pelo COPASI (3).



provando a fidelidade experimental *in silico* de acordo com as Teorias da Soma e da Conectividade.

4.2.2. Consequências da perturbação em degrau

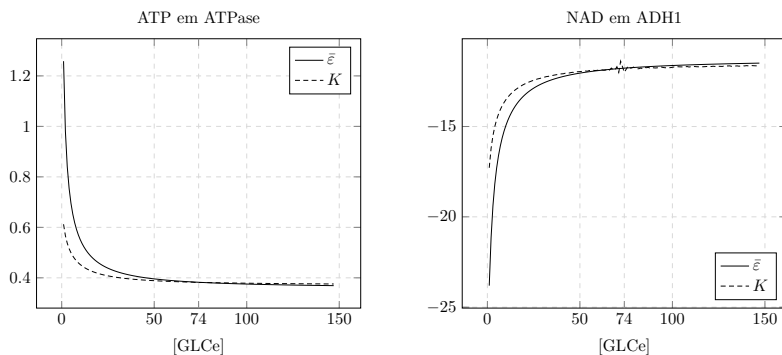
Perturbação dos metabólitos

A avaliação dinâmica da rede metabólica também foi realizada a partir dos 148 experimentos *in silico*, considerando o 74^o como o referencial, de acordo com o pré-estabelecido no modelo estruturado (2). Assim, existem 148 tipos de estados estacionários, nos quais concentrações de metabólitos e fluxos reacionais são conhecidos. Logo, é possível realizar o processo descrito na Figura 3.3, considerando qualquer meta-

bólito da rede como x e avaliando sua influência em determinado fluxo reacional v_i .

Os gráficos da Figura 4.7 esclarecem essa relação entre ganho estático e elasticidade adimensional. Quanto mais semelhante estiverem as condições experimentais da condição 74, K aproxima-se de $\bar{\varepsilon}$. Logo, ganho estático é a elasticidade adimensional da reação em avaliações descontínuas. Quanto maior [GLCe], maior a saturação do sistema e conseqüentemente os metabólitos apresentam a máxima interferência em v_i , ocorrendo ínfimas variações nos fluxos reacionais, corroboradas pelas tendências assintóticas tanto de K quanto de $\bar{\varepsilon}$.

Figura 4.7: Comparação entre a elasticidade dimensional e o ganho estático de ATP em ATPase e de NAD em ADH1.



Os pontos de K , referentes ao experimento 74, na Figura 4.7, foram retirados porque ocorre a relação indeterminada $0/0$. Devido à tolerância relativa do COPASI ser igual a $1 \cdot 10^{-6}$, e o fluxo reacional no estado estacionário ser muito baixo, ocorre oscilações na curva de $K_{\text{NAD}}^{\text{ADH1}}$, ao aproximar-se da indeterminação.

Perturbação da glicose extracelular

Uma vez revelada essa natureza do ganho estático na perspectiva da MCA, realizou-se a perturbação em degrau de [GLCe] na rede metabólica, variando-a de 74 a 740 mmol L^{-1} . Como a perturbação é a mesma em todas as reações, a informação elástica discreta K revela quão impactante é a glicose extracelular no sistema.

No modelo (2), ATPase representa todos os processos de consumo do ATP, cujos parâmetros e a lei da taxa foram obtidos no trabalho desenvolvido por Teusink *et al.* (1998) e ajustados na terceira

iteração do modelo estruturado aqui empregado (2). Logo, pode-se considerá-la representante do transporte ativo de H^+ .

As reações TDH2, PYK2 e ADH5 têm fluxos nulos, devido aos parâmetros cinéticos definidos no modelo (2) e AK, G3PDH e G3PT não possuem comportamento referente a nenhuma ordem dinâmica tradicional a partir da perturbação em degrau de $[GLC_e]$. Por isso, os parâmetros τ e K dessas reações não foram determinados.

De acordo com a Figura 4.8, HXK2, PGI, PFK, ALD e TPI possuem $K \simeq 0,19 \frac{mmol}{mmol} \frac{s^{-1}}{L^{-1}}$ e, na Figura 4.9, $\tau \simeq 128,5 s$. As reações PGK, PGM, CDC19, PDC1 e ADH1 apresentam $K \simeq 0,38 \frac{mmol}{mmol} \frac{s^{-1}}{L^{-1}}$ e $\tau \simeq 130 s$. Na fase de preparação (HXK2–PGI–PFK–ALD–TPI), a resposta do investimento de ATP à perturbação $\Delta[GLC_e]$ é ligeiramente mais rápida que a de pagamento, porém o ganho estático daqueles fluxos é a metade destes. Isso se deve ao fato de a molécula FDP sofrer clivagem em DHAP e G3P, reduzindo a inércia mássica, favorecendo ao incremento do fluxo reacional a partir da fase de pagamento.

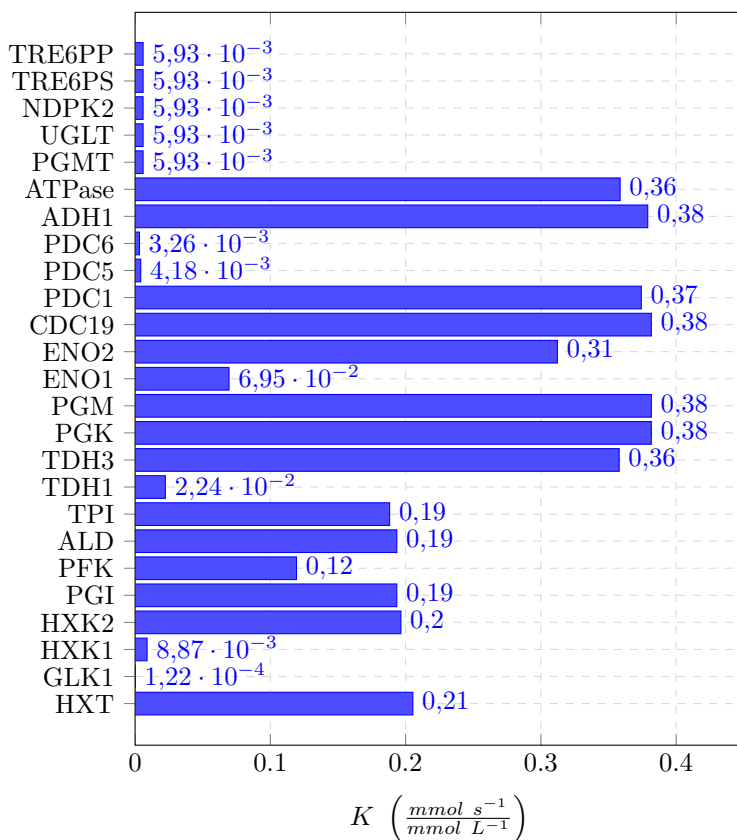
A glicólise, a descarboxilação do piruvato a acetaldeído e a redução deste a etanol demonstraram uma resposta temporal similar e tal coerência foi quantificada através desses experimentos *in silico* em que também expôs as diferenças dinâmicas das isoenzimas.

A maior discrepância foi na fosforilação da GLC_c, representada pelas isoenzimas GLK1, HXK1 e HXK2. τ atingiu uma diferença de 62,7 s entre a primeira e a terceira reações, representadas na Figura 4.9. Hexoquinase sofre uma profunda transformação conformacional indutiva ao se acoplar com a glicose. Dois domínios da proteína se aproximam em 8 Å quando ATP se liga a essa enzima. Esse movimento aproxima a molécula de ATP à de GLC_c, bloqueando o acesso de H_2O , evitando a hidrólise das ligações fosfoanidridícas do ATP (1).

Estruturalmente, sabe-se que as isoenzimas são diferentes por serem codificadas a partir de genes distintos. A partir das informações apresentadas na Tabela 4.4, verifica-se que as posições dos genes responsáveis por suas codificações diferem-se, como também o comprimento da cadeia de GLK1 diante das demais. Esta é específica para aldo-hexoses e as outras duas podem fosforilar ceto- e aldo-hexoses (49). HXK2 é a principal enzima para fosforilação da glicose, podendo atuar tanto na indução como repressão gênica pela glicose (50). As contribuições de HXK2, HXK1 e GLK1 na produção de G6P são, respectivamente, 95,779, 4,165 e 0,056 %.

O gráfico da Figura 4.8 demonstra que $K_{GLC_e}^{HXK2}$ é praticamente igual ao das reações da fase preparatória e, na Figura 4.9, o $\tau_{GLC_e}^{HXK2}$ é similar às demais reações da glicólise. Todos os valores de τ e K calcu-

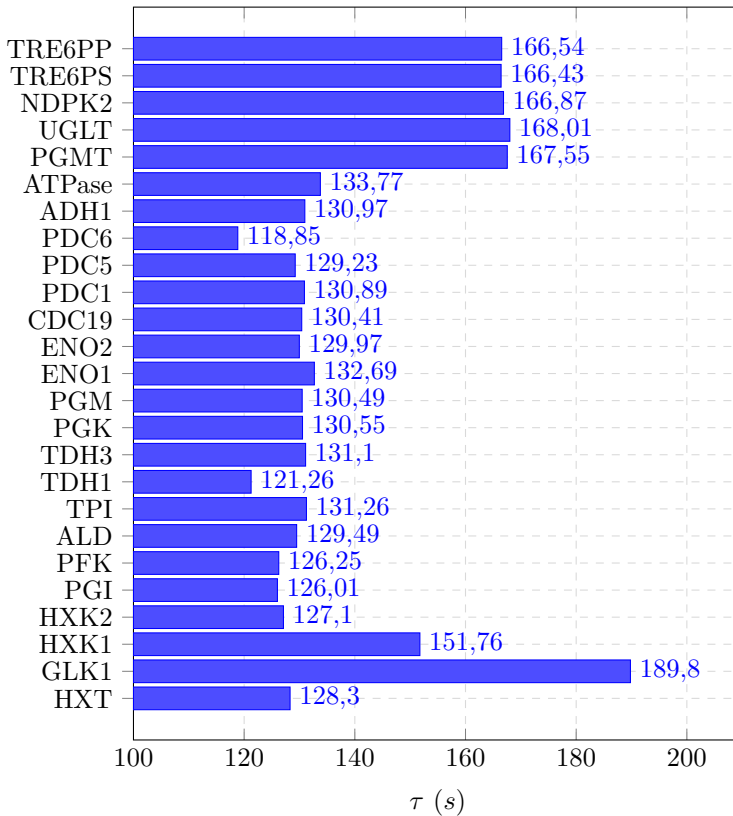
Figura 4.8: $K \left(\frac{\text{mmol s}^{-1}}{\text{mmol L}^{-1}} \right)$ das reações com resposta em primeira ordem à perturbação de grau em [GLCe].



lados, bem como o desvio padrão da regressão não-linear, são apresentados em anexo.

Essas grandezas da análise dinâmica corroboraram a relevância de HXT no controle metabólico. A glicólise e a produção de etanol seguem com tempo de resposta similar ao transporte de glicose, certamente devido à representatividade exclusiva de HXT para essa função no modelo e ao desencadeamento metabólico. Tanto os modelos estruturados tradicionais e os modificados, como Pritchard et al. (22) e Mendes et al. (2), respectivamente, demonstram que o controle do fluxo glicolítico em *S. cerevisiae* cabe, principalmente, a esse trans-

Figura 4.9: τ (s) das reações com resposta em primeira ordem à perturbação degrau em [GLCe].



porte. Essa característica já fora revelada também por modelos cinéticos tradicionais (52). Entretanto, a análise dinâmica *in silico* não só comprova a importância do transporte transmembrana como também a quantifica, ampliando a ideia de reação limitante para reação mais elástica.

Em anexo estão os parâmetros τ e K , com os respectivos desvios padrão da regressão não-linear, provenientes da perturbação em degrau de [GLCe], tradicional, sendo o perfil comportamental das reações em primeira ordem.

Tabela 4.4: Subsequências BLAST e comprimento das isoenzimas HEX1: GLK1, HXK1 e HXK2 (6).

| Isoenzima | Subsequência BLAST | Comprimento |
|------------------|---------------------------|--------------------|
| GLK1 (49) | 2 – 500 | 499 |
| HXK1 (51) | 1 – 485 | 485 |
| HXK2 (50) | 2 – 486 | 485 |

Capítulo 5

CONCLUSÃO

O modelo estruturado (2) representa o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* em uma ampla faixa de glicose extracelular. A consistência foi comprovada também através de dados literários provenientes dessa espécie geneticamente modificada. Logo, o modelo quantifica o estresse metabólico ocorrido por alterações genéticas ou limitações nutricionais.

A identificação da rota metabólica mais afetada pelo meio reacional foi viável pela Análise de Controle Metabólico. Em baixas concentrações de glicose extracelular, as reações PGI e PFK apresentaram-se com a maior elasticidade absoluta, quantificando a preferência do micro-organismo à produção de etanol. Localmente, PFK é inibida a partir de $[ATP] = 3,44 \text{ mmol L}^{-1}$. Globalmente, isso ocorre em $[ATP] = 1,69 \text{ mmol L}^{-1}$. Entretanto, esse fenômeno não ocorre a $[GLC_e]$ alta.

Os Coeficientes de Resposta Particionado corroboraram essa adaptação ao meio, através dos metabólitos NAD e ATP, via análise global das rotas. Através desses parâmetros, quantificou-se a influência da desativação da invertase extracelular e a contribuição do simporte de sacarose na rede metabólica. Sem o efeito de HXT, o ATP reduz o fluxo reacional de PFK, revelando que os produtos da hidrólise intracelular de sacarose são degradados mais lentamente, em relação à entrada dos mesmos via difusão facilitada. A relação $(R_\alpha/R_\beta)_{ATP}^{CDC19}$ varia entre 3,7-2,2, para cada $[GLC_e]$ no estado estacionário, a partir do 11º experimento. Por sempre encontrar-se positivo, R_{NAD}^{G3PDH} revela que a produção de glicerol é sempre desfavorecida, em relação a de etanol, cujo menor valor é unitário. A atividade da permease HXT afeta intimamente a produção de glicerol e, em relação ao etanol, é menor, porém com o mesmo perfil comportamental com HXT ausente.

A interdisciplinaridade entre *Análise Dinâmica* e *Análise de Controle Metabólico* revelou que o ganho estático K é uma elasticidade dimensional discreta. Quanto menor a variação no ganho estático entre os experimentos realizados, K torna-se a elasticidade adimensional tradicional, os quais revelam os relacionamentos local e global da rede metabólica.

A partir da perturbação em degrau tradicional de [GLCe], o ganho estático da fase preparatória é de aproximadamente 0,19, e a de pagamento, $0,38 \frac{mmol\ s^{-1}}{mmol\ L^{-1}}$. A glicólise possui $\tau \simeq 130\ s$, revelando a discrepância de atuação das isoenzimas HEX1, HXK2, HXK1 e GLK1 possuem τ igual a 127,1 151,7 e 189,8 s, respectivamente, e as contribuições na produção de G6P são de 95,8, 4,17 e 0,056 %. Logo, o modelo considera HXK2 como a principal isoenzima desse processo, coerentemente com a literatura (50).

Através do conhecimento indutivo-dedutivo, modelos bioquímicos estruturados devem ser usados paralelamente a análises cinéticas microbianas, para orientar a pesquisa e desvendar a lógica metabólica pela técnica da MCA.

5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Propor rota de transporte ativo da sacarose associada com a hidrólise enzimática interna a frutose e glicose.
- Definir cinética de degradação da frutose juntamente com a rota metabólica central apresentada nesse trabalho.
- Realizar análise sensitiva dos parâmetros cinéticos acrescentados ao modelo e validá-los de acordo com as propostas de alteração genética atual, encontradas na literatura.

Referências

- 1 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. [S.l.]: Sarvier, 2011.
- 2 SMALLBONE, K.; MESSIHA, H. L.; CARROLL, K. M.; WINDER, C. L.; MALYS, N.; DUNN, W. B.; MURABITO, E.; SWAINSTON, N.; DADA, J. O.; KHAN, F.; PIR, P.; SIMEONIDIS, E.; SPASIC, I.; WISHART, J.; WEICHART, D.; HAYES, N. W.; JAMESON, D.; BROOMHEAD, D. S.; OLIVER, S. G.; GASKELL, S. J.; MCCARTHY, J. E.; PATON, N. W.; WESTERHOFF, H. V.; KELL, D. B.; MENDES, P. A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterization of all its enzymes. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2832–2841, 2013.
- 3 HOOPS, S.; MENDES, P. 2014. Disponível em: <http://www.copasi.org/>.
- 4 BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 85–111, 1997.
- 5 FERNANDES, M.; JUNIOR, A. F.; MONTEIRO, J. B. **Avaliação do desempenho fermentativo de leveduras geneticamente modificadas na metabolização de sacarose**. Tese (Dissertação de Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2013.
- 6 EMBL-EBI. **BLAST—The Basic Local Alignment Search Tool**. 2014. Disponível em: <http://www.uniprot.org/blast/>.
- 7 JUNCKER, J.-C. Outubro 2014. The EU Framework Programme for Research and Innovation. Disponível em:

http://ec.europa.eu/research/bioeconomy/index_en.htm.

8 OLEJ, B.; FRISCHTAK, C. R.; MACHADO, J.; ENRIQUEZ, J.; FERREIRA, S. N.; GRADIN, B.; OOTANI, R. S. Bioeconomia – uma agenda para o Brasil. In: CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **Harvard Business Review – Brasil**. [S.l.]: Harvard Business Review Analytic Services, 2013. p. 1–40.

9 STEPHANOPOULOS, G. **Laboratory for Bioinformatics and Metabolic Engineering**. Abril 2015. Disponível em: <http://bamel.scripts.mit.edu/gns/>.

10 MIAN, R. **Lançada a Associação Brasileira de Biotecnologia Industrial**. Abril 2014. Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1113093>. Acesso em: Abril de 2015.

11 SCHROEDER, J. **Brazilian Industrial Biotechnology Association Formed**. Maio 2014. Disponível em: <http://domesticfuel.com/2014/05/01/brazilian-industrial-biotechnology-association-formed/>. Acesso em: Abril de 2015.

12 MARPLES, F. **Brazilian Industrial Biotechnology Association founded in São Paulo**. Maio 2014. Disponível em: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/05/05/brazilian-industrial-biotechnology-association-founded-in-sao-paolo/>.

13 SCHNEIDER, M. V.; WATSON, J.; ATTWOOD, T.; ROTHER, K.; BUDD, A.; MCDOWALL, J.; VIA, A.; FERNANDES, P.; NYRONEN, T.; BLICHER, T.; JONES, P.; BLATTER, M.-C.; RIVAS, J. D. L.; JUDGE, D. P.; GOOL, W. van der; BROOKSBANK, C. Bioinformatics training: a review of challenges, actions and support requirements. **Briefing in Bioinformatics**, v. 2, p. 544–551, 2010.

14 ÖSTERLUND, T.; NOOKAEW, I.; NIELSEN, J. Fifteen years of large scale metabolic modeling of yeast: Developments and impacts. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 979–988, 2012.

15 SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering–Basic Concepts**. [S.l.]: Prentice Hall PTR, 2009.

16 SCHOMBURG, D. 2015. Disponível em: <http://www>.

brenda-enzymes.org.

17 SCHÜLKE, N.; SCHMID, F. X. The stability of a yeast invertase is not significantly influenced by glycosylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8827–8831, 1988.

18 CONDE, A.; DIALLINAS, G.; CHAUMONT, F.; CHAVES, M.; GERÓS, H. Transporters, channels, or simple diffusion? dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 857–868, 2010.

19 DIDERICH, J. A.; SCHEPPER, M.; HOEK, P. van; LUTTIK, M. A. H.; DIJKEN, J. P. van; PRONK, J. T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, H. F. M.; MATTOS, M. J. T. de; DAM, K. van; KRUIEBERG, A. L. Glucose uptake kinetics and transcription of hxt genes in chemostat cultures of *saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 15350–15359, 1999.

20 CERVISIAE, R. of Cation Balance in *S. Martha s. cyert* and *caroline c. philpott*. **Genetics**, v. 193, p. 677–713, 2013.

21 SCHLESSER, A.; ULASZEWSKI, S.; GHISLAIN, M.; GOFFEAU, A. Second transport atpase gene in *saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 19480–19487, 1988.

22 PRITCHARD, L.; KELL, D. B. Schemes of flux control in a model of *saccharomyces cerevisiae* glycolysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 3894–3904, 2002.

23 GU, Z.; CAVALCANTI, A.; CHEN, F.-C.; BOUMAN, P.; LI, W.-H. Extent of gene duplication in the genomes of *drosophila*, nematode, and yeast. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, p. 256–262, 2002.

24 HEAVNER, B. D.; SMALLBONE, K.; BARKER, B.; MENDES, P.; WALKER, L. P. Yeast 5 – an expanded reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. **BMC Systems Biology**, v. 6, p. 55–68, 2012.

25 HOOPS, S.; SAHLE, S.; GAUGES, R.; LEE, C.; PAHLE, J.; SIMUS, N.; SINGHAL, M.; XU, L.; MENDES, P.; HUMMER, U.

Copasi – a complex pathway simulator. **System Biology**, v. 22, p. 3067–3074, 2006.

26 LI, C.; DONIZELLI, M.; RODRIGUEZ, N.; DHARURI, H.; CHELLIAH, L. E. V.; LI, L.; HE, E.; HENRY, A.; STEFAN, M. I.; SNOEP, J. L.; HUCKA, M.; NOVÈRE, N. L.; LAIBE, C. **Biomodels** database: An enhanced, curated and annotated resource for published quantitative kinetic models. **BMC Systems Biology**, v. 4, p. 92–106, 2010.

27 HEIJNEN, J. J.; SMOLKE, C. D. **The Metabolic Pathway Engineering Handbook**. [S.l.]: CRC Press, 2010.

28 SMALL, J. R.; FELL, D. A. Metabolic control analysis. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, p. 413–420, 1990.

29 KACSER, H.; BURNS, J. A. The control of flux. **The Society of Experimental Biology**, v. 27, p. 65–104, 1973.

30 HEINRICH, R.; RAPOPORT, T. A. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. **European Journal of Biochemistry**, v. 42, p. 89–95, 1974.

31 WESTERHOFF, H. V.; CHEN, Y.-D. How do enzyme activities control metabolite concentrations? **European Journal of Biochemistry**, v. 142, p. 425–430, 1984.

32 KELL, D.; COWLEY, J. **The Metabolic Control Analysis Web**. Fevereiro 2004. Disponível em: http://dbkgroup.org/mca_home.htm.

33 SEBORG, D. E.; EDGAR, T. F.; MELLICHAMP, D. A. **Process Dynamics and Control**. [S.l.]: John Wiley and Sons, Inc., 2003.

34 PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. [S.l.]: McGraw Hill, 1999.

35 HUCKA, M.; BERGMANN, F.; NOVÈRE, N. L.; OLIVIER, B. G.; SAHLE, S.; WALTEMATH, D. 2014. Disponível em: <http://sbml.org/>.

36 CHAOUIYA, C.; BERENGUIER, D.; HEATING, S. M.; NALDI, A.; LERSEL, M. P. van; RODRIGUEZ, N.; DRÄGER, A.; BüCHEL,

F.; COKELAER, T.; KOWAL, B.; WICKS, B.; GONÇALVES, E.; DORIER, J.; PAGE, M.; MONTEIRO, P. T.; KAMP, A. von; XENARIOS, I.; JONG, H. de; HUCKA, M.; KLAMT, S.; THIEFFRY, D.; NOVÈRE, N. L.; SAEZ-RODRIGUEZ, J.; HEIKAR, T. Sbm1 qualitative models: a model representation format and infrastructure to foster interactions between qualitative modelling formalisms and tools. **BMC Systems Biology**, v. 7, 2013.

37 PROJECT, Q. 2014. Disponível em: <http://qt-project.org/>.

38 GILLESPIE, D. T. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. **Journal of Physical Chemistry**, v. 25, p. 2340–2361, 1977.

39 PETZOLD, L. Automatic selection of methods for solving stiff and nonstiff systems of ordinary differential equations. **SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing**, v. 4, p. 136–148, 1980.

40 HINDARSH, A. C. Odepack, a systematized collection of ode solvers. **IMACS Transactions on Scientific Computation**, v. 1, p. 55–64, 1982.

41 WEISSTEIN, E. W. **Adams' Method**. 2014. MathWorld – A Wolfram Web Resource. Disponível em: <http://mathworld.wolfram.com/AdamsMethod.html>.

42 SUNDIALS. 2007. Disponível em: <http://sundials.wikidot.com/bdf-method>.

43 REDER, C. Metabolic control theory: A structural approach. **Journal of Theoretical Biology**, v. 135, p. 175–201, 1988.

44 ANTON, H. **Calculus with Analytic Geometry**. [S.l.]: Wiley, 1999. 165–171, A44–A46 p.

45 IDA, Y.; HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C. Utilization of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain incapable of both ethanol and glycerol biosynthesis for anaerobic bioproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 4811–4819, 2013.

46 XIAOJING, X.; LIMIN, C.; XUN, C. Elementary flux mode analysis for optimized ethanol yield in anaerobic fermentation of glucose with *Saccharomyces cerevisiae*. **Chinese Journal of**

Chemical Engineering, v. 16, p. 135–142, 2008.

47 ZANGHELLINI, J.; RUCKERBAUER, D. e.; HANSCHO, M.; JUNGREUTHMAYER, C. Elementary flux modes in a nutshell: Properties, calculation and applications. **Biotechnology Journal**, v. 8, p. 1009–1016, 2013.

48 SCHUSTER, S.; DANDEKAR, T.; FELL, D. **Description of the algorithm for computing elementary flux modes**. 2014. Disponível em: <http://penguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/metatool/algorithm.pdf>.

49 UNIPROT. **P17709 – HXKG YEAST**. 2014. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P17709>.

50 UNIPROT. **P04807 – HXKB YEAST**. 2014. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04807>.

51 UNIPROT. **P04806 – HXKA YEAST**. 2014. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04806>.

52 STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; ARAÚJO, P. S. de. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 212–214, 2000.