BALANÇOS DE ELEMENTOS E REDOX

Caroline Satye Martins Nakama

O que são balanços?

- Balanços estão relacionados com o princípio de conservação

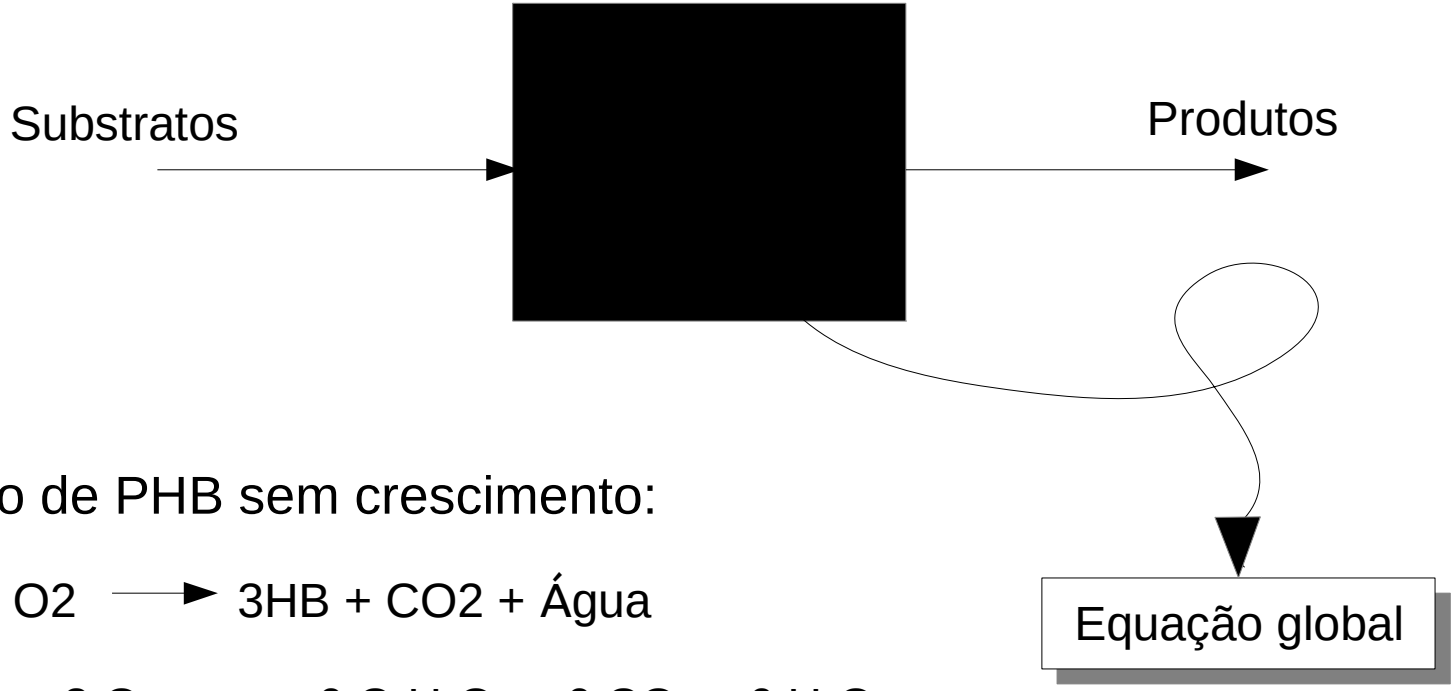
Variação = entrada + produzido + consumido + saída

em um momento ou intervalo de tempo

Por que é importante verificar os balanços nos dados?

- Verificar a consistência dos dados
  - Garantir que os dados fazem sentido e estão certos
- Indício de que a rede estudada está correta
- No nosso caso, quando trabalhamos com modelos de fluxo é imprescindível que os balanços fechem (em alguns casos devem ser exatos)

Modelo *black box*



Produção de PHB sem crescimento:

Glicose + O2 ⟶ 3HB + CO2 + Água

$$5\ C_6H_{12}O_6 + 3\ O_2 \longrightarrow 6\ C_4H_8O_3 + 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

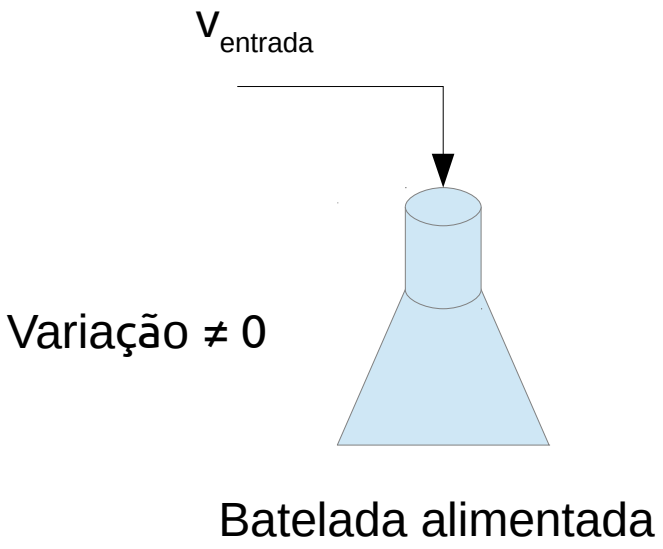
Por que balanço de elementos e redox?

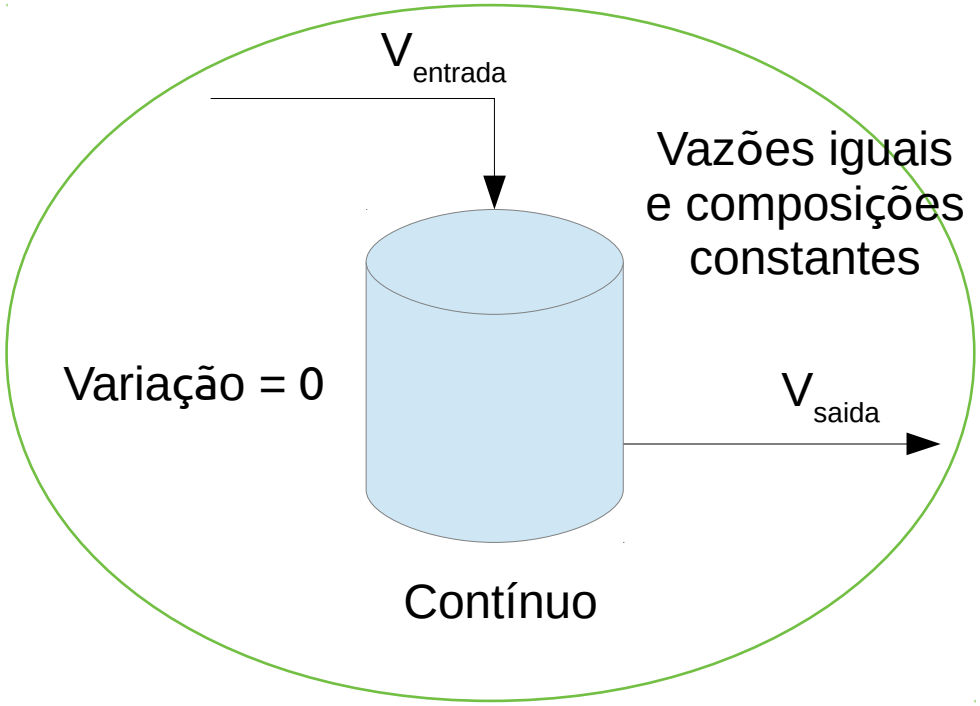
- Balanço de massa não fornece informação suficiente sobre as reações

- Dificuldade de medição de todas as substâncias
  - Não é possível diferenciar a água produzida da água do meio

Quais tipos de experimento podemos fazer balanços?

- Teoricamente podemos calcular balanços em qualquer tipo de experimento





Balanço de elementos

- Elementos comuns:
  - **C – Carbono**
  - N – Nitrogênio
  - S – Enxofre
  - P – Fósforo

$$\cancelto{0}{\textbf{Variação}} = \textbf{entrada} + \cancelto{0}{\textbf{produzido}} + \cancelto{0}{\textbf{consumido}} + \textbf{saída}$$

- Precisamos do número de átomos do elemento do balanço de cada composto envolvido
- Exemplo: $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2$ (Glicose $\longrightarrow$ etanol)

$$-1 \times 6 + 2 \times 2 + 2 \times 1 = 0$$

Balanço de carbono - exemplo

Glicose + O2 ⟶ 3HB + CO2

Exemplo

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO_2	O_2
B10 P(3HB)	g/h	2,85	1,11	0,00	0,00	-	-
	g/g.h	0,35	0,14	0,00	0,00	-	-
	mmol/g.h	1,97	1,60	0,00	0,00	4,26	3,57
	mmolC/g.h	11,82	6,42	0,00	0,00	4,26	

Fórmulas

Glicose – $C_6H_{12}O_6$

3HB – $C_4H_8O_3$

(Trabalhando com vetores)

- Vetores são matrizes de **uma** <u>coluna</u> ou **uma** linha

$$n_C = \begin{pmatrix} n_C^{glic} & n_C^{3HB} & n_C^{O2} & n_C^{CO2} \end{pmatrix} \qquad v = \begin{pmatrix} -v^{glic} \\ v^{3HB} \\ -v^{O2} \\ v^{CO2} \end{pmatrix}$$

$$n_C v = n_C^{glic}(-v^{glic}) + n_C^{3HB} v^{3HB} + n_C^{O2}(-v^{O2}) + n_C^{CO2}(-v^{CO2})$$

Balanço de carbono - Exemplo

	Glicose	O2	3HB	CO2
Num. átomos C	6	0	4	1
Fluxo v (mmol/g.h)	-1,97	-3,57	1,60	4,26
Fluxo de C (mmolC/g.h)				

Balanço: $v_C^{glic} + \cancel{v_C^{O2}} + v_C^{3HB} + v_C^{CO2} =$

Balanço (%): $\dfrac{v_C^{3HB} + v_C^{CO2}}{-v_C^{glic}} =$

Fluxos de substratos são negativos!

Balanço redox

- Todos os substratos com C podem ser oxidados a CO_2
- Vias metabólicas transformam substratos em produtos mais reduzidos ou oxidados em relação ao substratos
- O balanco do nível redox (grau de redução) de todas as espécies envolvidas em uma reação deve fechar

- **Nos ajuda a identificar vias que utilizam cofatores**

Cálculo do nível redox

- Definições:
  - H tem nível redox igual a 1
  - Compostos com nível redox zero correspondente a cada elemento

H_2O – O	$2 \times 1 + O = 0$	$O = -2$
CO_2 – C	$C + 2 \times (-2) = 0$	$C = 4$
NH_3 – N	$N + 3 \times 1 = 0$	$N = -3$
H_2SO_4 – S	$2 \times 1 + S + 4 \times (-2) = 0$	$S = 6$
H_3PO_4 – P	$3 \times \ + P + 4 \times (-2) = 0$	$P = 5$

- Example: (Glicose) $C_6H_{12}O_6$: $\underbrace{6 \times 4}_{24} + \underbrace{12 \times 1}_{12} + \underbrace{6 \times (-2)}_{-12} = 24$

Balanço redox - exemplo

Glicose + O2 ⟶ 3HB + CO2

Exemplo

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO_2	O_2
B10 P(3HB)	g/h	2,85	1,11	0,00	0,00	-	-
	g/g.h	0,35	0,14	0,00	0,00	-	-
	mmol/g.h	1,97	1,60	0,00	0,00	4,26	3,57
	mmolC/g.h	11,82	6,42	0,00	0,00	4,26	

Fórmulas

Glicose – $C_6H_{12}O_6$

3HB – $C_4H_8O_3$

O = -2

C = 4

H = 1

Balanço redox - Exemplo

	Glicose	O2	3HB	CO2
Nivel redox (NR)	24	-4	18	0
Fluxo v (mmol/g.h)	-1,97	-3,57	1,60	4,26
Fluxo x NR (mmol/g.h)				

Balanço: $v_{NR}^{glic} + v_{NR}^{O2} + v_{NR}^{3HB} + \cancel{v_{NR}^{CO2}} =$

Balanço (%): $\dfrac{v_{NR}^{3HB}}{-(v_{NR}^{glic} + v_{NR}^{O2})} =$

Fluxos de substratos são negativos!

Balanço redox – Identificando cofatores em vias metabólicas

- Deve-se fazer o balanço da estequiometria geral da via
- Exemplos:

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2$ (Glicose $\longrightarrow$ etanol)

$$- 24 + 2 \times 12 + 2 \times 0 = 0$$

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_4O_2 + 2\ CO_2 + 4\ NADH$ (Glicose $\longrightarrow$ Ac. Acético)

$$- 24 + 2 \times 8 + 2 \times 0 + 4 \times 2 = 0$$

NR do NAD(P)H = 2

Por que os balanços não fecham?

- Alguns produtos não foram medidos
- Produtos que eram esperados na fase líquida foram liberados na fase gasosa
- Aparelho medidor mal calibrado ou com defeito
- **Ruídos (erros) na medição**

Medições são variáveis aleatórias

“Uma variável aleatória é uma variável quantitativa, cujo resultado (valor) depende de fatores aleatórios”

Wikipedia

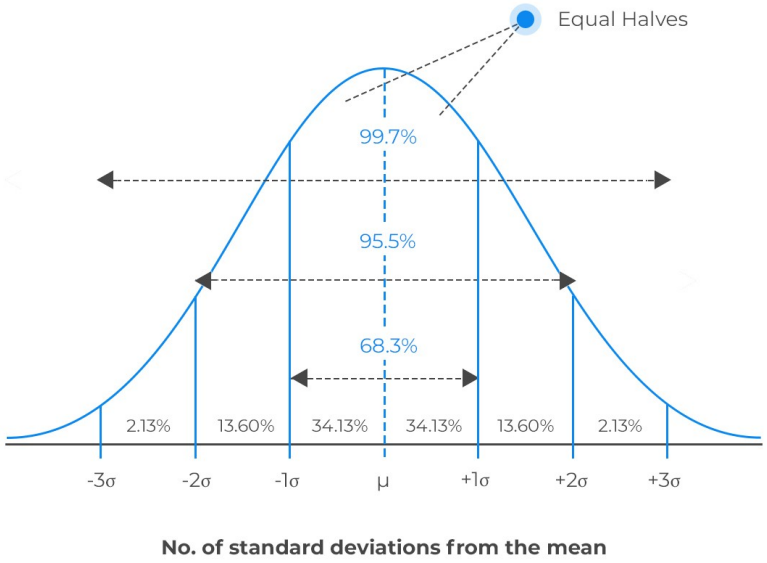
Medições são variáveis aleatórias

- A incerteza dos valores medidos são decorrentes dos erros de medição, ε
- Quase sempre assumimos que os erros seguem uma distribuição normal com media 0 e variancia σ^2

$\mathcal{N}(\bar{v}, \sigma^2)$ —— $v = \bar{v} + \varepsilon$

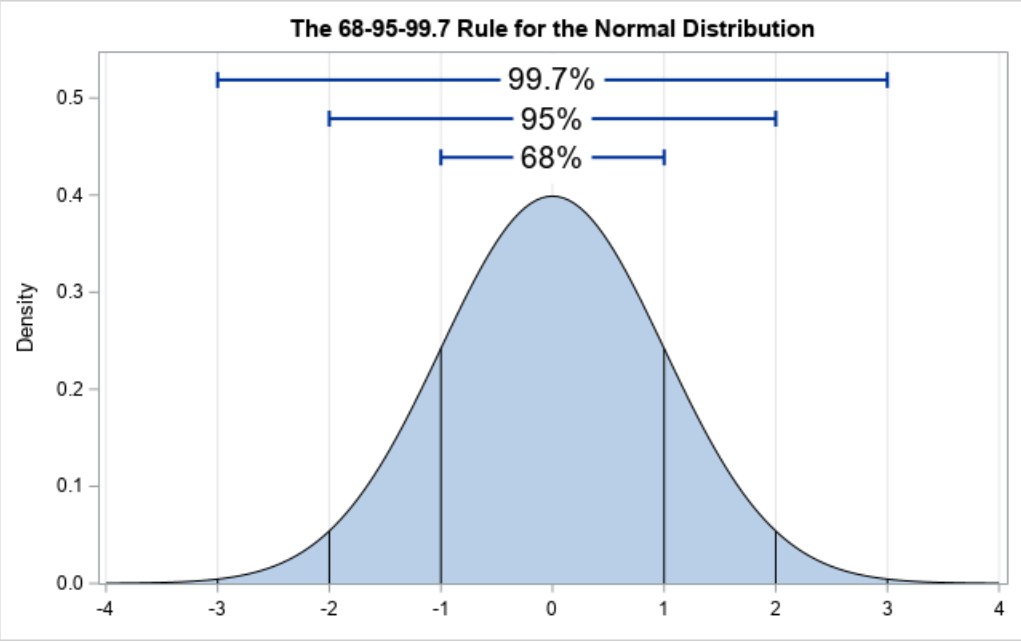
média (μ)

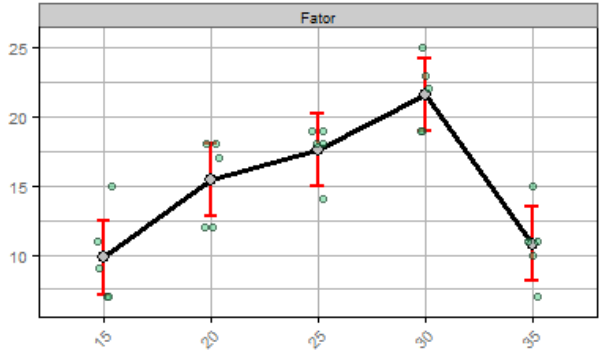
$\mathcal{N}(0, \sigma^2)$

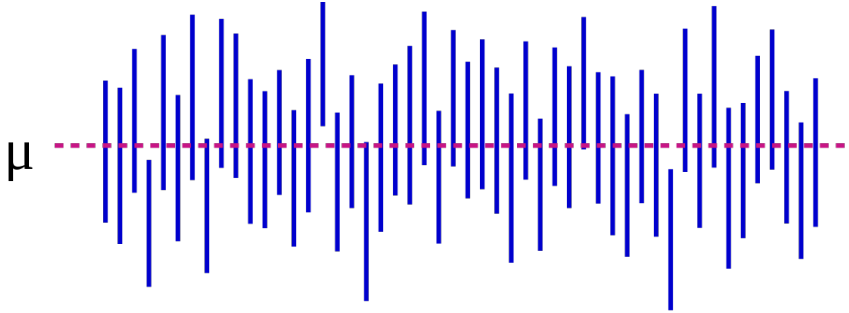


IMPORTANTE

- **O desvio padrão ou a variância de uma variável aleatória <u>NÃO</u> são iguais ao intervalo de confiança!**







Reconciliação linear

- Do ponto de vista matemático, é um problema que chamamos de estimação linear de parâmetros
- De modo geral, parâmetros são variáveis aleatórias que não sabemos seu valor real, mas estamos buscando uma estimativa
- No nosso caso podemos dizer que os fluxos são nossos parâmetros e as medições são realizações das variáveis aleatórias

Obtenção de um valor da variável aleatória

Reconciliação linear

- Podemos usar esse método, pois os fluxos estão no estado estacionário e utilizamos os balanços para fazer a reconciliação. Devemos também assumir que o erro de cada fluxo segue uma distribuição de probabilidade normal

$$v_{rec} = v_{med} - \Sigma A^T (A \Sigma A^T)^{-1} A v_{med}$$

Vetor de fluxos v (med – medido, rec – reconciliado)

fluxos em um vetor coluna

Matriz de balancos A

cada linha da matriz corresponde aos coeficientes de um balanço e cada coluna a um composto (ou fluxo) / A^T corresponde à transposta da matriz A

Matriz de covariancia Σ

vamos usar a matriz com a variância de cada fluxo na diagonal correspondente

Reconciliação linear

$$v_{rec} = v_{med} - \Sigma A^T (A \Sigma A^T)^{-1} A v_{med}$$

$$\begin{pmatrix} v_{rec}^{glic} \\ v_{rec}^{3HB} \\ v_{rec}^{O2} \\ v_{rec}^{CO2} \end{pmatrix}$$

(4 x 1)

$$\begin{pmatrix} v_{med}^{glic} \\ v_{med}^{3HB} \\ v_{med}^{O2} \\ v_{med}^{CO2} \end{pmatrix}$$

(4 x 1)

$$\begin{pmatrix} n_C^{glic} & n_{NR}^{glic} \\ n_C^{3HB} & n_{NR}^{3HB} \\ n_C^{O2} & n_{NR}^{O2} \\ n_C^{CO2} & n_{NR}^{CO2} \end{pmatrix}$$

(4 x 2)

$$\begin{pmatrix} \sigma^{2,vglic} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma^{2,v3HB} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma^{2,vO2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \sigma^{2,vCO2} \end{pmatrix}$$

(4 x 4)

$$\begin{pmatrix} n_C^{glic} & n_C^{3HB} & n_C^{O2} & n_C^{CO2} \\ n_{NR}^{glic} & n_{NR}^{3HB} & n_{NR}^{O2} & n_{NR}^{CO2} \end{pmatrix}$$

(2 x 4)

Dimensão: (num. linhas x num. colunas)

(Operações com matrizes)

Multiplicação: (n x m) (m x k) = (n x k) – o número de colunas da primeira deve ser igual ao número de linhas da segunda. O resultado tem o número de linhas da primeira e o número de colunas da segunda

Soma/Subtração: (n x m) + (n x m) = (n x m) – ambas devem ter o mesmo número de linhas e colunas

Inversa: $(n \times n)^{-1} = (n \times n)$ – a matriz deve ter o mesmo número de linhas e colunas (chamamos de matriz quadrada) e sua dimensão é mantida

$$\boxed{v_{rec} = v_{med} - \Sigma A^T (A \Sigma A^T)^{-1} A v_{med}}$$

$$(4 \times 1) = (4 \times 1) - \underbrace{(4 \times 4)}_{(4 \times 2)} \underbrace{(4 \times 2) [(2 \times 4) (4 \times 4) (4 \times 2)]^{-1}}_{[2 \times 2]^{-1}} \underbrace{(2 \times 4) (4 \times 1)}_{(2 \times 1)}$$

$$(4 \times 1)$$

Reconciliação linear - Exemplo

$$\text{Glicose} + O_2 \longrightarrow 3HB + CO_2$$

Considerar variância de 2,5% do valor medido de cada fluxo

$$\Sigma = \begin{pmatrix} 0{,}025 \cdot v^{glic} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0{,}025 \cdot v^{O2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0{,}025 \cdot v^{3HB} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0{,}025 \cdot v^{CO2} \end{pmatrix}$$

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO_2	O_2
B10 P(3HB)	g/h	2,85	1,11	0,00	0,00	-	-
	g/g.h	0,35	0,14	0,00	0,00	-	-
	mmol/g.h	1,97	1,60	0,00	0,00	4,26	3,57
	mmolC/g.h	11,82	6,42	0,00	0,00	4,26	

Fórmulas

Glicose – $C_6H_{12}O_6$

3HB – $C_4H_8O_3$

$$v_{rec} = v_{med} - \Sigma A^T (A \Sigma A^T)^{-1} A v_{med}$$

Reconciliação linear - Exemplo

	Glicose	O2	3HB	CO2	
Num. átomos C	6	0	4	1	A
Nivel redox (NR)	24	-4	18	0	
Fluxo v [mmol/g.h]	-1,97	-3,57	1,60	4,26	v_{med}^T
Variância σ^2 [mmol/g.h]					diag(Σ)
Fluxo v_{rec} [mmol/g.h]					v_{rec}^T

$$v_{rec} = v_{med} - \Sigma A^T (A \Sigma A^T)^{-1} A v_{med}$$

Fluxos de substratos são negativos!

Reconciliação linear - Exercicio

- Verifique os balancos de carbono e redox para os fluxos reconciliados

Exercício

- Calcular os balanços de carbono e redox e fazer a reconciliação dos fluxos considerando variância de 2,5% do valor de cada fluxo para o experimento abaixo.

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO_2	O_2
	g/h	2,78	1,21	0,21	0,11	-	-
	g/g.h	0,28	0,12	0,02	0,01	-	-
	mmol/g.h	1,54	1,40	0,18	0,09	3,29	3,16

Fórmulas

Glicose – $C_6H_{12}O_6$

Ac. Hex – $C_6H_{12}O_2$

3HB – $C_4H_8O_3$

3HHx – $C_6H_{10}O_2$

Bibliografia

- Balanços de elementos e redox

Stephanopoulos, George, Aristos A. Aristidou, and Jens Nielsen. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. Elsevier, 1998.

(Capítulo 3 de um livro que o Prof. Gregório mandou)

- Reconciliação

Narasimhan, Shankar, and Cornelius Jordache. *Data reconciliation and gross error detection: An intelligent use of process data*. Elsevier, 1999.

- Exemplos

Mendonça, Thatiane Teixeira. *Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para biossíntese do copolímero biodegrádavel poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)[P (3HB-co-3HHx)*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.