

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

SIMULAÇÃO DE ALTERNATIVAS DE PROCESSOS
PARA A HIDRÓLISE DA SACAROSE

CLAUDINEI BERTI

Eng^o Químico, UEM, 1988

Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD
Prof. Titular do DEQ, FUEM

Dissertação de Mestrado submetida à
Fundação Universidade Estadual de
Maringá, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Química, área
de Desenvolvimento de Processos.

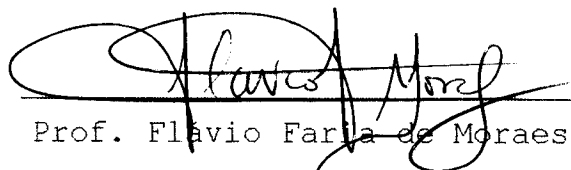
Maringá, PR - Brasil

1996

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão definitiva da dissertação de Mestrado submetida por Claudinei Berti, à Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 29 de julho de 1995.

COMISSÃO JULGADORA:


Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.
Orientador


Prof. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva, Dr. Eng.
Membro


Prof^a Gisella Maria Zanin, Dr^a Eng.
Membro

À Deus

Aos meus pais, Urandi e Maria Helena

À minha esposa, Cintia Maria

AGRADECIMENTOS

Aos professores Flávio Faria de Moraes e Gisella Maria Zanin, pela orientação e compreensão no desenvolvimento deste trabalho.

À Marilza, pelo grande apoio que sempre prestou durante todos os anos de realização deste trabalho.

À todos os professores do DEQ e do PEQ/FUEM, que tanto na graduação como no mestrado contribuíram para a minha formação.

Aos amigos José Antônio Veronez e Paula e à minha esposa Cintia Maria, que me auxiliaram na digitação deste trabalho.

À minha esposa Cintia Maria e a meus pais, pela paciência e compreensão nos momentos em que fiquei trabalhando e não pude estar junto deles.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
NOTAÇÃO E NOMENCLATURA	xi
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
I - INTRODUÇÃO	01
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
III - METODOLOGIA DE MODELAGEM, RESULTADOS E DISCUS- SÃO.....	50
IV - CONCLUSÕES	104
V - SUGESTÕES	107
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
VII - ANEXOS	112

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	01
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
2.1	SACAROSE	07
2.2	ENZIMAS	07
2.2.1	Invertase	10
2.2.2	Inversão da Sacarose	12
2.2.2.1	Inversão Química	12
2.2.2.2	Inversão Enzimática	14
2.2.2.3	Aplicações do Açúcar Invertido	14
2.3	PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA ENZIMA INVERTASE	15
2.3.1	Influência do Tempo de Reação - Método das Velocidades Iniciais	15
2.3.2	Influência da Concentração de Enzima	17
2.3.3	Influência do pH	17
2.3.4	Influência da Temperatura	19
2.3.4.1	Energia de Ativação da Reação de Hidrólise	20
2.3.4.2	Energia de Desativação Térmica da Enzima	22
2.3.5	Estabilidade Operacional	25
2.4	CINÉTICA ENZIMÁTICA	26
2.4.1	Hipótese do Equilíbrio Rápido	27
2.4.2	Hipótese do Estado Estacionário	30
2.4.3	Modelo Generalizado Para Reações Com Um Substrato	33
2.4.3.1	Inibição Competitiva	33
2.4.3.2	Inibição Não Competitiva	35
2.4.3.3	Inibição do Tipo Mista	35
2.4.4	Efeito da Concentração de Substrato	37
2.4.5	Efeito da Concentração de Produto	38
2.4.6	Determinação Experimental dos Parâmetros Cinéticos	39

2.5	CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA SACAROSE PELA ENZIMA INVERTASE	43
III.	METODOLOGIA DE MODELAGEM, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1	MODELAGEM DA CINÉTICA EM REATOR BATELADA	50
3.1.1	Modelo de Bowski	50
3.1.1.1	Concentração de Água Constante	50
3.1.1.2	Concentração de Água Variável	51
3.1.2	Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima.....	52
3.1.2.1	Concentração de Água Constante	53
3.1.2.2	Concentração de Água Variável	53
3.1.3	Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima e Inibição pelos Produtos da Reação	54
3.1.3.1	Concentração de Água Constante	54
3.1.3.2	Concentração de Água Variável	55
3.2	OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	55
3.3	CÁLCULO DO PARÂMETRO DE INIBIÇÃO	57
3.3.1	Concentração de Água Constante	57
3.3.2	Concentração de Água Variável	60
3.4	AJUSTE DOS MODELOS CINÉTICOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS	62
3.4.1	Modelo de Bowski	63
3.4.1.1	Concentração de Água Constante	63
3.4.1.2	Concentração de Água Variável	65
3.4.2	Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima	67
3.4.2.1	Concentração de Água Constante	67
3.4.2.2	Concentração de Água Variável	69
3.4.3	Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima e Inibição pelos Produtos da Reação	71
3.4.3.1	Concentração de Água Constante	71

3.4.3.2	Concentração de Água Variável	73
3.5	SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO PARA A HIDRÓLISE DA SACAROSE	76
3.5.1	Obtenção dos Parâmetros Cinéticos	76
3.5.1.1	Cálculo da Constante "a"	76
3.5.1.2	Cálculo da Constante de Desativação Térmica da Enzima	77
3.5.2	Obtenção dos Modelos a Partir da Simulação ...	78
3.5.2.1	Concentração de Água Constante	79
3.5.2.2	Concentração de Água Variável	79
3.5.3	Influência da Concentração Inicial de Substrato	80
3.5.3.1	Concentração de Água Constante	80
3.5.3.2	Concentração de Água Variável	82
3.5.4	Influência da Temperatura	84
3.5.4.1	Concentração de Água Constante	84
3.5.4.2	Concentração de Água Variável	87
3.5.5	Influência da Concentração da Água	89
3.6	INFLUÊNCIA DA FORMA DE ADIÇÃO DA ENZIMA AO MEIO REACIONAL	91
3.6.1	Modelagem da Cinética em Reator Batelada	92
3.6.1.1	Obtenção do Perfil de Adição da Enzima	92
3.6.1.2	Obtenção do Modelo Integrado	94
3.6.2	Comparação entre os Modelos de Adição Total e Parcial da Enzima	95
3.7	SIMULAÇÃO DE CONDIÇÕES DE ADIÇÃO DE ENZIMA AO MEIO REACIONAL	97
3.7.1	Influência da Quantidade Inicial de Enzima ..	99
3.7.2	Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima	101
IV.	CONCLUSÕES	104
V.	SUGESTÕES	107

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
VII. ANEXOS	112
7.1 ANEXO I - Velocidade Inicial em Função da Concentração de Substrato	112
7.2 ANEXO II - Programa FITPOR	113
7.3 ANEXO III - Programa DCTE	116
7.4 ANEXO IV - Programa DVAR	117
7.5 ANEXO V - Dados de Conversão em Função do Tempo ..	118
7.6 ANEXO VI - Dados de Conversão em Função do Tempo...	121

ÍNDICE DE TABELAS

2.1 - Comparação entre Enzimas e Catalisadores Químicos (ZANIN, 1989)	09
2.2 - Energia de Ativação e Velocidade de Reação para a Decomposição de Peróxido de Hidrogênio Com e Sem Catalisador (HARTMEIER, 1988)	10
2.3 - Propriedades da Enzima Invertase Extracelular e Intracelular (GÁSCON et alii, 1967)	11
2.4 - Energia de Ativação (E_a), Energia de Desativação (E_d) e Tempo de Meia-Vida ($t_{1/2}$) para a Enzima Invertase Comercial - NOVO	26
3.1 - Obtenção dos Parâmetros Cinéticos - $[E] = 0,00099$ g/L; pH 5,0; 55 °C (BERGAMASCO, 1989).....	56
3.2 - Resultados de Modelagem com a Equação (3.68)	64
3.3 - Resultados de Modelagem com a Equação (3.69)	66
3.4 - Resultados de Modelagem com a Equação (3.70)	68
3.5 - Resultados de Modelagem com a Equação (3.71)	70
3.6 - Resultados de Modelagem com a Equação (3.72)	72
3.7 - Resultados de Modelagem com a Equação (3.73)	74
3.8 - Atividade Específica (U/mg) em Função da Temperatura (°C) (BERGAMASCO, 1989)	76

3.9 - Valores do Parâmetro "a" em Função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	77
3.10 - Constante de Desativação Térmica em Função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (BERGAMASCO, 1989)	78
3.11 - Coeficientes da Equação (3.28)	79
3.12 - Coeficientes da Equação (3.32)	80
3.13 - Valores dos Coeficientes das Equações (3.108) e (3.109)	99
7.1.1 - Velocidade Inicial em Função da Concentração de Substrato (BERGAMASCO, 1989)	113
7.5.1 - Dados de Conversão em Função do Tempo, no Reator Batelada (BERGAMASCO, 1989)	119
7.6.1 - Dados de Conversão em Função do Tempo, Utilizados para o Cálculo do Parâmetro de Inibição pelos Produtos da Reação	122

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 - Representação Esquemática da Estrutura da Sacarose	08
2.2 - Mecanismo Sugerido para a Formação do Complexo Ativo Invertase-Sacarose (BOWSKI et alii, 1971)	13
2.3 - Representação de uma Curva Típica de Reação Enzimática	16
2.4 - Curva Típica de Atividade Enzimática em Função do pH, Grupos NH ₂ e COOH (HARTMEIER, 1988)	18
2.5 - Atividade Relativa em Função da Temperatura para a Invertase (IMAI et alii, 1983)	20
2.6 - Atividade Relativa em Função do Tempo - Enzima Invertase Adsorvida em Resina IRA 93, Tampão Fosfato (0,01 M), pH 4,0 (BOUDRANT & CHEFEL, 1975)	21
2.7 - Coeficiente de Ativação (A) e Desativação (K) em Função do Inverso da Temperatura Absoluta (HARTMEIER, 1988).....	25
2.8 - Representação Esquemática da Estabilidade Operacional de uma Enzima Livre e Imobilizada (CHEETHAM, 1985)	27
2.9 - Velocidade Inicial em Função da Concentração de Substrato (SEGEL, 1975)	34
2.10 - Representação dos Métodos de Cálculo de K _m e V _{máx} (DIXON & WEBB, 1979)	42
2.11 - Cinética de Inibição pelo Substrato Segundo Haldane (BAILEY & OLLIS, 1986)	44

3.1 - Obtenção dos Parâmetros Cinéticos - $[E] = 0,00099 \text{ g/L}$, pH 5,0; 55°C	57
3.2 - Dados Experimentais de Conversão de Substrato em Função do Tempo (BERGAMASCO, 1989).....	62
3.3 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.68) aos Dados Experimentais	65
3.4 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.69) aos Dados Experimentais	67
3.5 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.70) aos Dados Experimentais	69
3.6 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.71) aos Dados Experimentais	71
3.7 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.72) aos Dados Experimentais	73
3.8 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.73) aos Dados Experimentais	75
3.9 - Influência da Concentração da Água no Ajuste do Modelo aos Dados Experimentais	75
3.10 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 50^\circ\text{C}$ - Concentração de Água Constante	81
3.11 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 55^\circ\text{C}$ - Concentração de Água Constante	81
3.12 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 60^\circ\text{C}$ - Concentração de Água Constante	82

3.13 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 50^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Variável	83
3.14 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 55^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Variável	83
3.15 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 60^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Variável	84
3.16 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 550 \text{ mg/ml}$ = 55% p/v - Concentração de Água Constante	85
3.17 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 650 \text{ mg/ml}$ = 65% p/v - Concentração de Água Constante	85
3.18 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 750 \text{ mg/ml}$ = 75% p/v - Concentração de Água Constante	86
3.19 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 850 \text{ mg/ml}$ = 85% p/v - Concentração de Água Constante	86
3.20 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 550 \text{ mg/ml}$ = 55% p/v - Concentração de Água Variável	87
3.21 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 650 \text{ mg/ml}$ = 65% p/v - Concentração de Água Variável	88
3.22 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 750 \text{ mg/ml}$ = 75% p/v - Concentração de Água Variável.....	88
3.23 - Conversão em Função da Temperatura para $[S]_0 = 850 \text{ mg/ml}$ = 85% p/v - Concentração de Água Variável	89
3.24 - Influência da Concentração da Água no Desempenho da Reação - $T = 50^{\circ}\text{C}$	90

3.25 - Influência da Concentração da Água no Desempenho da Reação - T = 55 °C	90
3.26 - Influência da Concentração da Água no Desempenho da Reação - T = 60 °C	91
3.27 - Comparação entre os Modelos de Adição Total e Parcial de Enzima ao Meio Reacional	96
3.28 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima para $\beta = 0,25$	100
3.29 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima para $\beta = 0,50$	100
3.30 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima para $\beta = 0,60$	101
3.31 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima para $\alpha = 0,25$	102
3.32 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima para $\alpha = 0,50$	102
3.33 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima para $\alpha = 0,60$	103

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

- A - Coeficiente de variação da concentração da água (Equação 3.11)
- A_{in}^0 - Atividade enzimática inicial, observada no reator sem incubação da enzima (U/g)
- A_{in} - Atividade enzimática residual, observada no reator após certo período de incubação (U/g)
- a - Parâmetro definido na Equação (2.58)
- A_r - Constante de Arrhenius
- B - Coeficiente de variação da concentração da água (Equação 3.12)
- b - Parâmetro definido na Equação (2.59)
- c - Parâmetro definido na Equação (2.60)
- d - Parâmetro de ajuste (inibição pelo produto)
- $-\frac{d[ES]}{dt}$ - Velocidade de decomposição do complexo ES ($ML^{-3}T^{-1}$)
- $-\frac{d[S]}{dt}$ - Velocidade de decomposição do substrato ($ML^{-3}T^{-1}$)
- $-\frac{d[P]}{dt}$ - Velocidade de decomposição do produto ($ML^{-3}T^{-1}$)
- [E] - Concentração de enzima ativa (ML^{-3})
- E_a - Energia de ativação da reação (L^2T^{-2})
- $[E]_0$ - Concentração inicial de enzima ativa (ML^{-3})
- E_d - Energia de desativação térmica da enzima (L^2T^{-2})

- [E]_t - Concentração total de enzima (ML⁻³)
- [E]₁ - Concentração da solução de enzima (ML⁻³)
- [E]_{1im} - Concentração de enzima ativa no tempo de adição limite (ML⁻³)
- [ES] - Concentração do complexo enzima-substrato (ML⁻³)
- [EI] - Concentração do complexo enzima-inibidor (ML⁻³)
- [ESI] - Concentração do complexo enzima-substrato-inibidor (ML⁻³)
- [EIS] - Concentração do complexo enzima-inibidor-substrato (ML⁻³)
- [ES₂] - Concentração do complexo enzima-substrato-substrato (ML⁻³)
- [EP] - Concentração do complexo enzima-produto (ML⁻³)
- [I] - Concentração de inibidor (ML⁻³)
- K_m - Constante de Michaelis-Menten
- K_i - Constante de velocidade para a formação do complexo EI a partir de E + I
- K₁ - Constante de velocidade para a formação do complexo ES a partir de E + S
- K₋₁ - Constante de velocidade para a dissociação do complexo ES em E + S
- K₃ - Constante de velocidade para a formação do complexo SE a partir de E + S
- K₋₃ - Constante de velocidade para a dissociação do complexo SE em E + S
- K₄ - Constante de velocidade para a formação do complexo SES a partir de SE + S

- K_{-4} - Constante de velocidade para a dissociação do complexo SES em SE + S
- K_5 - Constante de velocidade para a formação do complexo SES a partir de ES + S
- K_{-5} - Constante de velocidade para a dissociação do complexo SES em ES + S
- K_p - Constante de velocidade para a dissociação do complexo ES em E + P
- K_s - Constante de equilíbrio para a formação do complexo ES a partir de E + S
- K_t - Constante de equilíbrio para a formação do complexo inativo SE
- K_6 - Constante de velocidade para a formação do complexo EP a partir de E + P
- K_{-6} - Constante de velocidade para a dissociação do complexo EP em E + P
- K'_t - Constante de equilíbrio para a formação do complexo inativo SES
- K'_p - Constante de equilíbrio para inibição pelo produto
- K^0 - Constante de equilíbrio para a formação do complexo ES a partir de E + S
- K'' - Constante de equilíbrio para a formação do complexo inativo SES
- K_{eq} - Constante de equilíbrio
- K_d - Constante de desnaturação da enzima em uma determinada temperatura, modelo exponencial (h^{-1})

- K_d^0 - Fator exponencial (h^{-1})
- K_{is} - Constante de velocidade para a formação do complexo ESI a partir de ES + I
- [P] - Concentração de produto (ML^{-3})
- Q - Vazão de adição de enzima (L^3T^{-1})
- p/v - peso por volume (ML^{-3})
- R - Constante da lei dos gases (1,987 cal/gmol.K)
- R^2 - Proporção de variação explicada pela regressão
- $r_d = \frac{d[E]}{dt}$ - Velocidade de desnaturação térmica da enzima ($ML^{-3}T^{-1}$)
- [S] - Concentração de substrato (ML^{-3})
- [SES]- Concentração do complexo substrato-enzima-substrato (ML^{-3})
- [SE] - Concentração do complexo substrato-enzima (ML^{-3})
- [S]₀ - Concentração inicial de substrato (ML^{-3})
- T - Temperatura absoluta (K)
- t - Tempo de reação (T)
- $t_{1/2}$ - Tempo de meia-vida (T)
- t_{lim} - Tempo limite para adição de enzima (T)
- u - Função degrau unitário
- V - Velocidade inicial de reação ($ML^{-3}T^{-1}$)
- V_{max} - Velocidade máxima de reação ($ML^{-3}T^{-1}$)

- v - Velocidade espacial (T^{-1})
- V_u - Volume útil do reator (L^3)
- $[W]$ - Concentração de água (ML^{-3})
- $[W]_0$ - Concentração inicial de água (ML^{-3})
- X_A - Conversão de sacarose em glicose e frutose (%)
- α' - Fator que multiplica K_s quando se forma o complexo EI
- α - Fração inicial de enzima no meio reacional
- β - Fração de tempo necessário para se atingir conversão de 95 %
- σ - Erro padrão de estimativa

RESUMO

Este trabalho apresentou como objetivo principal, contribuir para a determinação da cinética da reação de hidrólise da sacarose pela enzima invertase, em reator homogêneo do tipo batelada, visando trazer subsídios para projeto de reator em escala industrial.

As propriedades catalíticas da enzima invertase e os dados experimentais utilizados para verificar a qualidade de ajuste dos modelos desenvolvidos, foram obtidos em BERGAMASCO (1989). A reação foi modelada a partir dos dados de conversão em função do tempo, para a hidrólise de uma solução de sacarose a 85 % p/v, pH = 5,0 e T = 55 °C.

Os resultados da modelagem mostraram que os pontos experimentais foram bem ajustados pelo modelo de BOWSKI et alii, quando incorporados os efeitos de desativação térmica da enzima e da inibição pelos produtos da reação. Também a hipótese da concentração de água ser variável, em função de ser consumida no decorrer da reação, foi incorporada ao modelo, sem prejudicar a qualidade do ajuste.

Resultados de simulação mostraram que, um aumento da concentração inicial de substrato requer maiores tempos de reação para se atingir uma dada conversão.

Da simulação pode ser observado também que o melhor desempenho é obtido para uma faixa de temperatura de 50 a 55 °C, enquanto que para uma temperatura de 60 °C observa-se uma sensível desativação térmica, chegando até à redução da conversão máxima obtida.

A hipótese de adição parcial de enzima com o restante distribuído ao longo do tempo, visando redução no tempo necessário para se obter conversão máxima, mostrou que esta apresenta desempenho inferior ao obtido pela adição total de enzima no início da reação.

ABSTRACT

This work had as main objective, to contribute to the study of the kinetics of sucrose hydrolysis by invertase, in a homogeneous reactor, aiming at increasing the knowledge necessary to project an industrial scale reactor for this process.

The catalytic properties of the enzyme and experimental data used to verify the quality of the developed models were taken from BERGAMASCO (1989). Sucrose hydrolysis has been modeled from conversion data obtained at pH 5,0, 55 °C and 85% w/v sucrose concentration.

Modeling results have shown that experimental data was well modeled by BOWSKI et alii (1971) model when the effects of enzyme deactivation and product inhibition were included. The hypothesis of varying water concentration as a function of the hydrolysis reaction has been included in the model.

Simulation results have shown that increasing initial substrate concentration leads to longer reaction times to reach equivalent high conversions.

From simulation it also can be observed that for shorter conversion times, the temperatures of 50 and 55 °C are indicated, while for 60 °C enzyme deactivation is noticeable, leading to a reduction in the maximum conversion that can be reached.

Staged enzyme addition was studied, varying the fraction of enzyme added at reaction time zero and subsequent addition at constant flow rate up to complete the same quantity added in the simple batch system. Simulation has shown that there is no advantage in staged enzyme addition in spite of the noticeable enzyme deactivation.

I - INTRODUÇÃO

A sacarose (açúcar de cana) é o açúcar de uso mais difundido em países de clima tropical, constituindo-se também num produto de exportação, o que lhe confere um grande uso em nível mundial. Apresenta um poder adoçante razoável, fornecendo melhor paladar aos alimentos que a contém. Além disso, contribui para a melhoria de aspectos como aparência e vida de prateleira dos alimentos, atuando também como fonte energética. Devido ao alto grau de desenvolvimento tecnológico dos métodos de produção e refino e o seu baixo custo relativo a outros adoçantes, a sacarose é uma das substâncias mais difíceis de serem substituídas.

Apesar de todas estas características positivas, a sacarose apresenta alguns aspectos indesejáveis para um adoçante. Por exemplo: não é adequada para diabéticos, apresenta uma baixa relação poder adoçante/conteúdo energético, entre outros. Aspectos como estes, têm levado à busca de alternativas que venham a substituir a sacarose para alguns grupos de consumidores.

Alguns adoçantes sintéticos, como a sacarina, vêm sendo utilizados, porém, seu uso ainda é restrito a algumas aplicações. Além disso, apresentam um sabor residual amargo, o que não satisfaz às características organolépticas desejáveis nos alimentos. Sob esse ponto de vista, a frutose ou açúcar de frutas, constitui-se numa grande alternativa à substituição da sacarose.

A frutose é um dos mais importantes açúcares naturais, sendo encontrada nas frutas e vegetais, e constituindo-se responsável por aproximadamente metade da matéria seca do mel. Glicose e frutose, cada uma, formam metade da molécula de sacarose e, como no caso de outros açúcares naturais, fazem parte da alimentação humana.

A diferença básica entre frutose e sacarose é que, em solução, enquanto a sacarose apresenta uma forma única de molécula, a frutose é uma mistura de formas anômeras de piranose e furanose, nas configurações α e β . As proporções relativas destas formas afetam a doçura da solução. Seu poder adoçante é maior na forma cristalina, onde aparece como β -D-frutopiranose. Quando comparada à sacarose, apresenta poder adoçante 1,3 a 1,8 vezes mais que esta, apesar de possuir o mesmo valor calórico de outros açúcares (4 kcal/g). A vantagem de sua utilização é que, por ser mais doce que a sacarose, pode ser usada em menores quantidades, reduzindo o poder calórico do alimento. Além disto, a frutose é um adoçante higroscópico, o que a torna atrativa nas aplicações onde a retenção de umidade é desejável.

A frutose tem sido utilizada na formulação de geléias, tortas, bolos, refrescos em pó, gelatinas, sorvetes, iogurtes, balas e produtos de confeitaria. Também é empregada como adoçante, na forma pura e em mistura com outros, como por exemplo a sacarina, onde tem o poder de mascarar o sabor residual amargo da mesma. É utilizada também para disfarçar o sabor amargo do café de baixa qualidade e dos componentes do cacau no chocolate. Na indústria de sorvete é aplicada para evitar a textura granular causada pela cristalização da lactose.

Na dieta humana a frutose é encontrada na taxa média de 50 g/dia; não causa hiperglicemia, como ocorre com a sacarose, sendo por isso mais tolerada pelos diabéticos, pessoas idosas e pessoas que sofrem de alguma disfunção de metabolismo da glicose e necessitam de um controle rigoroso do nível de açúcar no sangue.

Fora do Brasil, o uso da frutose é mais difundido, principalmente devido ao seu alto poder adoçante. Nos Estados Unidos é consumida em grandes quantidades na forma de xarope de

alto teor de frutose, obtido pela isomerização enzimática da glicose, proveniente da hidrólise de amido de milho (BASTA, 1982).

O Brasil é um país privilegiado pela vasta produção de açúcar, sendo que, em algumas situações, o excesso de produção ou queda de exportação causam problemas no mercado. No entanto, a possibilidade de utilização de açúcar para a produção de frutose, através da hidrólise da sacarose, abre mercados potenciais:

- A nível de mercado interno, desenvolvendo os seguintes empregos:

- . confeitos de centro macio, doces e balas;
- . produtos de baixa caloria;
- . uso conjunto com adoçantes sintéticos;
- . produtos para diabéticos;
- . produtos de confeitaria com elevada umidade de massa.

- A nível de mercado externo, suprindo o mercado de frutose cristalina.

Os primeiros métodos de produção industrial de frutose basearam-se na hidrólise da inulina (polímero da frutose) e na precipitação da frutose constituinte da sacarose, em meio alcalino, na forma cálcica, o qual é posteriormente acidificado para liberar a frutose. Estes métodos não alcançaram sucesso comercial, por não serem economicamente competitivos com a sacarose (CASTELLANI, 1973).

Dos métodos de produção de xarope de glicose e frutose, e posterior separação da frutose, os que mais alcançaram sucesso comercial foram aqueles derivados da inversão da sacarose e da hidrólise do amido de milho, que devido ao alto rendimento, permitem a produção de frutose em larga escala.

A sacarose é o açúcar industrialmente mais importante, seguido pela D-glicose, D-frutose, lactose e maltose. Ela é obtida principalmente a partir da cana-de-açúcar e da beterraba açucareira. É um açúcar não redutor, constituído por uma unidade de D-glicose e outra de D-frutose (WHISTLER & ZYSK, 1978; MORRISON & BOYD, 1961).

Industrialmente a inversão pode ser realizada através de dois processos distintos: a inversão química, por ácidos minerais ou orgânicos e, a inversão biológica, por ação da enzima invertase. O estágio final destes processos é o desdobramento das moléculas de sacarose em dois monossacarídeos: glicose e frutose.

A inversão química, do ponto de vista industrial, é relativamente mais fácil, por não necessitar de pessoal qualificado para sua execução, porém o produto final apresenta qualidade inferior, quando comparado àquele obtido por meio biológico. O emprego de agentes corrosivos (ácidos ou bases) apresenta sérios inconvenientes, tanto para a segurança dos operários, como para a manutenção dos equipamentos. Há também o problema de neutralização final do produto. Normalmente, esta é feita adicionando-se cal ao xarope, o que acarreta a formação de incrustações nos equipamentos, além de provocar a perda de açúcares durante o armazenamento, devido à presença de sais solúveis de cálcio que formam complexo com a frutose.

O produto de açúcar invertido mais conhecido é o Golden Syrup, comercializado na Europa. Foi obtido originalmente pela hidrólise ácida da sacarose, empregando-se o ácido sulfúrico diluído. Consiste de uma mistura de 48 a 50% de açúcar invertido e 31 a 33% de sacarose.

A inversão biológica se processa com a enzima invertase na faixa de 50 a 55 °C, com pH 4,5 a 5,5; sendo que o tempo de

reação varia de acordo com a concentração de sacarose presente na mistura.

Durante a Segunda Guerra Mundial, quando se fez sentir a escassez de ácido sulfúrico, o Golden Syrup passou a ser produzido pelo processo enzimático, utilizando-se enzima invertase imobilizada, e este deve ter sido um dos primeiros processos de produção em larga escala, que empregou a tecnologia de imobilização de enzimas. A matéria-prima foi a sacarose de beterraba e o produto continha 42 a 49% de açúcar invertido e 32 a 38% de sacarose (BUCKE, 1981).

Em função disto, os países não produtores de cana-de-açúcar e beterraba procuraram uma matéria-prima da qual pudessem obter o xarope de glicose e frutose para separar a frutose. A opção utilizada foi o amido. Assim, nos Estados Unidos, em 1975, foi implantada a primeira indústria de produção de xarope a partir do amido de milho, utilizando a enzima glicose isomerase para isomerizar a glicose à frutose (CARASIK & CARROLL, 1983). Este processo é atualmente empregado nos Estados Unidos e Europa (BARKER, 1976).

Para os países que são produtores de açúcar de cana em larga escala como o Brasil, a alternativa mais viável de produção de xarope de glicose e frutose é a partir da inversão da sacarose. Para que esta alternativa torne-se economicamente viável, há necessidade de se conhecer a cinética da reação de hidrólise, para fins de projeto do reator industrial e determinação das condições ótimas de operação.

A cinética, de um modo geral, procura caracterizar e analisar os fatores que influenciam a velocidade de uma reação química.

A hidrólise enzimática da sacarose, como toda reação, tem sua velocidade influenciada por diversos fatores, tais como:

concentrações de substrato, produto e catalisador; temperatura; pH; entre outros. O conhecimento da cinética da reação química auxilia na determinação do tempo de residência no reator, simulação de processo em diversas condições de operação e fornece parâmetros para um melhor controle de processo, possibilitando a sua utilização técnica e econômica.

Considerando-se o mercado potencial de açúcar invertido, o incentivo financeiro fornecido pela frutose, uma vez que o rendimento desta é de aproximadamente 50% em peso e o diferencial de preço de 1 para 5, objetivou-se neste trabalho:

(i) desenvolver um modelo cinético a partir do modelo de BOWSKI et alii (1971), aplicável ao projeto de um reator batelada operando sob condições isotérmicas, utilizando os dados experimentais obtidos por BERGAMASCO (1989) para estimativa dos parâmetros cinéticos;

(ii) determinar através de simulação com o modelo cinético que melhor ajustar-se aos dados experimentais, a influência da concentração de substrato e da temperatura no desempenho da reação;

(iii) desenvolver, a partir do modelo cinético anterior, um modelo aplicável à operação de um reator batelada sob condições isotérmicas, considerando apenas uma fração da quantidade total de enzima presente inicialmente no reator, e o restante a ser adicionado linearmente com o tempo;

(iv) determinar, através de simulação com o modelo anterior, a influência da forma de adição de enzima ao meio reacional no desempenho da reação.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O enfoque da revisão bibliográfica será concentrado nos seguintes tópicos: (i) sacarose; (ii) enzimas; (iii) propriedades catalíticas da enzima invertase; (iv) cinética da enzima invertase em reator batelada.

2.1 - SACAROSE

A sacarose é o dissacarídeo mais importante, tanto pela quantidade e frequência com que é encontrada na natureza, como pela sua importância na alimentação humana. O conhecimento da existência deste açúcar data de milênios, havendo citações da sua fabricação na Índia, já ao redor de 300 a. C. (BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A., 1985). Apesar de sua fonte principal ser a cana-de-açúcar, a sacarose é encontrada em todas as plantas que realizam o processo da fotossíntese.

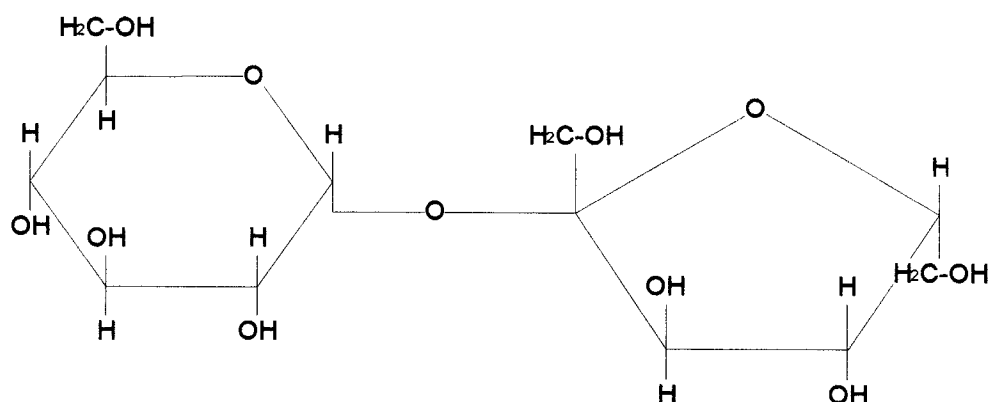
Sendo um dissacarídeo não redutor, a sacarose não reage com a solução de Fehling ou solução amoniacal de íons prata, nem sofre muta-rotação. É facilmente hidrolisada por soluções diluídas de ácidos minerais ou por enzimas (invertase), com formação de D-glicose e D-frutose.

A configuração dos carbonos anoméricos da molécula de sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) foi determinada enzimaticamente. Como a sacarose é hidrolisada pela enzima invertase que ataca as ligações β -frutofuranosídicas, conclui-se que a ligação glicosídica é a α -D-glicose- β -D-frutose, e que a frutose, na molécula de sacarose, está na forma de anel furanosídico, como mostrado na Figura 2.1.

2.2 - ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos formados por proteínas, que participam das reações metabólicas de todos os

organismos vivos. Atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação, sem no entanto alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação. Como a enzima não é consumida na reação, sua ação catalítica é semelhante à dos catalisadores inorgânicos. O que a distingue de um catalisador sintético (químico) é a sua capacidade de catalisar uma reação sob condições brandas, como em soluções aquosas à temperatura e pressão normais, com conseqüente diminuição de risco de desnaturação térmica dos compostos termolábeis, além da redução das necessidades energéticas e dos efeitos corrosivos (DIXON & WEBB, 1979; BAILEY & OLLIS, 1986).



α - D - GLUCOPIRANOSIL - β - D - FRUTOFURANOSÍDEO

FIGURA 2.1 - Representação Esquemática da Estrutura da Sacarose.

Com a compreensão da natureza das enzimas e do seu potencial catalítico, houve uma ampliação do campo de utilização industrial, tal como para produção de alimentos, cerveja, produtos têxteis e farmacêuticos, entre outros. Devido à sua natureza protéica e sua conformação tridimensional, as enzimas apresentam altíssima especificidade ao substrato, característica que elimina a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo, desta forma, os custos de

separação de produtos, bem como, os problemas de tratamento de efluentes (SEGEL, 1975; BAILEY & OLLIS, 1986). Na Tabela 2.1 comparam-se as enzimas com os catalisadores químicos, enquanto na Tabela 2.2 apresenta-se como exemplo, a energia de ativação e a velocidade de reação para a decomposição do peróxido de hidrogênio, com e sem catalisador.

TABELA 2.1 - Comparação entre Enzimas e Catalisadores Químicos (ZANIN, 1989).

CARACTERÍSTICA	ENZIMAS	CATALISADORES QUÍMICOS
1. Especificidade ao substrato	alta	baixa
2. Natureza da estrutura	complexa	simples
3. Sensibilidade à temperatura e pH	alta	baixa
4. Condições de reação (temperatura, pressão e pH)	brandas	drásticas (geralmente)
5. Custo de obtenção (isolamento e purificação)	alto	moderado
6. Natureza do processo	batelada	contínuo
7. Consumo de energia	baixo	alto
8. Formação de subprodutos	baixa	alta
9. Separação catalisador-produto	difícil/cara	simples
10. Atividade catalítica (temperatura ambiente)	alta	baixa
11. Presença de cofatores	sim	não
12. Estabilidade do preparado	baixa	alta
13. Energia de ativação	baixa	alta
14. Velocidade de reação	alta	baixa

Convencionalmente as reações enzimáticas são conduzidas em processos batelada, onde incuba-se a mistura do substrato com a enzima, e no final do processo esta é separada do produto por meio de desnaturação térmica ou variação drástica do pH, devido à inviabilidade econômica de se recuperar a enzima ativa para posterior reutilização (BAILEY & OLLIS, 1986).

TABELA 2.2 - Energia de Ativação e Velocidade de Reação Para a Decomposição de Peróxido de Hidrogênio Com e Sem Catalisador (HARTMEIER, 1988).

CATALISADOR	ENERGIA DE ATIVAÇÃO (kJ/mol)	VELOCIDADE RELATIVA DE REAÇÃO
Ausente	75,4	1
Platina (Químico)	50,2	$2 \cdot 10^4$
Catalase (Enzima)	8,4	$3 \cdot 10^{11}$

Para superar os problemas de baixa estabilidade, elevado custo de obtenção e dificuldade de separação do substrato e produto, tem-se estudado meios de tornar as enzimas insolúveis na solução de substrato. Esta operação de ligar química ou fisicamente as enzimas em suportes sólidos insolúveis no meio reacional, deu origem às enzimas imobilizadas. Desta forma, obtém-se catalisadores que, além de serem altamente específicos para um dado substrato, são mais estáveis e no final do processo são facilmente separáveis do produto, simplificando as etapas de purificação, com conseqüentes vantagens econômicas no processo.

2.2.1 - Invertase

Invertase ou Frutofuranosidase (E.C.3.2.126) é uma enzima que catalisa a hidrólise da sacarose, produzindo o que comumente se denomina açúcar invertido, que consiste numa mistura equimolar de glicose e frutose.

O termo inversão, aplicado à hidrólise da sacarose, foi derivado da observação da inversão de rotação ótica da solução durante a reação.

Essa enzima possui a capacidade de dividir a molécula de sacarose em glicose e frutose. O princípio ativo, causador da inversão, foi descoberto em 1833 por Berthelot (WISEMAN & WOODWARD, 1975).

A invertase apresenta-se em duas formas: a extracelular com cerca de 80% do total da invertase na célula, e a forma intracelular com os 20% restantes. A forma extracelular é uma glicoproteína com cerca de 50% de carboidratos, ao passo que a intracelular é destituída dos mesmos. As duas formas apresentam atividades específicas similares, mas sua composição de aminoácidos é diferente. A invertase extracelular contém cisteína, enquanto a intracelular não (GÁSCON et alii, 1967).

Na Tabela 2.3 apresentam-se algumas propriedades da invertase intracelular e extracelular.

TABELA 2.3 - Propriedades da Enzima Invertase Extracelular e Intracelular (GÁSCON et alii, 1967).

INVERTASE	Mol	CARBOIDRATO (%)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (Unidades/mg Proteína)	K _m (mM) Sacarose	ATIVIDADE ÓTIMA - pH	ESTABILIDADE - pH
Externa	270000	50	2700	26	3,5 - 5,5	3,0 - 7,5
Interna	135000	3	2900	25	3,5 - 5,5	6,0 - 9,0

A temperatura ótima de ação dessa enzima depende do grau de purificação da mesma e da concentração do substrato, tendo sido encontrados valores entre 23 °C e 55 °C (DRAETTA, 1971/72).

O mecanismo de ação da invertase não é conhecido, mas estudos com enzimas têm sugerido o envolvimento de um ânion

carboxilato e uma histidina residual na atividade catalítica (WOODWARD & WISEMAN, 1982).

Um mecanismo para formação do complexo ativo invertase-sacarose foi proposto por Laidler (citado por BOWSKI et alii, 1971), o qual é representado na Figura 2.2.

2.2.2 - Inversão da Sacarose

Industrialmente a inversão pode ser realizada através de dois métodos distintos: a inversão química por meio de ácidos minerais ou orgânicos, e a inversão biológica, por ação da enzima invertase.

Tanto por meio químico, como biológico, o estágio final é o desdobramento da molécula de sacarose em dois açúcares simples: glicose e frutose.

2.2.2.1 - Inversão Química

A inversão química, do ponto de vista industrial, é relativamente mais fácil, por não necessitar de pessoal qualificado para sua realização. Porém, o produto final tem qualidade inferior quando comparado àquele obtido por meio biológico.

O emprego de agentes corrosivos apresenta sérios inconvenientes, tanto para a segurança dos operadores, como para a conservação dos equipamentos. Há também o problema de neutralização final do produto. Normalmente esta é feita adicionando-se cal ao xarope, o que provoca incrustações nos equipamentos, além de ocasionar perda de açúcar durante o armazenamento, devido à presença de sais solúveis de cálcio.

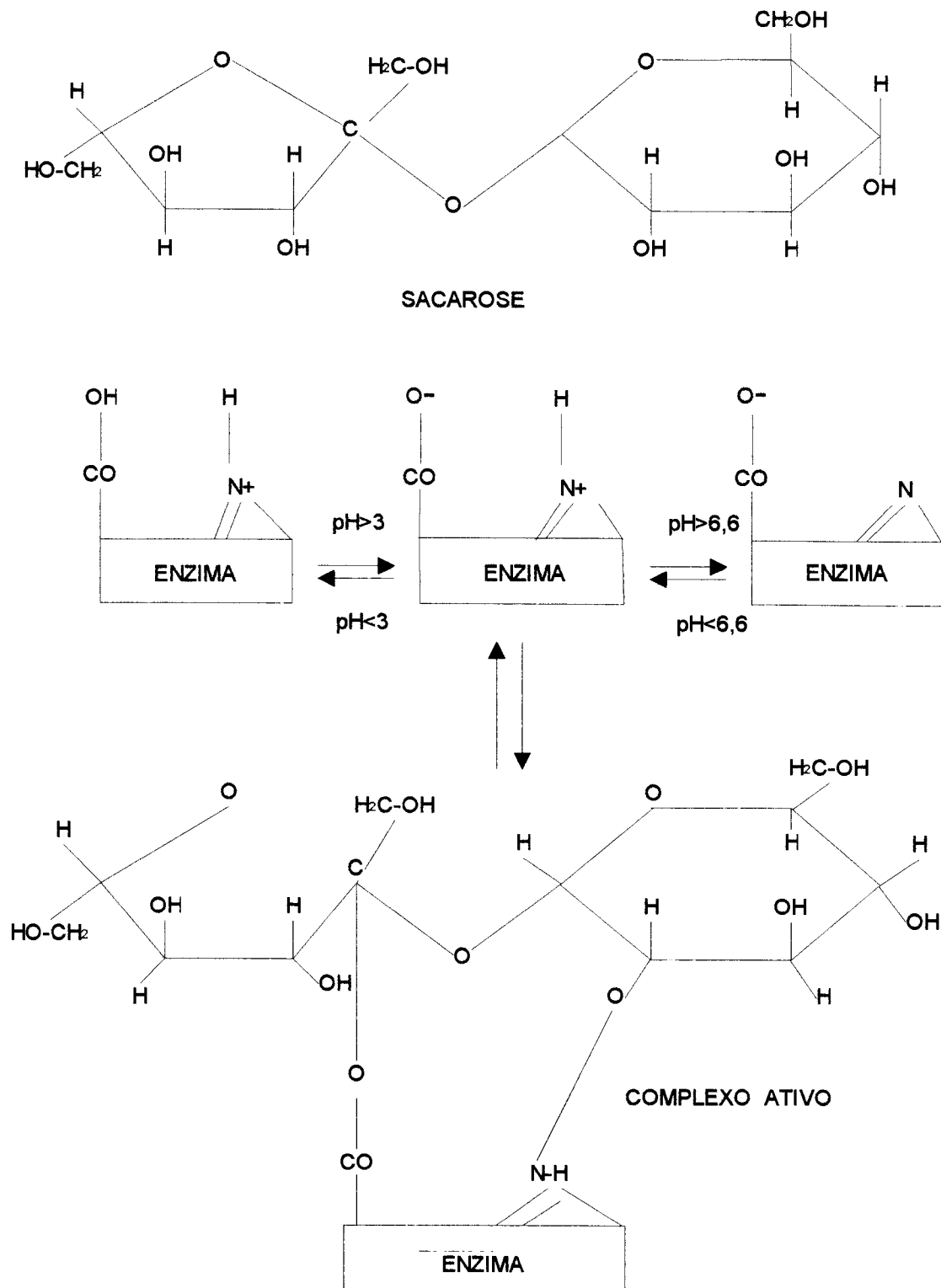


FIGURA 2.2 - Mecanismo Sugerido Para a Formação do Complexo Ativo Invertase-Sacarose (BOWSKI et alii, 1971).

Geralmente o ácido empregado é o sulfúrico, diluído na proporção de 1:5, e usado na quantidade de 1 litro para 1000 litros de xarope a 60 °Brix. Após a completa mistura, o xarope é submetido à agitação na temperatura de 85 °C durante 1 hora, sendo em seguida enviado aos cristalizadores, onde é agitado mais suavemente à temperatura de 75 °C, até se obter a inversão desejada, o que se consegue após 20 a 24 horas (CASTELLANI, 1973).

2.2.2.2 - Inversão Enzimática

Por via biológica consegue-se o desdobramento da sacarose por ação da invertase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, que segrega pouca quantidade de alcoolase, o que significa pouca perda de açúcares totais. Tais leveduras podem ser adquiridas em empresas especializadas ou então multiplicadas no próprio laboratório. A quantidade de levedura seca é de aproximadamente 200 g para 1000 litros de xarope a 55 °Brix, porém as quantidades podem variar de acordo com o teor de sacarose do xarope. O tempo de inversão de 1000 litros de xarope é cerca de 10 horas (CASTELLANI, 1973).

A temperatura do processo é de vital importância no controle da inversão da sacarose, e esta é feita com o objetivo de se obter um xarope concentrado, sem que a sacarose se cristalize no final.

2.2.2.3 - Aplicações do Açúcar Invertido

As indústrias de alimentos podem utilizar o açúcar invertido diretamente no processo. Os maiores consumidores são as fábricas de balas e caramelos, que atualmente consomem grandes quantidades de xaropes glicosados obtidos do milho, sendo que este é um produto mais caro, de processamento complexo e delicado.

O xarope glicosado pode ser aproveitado na preparação de compotas, marmelada e geléias. Serve para adoçar licores, aperitivos e refrigerantes. É empregado em confeitaria na fabricação de pães especiais e na preparação de recheios de biscoitos, além de outros tipos de massas de panificação. Quando submetida a 200 °C, com o carbonato de amônio, transforma-se em corante caramelo, utilizado em aperitivos, runs, cervejas, vinagres e até como aditivo na fabricação de fumos especiais (CASTELLANI, 1973).

2.3 - PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA ENZIMA INVERTASE

Como a principal característica das enzimas é catalisar as reações bioquímicas que ocorrem nos seres vivos, o estudo de sua função catalítica baseia-se na medida quantitativa da velocidade de reação em que participam. Devido à sua natureza protéica, são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima, entre outros fatores; portanto, o conhecimento da atuação destes parâmetros sobre a reação enzimática permite a melhor utilização das propriedades catalíticas da enzima.

2.3.1 - Influência do Tempo de Reação - Método das Velocidades Iniciais

A curva de progresso da maioria das reações enzimáticas é da forma apresentada na Figura 2.3, onde a velocidade da reação diminui com o tempo.

Os fatores que podem contribuir para esta redução são: (i) os produtos da reação inibem a enzima; (ii) o grau de saturação da enzima com o substrato pode diminuir, devido ao decréscimo da concentração de substrato à medida que a reação avança; (iii) as reações reversas podem se tornar mais importantes à medida que a concentração de produto aumenta; e, (iv) a enzima (ou coenzima) pode sofrer inativação térmica ou pelo pH. Estes

fatores podem agir isoladamente ou em conjunto, e portanto, a curva da reação enzimática não segue exatamente as equações das reações químicas homogêneas (DIXON & WEBB, 1979; HAWCROFT, 1987).

A atividade enzimática é determinada a partir da medida da velocidade inicial da reação, uma vez que no início da reação, os fatores acima mencionados não tiveram tempo de se manifestar e, conseqüentemente, neste ponto, as condições em que a reação se processa são exatamente conhecidas. Por exemplo, para se determinar o efeito da temperatura sobre a velocidade inicial da reação, basta manter constantes todas as outras propriedades (pH, concentração de substrato, etc) e variar somente esta.

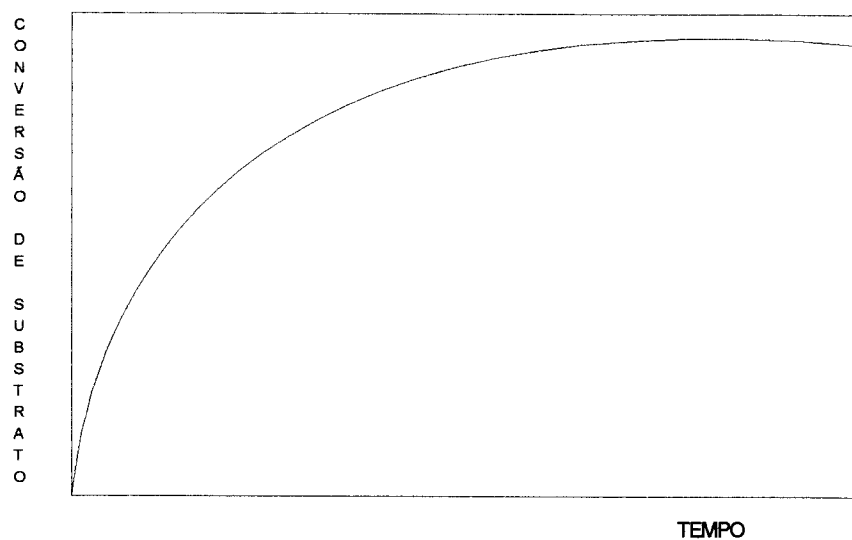


FIGURA 2.3 - Representação de Uma Curva Típica de Reação Enzimática.

A velocidade inicial é obtida a partir da primeira parte da curva de progresso da reação, sendo que esta é praticamente linear até aproximadamente 20% de conversão de substrato em produto (DIXON & WEBB, 1979).

A evolução da reação enzimática pode ser acompanhada de duas maneiras: (i) método de amostragem e, (ii) métodos

contínuos. No método de amostragem as análises são realizadas nas amostras retiradas em vários tempos, de modo que obtém-se na curva de progresso, uma série de pontos isolados. Neste método, geralmente determina-se a concentração de substrato ou a de produto formado. Por ser um método descontínuo, necessita-se no mínimo de 3 amostras, uma no tempo zero da reação, outra após um tempo pré-estabelecido e a terceira, aproximadamente, num tempo de duas vezes o da segunda amostra. Isto permite verificar a linearidade da curva no intervalo de tempo considerado. Por outro lado, no método contínuo, as observações são feitas durante a reação por meio de um grande número de leituras ou por meio de registradores automáticos, obtendo-se curvas contínuas (DIXON & WEBB, 1979).

2.3.2 - Influência da Concentração de Enzima

Na maioria dos casos, sob determinadas condições, a velocidade de transformação de substrato em produto é proporcional à quantidade de enzima presente. Desvios da linearidade podem ocorrer devido a: (i) presença de pequenas quantidades de substâncias tóxicas; (ii) presença de um ativador dissociável da enzima, e (iii) limitações impostas pelo método de análise. A fim de se evitar o efeito causado por estes fatores recomenda-se utilizar nos ensaios cinéticos, sempre que possível: (i) enzimas com alto grau de pureza; (ii) substratos puros; e (iii) método de análise confiável (DIXON & WEBB, 1979).

2.3.3 - Influência do pH

Geralmente as enzimas somente são ativas numa faixa restrita de pH e, na maioria dos casos, há um pH ótimo definido.

O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações do estado de ionização dos componentes do sistema, à medida que o

pH varia. Como as enzimas são proteínas que contêm muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização. Por isso, como a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH, parece que somente uma forma iônica do centro ativo da enzima é cataliticamente ativo (DIXON & WEBB, 1979).

Como a enzima é ativa somente num determinado estado de ionização, tem-se que a ionização de dois grupos próximos ao centro ativo determina a atividade, e estes são conhecidos como os grupos ácido e básico da enzima. Na Figura 2.4 mostra-se uma curva típica de atividade em função do pH e os efeitos sobre a carga dos grupos NH_2 e COOH , sendo que neste exemplo, o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas coincide com o pH ótimo.

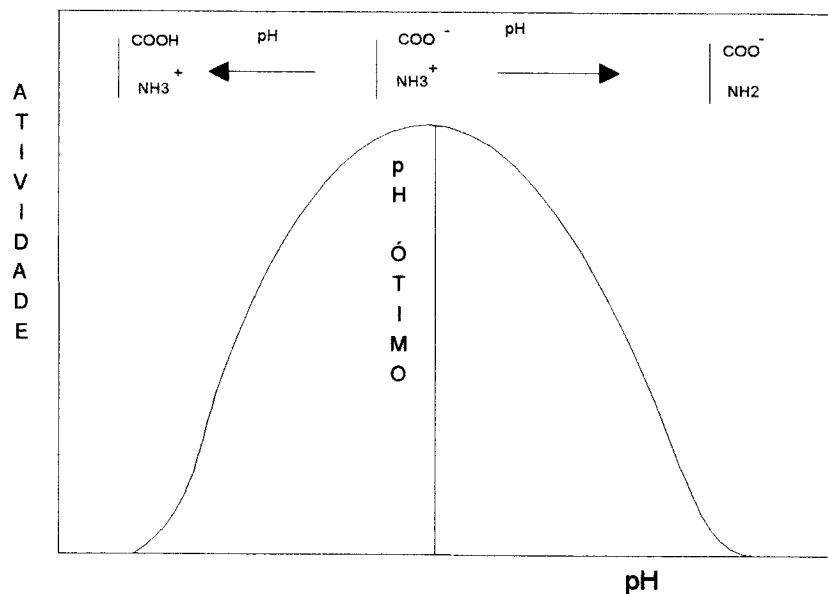


FIGURA 2.4 - Curva Típica de Atividade Enzimática em Função do pH, Grupos NH_2 e COOH (HARTMEIER, 1988).

Dados apresentados por BERGAMASCO (1989) mostram que a enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* tem um pH onde apresenta atividade máxima, compreendido na faixa de 3,5 - 7,0,

sendo que o valor mais comum situa-se entre pH 4,5 e 5,5; independente do substrato e do tipo de solução tampão utilizado.

2.3.4 - Influência da Temperatura

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais. Porém, à medida que se eleva a temperatura, dois efeitos ocorrem simultaneamente: (i) a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas; e (ii) a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica (MESSING, 1975; CHIBATA, 1978; DIXON & WEBB, 1979).

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima é, geralmente, representada em termos de atividade relativa ou velocidade de reação em função da temperatura (Figura 2.5).

Freqüentemente, neste tipo de representação, a atividade não é indicada em unidades internacionais, mas como atividade relativa, isto é, a razão entre a atividade real e a maior atividade medida. Conseqüentemente, a temperatura ótima tomada deste tipo de gráfico é erroneamente considerada constante para a enzima em questão, pois, a temperatura ótima depende da duração e das condições em que foi realizado o ensaio. Observa-se que, quanto menor o tempo de exposição maior é a temperatura ótima da enzima, portanto a curva de atividade-temperatura é o resultado líquido da elevação da temperatura (aceleração da reação) e o aumento da inativação (destruição da atividade).

A desnaturação da enzima pelo efeito da temperatura normalmente é obtida incubando-se a enzima em água, solução tampão ou presença de substrato por um certo período de tempo e, em seguida, determinando-se a atividade. Os gráficos são construídos relacionando-se a atividade relativa em função do tempo, como representado na Figura 2.6.

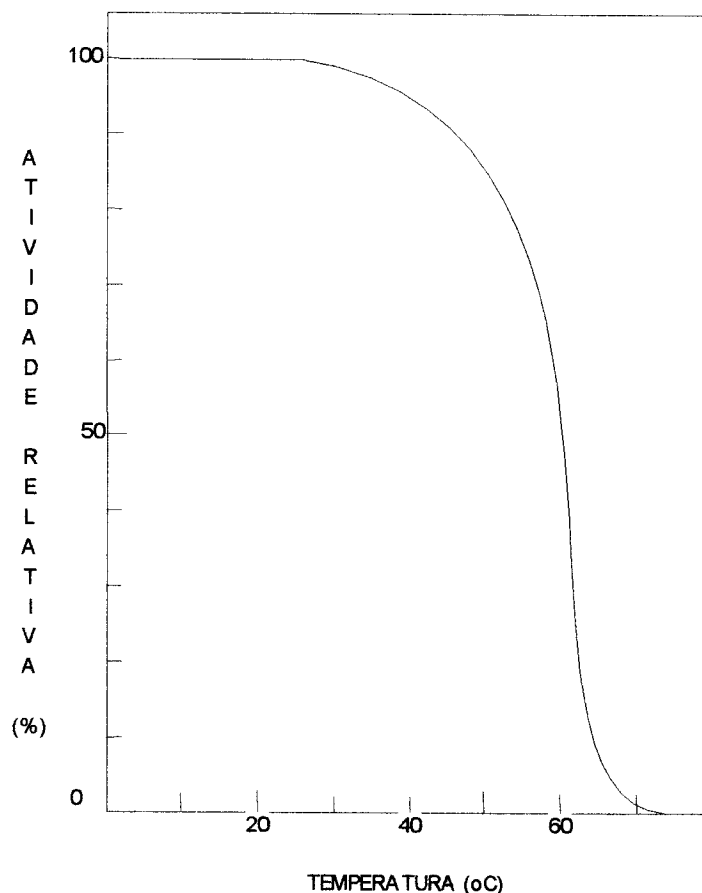


FIGURA 2.5 - Atividade Relativa em Função da Temperatura Para a Invertase (IMAI et alii, 1983).

Dados apresentados por BERGAMASCO (1989), mostram que a temperatura ótima da enzima invertase depende das condições usadas. A presença de substrato tem o efeito de aumentar a estabilidade térmica da enzima, pois acredita-se que este, ligando-se ao centro ativo ou parte dele, provoque uma mudança conformacional da estrutura enzimática, conferindo-lhe maior resistência à temperatura (WISEMAN & WOODWARD, 1975).

2.3.4.1 - Energia de Ativação da Reação de Hidrólise

Antes que uma molécula de reagente ou substrato venha a se tornar uma molécula de produto, ela deve possuir uma certa energia mínima, para passar por um estado de transição. A

quantidade de energia necessária para que isto ocorra é chamada energia de ativação.

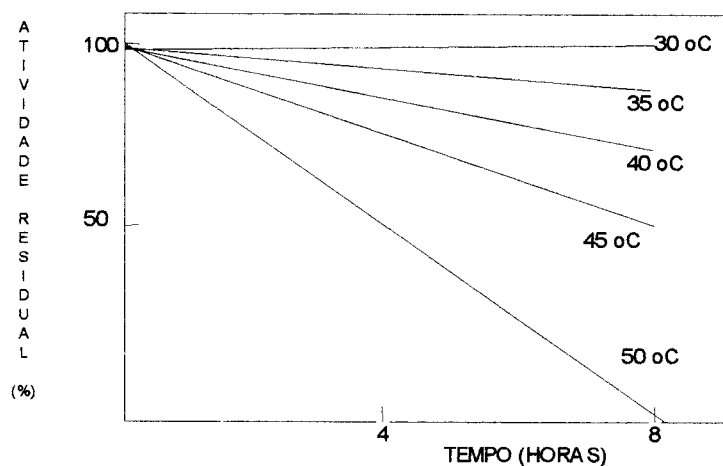


FIGURA 2.6 - Atividade Relativa em Função do Tempo - Enzima Invertase Adsorvida em Resina IRA 93, Tampão Fosfato (0,01 M), pH 4,0 (BOUNDRANT & CHEFTEL, 1975).

Há duas maneiras de aumentar a velocidade de uma reação: uma delas consiste em aumentar a temperatura, a outra em abaixar a energia de ativação. As células vivas existem a temperaturas relativamente baixas entre 0 e 100 °C. À temperatura da célula, poucas reações de metabolismo intermediário ocorreriam a uma velocidade suficiente para permitir o crescimento e manutenção da célula. As células vivas podem existir sob condições relativamente suaves porque elas possuem as enzimas, que abaixam seletivamente as energias de ativação das reações químicas vitais.

Os dados de atividade em função da temperatura, como mostra a Figura 2.5, são úteis para se estudar o efeito da temperatura sobre a reação enzimática. Estes podem ser analisados com auxílio da relação de Arrhenius, onde o logaritmo da atividade ou da velocidade da reação é plotado em função do inverso da temperatura absoluta (CHEETHAM, 1985; BAILEY & OLLIS, 1986; HARTMEIER, 1988):

$$V = A_r \cdot \exp(-E_a/R \cdot T) \quad (2.1)$$

onde:

A_r - Constante de Arrhenius;

E_a - Energia de ativação da reação;

R - Constante da lei dos gases (1,987 cal/gmol.K);

T - Temperatura absoluta (K);

V - Velocidade inicial da reação.

Em reações com alta energia de ativação, o acréscimo da temperatura aumenta a velocidade da reação mais do que nas reações com baixa energia de ativação. Normalmente as energias de ativação para as reações enzimáticas estão na faixa de 4 - 20 kcal/mol, de tal modo que a taxa de reação aumenta por um fator entre 1,2 e 2,9 a cada elevação de 10 °C (DIXON & WEBB, 1979; CHEETHAM, 1985; HARTMEIER, 1988).

2.3.4.2 - Energia de Desativação Térmica da Enzima

A energia de desativação (desnaturação da proteína) pode ser obtida por um raciocínio análogo ao da obtenção da energia de ativação, a partir dos dados de estabilidade térmica obtidos incubando-se a enzima por um certo período de tempo, em condições pré-determinadas, e dosando-se sua atividade após cada intervalo de incubação. Na maioria dos trabalhos realizados nesta área supõe-se que a velocidade de desnaturação é de primeira ordem em relação à concentração da enzima ativa e segue a lei de Arrhenius (MARC, 1985). A partir desta hipótese, a velocidade de desativação da invertase pode ser representada pela equação:

$$r_d = -K_d \cdot [E] \quad (2.2)$$

$$K_d = K_d^0 \cdot \exp(-E_d/R \cdot T) \quad (2.3)$$

onde:

- [E] - Concentração de enzima ativa;
 E_d - Energia de desativação térmica da enzima;
 K_d - Constante de desnaturação da enzima em uma determinada temperatura (h^{-1});
 K_d^0 - Fator exponencial (h^{-1});
 r_d - Velocidade de desnaturação térmica da enzima.

Fazendo-se um balanço material em relação à enzima, para um determinado reator, tem-se:

$$(d[E]/dt) = -K_d \cdot [E] \quad (2.4)$$

que integrando conduz a:

$$[E] = [E]_0 \cdot \exp(-K_d \cdot t) \quad (2.5)$$

onde:

- $[E]_0$ - Concentração inicial da enzima ativa;
 t - tempo de reação.

Considerando-se que as atividades enzimáticas iniciais são diretamente proporcionais à quantidade de enzima ativa (DIXON & WEBB, 1979), tem-se:

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{A_m}{A_m^0} \quad (2.6)$$

onde:

- A_{in} - Atividade enzimática residual observada no reator, após um certo período de incubação;

A_{in}° - Atividade enzimática inicial observada no reator, sem incubação da enzima.

A relação entre a atividade inicial e a residual num determinado tempo é, portanto, do tipo exponencial:

$$A_{in} = A_{in}^{\circ} \cdot \exp(-K_d \cdot t) \quad (2.7)$$

A partir das curvas de $\ln(A_{in}/A_{in}^{\circ})$ em função do tempo, pode-se obter o valor da constante de desnaturação (K_d) para uma determinada temperatura.

Outra característica importante da estabilidade da enzima, é o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), que representa o tempo necessário para que a atividade seja reduzida à metade do seu valor inicial num determinado conjunto de condições. Se a atividade decresce de acordo com a Equação (2.7), há uma relação inversamente proporcional entre o tempo de meia-vida e o coeficiente de inativação:

$$t_{1/2} = (\ln 0,5)/(-K_d) = 0,693/K_d \quad (2.8)$$

A energia de desativação da maioria das enzimas normalmente encontra-se entre 47 e 96 kcal/mol, sensivelmente maior do que a energia de ativação que geralmente é inferior a 25 kcal/mol. Esta diferença de grandeza entre a energia de ativação e desativação deve-se ao fato que as enzimas são muito mais ativas em baixas temperaturas e desnaturadas à temperaturas mais elevadas. No diagrama de Arrhenius isto é percebido pela diferença nos coeficientes angulares das curvas, onde, à baixa temperatura predomina o fenômeno da ativação e quanto menor a temperatura, menor é o efeito da inativação (Figura 2.7).

Na Tabela 2.4 são apresentados valores para a energia de ativação (E_a), energia de desativação (E_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a enzima invertase, onde se observa que a enzima apresenta uma alta estabilidade a baixas temperaturas.

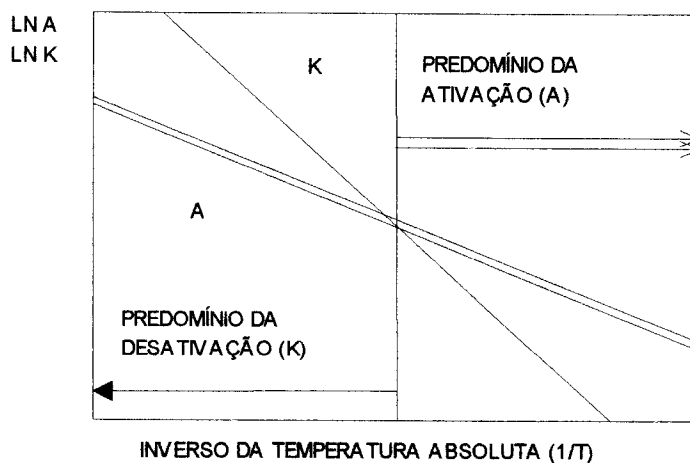


FIGURA 2.7 - Coeficiente de Ativação (A) e Desativação (K) em Função do Inverso da Temperatura Absoluta (HARTMEIER, 1988).

2.3.5 - Estabilidade Operacional

Para uso industrial um dos fatores preponderantes é a estabilidade operacional da enzima. Os fatores que estabilizam e inativam as enzimas não são bem conhecidos.

Na ausência de restrições difusionais a atividade decresce exponencialmente com o tempo, porém, quando as limitações por difusão estão presentes, a atividade decresce linearmente com o tempo (CHEETHAM, 1985), como se observa na Figura 2.8 - curvas 3 e 2, respectivamente.

De um modo geral, o processo de imobilização aumenta a estabilidade operacional da enzima em relação à enzima livre, (Figura 2.8 - curva 1). Isto pode ser um artifício provocado pelas limitações difusionais, que faz com que somente uma

fração da enzima imobilizada seja ativa no início do processo, permanecendo o restante como reserva que somente começará a atuar quando a atividade inicial estiver desnaturada.

TABELA 2.4 - Energia de Ativação (E_a), Energia de Desativação (E_d) e Tempo de Meia-Vida ($t_{1/2}$) Para a Enzima Invertase Comercial - NOVO.

ENERGIA DE ATIVAÇÃO (kcal/mol)	ENERGIA DE DESATIVAÇÃO (kcal/mol)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE MEIA-VIDA (dias)	REFERÊNCIA
7,32	-	-	-	DICKENSHEETS et alii (1977)
7,69	-	-	-	MANSFELD, SCHELLERBERGER (1987)
7,85	141,17	60	0,02	CABRAL (1989)
		54	1,1	
		50	15,5	
		45	475*	
		40	17410*	

(*) Estimado a partir dos dados de estabilidade térmica da enzima incubada em tampão pH 4,7; durante 80 min a 60 °C, 27 horas a 54 °C, e 240 horas a 50 °C.

2.4 - CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que lida com os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas, avaliada através do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada. A atividade da enzima e, portanto, a cinética enzimática, é determinada pela concentração da enzima, concentração de substrato e sua disponibilidade, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidores (quando

presentes), e ainda pH e temperatura. A influência da concentração de enzima, temperatura e pH foram abordados no item 2.3; neste item serão analisados, principalmente, os efeitos da concentração de substrato e produto na reação.

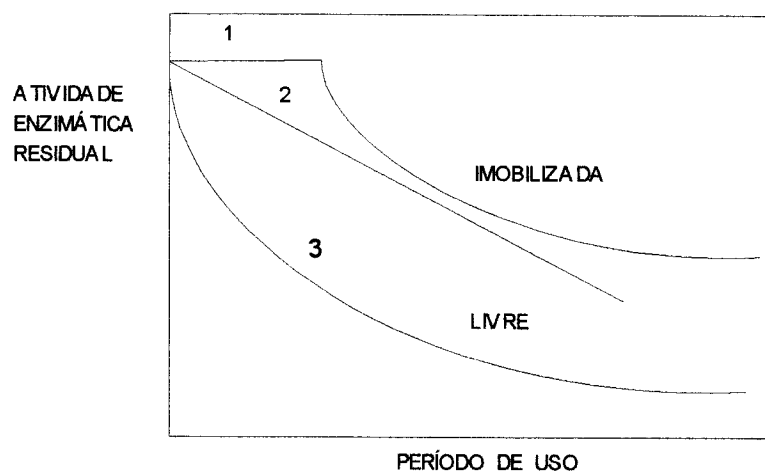


FIGURA 2.8 - Representação Esquemática da Estabilidade Operacional de uma Enzima Livre e Imobilizada (CHEETHAM, 1985).

Convencionalmente, em cinética enzimática, o conceito de velocidade de reação está associado à velocidade inicial, onde a influência de muitos fatores é desprezível.

2.4.1 - Hipótese do Equilíbrio Rápido

Durante o final do século XIX, muitos pesquisadores se dedicaram ao estudo das reações enzimáticas, e tentaram explicar o comportamento destas reações em termos dos princípios de equilíbrio das reações químicas. A primeira equação geral para reações enzimáticas foi formulada por Brown (1902) e Henri (1903), citados por SEGEL (1975), fundamentados na hipótese que a transformação enzimática de Substrato (S) em Produto (P), só é possível através de uma reação reversível que origina a formação de um Complexo Enzima (E) - Substrato (ES), que se decompõe formando os produtos da reação. As outras hipóteses formuladas foram:

(i) a reação de formação do complexo enzima - substrato é rápida;

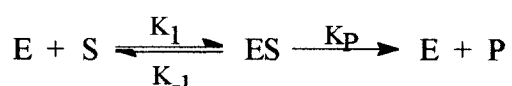
(ii) enzima, substrato e complexo enzima - substrato estão em equilíbrio, isto é, a velocidade de formação de ES e de sua decomposição em E + S é muito maior que a velocidade de quebra do complexo para formar E + P;

(iii) a concentração de substrato é muito maior que a de enzima, de modo que a formação do complexo ES não altera a concentração de substrato;

(iv) a velocidade global da reação é limitada pela decomposição do complexo ES, originando E + P;

(v) a velocidade é medida no início da reação, tal que a reação reversa seja desprezível.

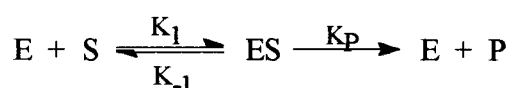
Estas hipóteses foram verificadas experimentalmente por Michaelis e Menten, e a reação pode ser representada por:



A hipótese de equilíbrio rápido ou de Michaelis-Menten estabelece que a reação entre a enzima e o substrato estão em equilíbrio.

A equação da velocidade da reação (V) pela hipótese do equilíbrio rápido é obtida a partir do seguinte procedimento:

1. Escrever as reações que envolvem a conversão global de S em P:



2. Escrever a equação do balanço de massa para a enzima:

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (2.9)$$

onde: $[E]_t = \text{Enzima Total}$

3. Escrever a equação de velocidade global:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = V = K_p \cdot [ES] \quad (2.10)$$

4. Dividir o lado esquerdo da equação (2.10) por $[E]_t$ e o lado direito por $([E] + [ES])$:

$$\frac{V}{[E]_t} = \frac{K_p \cdot [ES]}{([E] + [ES])} \quad (2.11)$$

5. Como a constante de equilíbrio (K_{eq}) é igual a

$$K_{eq} = \frac{K_{-1}}{K_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} \quad (2.12)$$

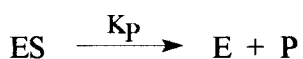
$$\text{substituir } [ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_{eq}} \quad (2.13)$$

na Equação (2.11):

$$\frac{V}{[E]_t} = \frac{K_p \cdot [E] \cdot [S] / K_{eq}}{[E] \cdot (1 + [S] / K_{eq})} \quad (2.14)$$

$$\text{Cancelando-se } [E] \text{ e chamando } V_{max} = K_p \cdot [E]_t \quad (2.15)$$

de velocidade de formação do produto a partir da equação:



obtem-se:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_{eq} + [S]} \quad (2.16)$$

A Equação (2.16) é a expressão cinética (equação de velocidade) para a conversão de S em P e só é válida quando K_p é muito menor que K_{-1} , pois quando estas constantes são da mesma ordem de grandeza, a concentração do complexo ES não é fixada apenas pelas concentrações de S, E e pela constante de equilíbrio K_{eq} . Quando isso ocorrer, a equação de velocidade deve ser obtida a partir da hipótese do estado estacionário.

As principais razões para o uso extensivo do tratamento do equilíbrio rápido são: (i) este tipo de análise permite encontrar a equação de velocidade na ausência de um conhecimento prévio da ordem de grandeza relativa das constantes de reação, uma vez que as equações da velocidade são obtidas após a análise das constantes de equilíbrio entre as várias espécies envolvidas na reação. Se os dados experimentais puderem ser ajustados pela equação encontrada, tem-se um mecanismo cinético simples para o sistema; caso contrário, deve-se procurar modelos mais complexos; e (ii) em muitos casos o tratamento do equilíbrio rápido e do estado estacionário conduzem a uma equação final da velocidade da mesma forma, porém as constantes não são as mesmas.

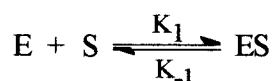
2.4.2 - Hipótese do Estado Estacionário

Em 1925, Briggs e Haldane (citados por SEGEL, 1975) deduziram uma equação de velocidade que não necessitava da restrição de equilíbrio rápido requerido pelo método de Henri, Michaelis e Menten. Esses pesquisadores assumiram que após um curto período de tempo do início da reação (da ordem de microsegundos, desprezível para a maioria dos efeitos práticos), atinge-se um estado estacionário, onde a variação da

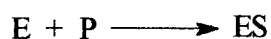
concentração do complexo ES com o tempo é desprezível quando comparada com a concentração de S e P, isto é, a velocidade de formação de ES é igual à sua velocidade de decomposição. O nível de estado estacionário é igual ao nível de estado de equilíbrio se K_p é muito pequeno em relação a K_{-1} . Por outro lado, se K_p é comparável a K_{-1} ou maior, o nível de estado estacionário deve ser bem menor que o nível de equilíbrio, isto é, a decomposição de ES em E + P é tão rápida que nunca se atingiria um nível em que E e S estariam em equilíbrio.

A equação da velocidade por este procedimento é obtida da seguinte forma:

1. ES é formado a partir de:

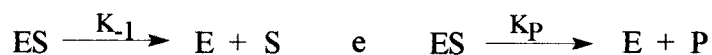


sendo que a reação reversa:



é desprezada porque no início a concentração do produto é pequena

2. ES decompõe-se por dois processos:



3. Velocidade de formação de ES:

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (2.17)$$

4. Velocidade de decomposição de ES:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = (K_{-1} + K_p) \cdot [ES] \quad (2.18)$$

5. No estado estacionário $\left(\frac{d[ES]}{dt}\right) = \left(-\frac{d[ES]}{dt}\right) = 0$ (2.19)

portanto, $K_1 \cdot [E] \cdot [S] = (K_{-1} + K_p) \cdot [ES]$ (2.20)

e $[ES] = \left[\frac{K_1 \cdot [S]}{(K_{-1} + K_p)} \right] \cdot [E]$ (2.21)

6. Substituindo-se as Equações (2.9) e (2.10) em (2.21), tem-se que:

$$\frac{V}{[E]_i} = \frac{K_p \cdot [ES]}{([E] + [ES])} \quad (2.22)$$

7. Substituindo-se os valores de [ES] (etapa 5), V_{\max} . (Equação 2.15) e rearranjando, obtém-se:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{(K_m + [S])} \quad (2.23)$$

onde $K_m = \frac{(K_{-1} + K_p)}{K_1}$ (2.24)

K_m = constante de Michaelis-Menten, que expressa a relação entre as concentrações no estado estacionário.

A Equação (2.23) é idêntica à obtida por Henri, Michaelis e Menten (Equação 2.16), mas as constantes têm significado diferente, uma vez que as suposições restritas feitas por estes pesquisadores são um caso especial do tratamento do estado estacionário. Quando $K_p \ll K_{-1}$, $K_m \cong K_{-1}/K_1 = K_{eq}$, de modo que K_m é

a constante de dissociação do complexo ES. Por outro lado se $K_{-1} \ll K_p$, $K_m \cong K_p/K_1 =$ constante cinética.

A equação da velocidade pode ser escrita como:

$$(V_{\max} - V) \cdot (K_m + [S]) = K_m \cdot V_{\max} \quad (2.25)$$

que é uma seção retangular de uma hipérbole com limites V_{\max} e $(-K_m)$. Portanto, a representação gráfica da equação da velocidade é uma curva do tipo mostrado na Figura 2.9, onde se representa a velocidade inicial (V) em função da concentração de substrato ([S]).

2.4.3 - Modelo Generalizado Para Reações Com Um Substrato

A maioria das reações enzimáticas de interesse comercial envolvem um único substrato, que é degradado em produtos mais simples (hidrólise), ou alterado na sua configuração química (isomerização). Uma situação freqüente é a inibição (reversível) pelos produtos da reação ou pela alta concentração de substrato, cujo efeito é reduzir a velocidade da reação catalisada.

Qualquer substância que reduza a velocidade de uma reação enzimática pode ser considerada como um inibidor. Estudos de inibição, freqüentemente indicam algo com relação à especificidade de uma enzima, a arquitetura química e física do sítio ativo e o mecanismo cinético da reação.

Os principais tipos de inibição são (SEGEL, 1975; DIXON & WEBB, 1979):

2.4.3.1 - Inibição Competitiva

O inibidor (I) se liga com a enzima de forma mutuamente exclusiva ao substrato, formando o complexo (EI). Este tipo de inibidor compete com o substrato pelo mesmo sítio catalítico e, neste caso, há alteração da afinidade da enzima pelo substrato (K_m), porém a reatividade do complexo ativo (ES) permanece inalterada (V_{max}).

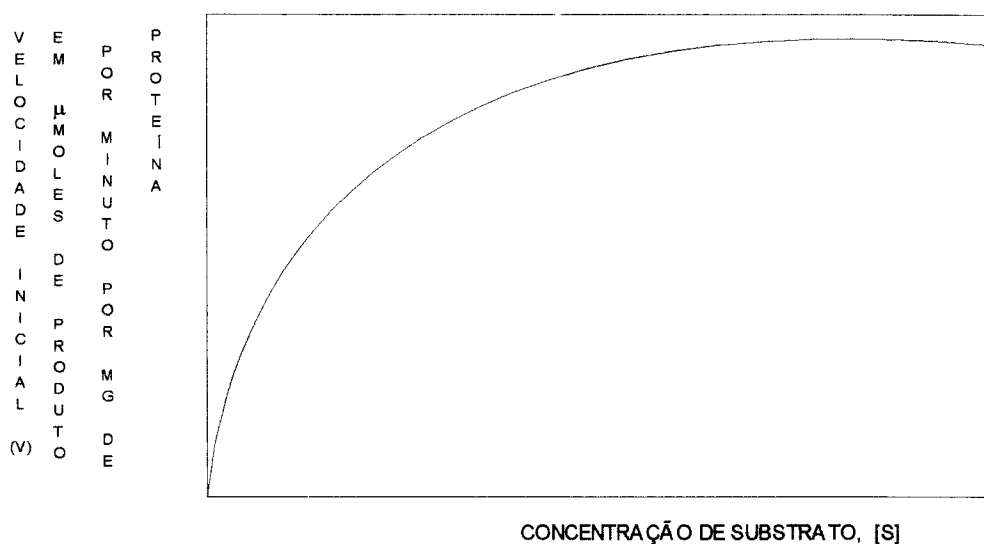
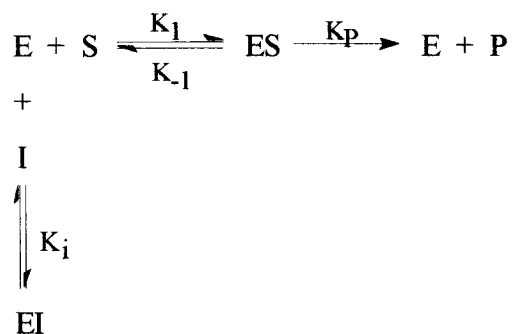


FIGURA 2.9 - Velocidade Inicial em Função da Concentração de Substrato (SEGEL, 1975).

A reação enzimática na presença de inibidor competitivo é representada por:



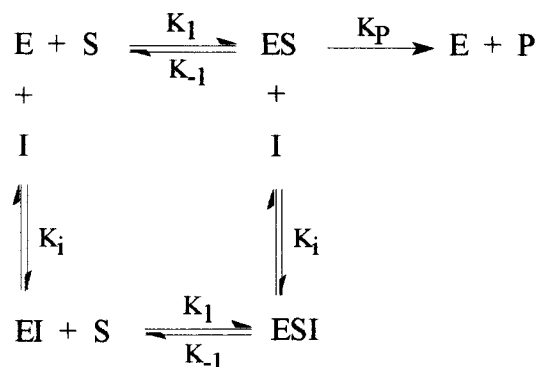
A expressão cinética a partir da hipótese do equilíbrio rápido ou do estado estacionário, é dada por:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[K_m \cdot (1 + [I]/K_i) + [S]]} \quad (2.26)$$

2.4.3.2 - Inibição Não Competitiva

Um inibidor não competitivo clássico não tem efeito na ligação do substrato e vice-versa. (S) e (I) se ligam reversível, aleatória e independentemente, em sítios diferentes. Esta inibição é caracterizada pela existência de um complexo inativo (ESI), formado pela ligação de (I) com (ES) ou pela ligação de (S) com (EI), onde o complexo (EI) tem a mesma afinidade que (E) pelo substrato (K_m), porém a reatividade é alterada (V_{\max}).

A reação enzimática na presença de um inibidor não competitivo é representada por:



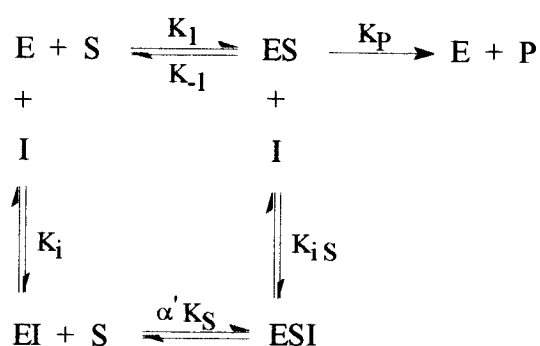
Sua expressão cinética, seguindo raciocínio análogo ao anterior, é dada por:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m \cdot [1 + ([I]/K_i)] + [S] \cdot [1 + ([I]/K_i)]} \quad (2.27)$$

2.4.3.3 - Inibição do Tipo Mista

É a mais freqüente na prática, sendo que um caso particular deste tipo é a inibição incompetitiva, caracterizada pela ausência na molécula enzimática de um sítio para se ligar ao inibidor (I), o qual só é formado depois que a enzima se uniu ao substrato (ES). Portanto, o inibidor só pode formar complexos terciários EIS ou ESI inativos. O sistema pode ser considerado como uma mistura de inibição competitiva parcial e inibição não competitiva pura, quando α' (fator que multiplica K_s quando o inibidor se liga à enzima) é maior que 1 (SEGEL, 1975).

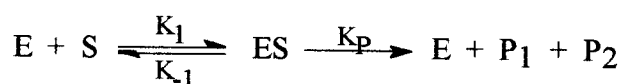
O equilíbrio é mostrado por:



A expressão cinética que representa o fenômeno, obtida por raciocínio análogo aos anteriores, é dado por:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m \cdot [1 + ([I]/K_i)] + [S] \cdot [1 + ([I]/K_{is})]} \quad (2.28)$$

Na maioria das reações enzimáticas a formação de não mais que dois produtos é típica. Frequentemente a transformação de substrato pode ser formalmente tratada como uma reação em duas etapas, com uma constante catalítica (K_p) (SIIMER, 1978).



ZANIN (1989) e BERGAMASCO (1989) descrevem o caso em que a reação anterior é inibida pelo substrato (S) e produto (P_1 e P_2), obtendo uma expressão geral de velocidade para esta situação, além dos valores dos parâmetros cinéticos, obtidos a partir deste esquema de reação generalizado, para diferentes tipos de modelos cinéticos. A partir daí, é possível obter-se as equações para os modelos cinéticos de reações irreversíveis que envolvem um único substrato.

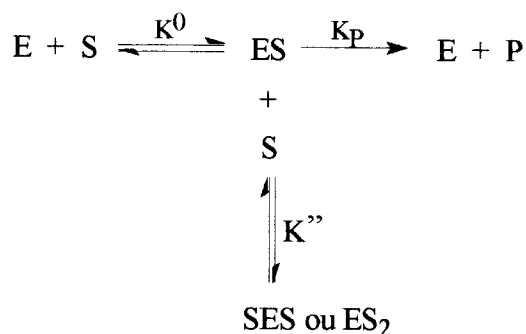
2.4.4 - Efeito da Concentração de Substrato

A equação de Michaelis-Menten (Equação 2.23) normalmente é obedecida a baixas concentrações de substrato, porém é bastante freqüente encontrar-se situações em que, à medida que se aumenta a concentração de substrato, a velocidade inicial da reação diminui.

Os estudos sobre especificidade das enzimas sugerem que a maioria das enzimas possuem diversos grupos, sendo que cada um combina-se com uma determinada parte da molécula de substrato. Na formação do complexo ativo enzima - substrato (ES), uma molécula de substrato combina-se com todos os grupos. Também é possível imaginar-se a formação de um complexo inativo, no qual alguns dos grupos ligantes combinam-se com uma molécula de substrato. Na presença de altas concentrações de substrato, onde estas moléculas comprimem a enzima, as chances de formação do complexo inativo, com duas ou mais moléculas de substrato combinando-se com um sítio ativo, aumentam.

Este sistema foi analisado por Haldane (citado por DIXON & WEBB, 1979) pela hipótese do equilíbrio rápido; porém, o tratamento pelo método do estado estacionário também se aplica, conduzindo a uma equação idêntica.

Esta possibilidade pode ser representada pelo seguinte esquema de reação:



Partindo da expressão generalizada apresentada por ZANIN (1989) e BERGAMASCO (1989) obtém-se a seguinte equação de velocidade inicial para reações enzimáticas em presença de alta concentração de substrato:

$$V = \frac{K_p \cdot [E]_t \cdot [S]}{[S] \cdot (1 + [S]/K'') + K^0} \quad (2.29)$$

Na equação anterior, definindo:

$$K'' = K_i - \text{ constante de inibição pelo substrato} \quad (2.30)$$

$$K^0 = K_m - \text{ constante de Michaelis-Menten} \quad (2.31)$$

e utilizando $V_{\text{máx}}$ definido pela Equação (2.15) tem-se:

$$V = \frac{V_{\text{máx}}}{1 + (K_m/[S]) + ([S]/K_i)} \quad (2.32)$$

2.4.5 - Efeito da Concentração de Produto

De maneira análoga ao substrato, também o produto formado pode alterar a velocidade de reação, quando presente em concentrações relativamente elevadas.

Partindo-se novamente da expressão generalizada citada no item anterior, obtém-se a seguinte equação de velocidade inicial:

$$V = \frac{K_p \cdot [E]_t \cdot [S]}{[S] + K^0 + K^0 \cdot ([P]/K_i)} \quad (2.33)$$

Na equação anterior, fazendo:

$$K_i = K_p \quad - \text{constante de inibição pelo produto} \quad (2.34)$$

$$[P] = [I] \quad - \text{concentração do produto inibidor} \quad (2.35)$$

e definindo K^0 e $V_{\text{máx}}$ respectivamente pelas Equações (2.31) e (2.15) tem-se:

$$V = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]}{[S] + K_m \cdot [1 + ([I]/K_p)]} \quad (2.36)$$

2.4.6 - Determinação Experimental dos Parâmetros Cinéticos

Para que as expressões cinéticas desenvolvidas nas seções anteriores possam ser utilizadas em projetos de reatores enzimáticos, é necessário avaliar-se os parâmetros cinéticos (K_m , K'_t , K'_p , $V_{\text{máx}}$). A forma usual de obtê-los é a partir de medidas de velocidade inicial da reação, em diferentes concentrações das substâncias que afetam a velocidade da reação (substrato, produto, etc.).

A equação de Michaelis-Menten (Equação 2.23) pode ser representada graficamente de diversos modos, a fim de se determinar $V_{\text{máx}}$ e K_m a partir de um conjunto de medidas de velocidade e concentrações de substrato (Figura 2.10). Estes métodos são discutidos a seguir, de forma resumida (DIXON & WEBB, 1979):

a) Gráfico de V em função de [S]

$$\text{Substituindo-se } V = V_{\max}/2 \quad (2.37)$$

a Equação (2.23) transforma-se em:

$$[S] = K_m \quad (2.38)$$

sendo que K_m pode ser determinado a partir do ponto intermediário da curva experimental.

b) Gráfico de V em função de $pS = -\log[S]$ (2.39)

que corresponde à forma logarítmica da equação de Michaelis - Menten:

$$pS = pK_m + \log[(V_{\max} - V)/V] \quad (2.40)$$

Neste caso a forma da curva não depende do valor de K_m . Substituindo-se V como definido na Equação (2.37) na Equação (2.40), no ponto intermediário da curva tem-se o valor de pK_m .

c) Método de Lineweaver-Burk - Gráfico dos inversos ($1/V$ em função de $1/[S]$)

Neste caso, toma-se o inverso da Equação (2.23), e tem-se uma reta:

$$1/V = 1/V_{\max} + (K_m/V_{\max}) \cdot (1/[S]) \quad (2.41)$$

d) Gráfico de Hanes

Também obtém-se uma reta ($[S]/V$ em função de $[S]$)

$$[S]/V = K_m/V_{\max} + (1/V_{\max}) \cdot [S] \quad (2.42)$$

e) Gráfico de Woolf - Hofstee

Obtém-se uma reta, plotando V em função de $V/[S]$

$$V = V_{\max} - K_m \cdot (V/[S]) \quad (2.43)$$

Uma comparação entre os métodos de Lineweaver-Burk, Hanes e Wolf-Hofstee, conduziu ao seguinte: o método de Lineweaver-Burk foi o menos seguro dos três, não prevendo estimativas precisas, mesmo quando o erro experimental era pequeno. A escolha entre os métodos de Hanes e Wolf-Hofstee depende, até certo ponto, da confiabilidade da medida de V . Embora o método de Wolf-Hofstee seja ligeiramente superior, é o mais sensível aos desvios da linearidade. Naturalmente, nenhum destes métodos fornece resultados tão precisos quanto àqueles obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais, através de métodos estatísticos, como o método dos mínimos quadrados (DIXON & WEBB, 1979).

Além dos cinco métodos apresentados, ainda há o de Dixon, que normalmente é utilizado para a determinação da constante de inibição pelo produto (K'_p) (DIXON & WEBB, 1979) - Figura 2.10 - f.

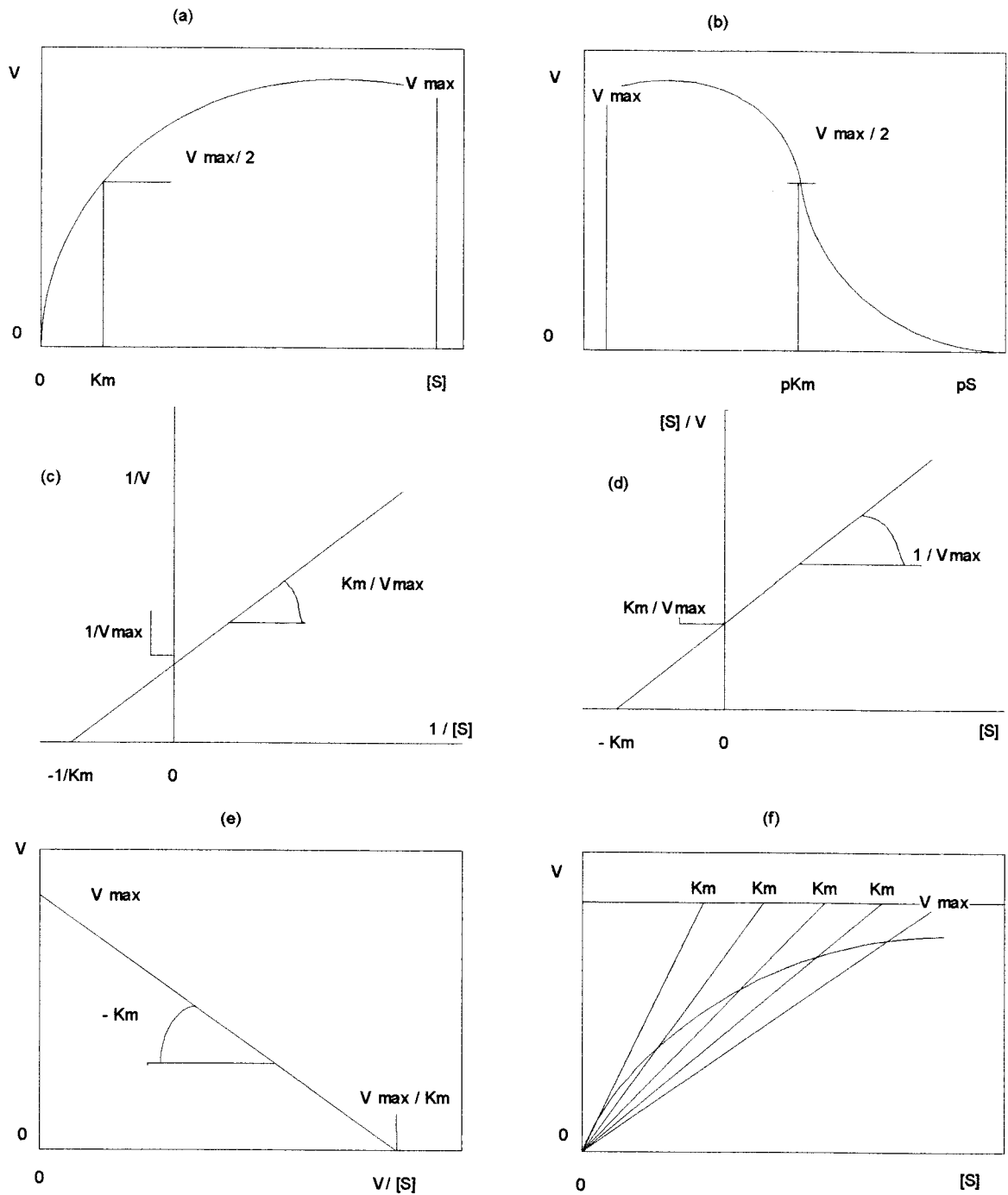


FIGURA 2.10 - Representação dos Métodos de Cálculo de K_m e V_{max} (DIXON & WEBB, 1979).

Os métodos anteriores são bastante apropriados para a determinação das constantes cinéticas (K_m e V_{max}) quando a equação de Michaelis-Menten é obedecida. Porém, nos casos mais complexos onde há, por exemplo, inibição pelo substrato, a obtenção deste parâmetros é mais complexa. A curva de

velocidade em função da concentração de substrato tem a forma característica apresentada na Figura 2.11, onde a velocidade inicial diminui à medida que a concentração de substrato aumenta. Para o cálculo das constantes K_m , K'_t , e V_{max} pode-se utilizar um gráfico de $(1/V)$ em função de $[S]$ onde obtém - se: (i) uma porção linear, que representa a região na qual $K_m/[S]$ é desprezível, e, (ii) uma parte que se alinha ao longo do eixo vertical, que corresponde à região em que o termo $[S]/K'_t$ é desprezível (Figura 2.11).

Um rearranjo adequado da Equação (2.32), como o feito por Haldane (citado por VAN DER HEUVEL & BEEFTINK, 1988), permite o cálculo mais preciso das constantes cinéticas a partir do ajuste de uma parábola, como mostrado na Equação (2.44)

$$\left(\frac{[S]}{V}\right) = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) \cdot [S] + \left[\frac{1}{(K'_t \cdot V_{max})}\right] \cdot [S]^2 \quad (2.44)$$

2.5 - CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA SACAROSE PELA ENZIMA INVERTASE

Vários modelos cinéticos foram propostos para descrever a hidrólise da sacarose na presença da invertase. Todos os modelos são derivados do modelo de Michaelis-Menten, sendo então modificados pela incorporação dos efeitos individuais, tais como: concentração da água, viscosidade do meio ou inibição pelo substrato.

Ingerssol (1926) citado por SILVER & KAREL (1981), mostrou que, quando a concentração da sacarose aumentava, a de água diminuía, mas não conseguiu determinar se este era o fator responsável pela redução da velocidade da reação.

NELSON & SCHUBERT (1928) afirmaram, com base nos estudos de Ingerssol (1926), que o decréscimo da concentração de água era o fator predominante na velocidade da reação.

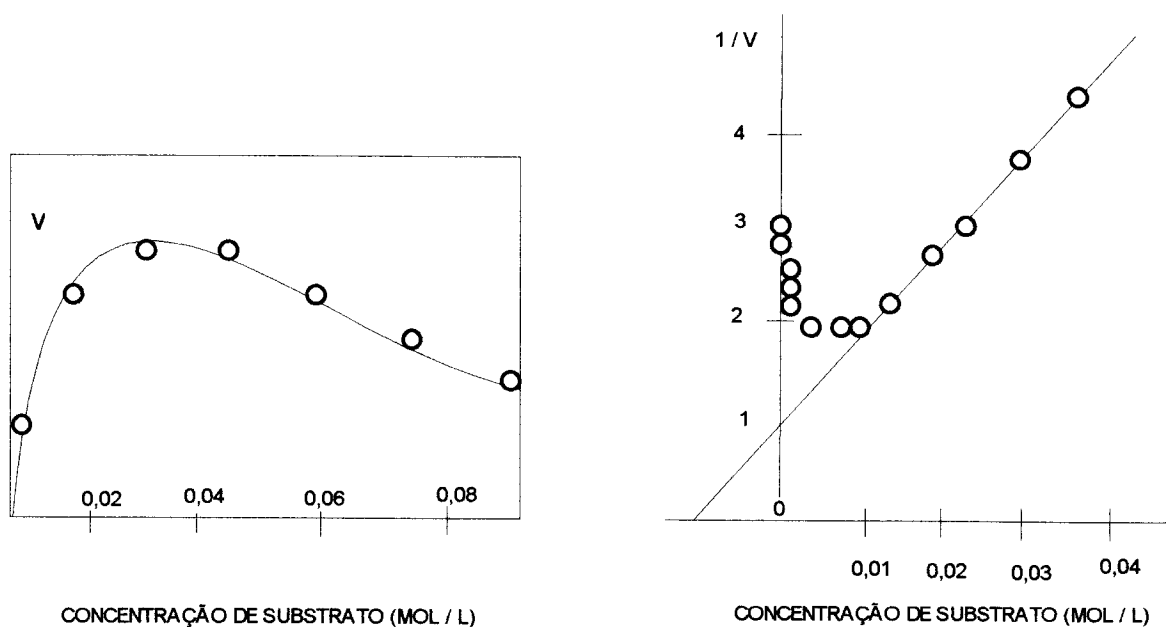


FIGURA 2.11 - Cinética de Inibição pelo Substrato Segundo Haldane (BAILEY & OLLIS, 1986).

Achalme & Bresson (1911); Colin & Chaudin (1922/23) citados por SILVER & KAREL (1981), propuseram que a velocidade da reação poderia ser proporcional à fluidez.

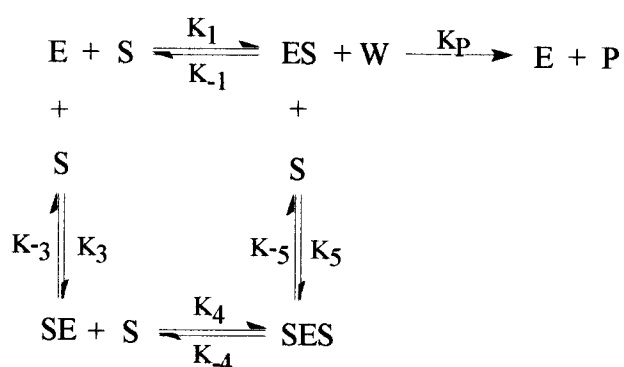
Mc LAREN (1963) e RUCHTI & Mc LAREN (1964), reexaminaram estes modelos e concluíram que a concentração da água e a viscosidade não explicavam, adequadamente, a cinética da invertase em altas concentrações de sacarose. Portanto, propuseram que o fator limitante era a inibição pelo substrato.

Em 1966, Romney citado por SILVER & KAREL (1981), afastou a hipótese da inibição pelo substrato, favorecendo a teoria de que o fator limitante da reação era a dificuldade de difusão intramolecular, devido a um invólucro de difícil acesso ao substrato.

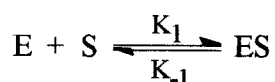
BOWSKI et alii (1971) partindo do modelo básico de Michaelis-Menten e testando, alternativamente, várias hipóteses, que incluíram, por exemplo: o efeito da viscosidade,

o efeito de redução da concentração da água no meio reacional e o efeito da inibição pelo substrato, concluíram que a velocidade da hidrólise só pode ser bem representada quando se leva em conta, no modelo de Michaelis-Menten: (i) inibição pelo substrato, (ii) redução da concentração da água e (iii) agregação de moléculas de substrato.

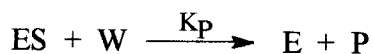
O modelo cinético sugerido por BOWSKI et alii (1971) pode ser representado por:



Utilizando o método do equilíbrio rápido, tem-se:



$$K_s = \frac{K_1}{K_{-1}} = \frac{[ES]}{[E] \cdot [S]} \quad (2.45)$$



$$K_i = \frac{K_3}{K_{-3}} = \frac{[SE]}{[E] \cdot [S]} \quad (2.46)$$



$$K'_i = \frac{K_5}{K_{-5}} = \frac{[SES]}{[ES] \cdot [S]} \quad (2.47)$$



$$K'' = \frac{K_4}{K_{-4}} = \frac{[SES]}{[SE] \cdot [S]} \quad (2.48)$$

$$\frac{d[P]/dt}{[E]_t} = \frac{K_p \cdot [ES] \cdot [W]}{[E] + [ES] + [SE] + [SES]} \quad (2.49)$$

$$\frac{d[P]/dt}{[E]_t} = \frac{K_p \cdot K_s \cdot [E] \cdot [S] \cdot [W]}{[E] + K_s \cdot [E] \cdot [S] + K'_i \cdot [E] \cdot [S] + K_s \cdot K'_i \cdot [E] \cdot [S]^2} \quad (2.50)$$

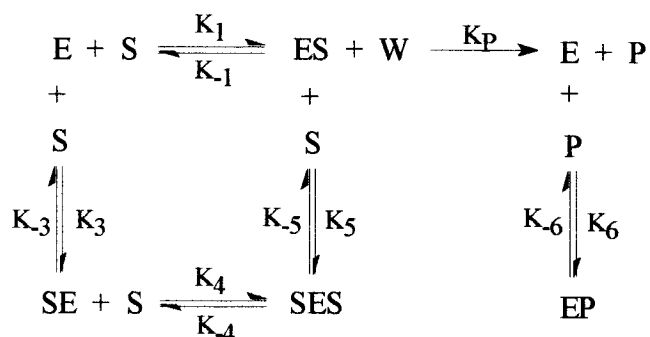
$$V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{K_p \cdot K_s \cdot [E] \cdot [S] \cdot [W]}{1 + K_s \cdot [S] + K'_i \cdot [S] + K_s \cdot K'_i \cdot [S]^2} \quad (2.51)$$

onde:

- K_s = constante de dissociação de ES;
- K_p = constante de velocidade de dissociação de ES;
- K_t = constante de formação de SE;
- K'_t = constante de formação de SES;
- $[S]$ = concentração de substrato (mol/L);
- $[W]$ = concentração total de água (mol/L);
- $[E]$ = concentração de enzima (mol/L);
- V = velocidade da reação (mol/L.min).

CUNHA E VITOLLO (1984) verificaram que: (i) o decréscimo da atividade específica da invertase em soluções de sacarose (0,255 M a 1 M) pode ser devido ao decréscimo de moléculas de água livre e/ou a um aumento da viscosidade na solução de sacarose e (ii) a água livre não é o fator limitante para a reação de hidrólise, com concentrações de sacarose na faixa de 30 - 50 % (p/v).

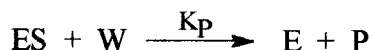
BERGAMASCO (1989) partindo do modelo de BOWSKI et alii (1971), incluiu um termo relativo à desativação térmica da enzima, além de um outro termo relativo à inibição pelos produtos da reação (glicose e frutose), obtendo as seguintes expressões:



Utilizando-se o método de equilíbrio rápido, tem-se:



$$K_s = \frac{K_1}{K_{-1}} = \frac{[ES]}{[E] \cdot [S]} \quad (2.45)$$



$$K_t = \frac{K_3}{K_{-3}} = \frac{[SE]}{[E] \cdot [S]} \quad (2.46)$$



$$K_i = \frac{K_5}{K_{-5}} = \frac{[SES]}{[ES] \cdot [S]} \quad (2.47)$$



$$K'' = \frac{K_4}{K_{-4}} = \frac{[SES]}{[SE] \cdot [S]} \quad (2.48)$$



$$K_p = \frac{K_6}{K_{-6}} = \frac{[EP]}{[E] \cdot [P]} \quad (2.53)$$

$$\frac{d[P]/dt}{[E]_t} = \frac{K_p \cdot [ES] \cdot [W]}{[E] + [ES] + [SE] + [SES] + [EP]} \quad (2.54)$$

$$\frac{d[P]/dt}{[E]_t} = \frac{K_s \cdot K_p \cdot [E] \cdot [S] \cdot [W]}{[E] + K_s \cdot [E] \cdot [S] + K_t \cdot [E] \cdot [S] + K_s \cdot K_i \cdot [E] \cdot [S]^2 + K_p \cdot [E] \cdot [P]} \quad (2.55)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{K_s \cdot K_p \cdot [E] \cdot [S] \cdot [W]}{1 + K_s \cdot [S] + K_t \cdot [S] + K_s \cdot K_i \cdot [S]^2 + K_p \cdot [P]} \quad (2.56)$$

onde:

$$[P] = [S]_0 - [S] \quad (2.57)$$

uma vez que se admite que o meio reacional tem densidade constante, e que cada molécula de substrato convertida produz uma molécula de produto. Observe-se que na hidrólise da sacarose formam-se duas moléculas, uma de glicose e outra de frutose, porém, freqüentemente, a concentração dos produtos é medida conjuntamente. Daí:

$$[P] = (\text{massa de glicose} + \text{frutose em g/L})/360.$$

Sejam:

$$a = K_p \cdot K_s \quad (2.58)$$

$$b = K_s + K_t \quad (2.59)$$

$$c = K_s \cdot K_i \quad (2.60)$$

$$d = K_p \quad (2.61)$$

logo:

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{a \cdot [E] \cdot [S] \cdot [W]}{1 + (b-d) \cdot [S] + c \cdot [S]^2 + d \cdot [S]_0} \quad (2.62)$$

onde [E] é definida pela Equação (2.5).

III - METODOLOGIA DE MODELAGEM, RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - MODELAGEM DA CINÉTICA EM REATOR BATELADA

Nesta seção serão apresentadas as deduções das equações de conversão de substrato em função do tempo obtidas a partir do modelo de BOWSKI et alii (1971), incorporando-se também as hipóteses de desativação térmica da enzima e o efeito da inibição pelos produtos, sendo que em cada caso serão abordadas as hipóteses de concentração da água considerada como um fator constante num caso e no outro variável, no meio reacional.

3.1.1 - Modelo de Bowski

A equação básica deste modelo pode ser representada por:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{K_p \cdot [E] \cdot K_s \cdot [S] \cdot [W]}{1 + (K_s + K_i) \cdot [S] + K_s \cdot K_i \cdot [S]^2} \quad (3.1)$$

obtida a partir de um rearranjo da Equação (2.51).

$$\text{Fazendo:} \quad a = K_p \cdot K_s \quad (2.58)$$

$$b = K_s + K_i \quad (2.59)$$

$$c = K_s \cdot K_i \quad (2.60)$$

na Equação (3.1) tem-se:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{a \cdot E \cdot [W] \cdot [S]}{1 + b \cdot [S] + c \cdot [S]^2} = - \frac{d[S]}{dt} \quad (3.2)$$

3.1.1.1 - Concentração de Água Constante

Considerando $[E]$ e $[W] = [W]_0$ constantes, e fazendo

$$p = a \cdot [E] \cdot [W] \quad (3.3)$$

Na Equação (3.2) tem-se:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{p \cdot [S]}{1 + b \cdot [S] + c \cdot [S]^2} \quad (3.4)$$

$$\text{Integrando e fazendo } [S] = [S]_0 \cdot (1 - X_A) \quad (3.5)$$

obtém-se a equação representativa deste modelo:

$$t = \alpha_1 \cdot X_A - \beta_1 \cdot \ln(1 - X_A) - \gamma_1 \cdot X_A^2 \quad (3.6)$$

$$\text{onde: } \alpha_1 = \frac{b \cdot [S]_0 + c \cdot [S]_0^2}{p} \quad (3.7)$$

$$\beta_1 = \frac{1}{p} \quad (3.8)$$

$$\gamma_1 = \frac{c \cdot [S]_0^2}{2p} \quad (3.9)$$

3.1.1.2 - Concentração de Água Variável

Representando a hidrólise da sacarose pela equação abaixo:



e efetuando um balanço de massa, tem-se:

$$[W] = A + B \cdot [S] \quad (3.10)$$

onde: $A = [W]_0 - B \cdot [S]_0$ (3.11)

$B = 1$ em unidades molares ou $B = \frac{18}{342}$ em unidades de massa (3.12)

Considerando $[E]$ constante e $[W]$ definido pela Equação (3.10), na Equação (3.2) tem-se:

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{a \cdot [E] \cdot [S] \cdot (A + B \cdot [S])}{1 + b \cdot [S] + c \cdot [S]^2} \quad (3.13)$$

Integrando e substituindo $[S]$ pela Equação (3.5), obtém-se a equação representativa do modelo com concentração de água variável:

$$t = \alpha_2 \cdot X_A - \beta_2 \cdot \ln(1 - X_A) + \gamma_2 \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_A)}{A + B \cdot [S]_0} \right] \quad (3.14)$$

onde: $\alpha_2 = \frac{c \cdot [S]_0}{a \cdot B \cdot [E]}$ (3.15)

$$\beta_2 = \frac{1}{a \cdot A \cdot [E]} \quad (3.16)$$

$$\gamma_2 = \frac{c \cdot A^2 + B^2 - b \cdot A \cdot B}{a \cdot [E] \cdot A \cdot B^2} \quad (3.17)$$

3.1.2 - Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima

Partindo da Equação (3.2) e considerando a desativação térmica representada pela Equação (2.5) tem-se:

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{a \cdot [E]_0 \cdot [W] \cdot [S] \cdot \exp(-K_d \cdot t)}{1 + b \cdot [S] + c \cdot [S]^2} \quad (3.18)$$

3.1.2.1 - Concentração de Água Constante

Considerando $[W] = [W]_0$ constante na Equação (3.18), integrando e substituindo $[S]$ como definido na Equação (3.5), tem-se:

$$t = -\frac{1}{K_d} \cdot \ln \left\{ -K_d \cdot \left[\alpha_3 \cdot X_A - \beta_3 \cdot \ln(1 - X_A) - \gamma_3 \cdot X_A^2 \right] + 1 \right\} \quad (3.19)$$

$$\text{onde: } \alpha_3 = \frac{b \cdot [S]_0 + c \cdot [S]_0^2}{a \cdot [E]_0 \cdot [W]} \quad (3.20)$$

$$\beta_3 = \frac{1}{a \cdot [E]_0 \cdot [W]} \quad (3.21)$$

$$\gamma_3 = \frac{c \cdot [S]_0^2}{2 \cdot a \cdot [E]_0 \cdot [W]} \quad (3.22)$$

3.1.2.2 - Concentração de Água Variável

Considerando $[W]$ definido pela Equação (3.10), integrando a Equação (3.18) e substituindo $[S]$ como definido na Equação (3.5), tem-se:

$$t = -\frac{1}{K_d} \cdot \ln \left\{ -K_d \cdot \left[\alpha_4 \cdot X_A - \beta_4 \cdot \ln(1 - X_A) + \gamma_4 \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_A)}{A + B \cdot [S]_0} \right] \right] + 1 \right\} \quad (3.23)$$

$$\text{onde: } \alpha_4 = \frac{c \cdot [S]_0}{a \cdot B \cdot [E]_0} \quad (3.24)$$

$$\beta_4 = \frac{1}{a \cdot A \cdot [E]_0} \quad (3.25)$$

$$\gamma_4 = -\frac{1}{a \cdot [E]_0} \left(\frac{A \cdot B \cdot b - B^2 - c \cdot A^2}{A \cdot B^2} \right) \quad (3.26)$$

3.1.3 - Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima e Inibição pelos Produtos da Reação

Como visto no final da Seção 2.5, a equação básica deste modelo pode ser representada por:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{a \cdot [E] \cdot [W] \cdot [S]}{1 + (b-d) \cdot [S] + c \cdot [S]^2 + d \cdot [S]_0} \quad (2.62)$$

Considerando [E] definido pela Equação (2.5), tem-se:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{a \cdot [E]_0 \cdot [W] \cdot [S] \cdot \exp(-K_d \cdot t)}{1 + (b-d) \cdot [S] + c \cdot [S]^2 + d \cdot [S]_0} \quad (3.27)$$

3.1.3.1 - Concentração de Água Constante

Considerando $[W] = [W]_0$ constante na Equação (3.27), integrando e substituindo [S] como definido na Equação (3.5), tem-se:

$$t = -\frac{1}{K_d} \cdot \ln \left\{ -K_d \cdot \left[\alpha_5 \cdot X_A - \beta_5 \cdot \ln(1 - X_A) - \gamma_5 \cdot X_A^2 \right] + 1 \right\} \quad (3.28)$$

$$\text{onde: } \alpha_5 = \frac{(b-d) \cdot [S]_0 + c \cdot [S]_0^2}{a \cdot [E]_0 \cdot [W]} \quad (3.29)$$

$$\beta_5 = \frac{1+d \cdot [S]_0}{a \cdot [E]_0 \cdot [W]} \quad (3.30)$$

$$\gamma_5 = \frac{c \cdot [S]_0^2}{2 \cdot a \cdot [E]_0 \cdot [W]} \quad (3.31)$$

3.1.3.2 - Concentração de Água Variável

Considerando [W] definido pela Equação (3.10), integrando a Equação (3.27) e substituindo [S] como definido na Equação (3.5), tem-se:

$$t = -\frac{1}{K_d} \cdot \ln \left\{ -K_d \cdot \left[\alpha_6 \cdot X_A - \beta_6 \cdot \ln(1 - X_A) + \gamma_6 \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_A)}{A + B \cdot [S]_0} \right] \right] + 1 \right\} \quad (3.32)$$

onde: $\alpha_6 = \frac{c \cdot [S]_0}{a \cdot [E]_0 \cdot B}$ (3.33)

$$\beta_6 = \frac{1+d \cdot [S]_0}{a \cdot [E]_0 \cdot A} \quad (3.34)$$

$$\gamma_6 = -\frac{1}{[E]_0} \cdot \left[\frac{(b-d)}{a \cdot B} - \frac{c \cdot A}{a \cdot B^2} - \frac{1+d \cdot [S]_0}{a \cdot A} \right] \quad (3.35)$$

3.2 - OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Na Equação (3.2), fazendo $y = [E] \cdot [W] \cdot [S] \cdot \frac{1}{V}$ (3.36)

e rearranjando, tem-se:

$$y = \frac{1}{a} + \frac{b}{a} \cdot [S] + \frac{c}{a} \cdot [S]^2 \quad (3.37)$$

que representa uma função polinomial de 2º grau na variável [S].

A partir de dados de velocidade inicial obtidos em BERGAMASCO (1989), que são apresentados na Tabela 7.1.1 do Anexo I, efetuou-se o ajuste da Equação (3.37) pelo método dos polinômios ortogonais (programa FITPOR, Anexo II).

Na Tabela 3.1 e na Figura 3.1 são apresentados os dados utilizados para o ajuste:

TABELA 3.1 - Obtenção dos Parâmetros Cinéticos -
[E] = 0,00099 g/L; pH = 5,0; 55 °C.

[S] (mol/L)	[W] ₀ (mol/L)	V (mol/L.h)	y
0,01461	55,3950	0,001281	0,6255
0,02921	55,2192	0,002565	0,6225
0,04382	55,0433	0,003727	0,6407
0,1461	53,8126	0,005830	1,3351
0,2629	52,4061	0,006120	2,2287
0,2921	52,0544	0,006515	2,3105
0,3506	51,3511	0,006669	2,6726
0,5259	49,2413	0,006513	3,9363
0,5843	48,5380	0,006131	4,5795
0,8764	45,0217	0,005758	6,7840
1,1686	41,5053	0,004729	10,1540
1,7528	34,4725	0,003433	17,4247
2,3371	27,4397	0,002401	26,4423

A função obtida pode ser expressa por:

$$y = 0,5182 + 5,2576 \cdot [S] + 2,4973 \cdot [S]^2, \quad R^2 = 0,9998, \quad \sigma = 0,1116 \quad (3.38)$$

Assim, os valores dos parâmetros cinéticos obtidos a partir da Equação (3.38), foram:

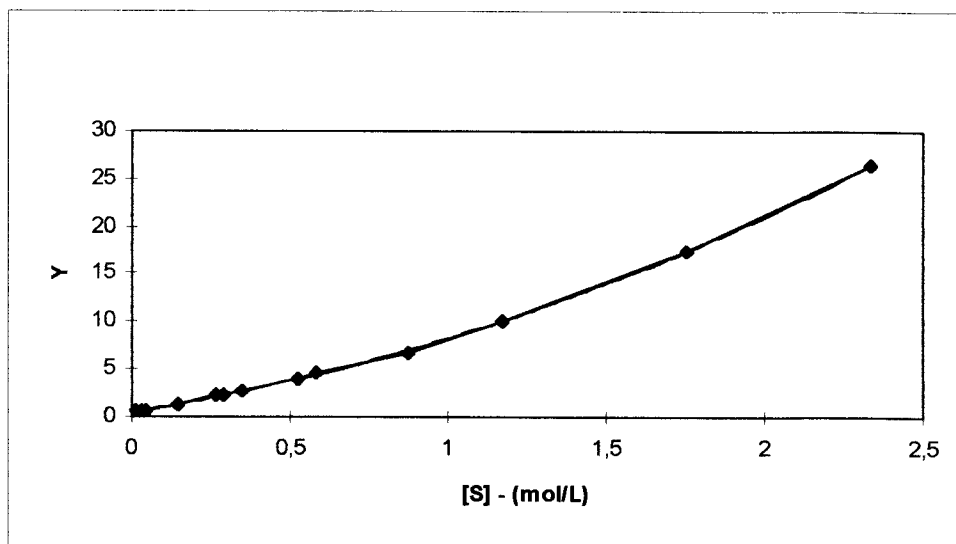


FIGURA 3.1 - Obtenção dos Parâmetros Cinéticos -
 $[E] = 0,00099 \text{ g/L}$; $\text{pH} = 5,0$; $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$a = 1,9297 \text{ L}^2/\text{g}\cdot\text{mol}\cdot\text{h}$$

$$b = 10,1456 \text{ L/mol}$$

$$c = 4,8190 \text{ L}^2/\text{mol}^2$$

3.3 - CÁLCULO DO PARÂMETRO DE INIBIÇÃO

O valor do parâmetro de inibição pelos produtos da reação (glicose e frutose) foi obtido a partir da equação representativa dos modelos (Equações 3.28 e 3.32) e de dados de conversão em função do tempo obtidos por BERGAMASCO (1989), apresentados na Tabela 7.6.1 do Anexo VI, aplicando-se o método dos mínimos quadrados.

3.3.1 - Concentração de Água Constante

Rearranjando a Equação (3.28), obtém-se:

$$\frac{\exp(-K_d \cdot t) - 1}{K_d} = -\alpha_5 \cdot X_A + \beta_5 \cdot \ln(1 - X_A) + \gamma_5 \cdot X_A^2 \quad (3.39)$$

onde α_5 e β_5 são funções lineares do parâmetro d , conforme representado nas Equações (3.29) e (3.30) e serão expressos por $\alpha_5(d)$ e $\beta_5(d)$.

$$\text{Seja: } F = \sum_i \left[\left(\frac{\exp(-K_d \cdot t_i) - 1}{K_d} \right) + \alpha_5(d) \cdot X_{Ai} - \beta_5(d) \cdot \ln(1 - X_{Ai}) - \gamma_5 \cdot X_{Ai}^2 \right]^2 \quad (3.40)$$

Aplicando o princípio do método dos mínimos quadrados $\left(\frac{\partial F}{\partial d} = 0 \right)$, tem-se:

$$\sum_i \left[\frac{\exp(-K_d \cdot t_i) - 1}{K_d} \right] \cdot f_i + \alpha_5(d) \cdot \sum_i (X_{Ai} \cdot f_i) - \beta_5(d) \cdot \sum_i \{ \ln(1 - X_{Ai}) \cdot f_i \} - \gamma_5 \cdot \sum_i (X_{Ai}^2 \cdot f_i) = 0 \quad (3.41)$$

$$\text{onde: } f_i = -\frac{[S]_0}{a \cdot [W] \cdot [E]_0} \cdot X_{Ai} - \frac{[S]_0}{a \cdot [W] \cdot [E]_0} \cdot \ln(1 - X_{Ai}) \quad (3.42)$$

Rearranjando as Equações (3.29) e (3.30) tem-se:

$$\alpha_5(d) = a_1 - b_1 \cdot d \quad (3.43)$$

$$\beta_5(d) = a_2 + b_2 \cdot d \quad (3.44)$$

$$\text{onde: } a_1 = \frac{b \cdot [S]_0 + c \cdot [S]_0^2}{a \cdot [W] \cdot [E]_0} \quad (3.45)$$

$$a_2 = \frac{1}{a \cdot [W] \cdot [E]_0} \quad (3.46)$$

$$b_1 = b_2 = \frac{[S]_0}{a \cdot [W] \cdot [E]_0} \quad (3.47)$$

Substituindo as Equações (3.43) e (3.44) em (3.41) e isolando d, tem-se:

$$d = \frac{a_1 \cdot H - a_2 \cdot J + E - K}{b_1 \cdot H + b_2 \cdot J} \quad (3.48)$$

$$\text{onde: } E = \sum_i \left[\frac{\exp(-K_d \cdot t_i) - 1}{K_d} \right] \cdot f_i \quad (3.49)$$

$$H = \sum_i (X_{Ai} \cdot f_i) \quad (3.50)$$

$$J = \sum_i [\ln(1 - X_{Ai}) \cdot f_i] \quad (3.51)$$

$$K = \gamma_s \cdot \sum_i (X_{Ai}^2 \cdot f_i) \quad (3.52)$$

A partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 7.6.1 do Anexo VI, obtidos para $[S]_0 = 2,4832 \text{ mol/L}$, $[W] = 25,6815 \text{ mol/L}$, $[E]_0 = 0,1698 \text{ mg/mL}$, $K_d = 0,0468$, $\text{pH} = 5,0$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, e utilizando o programa DCTE apresentado no Anexo III, obtém-se:

$$d = 7,5844 \text{ L/mol}$$

3.3.2 - Concentração de Água Variável

Rearranjando a Equação (3.32), obtém-se:

$$\frac{\exp(-K_d \cdot t) - 1}{K_d} = -\alpha_6 \cdot X_A + \beta_6 \cdot \ln(1 - X_A) - \gamma_6 \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_A)}{A + B \cdot [S]_0} \right] \quad (3.53)$$

onde β_6 e γ_6 são funções lineares do parâmetro d , conforme representado nas Equações (3.34) e (3.35) e serão expressos por $\beta_6(d)$ e $\gamma_6(d)$.

Seja:

$$G = \sum_i \left\{ \left[\frac{\exp(-K_d \cdot t_i) - 1}{K_d} \right] + \alpha_6 \cdot X_{Ai} - \beta_6(d) \cdot \ln(1 - X_{Ai}) + \gamma_6(d) \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_{Ai})}{A + B \cdot [S]_0} \right] \right\}^2 \quad (3.54)$$

Aplicando o princípio do método dos mínimos quadrados,

$\left(\frac{\partial G}{\partial d} \right) = 0$ tem-se:

$$\begin{aligned} \sum_i \left\{ \left[\frac{\exp(-K_d \cdot t_i) - 1}{K_d} \right] \cdot g_i \right\} + \alpha_6 \cdot \sum_i (X_{Ai} \cdot g_i) - \beta_6(d) \cdot \sum_i \left\{ \left[\ln(1 - X_{Ai}) \right] \cdot g_i \right\} \\ + \gamma_6(d) \cdot \sum_i \left\{ \left[\ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_{Ai})}{A + B \cdot [S]_0} \right] \right] \cdot g_i \right\} = 0 \end{aligned} \quad (3.55)$$

$$\text{onde } g_i = -\frac{[S]_0}{[E]_0 \cdot a \cdot A} \cdot \ln(1 - X_{Ai}) + \frac{1}{[E]_0} \cdot \left(\frac{1}{a \cdot B} + \frac{[S]_0}{a \cdot A} \right) \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_{Ai})}{A + B \cdot [S]_0} \right] \quad (3.56)$$

Rearranjando as Equações (3.34) e (3.35), tem-se:

$$\beta_6(d) = a_3 + b_3 \cdot d \quad (3.57)$$

$$\gamma_6(d) = a_4 + b_4 \cdot d \quad (3.58)$$

$$\text{onde: } a_3 = \frac{1}{[E]_0 \cdot a \cdot A} \quad (3.59)$$

$$b_3 = \frac{[S]_0}{[E]_0 \cdot a \cdot A} \quad (3.60)$$

$$a_4 = \frac{1}{[E]_0 \cdot a \cdot A} - \frac{b}{[E]_0 \cdot a \cdot B} + \frac{c \cdot A}{[E]_0 \cdot a \cdot B^2} \quad (3.61)$$

$$b_4 = \frac{1}{[E]_0 \cdot a \cdot B} + \frac{[S]_0}{[E]_0 \cdot a \cdot A} \quad (3.62)$$

Substituindo as Equações (3.57) e (3.58) em (3.55) e isolando d, tem-se:

$$d = \frac{a_4 \cdot P - a_3 \cdot N + M + L}{b_3 \cdot N - b_4 \cdot P} \quad (3.63)$$

$$\text{onde: } L = \sum_i \left\{ \left[\frac{\exp(-K_d \cdot t_i) - 1}{K_d} \right] \cdot g_i \right\} \quad (3.64)$$

$$M = \alpha_6 \cdot \sum_i (X_{Ai} \cdot g_i) \quad (3.65)$$

$$N = \sum_i \left\{ \left[\ln(1 - X_{Ai}) \right] \cdot g_i \right\} \quad (3.66)$$

$$P = \sum_i \left\{ \left[\ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_{Ai})}{A + B \cdot [S]_0} \right] \right] \cdot g_i \right\} \quad (3.67)$$

A partir dos dados experimentais representados na Tabela 7.6.1 do Anexo VI, obtidos para $[S]_0 = 2,4832 \text{ mol/L}$, $[W]_0 = 25,6815 \text{ mol/L}$, $[E]_0 = 0,1698 \text{ mg/mL}$, $K_d = 0,0468 \text{ h}^{-1}$, $A = 23,1983 \text{ mol/L}$, $B=1$, $\text{pH} = 5,0$ e $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, e utilizando o programa DVAR apresentado no Anexo IV, obtém-se:

$$d = 6,6871 \text{ L/mol}$$

3.4 - AJUSTE DOS MODELOS CINÉTICOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os ajustes dos modelos cinéticos com relação aos dados experimentais de conversão de substrato em função do tempo obtidos por BERGAMASCO (1989), que são apresentados na Tabela 7.5.1 do Anexo V e podem ser visualizados na Figura 3.2.

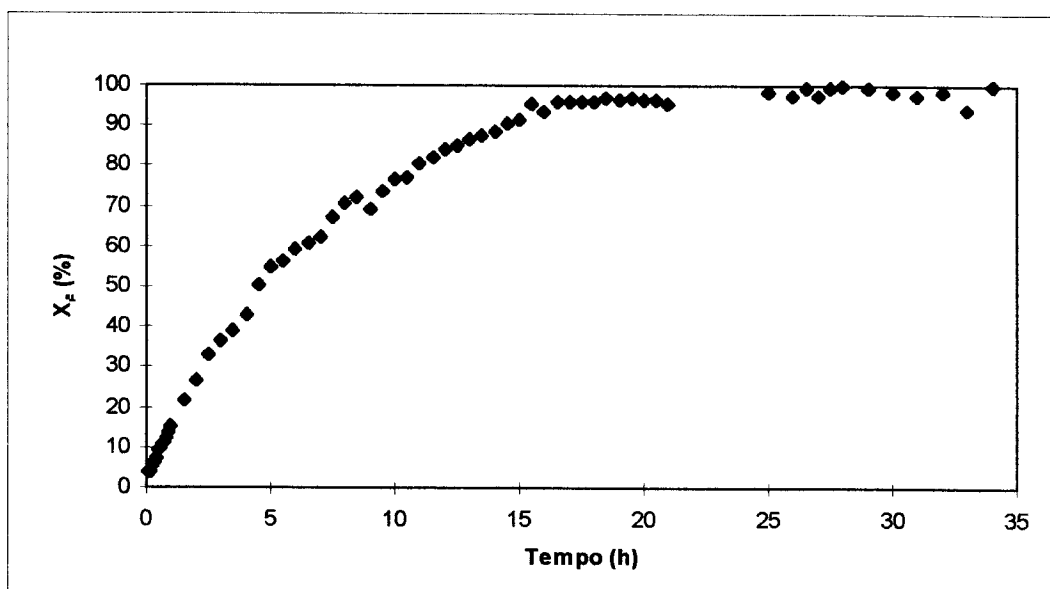


FIGURA 3.2 - Dados Experimentais de Conversão de Substrato em Função do Tempo (BERGAMASCO, 1989).

Os coeficientes das expressões de conversão de substrato em função do tempo que descrevem os modelos são obtidos para as mesmas condições dos dados experimentais, ou seja:

$$[S]_0 = 850 \text{ mg/mL} = 2,4832 \text{ mol/L} = 85\% \text{ p/v}$$

$$[W]_0 = 25,6815 \text{ ml/L}$$

$$[E]_0 = 0,1698 \text{ mg/mL}$$

$$K_d = 0,0468 \text{ h}^{-1}$$

$$A = 23,1983 \text{ mol/L}$$

$$B = 1$$

$$\text{pH} = 5,0$$

$$T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$$

3.4.1 - Modelo de Bowski

3.4.1.1 - Concentração de Água Constante

A Equação (3.6) para as condições descritas no item 3.4 pode ser expressa por:

$$t = 6,5252 \cdot X_A - 0,1188 \cdot \ln(1 - X_A) - 1,7656 \cdot X_A^2 \quad (3.68)$$

Na Tabela 3.2 e na Figura 3.3 apresentam-se os valores de X_A em função de t , ajustados pela Equação (3.68).

TABELA 3.2 - Resultados da Modelagem com a Equação (3.68).

X_A (%)	t (horas)
5	0,33
10	0,65
15	0,96
20	1,26
25	1,56
30	1,84
35	2,12
40	2,39
45	2,65
50	2,90
55	3,15
60	3,39
65	3,62
70	3,85
75	4,07
80	4,28
85	4,50
90	4,72
95	4,96
99	5,28

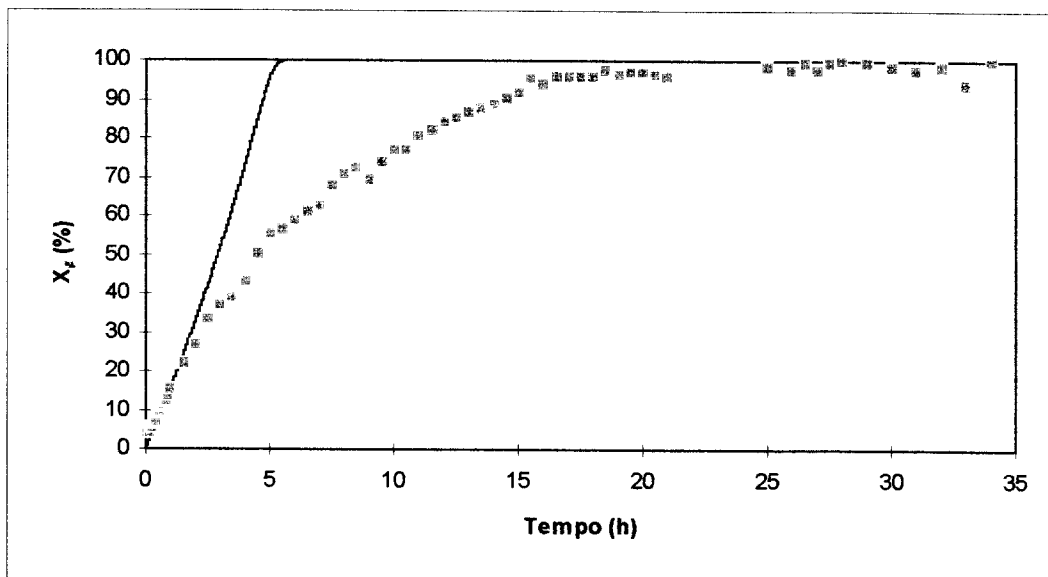


FIGURA 3.3 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso Pela Equação (3.68) aos Dados Experimentais.

A aplicação deste modelo cinético, para a reação de hidrólise da sacarose, nas condições descritas por BERGAMASCO (1989), conseguiu ajustar os dados experimentais somente na região de baixas conversões (até 25 % aproximadamente), como pode ser visto na Figura 3.3.

3.4.1.2 - Concentração de Água Variável

A Equação (3.14) para as condições descritas no item 3.4 pode ser expressa por:

$$t = 36,5209 \cdot X_A - 0,1316 \cdot \ln(1 - X_A) + 310,3496 \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] \quad (3.69)$$

Na Tabela 3.3 e na Figura 3.4 apresentam-se os valores de X_A em função de t , ajustados pela Equação (3.69).

A aplicação deste modelo cinético, para a reação da hidrólise da sacarose, nas condições descritas por BERGAMASCO (1989), conseguiu um ajuste de qualidade semelhante ao que propunha o modelo com a concentração de água constante. Porém, a exemplo do anterior, conseguiu ajustar os dados experimentais somente na região de baixas conversões (até 25 % aproximadamente) como pode ser visto na Figura 3.4.

TABELA 3.3 - Resultados da Modelagem com a Equação (3.69).

X_A (%)	t (horas)
5	0,33
10	0,65
15	0,96
20	1,27
25	1,57
30	1,87
35	2,15
40	2,43
45	2,71
50	2,97
55	3,23
60	3,48
65	3,73
70	3,97
75	4,21
80	4,44
85	4,67
90	4,91
95	5,18
99	5,53

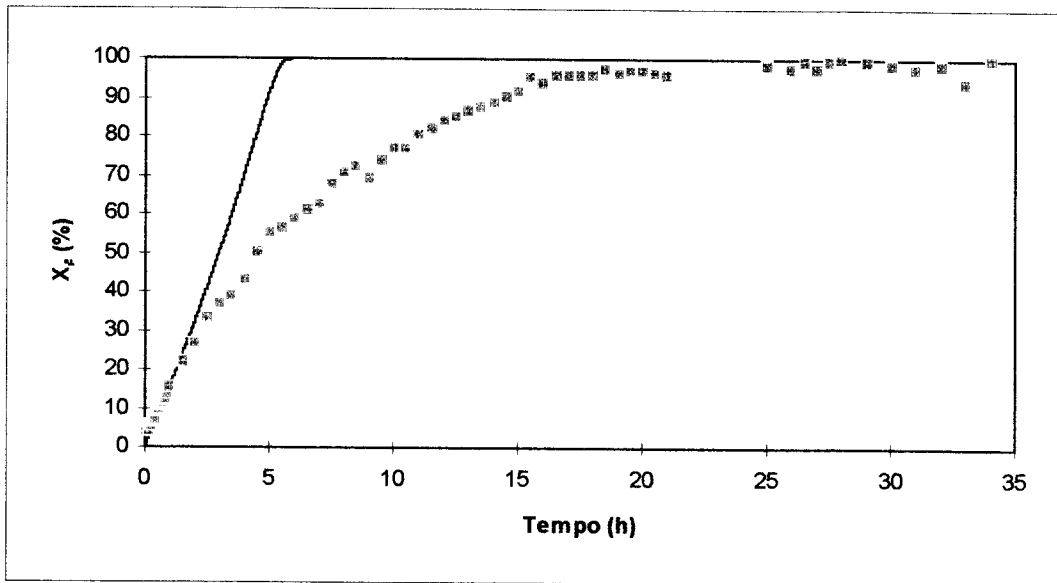


FIGURA 3.4- Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.69) aos Dados Experimentais.

3.4.2 - Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima

3.4.2.1 - Concentração de Água Constante

A Equação (3.19) para as condições descritas no item 3.4 pode ser expressa por:

$$t = -21,3675 \cdot \ln \left[-0,3054 \cdot X_A + 0,005560 \cdot \ln(1 - X_A) + 0,08263 \cdot X_A^2 + 1 \right] \quad (3.70)$$

Na Tabela 3.4 e na Figura 3.5 apresentam-se os valores de X_A em função de t , ajustados pela Equação (3.70).

TABELA 3.4 - Resultados da Modelagem com a Equação (3.70).

X_A (%)	t (horas)
5	0,33
10	0,66
15	0,98
20	1,30
25	1,61
30	1,93
35	2,23
40	2,53
45	2,83
50	3,12
55	3,41
60	3,69
65	3,97
70	4,24
75	4,51
80	4,78
85	5,05
90	5,33
95	5,65
99	6,06

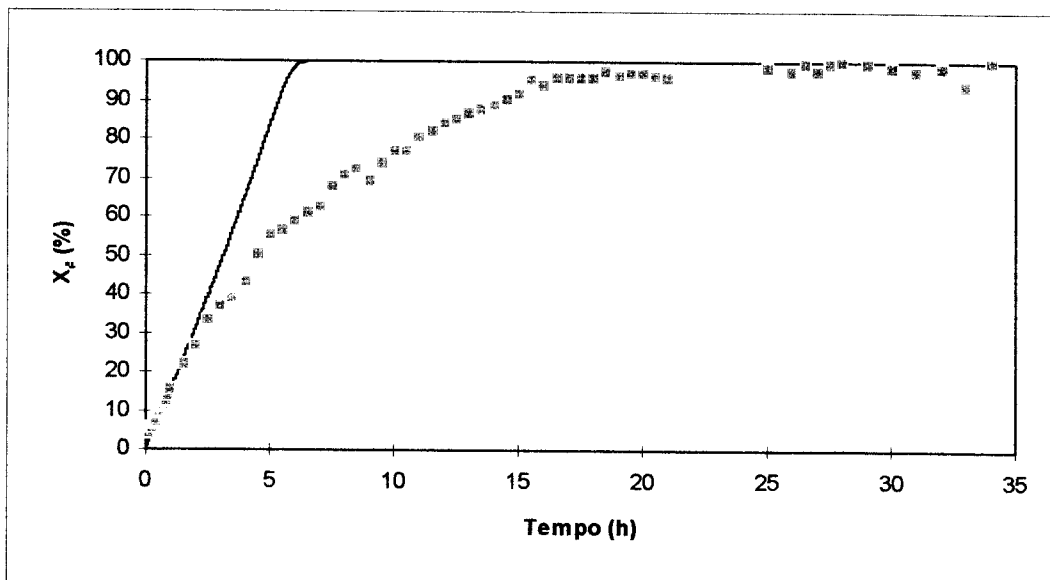


FIGURA 3.5 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.70) aos Dados Experimentais.

A inclusão da desativação térmica no modelo cinético de Bowski, para a reação de hidrólise da sacarose, nas condições descritas por BERGAMASCO (1989), não é suficiente para ajustar o modelo aos dados experimentais, ajustando razoavelmente bem os dados para conversões até a faixa de 35%, o que, no entanto, já representou um avanço com relação ao modelo de Bowski, independentemente da hipótese para a concentração de água.

3.4.2.2 - Concentração de Água Variável

A Equação (3.23) para as condições descritas no item 3.4, pode ser expressa por:

$$t = -21,3675 \cdot \ln \left\{ -1,7092 \cdot X_A + 0,006159 \cdot \ln(1 - X_A) - 14,5244 \cdot \ln \left[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A) \right] + 1 \right\} \quad (3.71)$$

Na Tabela 3.5 e na Figura 3.6 apresentam-se os valores de X_A em função de t , ajustados pela Equação (3.71).

TABELA 3.5 - Resultados da Modelagem com a Equação (3.71).

X_A (%)	t (horas)
5	0,33
10	0,66
15	0,99
20	1,31
25	1,63
30	1,95
35	2,27
40	2,58
45	2,89
50	3,20
55	3,50
60	3,80
65	4,10
70	4,39
75	4,69
80	4,98
85	5,27
90	5,58
95	5,94
99	6,40

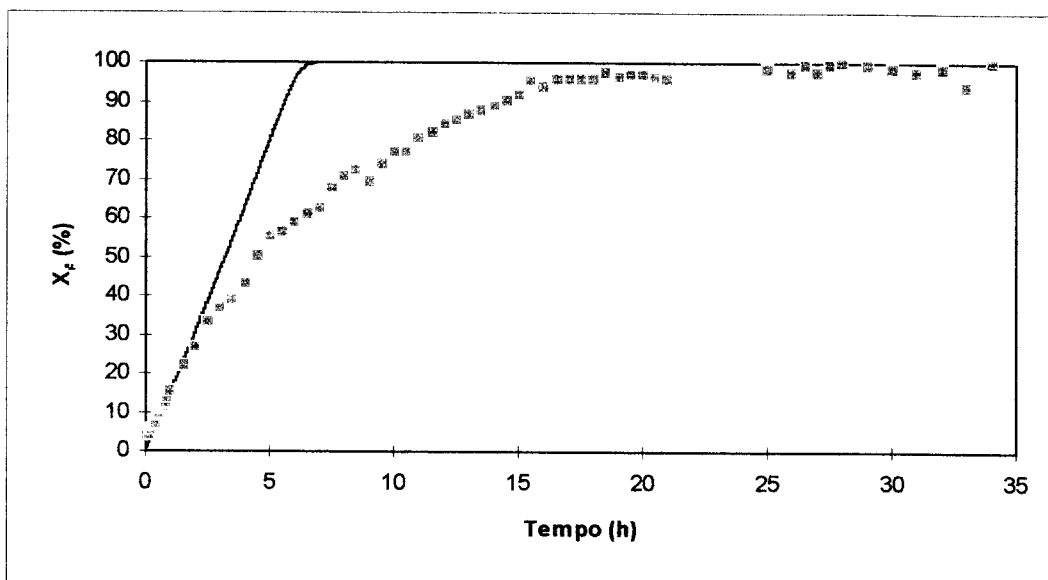


FIGURA 3.6 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.71) aos Dados Experimentais.

A aplicação deste modelo cinético para a reação de hidrólise da sacarose, nas condições descritas por BERGAMASCO (1989), a exemplo do modelo do item 3.4.2, conseguiu ajustar os dados experimentais somente até a faixa de 35%.

3.4.3 - Modelo de Bowski Adicionado da Desativação Térmica da Enzima e Inibição pelos Produtos da Reação

3.4.3.1 - Concentração de Água Constante

A Equação (3.28) para as condições descritas no item 3.4 pode ser expressa por:

$$t = -21,3675 \cdot \ln[-0,2007 \cdot X_A + 0,1103 \cdot \ln(1 - X_A) + 0,08263 \cdot X_A^2 + 1] \quad (3.72)$$

Na Tabela 3.6 e na Figura 3.7 apresentam-se os valores de X_A em função de t , ajustados pela Equação (3.72).

TABELA 3.6 - Resultados da Modelagem com a Equação (3.72).

X_A (%)	t (horas)
5	0,33
10	0,67
15	1,01
20	1,36
25	1,71
30	2,06
35	2,43
40	2,81
45	3,21
50	3,63
55	4,07
60	4,55
65	5,07
70	5,66
75	6,35
80	7,17
85	8,25
90	9,79
95	12,64
99	21,00

Observa-se da Figura 3.7 que, para as condições descritas por BERGAMASCO (1989), um modelo cinético simples (BOWSKI et alii, 1971), que leva em consideração a inibição pelo substrato, bem como a desativação térmica da enzima e inibição pela concentração de produtos formados, descreve razoavelmente bem os dados experimentais, apresentando um pequeno desvio na região de conversão de 50 a 90 % .

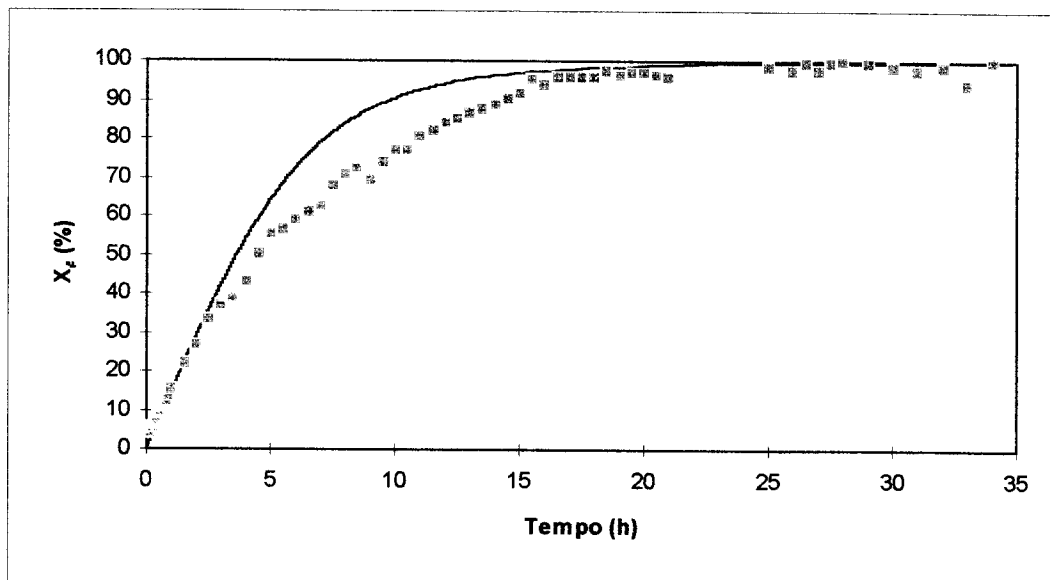


FIGURA 3.7 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.72) aos Dados Experimentais.

3.4.3.2 - Concentração de Água Variável

A Equação (3.32) para as condições descritas no item 3.4 pode ser expressa por:

$$t = -21,3675 \cdot \ln \left\{ -1,7092 \cdot X_A + 0,1084 \cdot \ln(1 - X_A) - 15,5816 \cdot \ln \left[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A) \right] + 1 \right\} \quad (3.73)$$

Na Tabela 3.7 e na Figura 3.8 apresentam-se os valores de X_A em função de t , ajustados pela Equação (3.73).

TABELA 3.7 - Resultados da Modelagem com a Equação (3.73).

X_A (%)	t (horas)
5	0,33
10	0,67
15	1,01
20	1,36
25	1,72
30	2,08
35	2,45
40	2,84
45	3,24
50	3,66
55	4,11
60	4,60
65	5,13
70	5,72
75	6,41
80	7,24
85	8,30
90	9,84
95	12,66
99	20,86

A exemplo do modelo anterior, observa-se da Figura 3.8, um bom ajuste aos dados experimentais, apresentando um desvio de ajuste na mesma região de conversão do caso anterior. Na Figura 3.9 pode-se observar conjuntamente o ajuste dos modelos descritos pela Equações (3.72) e (3.73) aos dados experimentais. Considerando a boa concordância dos ajustes, pode-se concluir que, nas condições apresentadas por BERGAMASCO (1989), ambos os modelos representam bem os dados experimentais.

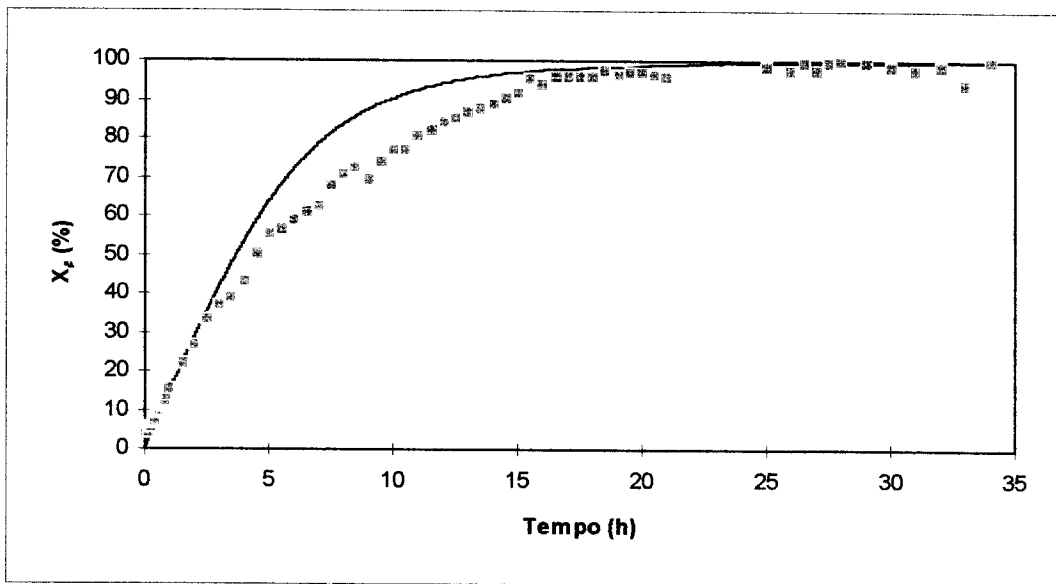


FIGURA 3.8 - Ajuste do Modelo Cinético Expresso pela Equação (3.73) aos Dados Experimentais.

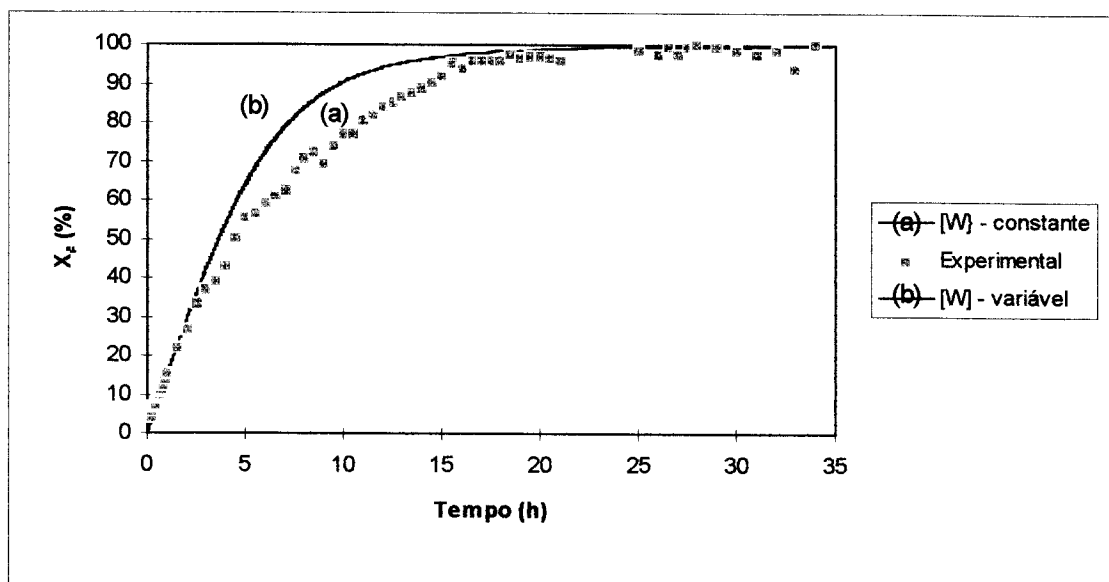


FIGURA 3.9 - Influência da Concentração da Água no Ajuste do Modelo aos Dados Experimentais.

3.5 - SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO PARA A HIDRÓLISE DA SACAROSE

Nesta seção serão estudados os efeitos da temperatura e concentração inicial de substrato na conversão de sacarose em glicose e frutose. A análise será feita a partir do modelo de Bowski incorporando-se os efeitos de desativação térmica da enzima e inibição pelos produtos, já que foi o que melhor descreveu os dados experimentais apresentados por BERGAMASCO (1989). Ainda considerar-se-á a concentração de água num caso constante e no outro variável, visando estudar este efeito em condições distintas da que foi utilizada na obtenção dos dados experimentais.

3.5.1 - OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

3.5.1.1 - Cálculo da Constante "a"

Na Tabela 3.8 apresentam-se dados de atividade específica em função da temperatura, obtidos por BERGAMASCO (1989).

TABELA 3.8 - Atividade Específica (A_e - U/mg) em Função da Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) - (BERGAMASCO, 1989).

T ($^{\circ}\text{C}$)	A_e (U/mg)
35	207,2
40	244,2
50	310,6
55	391,7

Ajustando estes dados a uma expressão do tipo lei de Arrhenius:

$$A_e = A_{e_0} \cdot \exp(-E_a/R \cdot T) \quad (3.74)$$

na forma logarítmica, tem-se:

$$\ln A_e = 15,2510 - 3055,93 \cdot \frac{1}{T} \quad (3.75)$$

com coeficiente de correlação igual a 0,9912, donde obtém-se $E_a = 6072,14$ cal/mol.

Será adotada a hipótese de trabalho que, das constantes cinéticas do modelo de hidrólise enzimática da sacarose proposto por BERGAMASCO (1989) (Seção 2.5), apenas a constante K_p varia significativamente com a temperatura, de forma que a "constante" $a = K_p \cdot K_s$ (2.58), obedece a uma expressão do tipo lei de Arrhenius:

$$a = a_0 \cdot \exp(-E_a/R \cdot T) \quad (3.76)$$

enquanto os parâmetros "b" e "c" serão admitidos constantes.

A simulação será executada para as temperaturas de 50, 55 e 60 °C. Na Tabela 3.9 pode-se observar os valores da constante "a" para 50 e 60 °C, calculados a partir da Equação (3.76) e dos valores de $a = 1,9297$ L²/g.mol.h a 55 °C (Seção 3.2) e $E_a = 6072,14$ cal/mol.

TABELA 3.9 - Valores do parâmetro "a" em Função da Temperatura (°C).

T (°C)	a (L ² /g.mol.h)
50	1,7576
60	2,3352

3.5.1.2 - Cálculo da Constante de Desativação Térmica da Enzima

Na Tabela 3.10 são apresentados dados de constante de desativação térmica em função da temperatura, obtidos por BERGAMASCO (1989).

TABELA 3.10 - Constante de Desativação Térmica em Função da Temperatura (°C) (BERGAMASCO, 1989).

T (°C)	K _d (h ⁻¹)
55	0,0499
60	0,3849
65	1,3082

Ajustando estes dados a uma expressão do tipo lei de Arrhenius:

$$K_d = K_d^0 \cdot \exp(-E_d/R \cdot T) \quad (3.77)$$

na forma logarítmica, obtém-se:

$$\ln K_d = 107,6629 - 36255,215 \cdot \frac{1}{T} \quad (3.78)$$

com coeficiente de correlação igual a 0,9909.

Partindo da Equação (3.77) obtém-se $K_d = 0,01023 \text{ h}^{-1}$ para $T = 50 \text{ °C}$.

3.5.2 - Obtenção dos Modelos a Partir da Simulação

Apresentam-se a seguir as equações obtidas a partir da variação da concentração inicial de substrato e temperatura do meio reacional.

As concentrações iniciais de substrato foram 550, 650, 750 e 850 mg/mL, que são valores altos, os quais apresentam

interesse industrial; e temperaturas de 50, 55 e 60 °C, os quais estão na faixa ótima de temperatura, obtida por BERGAMASCO (1989). O pH para todos os casos é igual a 5,0.

3.5.2.1 - Concentração de Água Constante

Os valores das constantes K_d , α_5 , β_5 e γ_5 da Equação (3.28) para as diferentes condições de simulação podem ser observados na Tabela 3.11.

TABELA 3.11 - Coeficientes da Equação (3.28).

[S] ₀ - mg/mL	1/K _d	K _d . α_5	K _d . β_5	K _d . γ_5	T (°C)
850	97,7517	0,05066	0,02785	0,02087	50
750		0,03551	0,02176	0,01429	
650		0,02452	0,01698	0,009578	
550		0,01648	0,01313	0,006192	
850	21,3675	0,2007	0,1103	0,08263	55
750		0,1406	0,08618	0,05658	
650		0,09709	0,06724	0,03793	
550		0,06527	0,05198	0,02452	
850	2,5981	1,4347	0,7888	0,5909	60
750		1,0055	0,6162	0,4046	
650		0,6943	0,4808	0,2712	
550		0,4667	0,3717	0,1754	

3.5.2.2 - Concentração de Água Variável

Os valores das constantes K_d , α_6 , β_6 e γ_6 da Equação (3.32) para as diferentes condições de simulação podem ser observados na Tabela 3.12.

TABELA 3.12 - Coeficientes da Equação (3.32).

$[S]_0$ - mg/ml	$1/K_d$	$K_d \cdot \alpha_6$	$K_d \cdot \beta_6$	$K_d \cdot \gamma_6$	A	B	T (°C)
850	97,7517	0,4316	0,02731	3,9345	0,9033	0,0967	50
750		0,3808	0,02090	4,5903	0,9250	0,0750	
650		0,3300	0,01603	5,2473	0,9420	0,0580	
550		0,2793	0,01223	5,9054	0,9557	0,0443	
850	21,3675	1,7092	0,1084	15,5816	0,9033	0,0967	55
750		1,5081	0,08277	18,1789	0,9250	0,0750	
650		1,3070	0,06349	20,7809	0,9420	0,0580	
550		1,1060	0,04845	23,3870	0,9557	0,0443	
850	2,5981	12,2220	0,7751	111,4221	0,9033	0,0967	60
750		10,7843	0,5919	129,9942	0,9250	0,0750	
650		9,3462	0,4540	148,6004	0,9420	0,0580	
550		7,9085	0,3464	167,2363	0,9557	0,0443	

3.5.3 - Influência da Concentração Inicial de Substrato

Apresenta-se a seguir a influência da concentração inicial de substrato no desempenho da reação, nas condições de temperaturas que foram simuladas.

3.5.3.1 - Concentração de Água Constante

Nas Figuras 3.10, 3.11 e 3.12 pode-se observar o comportamento da conversão da reação com relação ao tempo e concentração inicial de substrato.

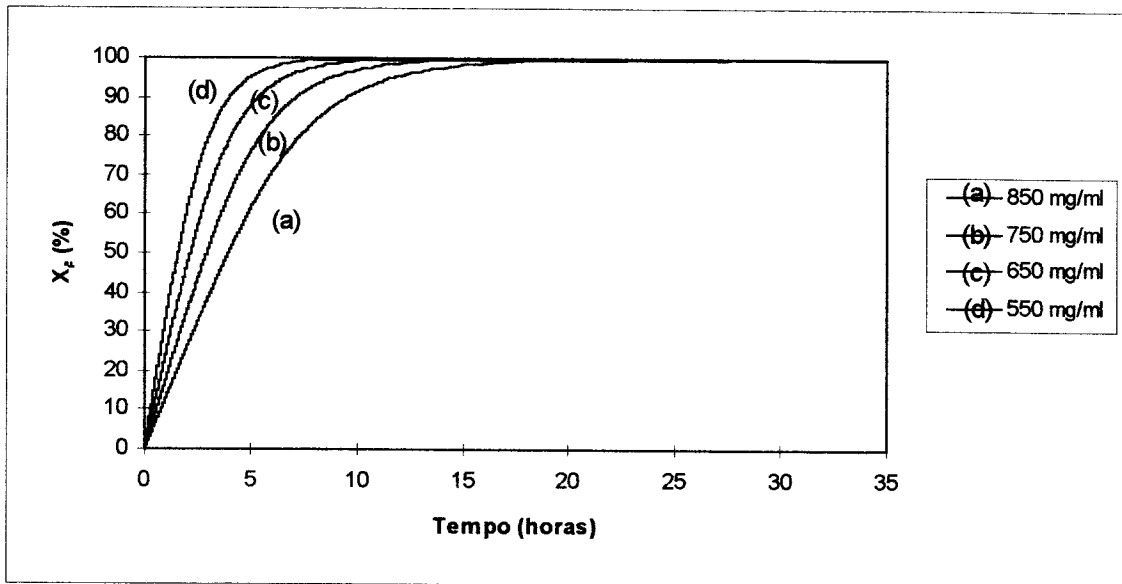


FIGURA 3.10 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Constante.

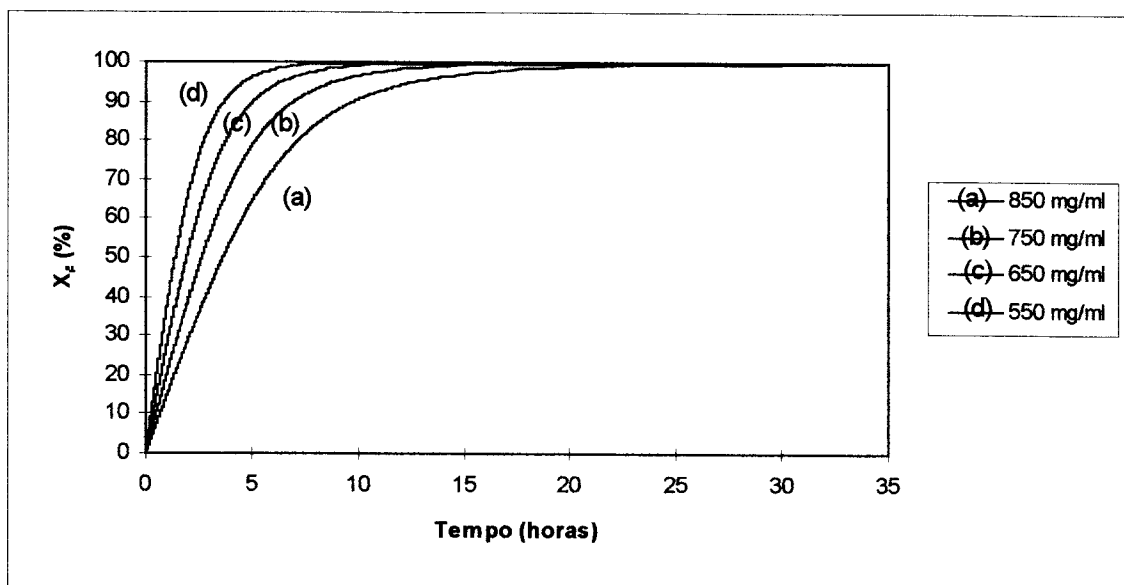


FIGURA 3.11 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Constante.

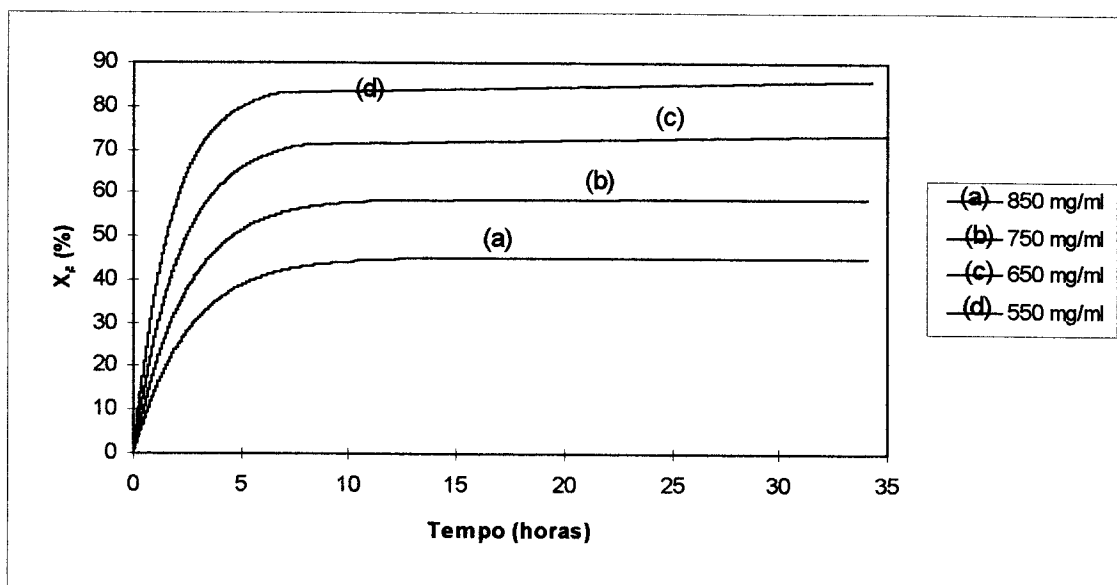


FIGURA 3.12 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Constante.

Da análise destas situações observa-se que, independentemente da temperatura, à medida que aumenta a concentração inicial do substrato, são necessários maiores tempos de reação para se atingir uma dada conversão.

3.5.3.2 - Concentração de Água Variável

Nas Figuras 3.13, 3.14 e 3.15 pode-se observar o comportamento da conversão da reação com relação ao tempo e concentração inicial de substrato.

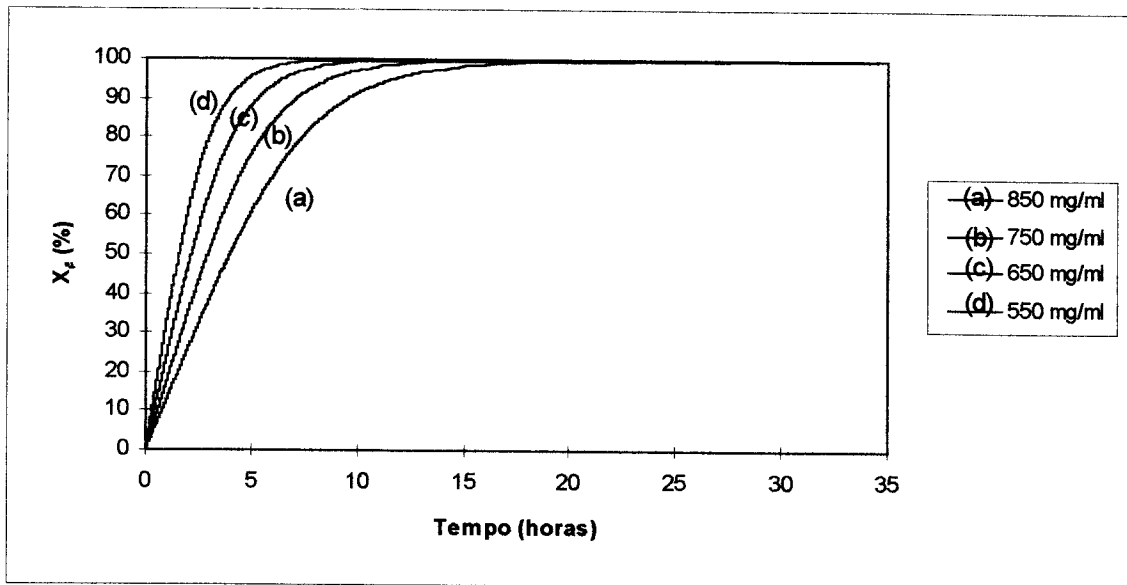


FIGURA 3.13 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$ - Concentração de Água Variável.

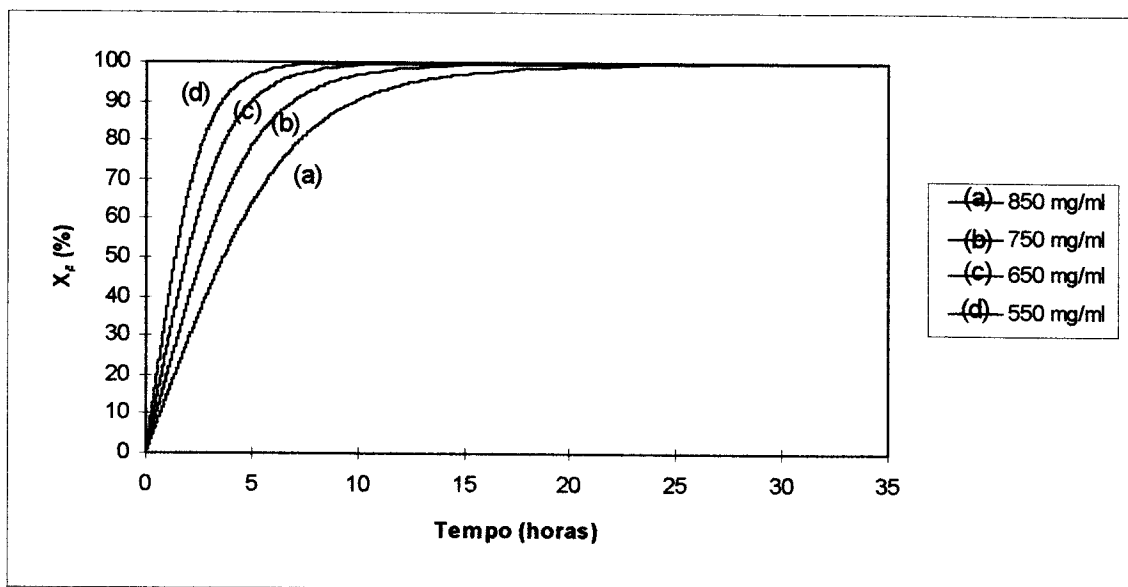


FIGURA 3.14 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ - Concentração de Água Variável.

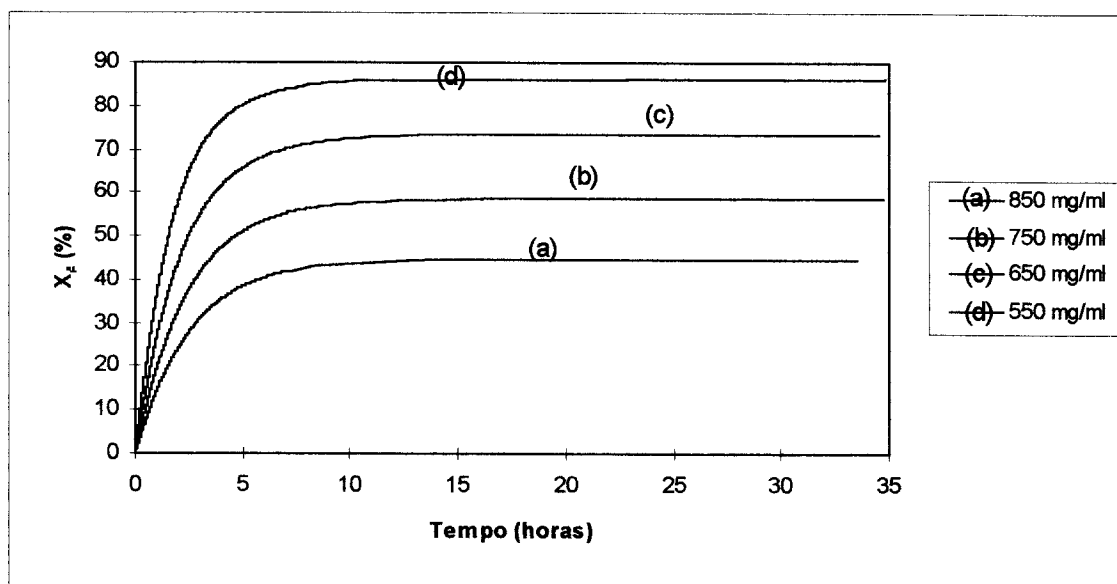


FIGURA 3.15 - Conversão em Função da Concentração Inicial de Substrato para $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Concentração de Água Variável.

Da análise destas situações observa-se que, a exemplo do item anterior, a conversão máxima é atingida para tempos menores, quanto menor for a concentração inicial de substrato.

3.5.4 - Influência da Temperatura

Apresenta-se a seguir a influência da temperatura no desempenho da reação, para as condições de concentração inicial de substrato que foram simuladas.

3.5.4.1 - Concentração de Água Constante

Nas Figuras 3.16, 3.17, 3.18 e 3.19 pode-se observar o comportamento da conversão de reação com relação ao tempo e à temperatura.

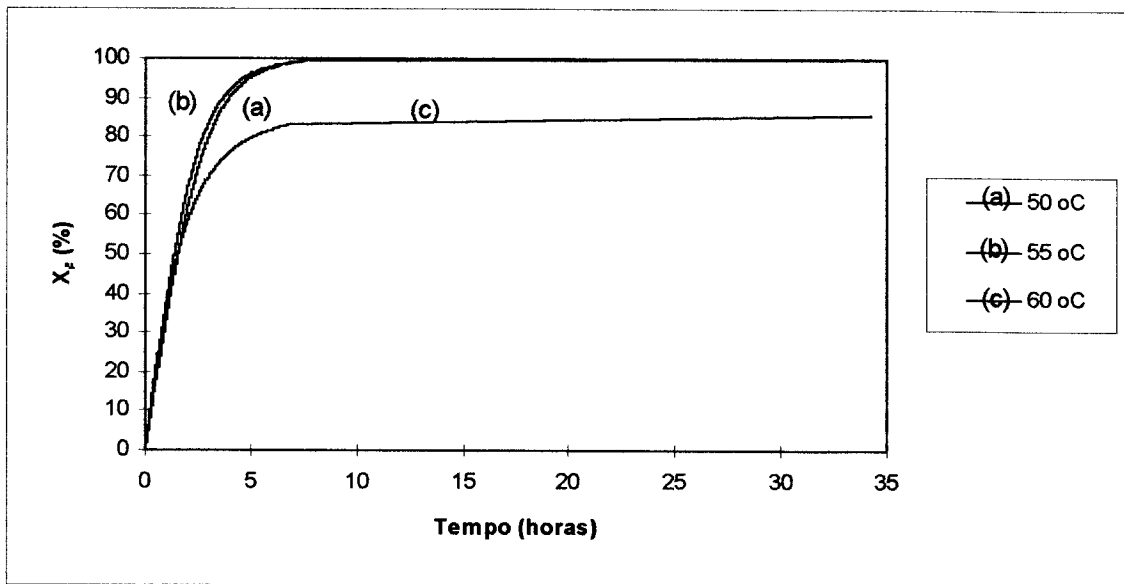


FIGURA 3.16 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 550 \text{ mg/mL} = 55 \text{ \% p/v}$ - Concentração de Água Constante.

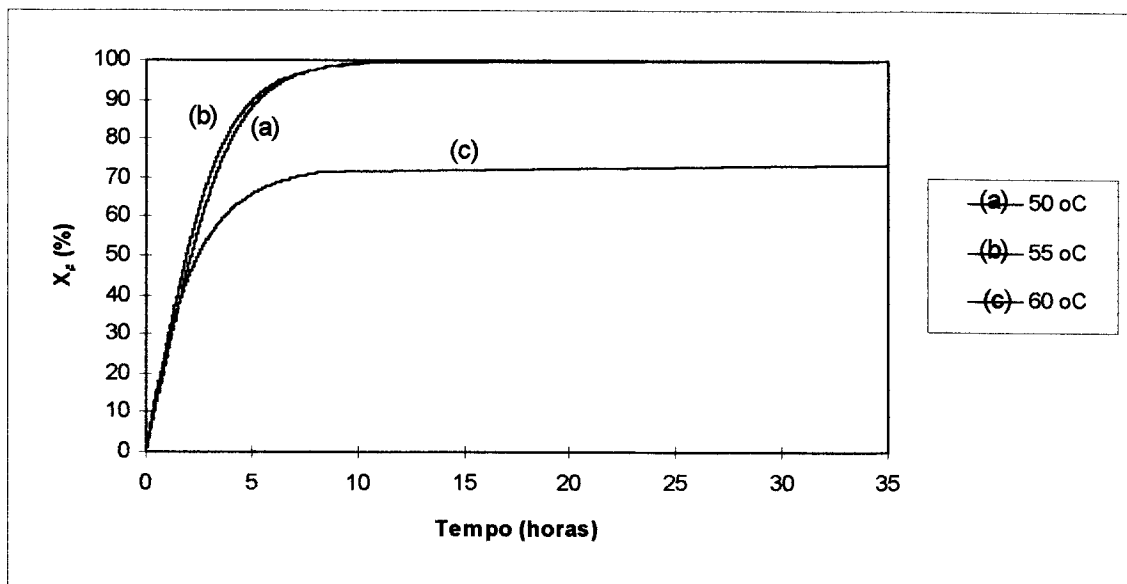


FIGURA 3.17 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 650 \text{ mg/mL} = 65 \text{ \% p/v}$ - Concentração de Água Constante.

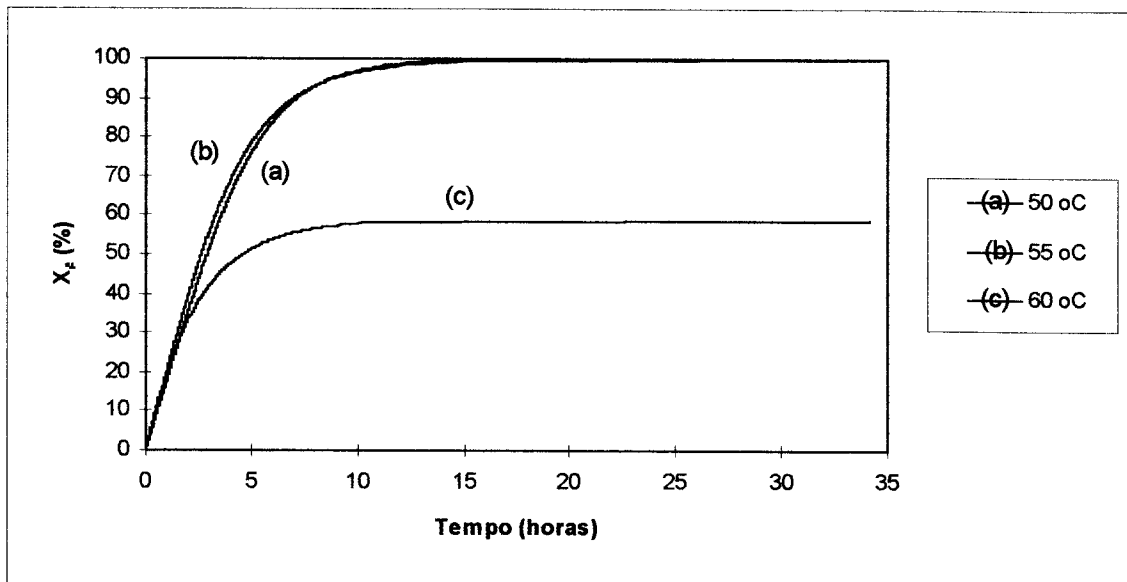


FIGURA 3.18 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 750 \text{ mg/mL} = 75 \% \text{ p/v}$ - Concentração de Água Constante.

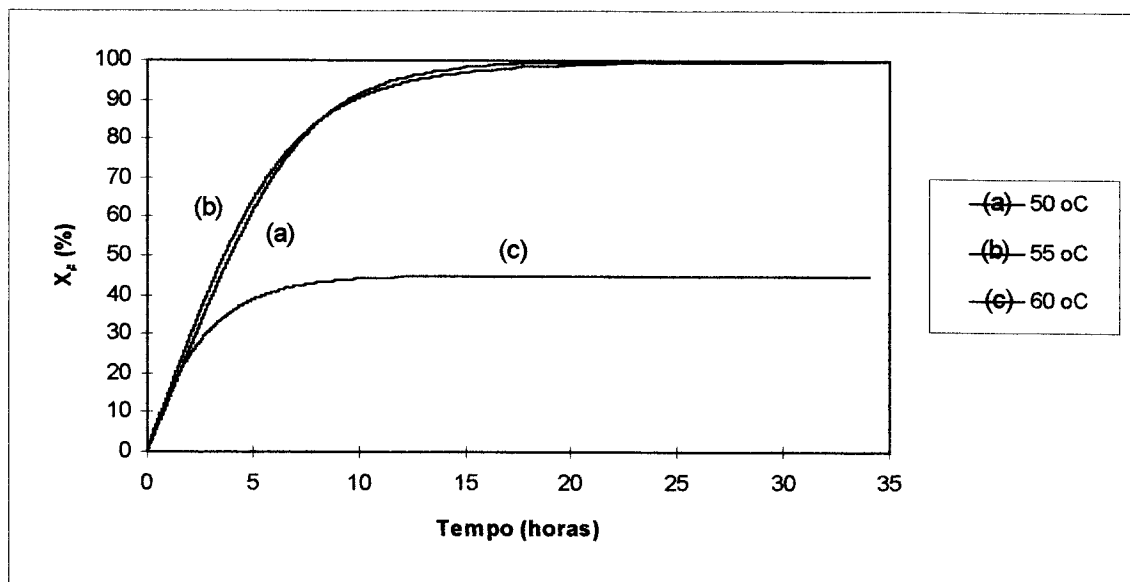


FIGURA 3.19 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 850 \text{ mg/mL} = 85 \% \text{ p/v}$ - Concentração de Água Constante.

Da análise destas situações observa-se que, independentemente da concentração inicial de substrato, para o

mesmo tempo decorrido, a reação apresenta maiores conversões para a temperatura de 55 °C até uma determinada conversão, dependendo da concentração inicial de substrato, sendo que a partir deste ponto predomina a desativação térmica sobre a ativação, apresentando maiores conversões para uma temperatura de 50 °C. Já para a temperatura de 60 °C há uma influência muito grande da desativação térmica, chegando até a reduzir a conversão máxima.

3.5.4.2 - Concentração de Água Variável

Nas Figuras 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23 pode-se observar o comportamento da conversão da reação com relação ao tempo e à temperatura.

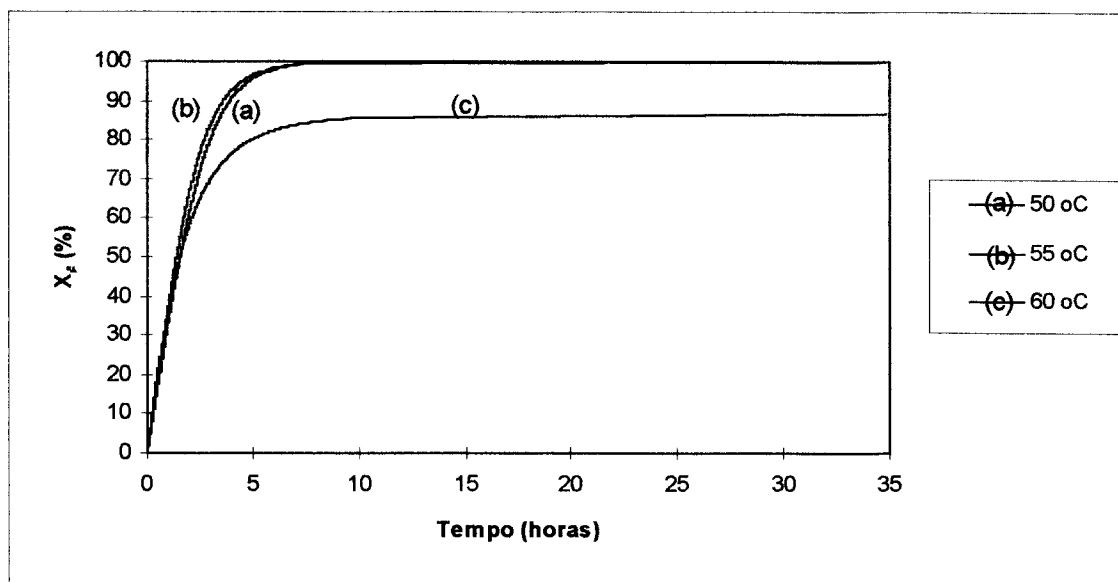


FIGURA 3.20 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 550 \text{ mg/mL} = 55 \text{ \% p/v}$ - Concentração de Água Variável.

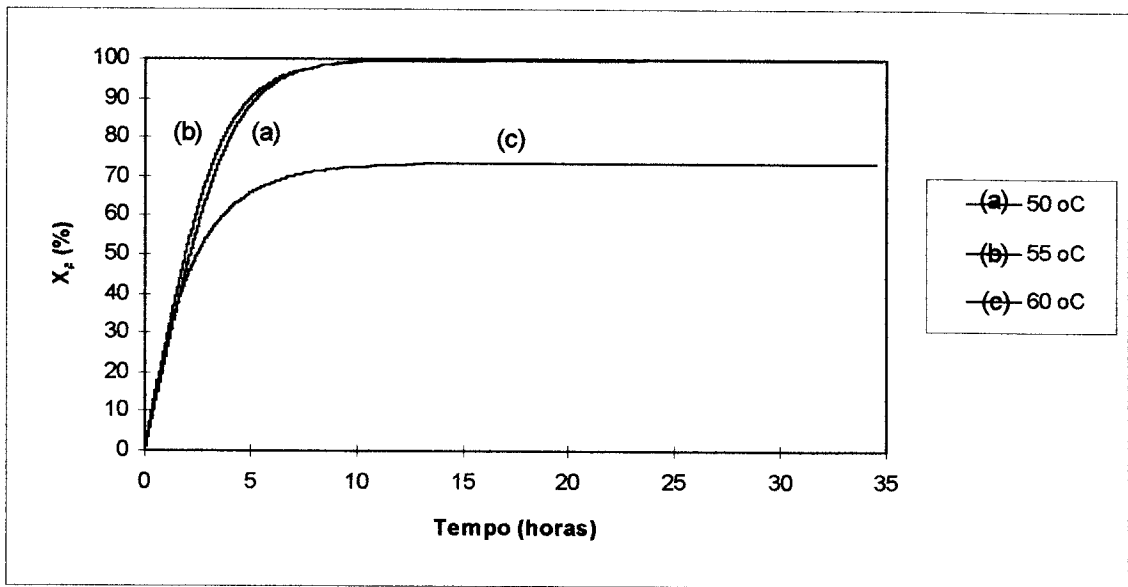


FIGURA 3.21 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 650 \text{ mg/mL} = 65 \% \text{ p/v}$ - Concentração de Água Variável.

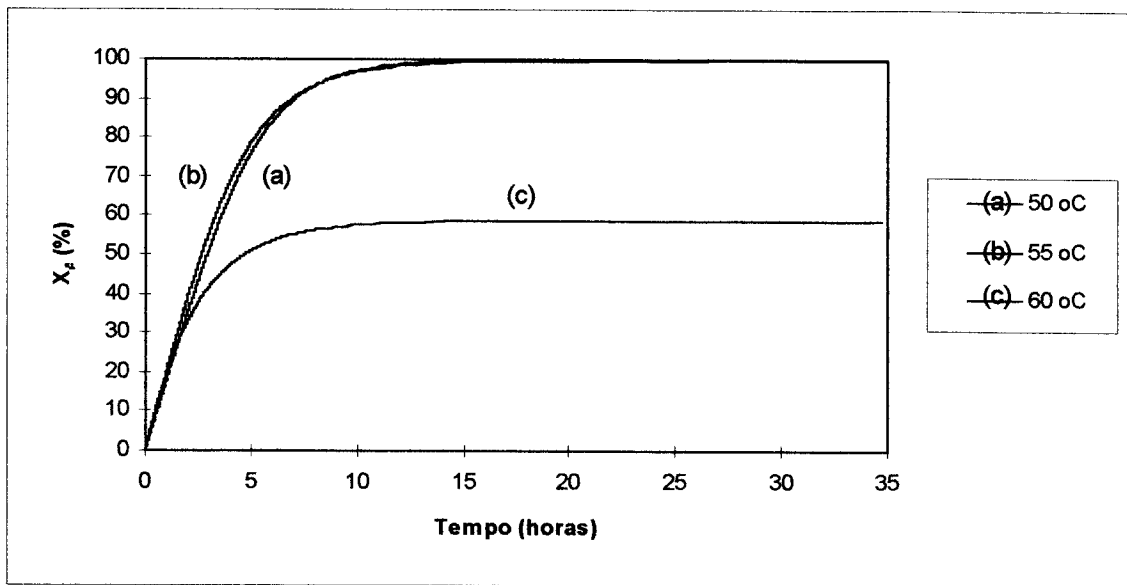


FIGURA 3.22 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 750 \text{ mg/mL} = 75 \% \text{ p/v}$ - Concentração de Água Variável.

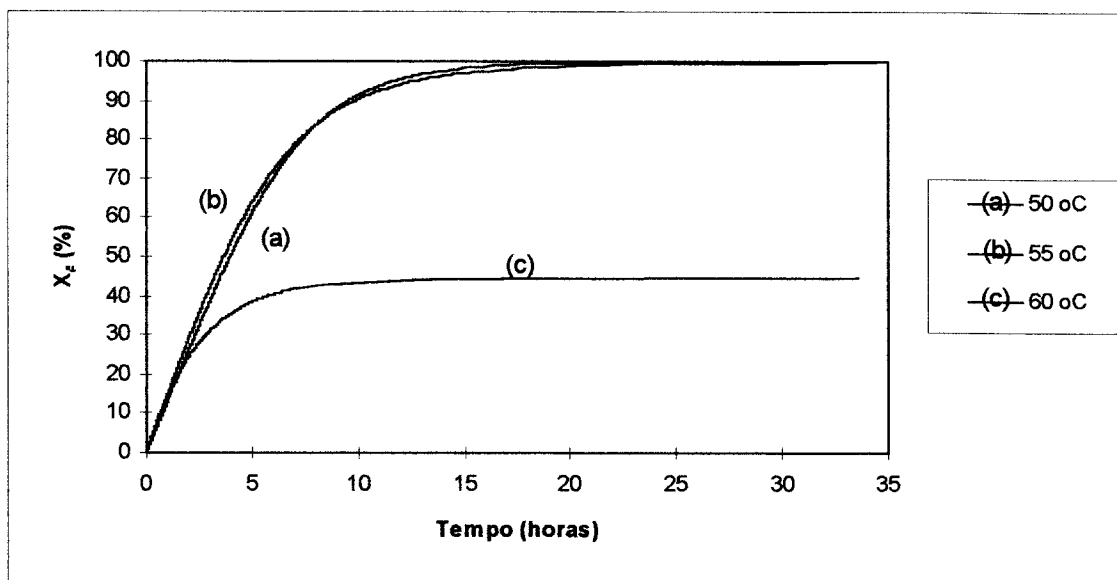


FIGURA 3.23 - Conversão em Função da Temperatura Para $[S]_0 = 850 \text{ mg/mL} = 85 \text{ \% p/v}$ - Concentração de Água Variável.

Da análise destas situações observa-se que, a exemplo do item anterior, existe um predomínio no desempenho da reação para a temperatura de 55 °C até uma determinada conversão, dependendo da concentração inicial de substrato, sendo que a partir deste ponto predomina a desativação térmica sobre a ativação, apresentando maiores conversões para uma temperatura de 50 °C. Já para a temperatura de 60 °C nota-se novamente uma influência muito grande da desativação térmica, chegando até a reduzir a conversão máxima.

3.5.5 - Influência da Concentração da Água

No item 3.4.3.2, através da Figura 3.9, pode-se observar que o modelo de Bowski adicionado dos fenômenos de desativação térmica da enzima e inibição pelos produtos, representa razoavelmente bem os dados experimentais apresentados por BERGAMASCO (1989), tanto para a hipótese de concentração de água variável quanto constante.

Nas Figuras 3.24, 3.25 e 3.26 podemos observar a influência da hipótese da concentração de água nas diversas condições de simulação deste trabalho.

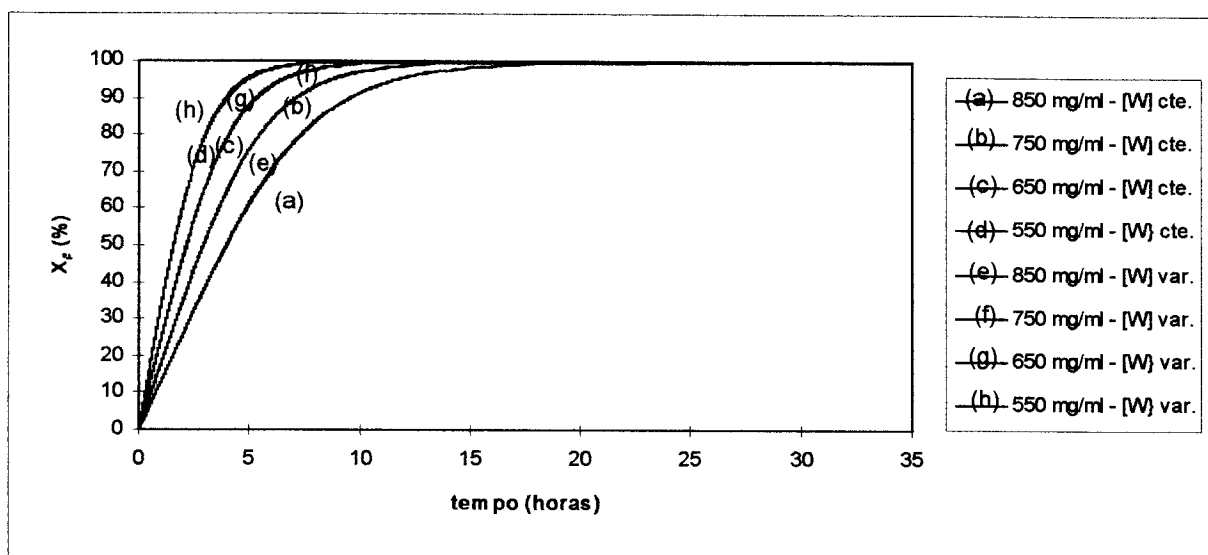


FIGURA 3.24 - Influência da Concentração de Água no Desempenho da Reação - $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

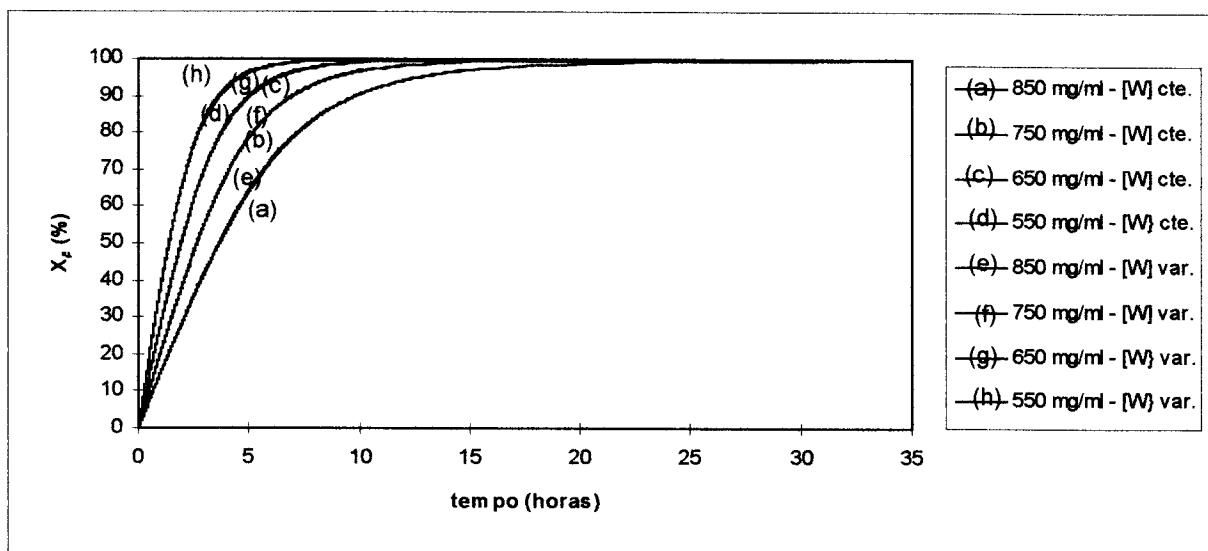


FIGURA 3.25 - Influência da Concentração de Água no Desempenho da Reação - $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$.

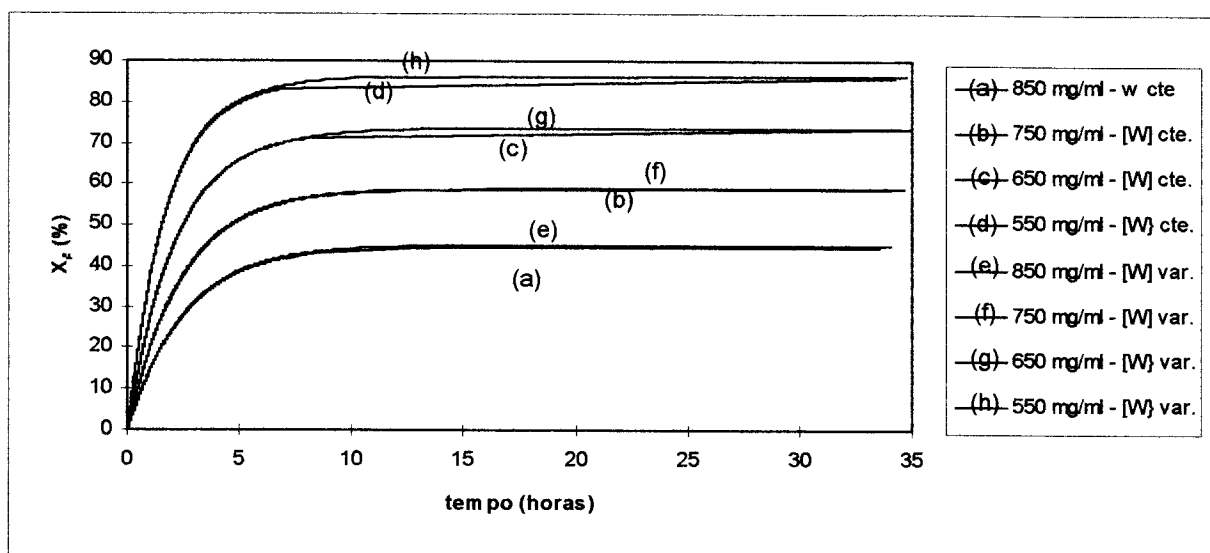


FIGURA 3.26 - Influência da Concentração de Água no Desempenho da Reação - $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Da análise destas situações observa-se que as curvas representativas dos modelos estão bastante próximas, a exemplo da situação que ocorreu para o ajuste com relação aos dados experimentais, apresentando igual probabilidade de descrever o fenômeno. No entanto, no decorrer desta seção será adotada a hipótese de concentração de água variável, uma vez que a mesma é mais realista, pois a água é consumida na reação.

3.6 - INFLUÊNCIA DA FORMA DE ADIÇÃO DA ENZIMA AO MEIO REACIONAL

Uma alternativa de obter melhores desempenhos de reação foi simulada neste trabalho. Esta alternativa consiste em adicionar inicialmente apenas uma fração da quantidade total de enzima e a quantidade restante ao longo do tempo, visando minimizar os efeitos de desativação térmica da enzima. Para efeito de análise, a adição da segunda parte da enzima será executada linearmente com tempo, a partir do tempo zero até uma determinada fração do tempo necessário para se atingir a conversão de 95 %. Este tempo será chamado t_{lim} .

O modelo utilizado para este estudo será o modelo de Bowski adicionando-se os efeitos de desativação térmica da enzima e inibição pelos produtos, já que este melhor descreveu os dados experimentais de BERGAMASCO (1989), utilizando-se também da hipótese da concentração de água variável, por razões já descritas anteriormente. As condições para este estudo são: $[S]_0 = 850 \text{ g/L}$, $T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$, e $\text{pH} = 5,0$.

3.6.1 - Modelagem da Cinética em Reator Batelada

O modelo básico pode ser representado pela Equação (3.13), obtida com aplicação da Equação (3.10) na Equação (2.62):

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{a \cdot [E] \cdot [S] \cdot (A + B \cdot [S])}{1 + (b-d) \cdot [S] + c \cdot [S]^2 + d \cdot [S]_0} \quad (3.13)$$

onde $[E]$ é uma função do tempo.

3.6.1.1 - Obtenção do Perfil da Adição da Enzima

Considerando um reator batelada de volume útil V_u , com uma quantidade inicial de enzima $[E]_0$, e a adição de uma solução de enzima de concentração $[E]_1$ a uma vazão Q , e efetuando um balanço de massa para a quantidade de enzima, tem-se:

$$(\text{Entra}) = (\text{Sai}) + (\text{Reage}) + (\text{Acumula}) \quad (3.79)$$

Representando em quantidades mensuráveis, tem-se:

$$Q \cdot [E]_1 = 0 + K_d \cdot [E] \cdot V_u + \frac{d[E]}{dt} \cdot V_u$$

ou:

$$v \cdot [E]_1 = 0 + K_d \cdot [E] + \frac{d[E]}{dt} \quad (3.80)$$

$$\text{onde: } v = \frac{Q}{V_u} \quad (3.81)$$

e assumiu-se que Q é tão pequeno tal que V_u não se altera.

Rearranjando a Equação (3.80) tem-se:

$$\frac{d[E]}{dt} + K_d \cdot [E] = v \cdot [E]_i \quad (3.82)$$

Integrando a Equação (3.82) para a condição de contorno $[E] = [E]_0$ para $t = 0$, tem-se:

$$[E] = \left([E]_0 - \frac{v \cdot [E]_i}{K_d} \right) \cdot \exp(-K_d \cdot t) + \frac{v \cdot [E]_i}{K_d} = f_1(t) \quad (3.83)$$

A Equação (3.83) é válida desde o tempo igual a zero até o instante final de adição da enzima, que será denominado t_{lim} .

A partir de t_{lim} não há mais adição de enzima e o perfil de concentração ativa obedece ao modelo de decaimento descrito pela Equação (2.5), podendo ser expresso por:

$$[E] = [E]_{lim} \cdot \exp[-K_d \cdot (t - t_{lim})] = f_2(t) \quad (3.84)$$

$$\text{onde: } [E]_{lim} = \left([E]_0 - \frac{v \cdot [E]_i}{K_d} \right) \cdot \exp(-K_d \cdot t_{lim}) + \frac{v \cdot [E]_i}{K_d} \quad (3.85)$$

$$\text{Lembrando que } u(t - t_{lim}) = \begin{cases} 0 & \text{se } t \leq t_{lim} \\ 1 & \text{se } t > t_{lim} \end{cases} \quad (3.86)$$

onde $u(t - t_{lim})$ é a função degrau ou função de Heaviside

$$\text{tem-se que: } E = f_1(t) + [f_2(t) - f_1(t)] \cdot u(t - t_{lim}) \quad (3.87)$$

3.6.1.2 - Obtenção do Modelo Integrado

Substituindo a Equação (3.87) em (3.13) e rearranjando, tem-se:

$$\int_0^t \left[\left([E]_0 - \frac{v \cdot [E]_1}{K_d} \right) \cdot \exp(-K_d \cdot t) + \frac{v \cdot [E]_1}{K_d} \right] \cdot dt - \int_0^t \left\{ \left([E]_0 - \frac{v \cdot [E]_1}{K_d} \right) \cdot \exp(-K_d \cdot t) + \frac{v \cdot [E]_1}{K_d} - [E]_{lim} \cdot \exp[-K_d \cdot (t - t_{lim})] \right\} \cdot u(t - t_{lim}) \cdot dt = \int_{[S]_0}^{[S]} f([S]) \cdot d[S] \quad (3.88)$$

$$\text{onde: } f([S]) = \left(\frac{1}{a \cdot [S] \cdot (A + B \cdot [S])} + \frac{(b-d)}{a \cdot (A + B \cdot [S])} + \frac{c \cdot [S]}{a \cdot (A + B \cdot [S])} + \frac{d \cdot [S]_0}{a \cdot [S] \cdot (A + B \cdot [S])} \right) \quad (3.89)$$

Integrando a Equação (3.88), tem-se:

$$\left([E]_0 - \frac{v \cdot [E]_1}{K_d} \right) \cdot [\exp(-K_d \cdot t) - 1] - v \cdot [E]_1 \cdot t = -\alpha_7 \cdot X_A - \beta_7 \cdot \ln(1 - X_A) - \gamma_7 \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_A)}{A + B \cdot [S]_0} \right] \quad \text{para } 0 \leq t \leq t_{lim} \quad (3.90)$$

e:

$$t = -\frac{1}{K_d} \cdot \ln \left\{ -\alpha_8 \cdot X_A + \beta_8 \cdot \ln(1 - X_A) - \gamma_8 \cdot \ln \left[\frac{A + B \cdot [S]_0 \cdot (1 - X_A)}{A + B \cdot [S]_0} \right] - \delta \right\} + t_{lim} \quad \text{para } t > t_{lim} \quad (3.91)$$

$$\text{onde: } \alpha_7 = \frac{K_d \cdot c \cdot [S]_0}{a \cdot B} \quad (3.92)$$

$$\beta_7 = K_d \cdot \frac{(1 + d \cdot [S]_0)}{a \cdot A} \quad (3.93)$$

$$\gamma_7 = -K_d \cdot \left[\frac{(b-d)}{a \cdot B} - \frac{c \cdot A}{a \cdot B^2} - \frac{1+d \cdot [S]_0}{a \cdot A} \right] \quad (3.94)$$

$$\alpha_8 = \frac{\alpha_7}{[E]_{lim}} \quad (3.95)$$

$$\beta_8 = \frac{\beta_7}{[E]_{lim}} \quad (3.96)$$

$$\gamma_8 = \frac{\gamma_7}{[E]_{lim}} \quad (3.97)$$

$$\delta = \frac{1}{[E]_{lim}} \cdot \left\{ \left([E]_0 - \frac{v \cdot [E]_1}{K_d} \right) \cdot [\exp(-K_d \cdot t_{lim}) - 1] - v \cdot [E]_1 \cdot t_{lim} - [E]_1 \right\} \quad (3.98)$$

3.6.2 - Comparação Entre os Modelos de Adição Total e Parcial de Enzima

Uma comparação entre a condição de adição total de enzima no início da reação, desenvolvida por BERGAMASCO (1989) e o modelo obtido nas Equações (3.90) a (3.98) foi realizada, visando avaliar as novas condições de reação.

O modelo foi aplicado às condições descritas no item 3.4, alterando a quantidade inicial de enzima para 0,0849 g, isto é, metade da quantidade total e adicionando-se o restante em 8 horas. Este tempo que corresponde ao t_{lim} , é aproximadamente a metade do tempo necessário para se atingir a conversão de 95 %. A adição da segunda parte da enzima, foi realizada através de uma solução de concentração 169,8 g/L a uma vazão de $2,5 \cdot 10^{-5}$ L/h num reator de 400 mL.

O resultado desta simulação pode ser expresso por:

$$0,01841 \cdot \ln(1 - X_A) - 0,2902 \cdot X_A - 2,6458 \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] =$$

$$-0,1419 \cdot [\exp(-0,0468 \cdot t) - 1] - 0,01061 \cdot t \quad \text{para } 0 \leq t \leq 8 \quad (3.99)$$

e

$$t = -21,3675 \cdot \ln \left\{ 0,1425 \cdot \ln(1 - X_A) - 2,2463 \cdot X_A - 20,4781 \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] + 1,3142 \right\}$$

$$+ 8 \quad \text{para } t > 8 \quad (3.100)$$

Na Figura 3.27 pode-se observar a comparação entre os modelos descritos pelas Equações (3.73), (3.99) e (3.100).

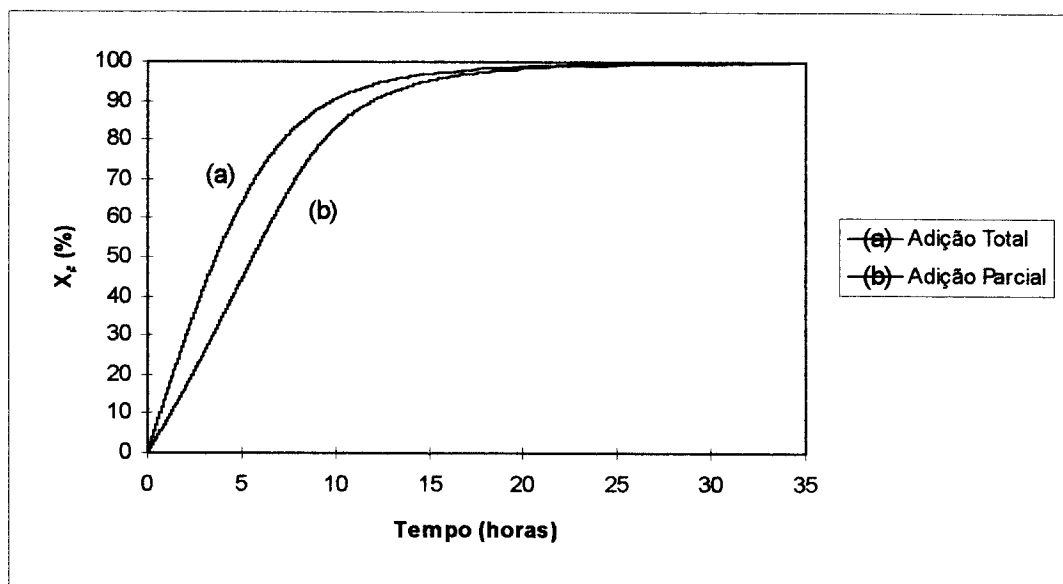


FIGURA 3.27 - Comparação Entre os Modelos de Adição Total e Parcial de Enzima ao Meio Reacional.

A análise da Figura 3.27 mostra que não houve ganho no desempenho da reação pelo fato de haver adição distribuída da enzima ao longo do tempo, nas condições anteriores de simulação.

3.7 - SIMULAÇÃO DE CONDIÇÕES DE ADIÇÃO DE ENZIMA AO MEIO REACIONAL

Apresenta-se nesta seção a simulação do modelo obtido no item 3.6, com o objetivo de investigar a possibilidade de obtenção de uma situação oposta àquela obtida no item 3.6.2, através das Equações (3.99) e (3.100), ou seja, um melhor desempenho de reação do que ao correspondente à adição total da enzima no início da reação.

As condições de simulação foram as mesmas descritas no item 3.4, variando-se a quantidade inicial de enzima no meio reacional, e o tempo de adição para o restante de enzima (t_{lim}), que é definido como uma fração de tempo necessário para se atingir a conversão de 95 %, com adição total de enzima.

Considerando o volume total de solução de enzima a ser adicionado igual a 0,4 mL num reator de 400 mL, com concentração inicial de enzima e t_{lim} dados por:

$$[E]_0 = 0,1698 \cdot \alpha \quad (3.101)$$

$$e \quad t_{lim} = 16 \cdot \beta \quad (3.102)$$

onde α e β têm valor entre zero e um. Dezesesseis (16) horas é aproximadamente o tempo necessário para se atingir a conversão de 95 %, com adição total de enzima no início da reação. Escolhendo $[E]_1 = 169,8$ mg de Enzima/mL, resulta para a segunda parte da enzima a ser adicionada ($0,1698 \cdot (1 - \alpha) \cdot V_u = E_1 \cdot Q \cdot t_{lim}$):

$$v = \frac{Q}{V_u} = \frac{(1 - \alpha)}{16000 \cdot \beta} \quad (3.103)$$

$$[E]_{lim} = \left([E]_0 - \frac{169,8 \cdot v}{0,0468} \right) \cdot \exp(-0,0468 \cdot t_{lim}) + \frac{169,8 \cdot v}{0,0468} \quad (3.104)$$

$$\delta = \frac{1}{[E]_{lim}} \cdot \left\{ \left([E]_0 - \frac{169,8 \cdot v}{0,0468} \right) \cdot [\exp(-0,0468 \cdot t_{lim}) - 1] - v \cdot 169,8 \cdot t_{lim} - [E]_{lim} \right\} \quad (3.105)$$

onde α é fração inicial de enzima no meio reacional (0 a 1) e β a fração de tempo necessário para se atingir a conversão de 95 % com adição total de enzima (0 a 1).

As Equações (3.90) e (3.91) podem ser expressas por:

$$0,01841 \cdot \ln(1 - X_A) - 0,2902 \cdot X_A - 2,6458 \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] =$$

$$\left([E]_0 - \frac{169,8 \cdot v}{0,0468} \right) \cdot [\exp(-0,0468 \cdot t) - 1] - v \cdot 169,8 \cdot t \quad \text{para } 0 \leq t \leq t_{lim} \quad (3.106)$$

e

$$t = -21,3675 \cdot \ln \left\{ \frac{0,01841}{[E]_{lim}} \cdot \ln(1 - X_A) - \frac{0,2902}{[E]_{lim}} \cdot X_A - \frac{2,6458}{[E]_{lim}} \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] - \delta \right\}$$

$$+ t_{lim} \quad \text{para } t > t_{lim} \quad (3.107)$$

Para fins de apresentação dos resultados de simulação, as Equações (3.106) e (3.107) podem ser expressas por:

$$0,01841 \cdot \ln(1 - X_A) - 0,2902 \cdot X_A - 2,6458 \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] =$$

$$-A_1 \cdot [\exp(-0,0468 \cdot t) - 1] - B_1 \cdot t \quad \text{para } 0 \leq t \leq t_{lim} \quad (3.108)$$

e

$$t = -21,3675 \cdot \ln \left\{ A_2 \cdot \ln(1 - X_A) - B_2 \cdot X_A - C_2 \cdot \ln[0,9033 + 0,0967 \cdot (1 - X_A)] - \delta \right\}$$

$$+ t_{lim} \quad \text{para } t > t_{lim} \quad (3.109)$$

$$\text{onde: } A_1 = [E]_0 - \frac{169,8 \cdot v}{0,0468} \quad (3.110)$$

$$B_1 = 169,8 \cdot v \quad (3.111)$$

$$A_2 = \frac{0,01841}{[E]_{\text{lim}}} \quad (3.112)$$

$$B_2 = \frac{0,2902}{[E]_{\text{lim}}} \quad (3.113)$$

$$C_2 = \frac{2,6458}{[E]_{\text{lim}}} \quad (3.114)$$

Na Tabela 3.13 são apresentados os valores obtidos para os parâmetros A_1 , B_1 , A_2 , B_2 , C_2 , δ e t_{lim} para alguns valores de α e β .

TABELA 3.13 - Valores dos Coeficientes das Equações (3.108) e (3.109).

α	β	A_1	B_1	A_2	B_2	C_2	δ	t_{lim}
0,25	0,25	0,6378	0,03184	0,1216	1,9175	17,4821	1,2220	4
0,25	0,50	0,2977	0,01592	0,1359	2,1430	19,5378	1,2539	8
0,25	0,60	0,2410	0,01397	0,1420	2,2380	20,4038	1,3095	9,6
0,50	0,25	0,3686	0,02123	0,1245	1,9630	17,8973	1,1486	4
0,50	0,50	0,1419	0,01061	0,1425	2,2463	20,4781	1,3142	8
0,50	0,60	0,1041	0,008844	0,1502	2,3677	21,5871	1,3854	9,6
0,60	0,25	0,2609	0,01698	0,1257	1,9819	18,0689	1,1596	4
0,60	0,50	0,07953	0,008490	0,1453	2,2901	20,8796	1,3400	8
0,60	0,60	0,04930	0,007055	0,1538	2,4240	22,0998	1,4183	9,6

3.7.1 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima

Nas Figuras 3.28, 3.29 e 3.30 pode-se observar a influência da quantidade inicial de enzima presente no meio reacional para alguns valores de β , bem como a comparação com o modelo obtido para a adição total de enzima no meio reacional.

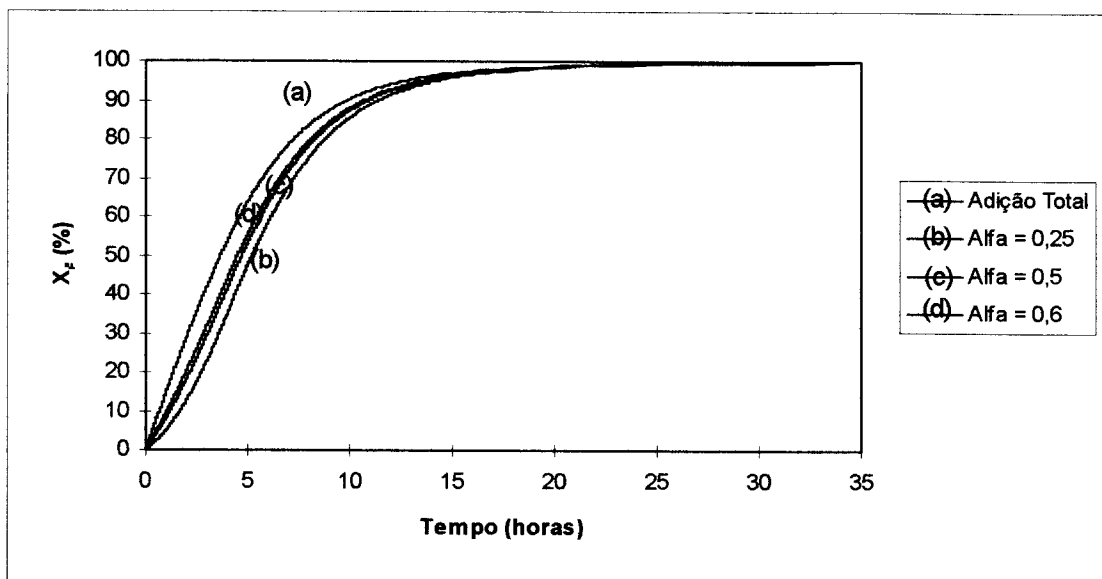


FIGURA 3.28 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima para $\beta = 0,25$.

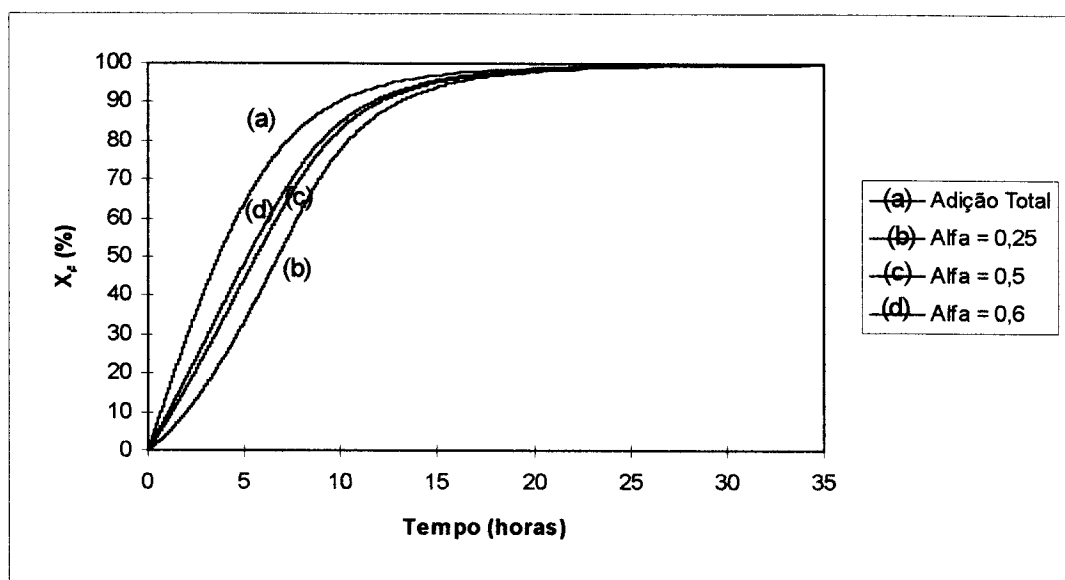


FIGURA 3.29 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima para $\beta = 0,50$.

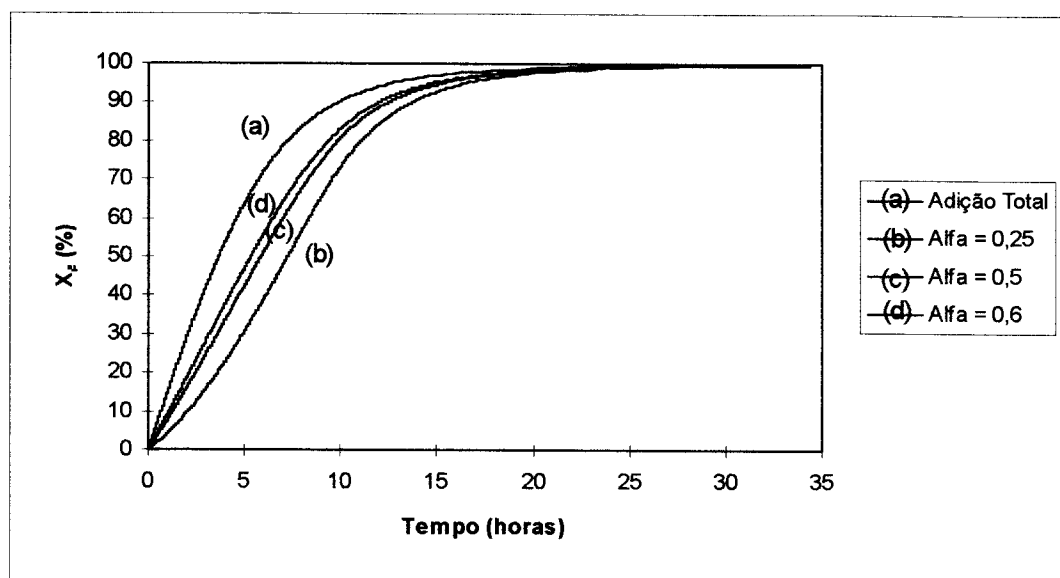


FIGURA 3.30 - Influência da Quantidade Inicial de Enzima para $\beta = 0,60$.

Observa-se das Figuras 3.28, 3.29 e 3.30 que independentemente do tempo de adição do restante da solução de enzima, quanto maior a quantidade inicial de enzima, melhor o desempenho da reação, sendo que o melhor desempenho ainda é obtido pela adição total de enzima no início da reação.

3.7.2 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima

Nas Figuras 3.31, 3.32 e 3.33 pode-se observar a influência do tempo de adição da solução de enzima para alguns valores de α , bem como a comparação com o modelo obtido para adição total de enzima no meio reacional.

Observa-se das Figuras 3.31, 3.32 e 3.33 que, independentemente da quantidade inicial de enzima, quanto menor o tempo de adição do restante da solução de enzima, melhor o desempenho da reação, sendo que o melhor desempenho ainda é obtido pela adição total de enzima no início da reação.

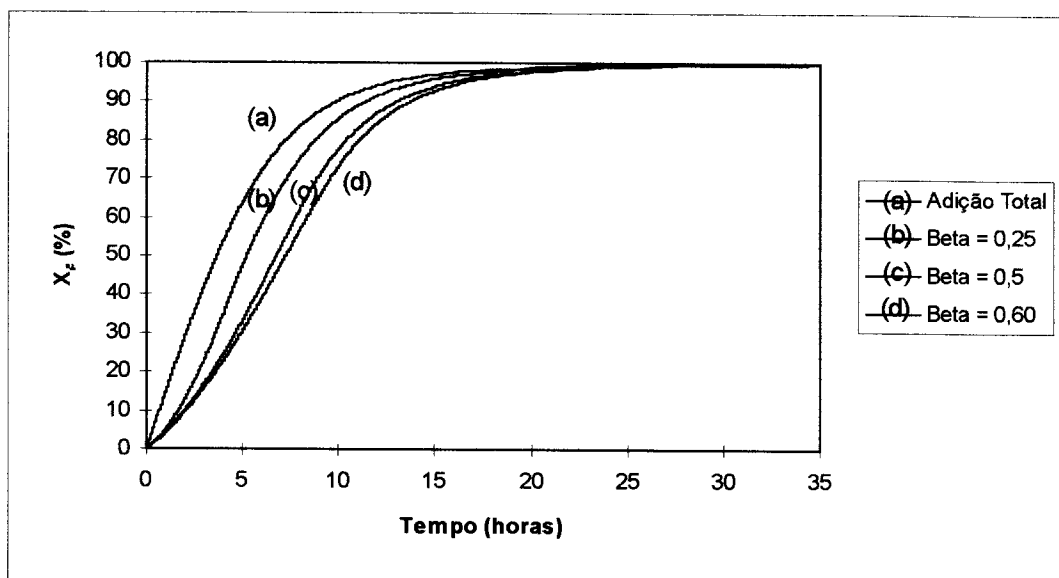


FIGURA 3.31 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima para $\alpha = 0,25$.

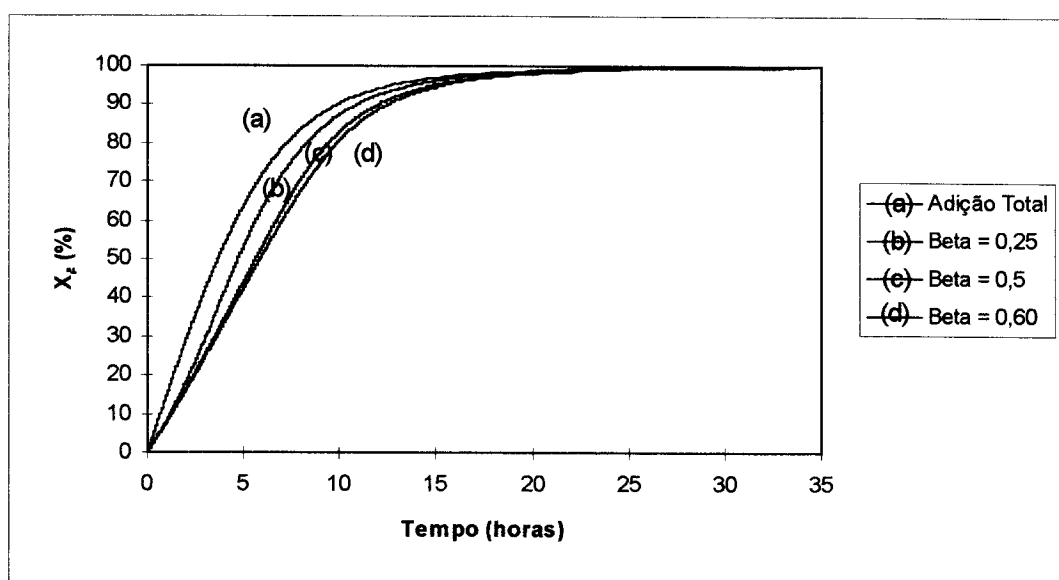


FIGURA 3.32 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima para $\alpha = 0,50$.

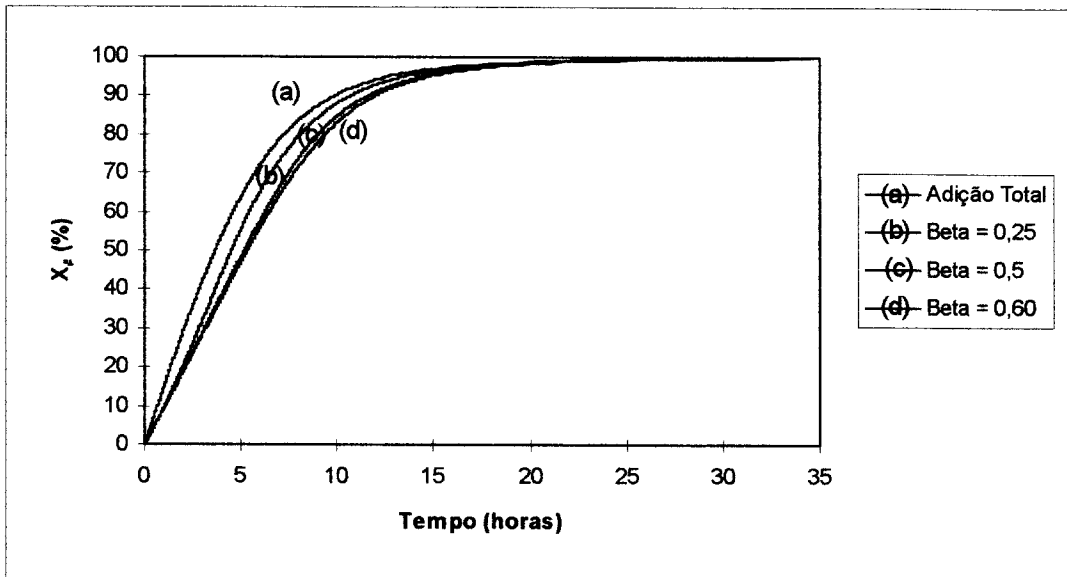


FIGURA 3.33 - Influência do Tempo de Adição da Solução de Enzima para $\alpha = 0,60$.

IV - CONCLUSÕES

Nesta seção serão apresentadas as conclusões decorrentes do desenvolvimento dos modelos e simulação das condições de hidrólise da sacarose pela enzima invertase, em reator homogêneo do tipo batelada.

O ajuste dos modelos desenvolvidos neste trabalho aos dados experimentais obtidos por BERGAMASCO (1989), mostrou que o modelo de BOWSKI et alii (1971) quando são incorporados os efeitos de desativação térmica da enzima e inibição pela concentração dos produtos formados na reação é o que melhor representa os dados experimentais, independentemente da hipótese da concentração de água ser considerada constante ou variável no meio reacional.

A simulação das condições de desenvolvimento da reação mostrou que, à medida que se tem um aumento na concentração inicial de substrato no meio reacional, são requeridos maiores tempos de reação para se atingir uma dada conversão, independentemente da hipótese considerada para a concentração de água (constante ou variável). Observa-se também que, para as diversas condições de concentração inicial e hipóteses da concentração de água, para as temperaturas de 50 e 55 °C não há alteração na conversão máxima obtida na reação, enquanto para uma temperatura de 60 °C há uma redução na conversão máxima à medida em que se tem um aumento na concentração inicial de substrato, uma vez que, em função da sensível desativação térmica nesta temperatura, não há tempo suficiente para converter todo o substrato presente na reação.

O desempenho obtido na reação é bastante próximo para as temperaturas de 50 e 55 °C, com predomínio na conversão para a temperatura de 55 °C para tempos de zero até próximos do necessário para a conversão em torno de 95 a 99%, dependendo da

predomínio para a temperatura de 50 °C, pois a desativação térmica apresenta maior influência de desnaturação da enzima para 55 °C e tempos longos de reação.

Em todas as condições de simulação, em condições idênticas de reação, e para o mesmo tempo de reação, a hipótese da concentração de água variável gera valores maiores de conversão do que para o caso da hipótese de concentração de água constante.

O ajuste dos modelos aos dados experimentais, mostra boa qualidade em ambas as hipóteses de concentração de água. Em função disto, e considerando que a água é consumida na reação, por se tratar de um reagente, o modelo mais adequado deve considerar a concentração de água como variável.

A hipótese de adição parcial de enzima, com o restante sendo adicionado ao longo do tempo, foi verificada para uma condição de interesse industrial, visando obter-se menores tempos de reação em função do melhor aproveitamento da enzima através da redução do efeito de desativação térmica. Os resultados de simulação mostraram que a vantagem não foi suficiente para se obter melhor desempenho com relação à situação idêntica com adição total de enzima no início da reação.

A variação da quantidade inicial da enzima presente no meio reacional mostra que, quanto maior for esta quantidade, mantendo-se fixo o tempo de adição do restante da solução de enzima, menores tempos são necessários para se atingir a conversão máxima, sendo coerente portanto com a melhor condição de desempenho para toda a enzima presente no início da reação.

A simulação mostra também que, na hipótese de adição de enzima distribuída ao longo do tempo, a melhor situação é obtida para adição em menores intervalos de tempo, caracterizando a redução do efeito de desativação térmica da enzima.

V - SUGESTÕES

Visando a obtenção de melhores condições de desenvolvimento da reação de hidrólise da sacarose pela enzima invertase, com o objetivo de sua utilização industrial face à grande potencialidade econômica deste processo, sugere-se a exploração dos seguintes aspectos:

- Estudar o processo com outros tipos de reatores;
- Imobilização da enzima invertase e sua aplicação em diversos tipos de reatores.
- Estudar a estabilidade térmica da enzima em diferentes concentrações de substrato.
- Estudar a cinética considerando-se a formação de dois produtos (glicose e frutose), produzidos simultaneamente ou seqüencialmente.
- Determinar independentemente as constantes de inibição da glicose e frutose.
- Estudar problemas de micromistura, tendo em vista a dissolução de uma pequena quantidade de solução enzimática num grande volume de solução de sacarose com viscosidade relativamente elevada.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd Ed., New York, McGraw-Hill, Cap. 3, 1986.
- BARKER, S. A. Pure fructose syrups - Process Biochemistry, 11 (10), 20, 1976.
- BASTA, N. Immobilization routes - They're not standing still. Chem. Engineering, 19, 5, April, 1982.
- BERGAMASCO, R.; Cinética da Hidrólise da Sacarose Pela Invertase - Modelagem Matemática. Tese de Mestrado: Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, 1989.
- BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. Introdução à Química de Alimentos. Campinas, Fundação Cargil, 1985.
- BOUDRANT, J. & CHEFTEL, C. Continuous hydrolysis of sucrose by invertase absorbed in a tubular reactor. Biotechnol. Bioeng., Vol. XVII, 827-44, 1975.
- BOWSKI, L.; SAINI, R.; RYU, D.Y. e VIETH, W. R. Kinetic modeling of the hydrolysis of sucrose by invertase. Biotechnol. Bioeng., 13:641-56, 1971.
- BUCKE, C. Enzymes in fructose manufacture, In: "Enzymes and Food Processing", edited by G. G. Birch; N. Blakebrough and K. J. Parker, London, Applied Science Publisher, 1981.
- CABRAL, F. A. Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio. Tese de Mestrado: Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 1989.

- CARASIK, W. & CARROLL, J. O. Development of immobilized enzymes for production of high - fructose corn syrup - Food Technology, p. 85, October, 1983.
- CASTELLANI, J. B. S. Produção e importância do xarope glicosado de cana-de-açúcar. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, (35); 71-7, 1973.
- CHEETHAM, P. S. J. Principles of industrial enzymology: basis of utilization of soluble and immobilized enzymes in industrial processes. In: Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed.; Ed. A. Wiseman, Chichester, John Wiley & Sons, 1985.
- CHIBATA, I. Immobilized Enzymes - Research and Development. New York, John Wiley & Sons, 1978.
- CUNHA, B. C. A. & VITOLLO, M. Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalysed by invertase obtained from *S. cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. Vol. XXVI, 811-13, 1984.
- DICKENSHEETS, P. A.; CHEN, L. F. e TSAO, G. T., Characteristics of yeast invertase immobilized on porous cellulose beads. Biotechnol. Bioeng., 19, 365-375 (1977).
- DIXON, M. & WEBB, E. C. Enzymes, 3rd ed., London, Longman Group Limited, Cap. 2, 1979.
- DRAETTA, I. S. Isolamento, purificação e cinética da invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 4: 23-37, 1971/72.
- GASCON, S.; NEUMANN, N. P. e LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. The Journal of Biological Chemistry, 243 (7): 1573-7, Apr., 10. 1967.

- HARTMEIER, W. Immobilize biocatalysts - An introduction.
Trans. J. WIESER, Berlin, Springer - Verlag, 1988.
- HAWCROFT, D. Diagnostic enzymology-analytical chemistry by open learning. Ed. A. M. James, Chichester, John Wiley & Sons, Cap. 2, 1987.
- IMAI, K.; SHIOMI, T.; SATO, K. e FUJISHIMA, A. Preparation of immobilized invertase using poly (vinil alcohol) membrane. Biotechnol. Bioeng.; Vol. XXV, 613-17, 1983.
- MANSFELD, J. & SCHELLENBERGER, A., Invertase immobilized on macroporous polystyrene: properties and kinetic characterization. Biotechnol. Bioeng., 29, 72-78 (1985).
- MARC, A. Cinetique et modelisation de reacteurs a glucoamylase soluble et immobilisee. Tese de Doutorado, Inst. Nat. Polytechnique de Lorraine, 1985.
- McLAREN, A. D. Enzyme reactions in structurally restricted systems III. Yeast 8 - fructofuranosidase (invertase) activity in concentrated sucrose solutions. Enzimologia, 26: 1-11, 1963.
- MESSING, R. S. Immobilized enzymes for industrial reactors. New York, Academic Press, 1975.
- MORRISON, R. T. & BOYD, R. N. "Química Orgânica". São Paulo, Edições Cardoso, 1961.
- NELSON, J. M. & SCHUBERT, M. P. Water concentration and the rate of hydrolysis of sucrose by invertase. Journal of the American Chemical Society, 50 (8), 1928.
- RUCHTI, J. & McLAREN, D. A. Enzyme reactions in structurally restricted systems V. Further observations on the kinetics

- of yeast β -fructofuranosidase (invertase) activity in viscous media. Enzimologia, 27: 185-98, 1964.
- SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. New York, John Wiley & Sons, In: Capítulos 1, 2, 3, 4 e 11, 1975.
- SIIMER, E. Generalized rate equation for one substrate enzymatic reactions. Biotechnol. Bioeng., 20, 1853-64, 1978.
- SILVER, M. & KAREL, M. The behaviour of invertase in model systems at low moisture contents. Journal of Food Biochemistry, 5, 283-311, 1981.
- VAN DEN HEUVEL, J. C. & BEEFTINK, H. H. Kinetic effects of simultaneous inhibition by substrate and product. Biotechnol. Bioeng., 31, 718-24, 1988.
- WHISTLER, R. L. & ZYSK, J. R. Carbohydrates. In: Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 4, 3rd Edition, New York, John Wiley & Sons, 1978.
- WISEMAN, A. Handbook of enzyme biotechnology. Second edition, Ellis Horwood Limited, New York, 1985.
- WISEMAN, A. & WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. Process Biochemistry, 10(6): 24-30, Jul/Aug., 1975.
- WOODWARD, J. & WISEMAN, A. Invertase. In: C. K. Lee e M. G. LINDLEY (Ed), Developments in food carbohydrate-3. London, Applied Science Publishers, 1982.
- ZANIN, G. M. Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidade Imobilizada. Tese de Doutorado: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1989.

VII - ANEXOS

7.1 - ANEXO I - Velocidade Inicial em Função da Concentração de Substrato

Serão apresentados a seguir os dados de velocidade inicial em função da concentração de substrato, obtidos por BERGAMASCO (1989).

TABELA 7.1.1 - Velocidade Inicial em Função da Concentração de Substrato (BERGAMASCO, 1989).

[S] - (g/L)	V - (g/L.h)
5	0,4613
10	0,9234
15	1,3416
50	2,0988
90	2,2032
120	2,4009
180	2,3448
200	2,2070
300	2,0730
400	1,7024
500	1,5820
600	1,2357
800	0,8642

7.2 - ANEXO II - Programa FITPOR

Este programa ajusta, pelo método dos polinômios ortogonais, polinômios de grau n na forma $y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$.

```

10 REM Ajuste Polinomios Ortogonais FITPOR
20 DIM X(20), Y(20), V(20), A(20), B(20), C(20), D(20), C2(20),
    E(20), F(20), VE(20)
30 IF PG > 0 THEN PRINT CHR$(12)
45 INPUT "Ajuste S/V "; C$
50 INPUT "GRAU DO POLINOMIO:"; M: MF = M
60 INPUT "FATOR DE REDUCAO DE ERRO:"; E
70 INPUT "NUMERO DE PONTOS:"; N
80 FOR I = 1 TO N
90 PRINT "X("; I; "),Y("; I; ")="; : INPUT " "; X(I), Y(I): IF
    C$ = "N" THEN 100
95 VE(I) = Y(I): Y(I) = X(I) / Y(I)
100 NEXT I
120 FOR I = 1 TO N: PRINT TAB(6); I; TAB(9); X(I); : IF C$ =
    "N" GOTO 127
125 PRINT TAB(22); VE(I): GOTO 135
127 PRINT TAB(22); Y(I)
135 NEXT I
140 INPUT "Correcao Dados"; B$
150 IF B$ = "N" THEN 180
160 INPUT "I="; I: PRINT "X("; I; "),Y("; I; ")="; : INPUT " ";
    X(I), Y(I): IF C$ = "N" THEN 170
165 VE(I) = Y(I): Y(I) = X(I) / Y(I)
170 GOTO 140
180 M = MF: GOSUB 1000
190 PRINT "COEFICIENTES AJUSTADOS:"
200 FOR I = 0 TO L
210 PRINT "A("; I; ")="; : PRINT USING "#####.#####";
    C(I): NEXT I
220 PRINT "DESVIO PADRAO="; : PRINT USING "####.#####"; D
230 PRINT "COEFICIENTE DE CORRELACAO="; : PRINT USING
    "###.#####"; R
235 IF C$ = "N" THEN 300
240 FOR I = 1 TO N
250 V(I) = X(I) / V(I): NEXT I
260 PRINT " I      S          V          VC          S/V"
270 FOR I = 1 TO N: PRINT USING "##"; I;
280 PRINT USING "#####.###"; X(I); VE(I); V(I); Y(I): NEXT I
290 PRINT : GOTO 600
300 PRINT " I      X          Y          YC"
310 FOR I = 1 TO N: PRINT USING "##"; I;
320 PRINT USING "#####.###"; X(I); Y(I); V(I): NEXT I: PRINT
600 K = 0: KA = 0
610 INPUT "Adicao pto"; A$: IF A$ = "N" GOTO 630
620 N = N + 1: PRINT "X("; N; ")=,Y("; N; ")="; : INPUT " ";
    X(N), Y(N): IF C$ = "N" THEN 625
622 VE(N) = Y(N): Y(N) = X(N) / Y(N)

```



```

625 K = 1: GOTO 610
630 INPUT "Retirar pto"; B$
640 IF (B$ = "N" AND K = 1) OR (B$ = "N" AND KA = 1) GOTO 180
650 IF B$ = "N" AND A$ = "N" GOTO 700
660 INPUT "I="; I: FOR J = I TO N: X(J) = X(J + 1): Y(J) = Y(J
+ 1): VE(J) = VE(J + 1): NEXT J
670 KA = 1: N = N - 1: GOTO 630
700 INPUT "DESEJA REPETIR O PROGRAMA? S OU N"; A$
710 IF A$ = "S" GOTO 720 ELSE 800
720 PG = PG + 1: GOTO 30
800 END
1000 REM SUBROTINA (LSQRPOLY)
1050 PRINT "CALCULANDO - PACIENCIA!"
1100 N1 = M + 1
1110 V1 = 10000000#
1120 FOR I = 1 TO N1
1130 A(I) = 0!: B(I) = 0!: F(I) = 0!: NEXT I
1150 SY = 0!: FOR I = 1 TO N: SY = SY + Y(I)
1160 V(I) = 0!: D(I) = 0!: NEXT I: YM = SY / N
1180 D1 = SQR(N): W = D1: F1 = D1: A1 = 0!
1200 FOR I = 1 TO N: E(I) = 1! / W: NEXT I
1250 DY = 0!: FOR I = 1 TO N: DY = DY + (Y(I) - YM) ^ 2
1260 A1 = A1 + X(I) * E(I) ^ 2: NEXT I
1280 C1 = 0
1290 FOR I = 1 TO N
1300 C1 = C1 + Y(I) * E(I): NEXT I
1320 B(1) = 1! / F1: F(1) = B(1) * C1
1340 FOR I = 1 TO N
1350 V(I) = V(I) + E(I) * C1: NEXT I
1370 M = 1
1380 FOR I = 1 TO L: C2(I) = C(I): NEXT I
1410 L2 = L: V2 = V: F2 = F1: A2 = A1: F1 = 0!
1420 FOR I = 1 TO N
1430 B1 = E(I)
1440 E(I) = (X(I) - A2) * E(I) - F2 * D(I)
1450 D(I) = B1: F1 = F1 + E(I) ^ 2: NEXT I
1480 F1 = SQR(F1)
1490 FOR I = 1 TO N: E(I) = E(I) / F1: NEXT I
1520 A1 = 0: FOR I = 1 TO N
1540 A1 = A1 + X(I) * E(I) ^ 2: NEXT I
1560 C1 = 0: FOR I = 1 TO N
1580 C1 = C1 + E(I) * Y(I): NEXT I
1600 M = M + 1: I = 0
1620 L = M - I: B2 = B(L): D1 = 0!
1640 IF L > 1 THEN D1 = B(L - 1)
1650 D1 = D1 - A2 * B(L) - F2 * A(L)
1660 B(L) = D1 / F1: A(L) = B2
1670 I = I + 1
1680 IF I <> M THEN GOTO 1620
1690 FOR I = 1 TO N
1700 V(I) = V(I) + E(I) * C1: NEXT I
1720 FOR I = 1 TO N1
1730 F(I) = F(I) + B(I) * C1: C(I) = F(I): NEXT I
1750 V = 0: FOR I = 1 TO N
1760 V = V + (V(I) - Y(I)) ^ 2: NEXT I

```

```
1800 VT = DY - V: R = SQR(VT / DY): V = SQR(V / (N - L - 1))
1810 L = M
1820 IF E = 0 THEN GOTO 1860
1830 IF ABS(VI - V) / V < E THEN GOTO 1960
1840 IF E * V > K * V1 THEN GOTO 1960
1850 V1 = V
1860 IF M = N1 THEN GOTO 1890
1870 GOTO 1380
1890 FOR I = 1 TO L: C(I - 1) = C(I): NEXT I
1920 C(L) = 0!: L = L - 1: D = V: RETURN
1960 L = L2: V = V2
1970 FOR I = 1 TO L
1980 C(I) = C2(I): NEXT I: GOTO 1890
```

7.3 - ANEXO III - Programa DCTE

Este programa calcula, pelo método dos mínimos quadrados, o valor do parâmetro de inibição pelos produtos, para o modelo que considera a concentração de água constante.

```
5 CLEAR
10 REM CALCULO DO VALOR DE D - W cte
15 DIM X(65), T(65), F(65), E(65), H(65), J(65), K(65)
20 INPUT "NUMERO DE PONTOS:"; N
30 FOR I = 1 TO N
40 PRINT "X("; I; "),T("; I; ")="; : INPUT " "; X(I), T(I)
50 NEXT I
55 P = 0: Q = 0: R = 0: S = 0
60 FOR I = 1 TO N
70 F(I) = (-.2951) * (LOG(1 - X(I)) + X(I))
80 E(I) = (EXP(-.0468 * T(I)) - 1) * F(I) / .0468
90 P = P + E(I)
100 H(I) = X(I) * F(I)
110 Q = Q + H(I)
120 J(I) = LOG(1 - X(I)) * F(I)
130 R = R + J(I)
140 K(I) = 1.7654 * X(I) ^ 2 * F(I)
150 S = S + K(I)
160 NEXT I
170 D = (6.5252 * Q - .1188 * R + P - S) / (.2951 * (Q + R))
180 PRINT "D="; D
190 END
```

7.4 - ANEXO IV - Programa DVAR

Este programa calcula, pelo método dos mínimos quadrados, o valor do parâmetro de inibição pelos produtos para o modelo que considera a concentração de água variável.

```

5 CLEAR
10 REM CALCULO DO VALOR DE D - W var
15 DIM X(65), T(65), G(65), L(65), M(65), N(65), P(65)
20 INPUT "NUMERO DE PONTOS:"; N
30 FOR I = 1 TO N
40 PRINT "X("; I; "),T("; I; ")="; : INPUT " "; X(I), T(I)
50 NEXT I
55 E = 0: H = 0: J = 0: K = 0
60 FOR I = 1 TO N
70 G(I) = (-.3267) * LOG(1 - X(I)) + 3.3786 * LOG(.9033 +
    .09669 * (1 - X(I)))
80 L(I) = (EXP(-.0468 * T(I)) - 1) * G(I) / .0468
90 E = E + L(I)
100 M(I) = 36.5209 * X(I) * G(I)
110 H = H + M(I)
120 N(I) = LOG(1 - X(I)) * G(I)
130 J = J + N(I)
140 P(I) = LOG(.9033 + .09669 * (1 - X(I))) * G(I)
150 K = K + P(I)
160 NEXT I
170 D = (310.0974 * K - .1316 * J + H + E) / (.3267 * J -
    3.3786 * K)
180 PRINT "D="; D
190 END

```

7.5 - ANEXO V - Dados de Conversão em Função do Tempo

Serão apresentados a seguir os dados de conversão em função do tempo, no reator batelada, apresentados em BERGAMASCO (1989).

TABELA 7.5.1 - Dados de Conversão em Função do Tempo no Reator Batelada (BERGAMASCO, 1989).

Tempo (h)	X_A (%)
0,08333	3,94
0,1667	4,19
0,25	5,48
0,3333	6,43
0,4167	7,26
0,5	9,37
0,5833	9,77
0,6667	10,71
0,75	11,21
0,8333	12,45
0,9167	13,85
1	15,14
1,5	21,85
2	26,9
2,5	33,33
3	36,79
3,5	39,14
4	43,12
4,5	50,51
5	55,13
5,5	56,34
6	59,22
6,5	60,88
7	62,48
7,5	67,44

8	70,86
8,5	72,22
9	69,21
9,5	73,6
10	76,78
10,5	77,15
11	80,51
11,5	82,2
12	84,2
12,5	85,11
13	86,83
13,5	87,62
14	88,76
14,5	90,39
15	91,81
15,5	95,38
16	93,68
16,5	96,11
17	96,1
17,5	95,96
18	95,96
18,5	97,18
19	96,44
19,5	96,96
20	96,77
20,5	96,6
21	95,79
25	98,47
26	97,38
26,5	99,26
27	97,28
27,5	99,33
28	99,99
29	99,74
30	98,47

31	97,28
32	98,47
33	93,99
34	99,99

7.6 - ANEXO VI - Dados de Conversão em Função do Tempo

Serão apresentados a seguir os dados de conversão em função do tempo, no reator batelada, utilizados para o cálculo do parâmetro de inibição pelos produtos da reação, obtidos a partir da seleção dos dados do Anexo V, que representam uma curva crescente de conversão em função do tempo.

TABELA 7.6.1 - Dados de Conversão em Função do Tempo no Reator Batelada, Utilizados no Cálculo do Parâmetro de Inibição Pelos Produtos da Reação.

Tempo (h)	X _A (%)
0,08333	3,94
0,1667	4,19
0,25	5,48
0,3333	6,43
0,4167	7,26
0,5	9,37
0,5833	9,77
0,6667	10,71
0,75	11,21
0,8333	12,45
0,9167	13,85
1	15,14
1,5	21,85
2	26,9
2,5	33,33
3	36,79
3,5	39,14
4	43,12
4,5	50,51
5	55,13
5,5	56,34
6	59,22

6,5	60,88
7	62,48
7,5	67,44
8	70,86
8,5	72,22
9,5	73,6
10	76,78
10,5	77,15
11	80,51
11,5	82,2
12	84,2
12,5	85,11
13	86,83
13,5	87,62
14	88,76
14,5	90,39
15	91,81
15,5	95,38
16,5	96,11
18,5	97,18
25	98,47
26,5	99,26
27,5	99,33
29	99,74
34	99,99