

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

200331906

RECUPERAÇÃO DAS ENZIMAS α E β - AMILASES
EM SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG / CaCl_2
PARA USO COMO BIOCATALISADOR DE AMILÁCEOS

Autor: José Carlos Curvelo Santana

Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Jordão

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza

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

Campinas - São Paulo
Junho de 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	80
Nº CHAMADA T/UNICAMP	Sa 59r
V	EX
TOMBO BC/	56034
PROC.	16-124/03
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/10/03
Nº CPD	

CM00190893-4

83.04 303200

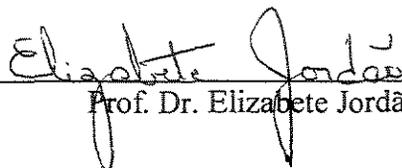
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Sa59r Santana, José Carlos Curvelo
 Recuperação das enzimas α e β - amilases em sistema bifásico aquoso PEG / CaCl_2 para uso como biocatalisador de amiláceos / José Carlos Curvelo Santana.—Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadores: Elizabete Jordão e Roberto Rodrigues de Souza
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bioengenharia. 2. Cinética de enzimas. I. Jordão, Elizabete. II. Souza, Roberto Rodriguez de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por José Carlos Curvelo Santana e aprovada em (dia) de (mês) de (ano) pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Elizabeth Jordão (Orientadora)

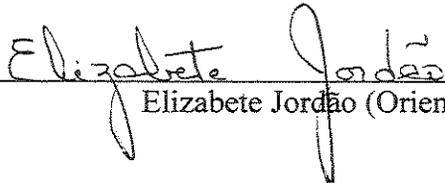


Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi (titular)



Prof. Dr. Alessandra Lopes de Oliveira (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.


Elizabete Jordão (Orientadora)

Versos íntimos

Vês?! Ninguém assistiu ao formidável

¹fantasia, sonho

Enterro de tua última quimera¹.

Somente a Ingratidão – Esta pantera –

Foi tua companheira inseparável!

Acostuma-te à lama que te espera!

O homem que nesta terra miserável,

Mora, entre feras, sente inevitável

Necessidade de também ser fera.

Toma um fósforo. Acende teu cigarro!

O beijo, amigo, é a véspera do escarro,

A mão que afaga é a mesma que apedreja.

Se alguém causa inda² pena a tua chaga,

²ainda

Apedreja esta mão vil que te afaga,

Escarra nesta boca que te beija!

O conhecimento é uma questão de ciência,
não admite a menor desonestidade ou presunção.

O que se requer é precisamente o contrário

- honestidade e modéstia.

Se se deseja adquirir conhecimento,
é preciso tomar parte na prática que transforma a realidade.”

TSE TUNG, M. (1999).

A memória do meu pai, que se dedicou à educação dos filhos, fazendo o possível e o impossível para dar-lhes o que jamais teve – acesso a educação – e graças a ele alcancei este título que todos almejam, mas poucos conseguem . Pai jamais serás esquecido, pois morará sempre em nossos corações.

A minha mãe e todos os meus familiares, por (junto com meu pai) servirem de espelho para a minha educação e pelo incentivo ao estudo continuado.

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esta jornada, fornecendo a minha pessoa sentimentos de paz, amor, amizade e fraternidade, de tal forma que lembrarei-me sempre de vocês.

A estes dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por manter-me com saúde física e mental suficiente para vencer os obstáculos que a vida nos proporciona durante a busca da felicidade, através do trabalho continuado, da realização pessoal e do amor ao próximo.

A todos os meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, dando-me apoio e incentivo moral para que concluísse mais uma etapa da minha jornada.

Aos professores Elizabete Jordão e Roberto Rodrigues de Souza pela orientação, dedicação, incentivo, paciência e compreensão e principalmente pela amizade a mim prestado, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Elias Basile Tambourgi, Alessandra Lopes de Oliveira e Rosemeri Melo e Souza, pelas suas preciosas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho – Dicas estas, que só poderiam vir de alguém que possua ‘know-how’ na área.

A todos professores, colegas e amigos do DESQ-FEQ-UNICAMP, por toda colaboração, amizade e incentivo a mim prestado.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe responsáveis pela minha formação durante a graduação, a qual deu-me base suficiente para superar os obstáculos acadêmicos, por terem me recebido de braços abertos e me incentivado durante esta jornada.

A todos meus amigos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe, aos alunos de iniciação científica do Grupo de Pesquisa em Biotecnologia e Meio Ambiente – GP BIOMA e principalmente aos alunos que trabalharam comigo durante o desenvolvimento deste trabalho, Alex Ferreira Evangelista, Graziela Batista Ferreira, João Baptista Severo Jr. e Joana Paula Menezes Biazus.

Serei para sempre muito grato a todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

Neste trabalho estudou-se o comportamento do sistema bifásico aquoso (SBA) PEG/ CaCl₂, a pH's 5,0; 6,0 e 7,0; e massas molares do polímero de 4000, 6000 e 8000, a condições ambientais de temperatura e pressão, bem como se determinou o coeficiente de partição com o sistema operando em batelada e contínuo, com a finalidade de recuperar as enzimas α e β -amilases de malte de milho (*Zea mays*), e desta forma agregar valor a esta cultura.

As enzimas foram obtidas pela germinação de sementes de milho selecionadas. Determinaram-se as atividades enzimáticas pelo método de Wohlguth modificado por Sandstedt, Kneen, Blich (1959) e pelo método do Laboratório Milles (1958) apresentados por REGULY (1996), bem como a concentração de proteína total pelo método de BRADFORD (1976). Comparou-se o comportamento cinético das enzimas em PEG e em malte, nas temperaturas e pHs ótimos. A recuperação foi feita em processo de extração em batelada e contínuo, com otimizações feitas a partir de planejamentos fatoriais dos experimentos.

Ao se caracterizar o SBA PEG/ CaCl₂ observou-se que seu comportamento foi semelhante aos descritos pela literatura. O modelo empírico que mais se ajustou aos dados da partição em batelada foi linear ao $\ln K$. A combinação do coeficiente de partição otimizado e dos melhores dados de atividade enzimática indicou o SBA PEG 4000/ CaCl₂, a pH 5,0; como sendo o melhor sistema a ser utilizado na extração contínua destas enzimas. O estudo cinético comparativo mostrou que as enzimas em PEG possuem um maior potencial catalítico que às em malte, com máxima atividade enzimática a 75°C.

A otimização da extração contínua apresentou como equação de processo, que mais se ajustou ao dados experimentais, o modelo quadrático da rotação das palhetas e da razão entre as vazões com o coeficiente de partição, sendo que sua região ótima se direciona para os menores valores destas variáveis independentes. Desta forma contribuiu-se na descoberta das condições ótimas de utilização do meio extrativo (SBA PEG / CaCl₂) e de operação da coluna de extração, para a recuperação das enzimas α e β -amilases de malte de sementes de milho (*Zea mays*).

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems (ATPS) PEG / CaCl₂ was studying in pH 5,0; 6,0 and 7,0 and polymer molecular weight 4000, 6000 and 8000, in environment pressure and temperature. The enzymes α and β - amylases from maize malt was recovered in bath and continuous extraction process, it was valorized this product.

The enzymes were obtained by germination of maize seeds. It was determinate of the enzymatic activity by modify Wohlghnuth method, Sandstedt, Kneen, Blich (1959) and Milles Laboratory method (1958), showed in REGULY (1996), and protein total by BRADFORD method (1976). The kinetic study was making between the enzymatic extract in PEG and maize malt, in optimum condition of enzymes. The enzymes were recovered in bath and continuous process systems. It was making an experimental plain for process optimization.

ATPS PEG/ CaCl₂ had similar conduct to literature description. The adjusted empiric model to bath partition was linear with $\ln K$. The combination of partition coefficient with enzymatic activity optimums showed the best system for recovery of the enzymes as been the ATPS PEG 4000/ CaCl₂, at pH 5,0. The kinetic study introduced a high catalytic power in enzymatic extract in PEG. The optimization of the continuous extraction process carried to a quadratic model of the pallet rotation and flow rate with the partition coefficient, where optimum region showed it in the value minor of the independents variables.

INDÍCE

Nomenclatura	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xi
Capítulo I - INTRODUÇÃO	1
1 – INTRODUÇÃO	3
Capítulo II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 - Sistemas bifásicos aquosos	9
2.1.1 - História do sistema bifásico aquoso	11
2.1.2 - Estudo das fases	14
2.2 - Estudo da partição	17
2.2.1 - Fatores que afetam a partição de biomoléculas	18
2.3 – Polímeros utilizados em sistemas bifásicos aquosos	20
2.3.1 – Polietileno glicol (PEG)	20
2.3.2 – Poli (α - 1,6 – glicose) ou dextrano	21
2.3.3 – Hidroxipropil amido ou reppal PES	22
2.3.4 – Uso de outros polímeros como alternativa para SBAs	23
2.4 - Equipamentos utilizados nas extrações líquido-líquido	23
2.4.1 - Classificação dos extratores	25
2.5 – Estudo da transferência de massa em extratores de palhetas rotativas	28
2.6 – Métodos de otimização de processos	31
2.6.1 – Método dos mínimos quadrados	35
2.6.2 – Otimização por planejamento fatorial	40
2.6.3 – Aplicação da otimização por planejamento fatorial	49

3.2.2 – Metodologia de estudo dos diagramas de fases do SBA PEG/ CaCl ₂	116
3.2.3 – Obtenção das “tie lines”	116
3.2.4 – Determinação da concentração de proteína total	117
3.2.5 – Metodologia de obtenção do coeficiente de partição das enzimas α e β - amilases	117
3.2.6 – Obtenção das enzimas	118
3.2.7 – Determinação da atividade enzimática	118
3.2.8 – Estudo cinético enzimático das enzimas amilases α e β - amilases	119
3.2.9 – Otimização dos sistemas estudados	120
3.2.10 – Recuperação das enzimas α e β - amilases em coluna de extração líquido-líquido com palhetas rotativas	123
Capítulo IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
4.1 – Diagrama de fases	129
4.1.1 – Efeito do pH sobre o diagrama de fases	129
4.1.2 – Efeito da massa molar sobre o diagrama de fases	130
4.2 – Estudo do comportamento das “tie lines”	132
4.3 – Avaliação do coeficiente de partição das enzimas α e β - amilases	136
4.4 Estudo dos fatores que influenciam na partição de proteína em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl ₂	138
4.5 – Análise da atividade enzimática	146
4.6 – Estudo cinético comparativo entre os extratos enzimáticos em PEG e em malte de milho	147
4.7 – Extração contínua das enzimas α e β - amilases	152
4.7.1 Análise do comportamento do sistema extração utilizado	152
4.7.2 – Otimização da extração contínua	156
Capítulo V - CONCLUSÕES	163
5 – CONCLUSÕES	165

Nomenclatura

A – Atividade enzimática (SKB)

AB – Distância entre os pontos A e B

AC – Distância entre os pontos C e D

b – Constante de atividade enzimática

C -Concentração (g/L)

C_I –Concentração da substância a ser particionada na fase inferior (g/L)

C_S –Concentração da substância a ser Particionada na fase superior (g/L)

C_{sal} - Concentração de sal (g/L)

DNA – Ácido desoxiribonucleico

d_I – Densidade da fase inferior (g/cm³)

d_S – Densidade da fase superior (g/cm³)

$[E]$ – Concentração de enzimas (g/L)

$[E]_0$ – Concentração inicial de enzimas (g/L)

$[E^+]$ – Concentração de enzimas na forma ácida (g/L)

$[E^-]$ – Concentração de enzimas na forma básica (g/L)

$[E]_T$ – Concentração total de enzimas (g/L)

$[EI]$ – Concentração do complexo enzima inibidor (g/L)

$[ES]$ – Concentração de complexo enzima substrato (g/L)

$[ES^+]$ – Concentração de enzimas na forma ácida (g/L)

$[ES^-]$ – Concentração de enzimas na forma básica (g/L)

$[ES]_T$ – Concentração total de enzimas (g/L)

$[ESI]$ – Concentração do complexo enzima substrato inibidor (g/L)

GA – Ácido giberélico

$[H^+]$ – Concentração hidrogeniônica (g/L)

K – Coeficiente de partição

$K_{ambiente}$ - Contribuição do ambiente ao valor de K

$K_{estrutural}$ – Contribuição da estrutura da molécula particionada ao valor de K

k_{cat} – Constante catalítica (min⁻¹)

K_m – Constante de Michaelis – Menten (g/L)

K_S – Constante de solubilidade

MM_{PEG} – Massa molar do PEG (g/mol)

Lista de Figuras:

Figura 2.01 – Diagrama de fases polímero P/ polímero A.

Figura 2.02 – Série de Hofmeister (BAILEY & OLLIS, 1986).

Figura 2.03 – Esquema de um extrator descontínuo.

Figura 2.04 – Esquema das colunas de extração sem agitação mecânica e separação por gravidade, a) coluna de pratos perfurados, b) coluna tipo spray e c) coluna com pratos recheados.

Figura 2.05 – Esquema de colunas com agitação mecânica, a) Coluna de fluxo pulsado, b) Coluna de pratos rotativos c) Coluna de discos rotativos (RDC).

Figura 2.06 – Atividades comuns na elaboração de um modelo, do princípio a sua aplicação (EDGAR & HIMMELBLAU, 1989).

Figura 2.07 – Esquema matricial para cálculo das estimativas dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.

Figura 2.08 – Estimativa de parâmetros usando modelo ortogonal por planejamento fatorial em dois níveis com ponto central (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Figura 2.09 – Estimativa de parâmetros usando “design” ortogonal para estimativa de parâmetros por um planejamento fatorial 2^2 pelo método estrela (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Figura 2.10 – Esquema da síntese da enzima α -amilase pelo DNA, em semente de monocotilédone.

Figura 2.11 – Curva de desenvolvimento cinético de um sistema reacional enzimático.

Figura 2.12 – Esquema de uma reação enzimática global, simples.

Figura 2.13 – Esquema de uma reação enzimática com formação do complexo enzima-produto.

Figura 2.14 – Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten linearizada por Lineweaver-Burk (MORRIS, 1979).

Figura 4.08 – Superfície de resposta que melhor descreve a influência mútua do pH e da “tie line” sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

Figura 4.09 – Curvas de níveis que melhor descrevem a influência mútua do pH e das massas molares do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

Figura 4.10 – Superfície de resposta que melhor descreve a influência mútua do pH e das massas molares do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

Figura 4.11 – Curvas de níveis que melhor descrevem a influência mútua da “tie line” e da massa molar do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

Figura 4.12 – Superfície de resposta que melhor descreve a influência mútua da “tie line” e das massas molar do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

Figura 4.13 – Curvas cinéticas de hidrólise do amido pelas amilases em extrato do malte de milho e em extrato de PEG 4000, a pH 5,0 e 75°C.

Figura 4.14 – Linearização pelo método de Lineweaver – Burk das curvas de hidrólise do amido pelas amilases em malte e em PEG 4000, a pH 5,0 e 75°C.

Figura 4.15 – Curvas cinéticas de hidrólise do amido pelas amilases em extrato do malte de milho e em extrato de PEG 4000, a pH 5,0 e 55°C.

Figura 4.16 – Linearização pelo método de Lineweaver – Burk das curvas de hidrólise do amido pelas amilases em malte e em PEG 4000, a pH 5,0 e 55°C.

Figura 4.17 – Comparação entre as curvas de cinética de hidrólise do amido nas temperaturas de 55°C e 75°C, utilizando as amilases em PEG 4000, a pH 5,0.

Figura 4.18 – Comparação entre as curvas de hidrólise do amido linearizadas nas temperaturas de 55°C e 75°C, utilizando as amilases em PEG 4000, a pH 5,0.

Figura 4.19 – Superfície de resposta para o modelo linear da extração contínua - Método do ponto central.

Figura 4.20 – Curvas de nível para o modelo linear da extração contínua das enzimas α e β -amilases – Método do ponto central.

Figura 4.21 - Superfície de resposta para o modelo quadrático da extração contínua das enzimas α e β -amilases - Método estrela.

Lista de Tabelas:

Tabela 2.01 – Tabela de análise da variância de um modelo linear nas estimativas dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 2.02 – Matriz de planejamento gerada pelo planejamento completo para estudar a influência dos fatores pressão (P) e temperatura (T) sobre a taxa de reação (r) em um estudo de cinética reacional.

Tabela 2.04 - Composição de amido de várias fontes naturais.

Tabela 2.05 – Composição aproximada do grão de milho.

Tabela 3.01 – Reagentes utilizados durante a realização dos experimentos.

Tabela 3.02 – Equipamentos utilizados durante a realização dos experimentos.

Tabela 3.03 – Vidrarias utilizadas durante a realização dos experimentos.

Tabela 4.01 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 4000/ CaCl₂ a pH 5,0.

Tabela 4.02 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 6000/CaCl₂ a pH 5,0.

Tabela 4.03 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 8000/ CaCl₂ a pH 5,0.

Tabela 4.04 – Dados das composições médias “tie lines” do SBA PEG 4000/CaCl₂ a pH 6,0.

Tabela 4.05 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 6000/CaCl₂ a pH 6,0.

Tabela 4.06 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 8000/CaCl₂ a pH 6,0.

Tabela 4.07 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 4000/CaCl₂ a pH 7,0.

Tabela 4.08 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 6000/CaCl₂ a pH 7,0.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

A bioseparação é um ramo da bioengenharia que nos últimos tempos vem sendo muito estudado com o intuito de aprimorar técnicas mais eficientes e mais econômicas em larga escala (“scale-up”), alcançando um bom grau de pureza e recuperação da biomolécula, mantendo sua atividade. A mais eficiente destas técnicas é a cromatografia em fase líquida. Contudo, esta embora produza um material de alto grau de pureza e com boa atividade, seu rendimento é baixo e o custo do produto é elevado. A dificuldade e a complexidade enfrentadas nos processos de “downstream” (concentração e/ ou purificação) de produtos farmacêuticos e biológicos impulsionou o desenvolvimento da pesquisa no campo da bioseparação, dando ênfase a estudos envolvendo a utilização de técnicas alternativas. Uma das técnicas que possuem bom rendimento na separação da biomolécula sem interferir em sua atividade, com boa viabilidade econômica, é a partição em sistemas bifásicos aquosos (SBAs) (DIAMOND & HSU, 1992).

Os sistemas bifásicos aquosos mais utilizados atualmente são os sistemas polímero/ polímero, mais comumente representados pelo polietileno glicol (PEG)/ Dextrana e os sistemas polímero/ sal, representados na maioria dos estudos por PEG/ fosfato de potássio. Estes sistemas foram descobertos por Per - Åka Albertsson em 1955 e, desde esta data, os sistemas bifásicos são estudados e utilizados na recuperação e/ ou purificação diversas substâncias, principalmente de biomoléculas.

Como os SBA's polímero/ polímero ou polímero/ sal, oferecem ambientes físico-químicos apropriados para as biomoléculas, apresentando baixas diferenças de potencial, tensão superficial em torno de 10^{-7} N/ cm, contendo 80% a 90% em peso de água em suas fases. Já os sistemas solventes/ água, estudados por CRAIG & CRAIG (1956), possuem alta tensão superficial (da ordem de 10^{-4} N/ cm), apresentando em alguns casos alta diferença de potencial e fases orgânicas contendo entre 40% a 50% em peso de água, o que acarreta sérios problemas, como a desnaturação de proteínas, inativação da biomolécula, precipitação e concentração na fase aquosa (DIAMOND & HSU, 1992).

Nas últimas décadas tem-se pesquisado novas substâncias que possibilitem a formação dos sistemas bifásicos aquosos, e a caracterização dos mesmos, para que possam ser aplicados na purificação de material biológico, principalmente: proteínas, DNA, enzimas e produtos farmacêuticos. Os bifásicos aquosos (SBA) também têm encontrado aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, especialmente no que se refere à utilização de sistemas alternativos de baixo custo, como o SBA constituído por goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) e PEG (VIEIRA, 1999).

As enzimas α -amilase e β -amilase são muito utilizadas nas indústrias de álcool, principalmente as cervejarias, em indústrias têxteis, em indústrias de processamento de farinhas, como as de biscoito e padarias e tantas outras, pois estas hidrolisam o amido até que este atinja um certo grau de sacarificação desejado por estas indústrias. Normalmente, elas são obtidas de malte de cevada (cerveja) ou de microrganismos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Bacillus subtilis*), sendo que a α -amilase possui o íon Ca^{2+} em sua estrutura e atua sobre as ligações α 1-4 da amilose, amilopectina, glicogênio e dextrinas de forma aleatória e a β -amilase atua nas mesmas ligações, só que nas extremidades da amilopectina e do glicogênio separando as mesmas em unidades de maltose. Estas últimas geralmente são purificadas por métodos que elevam os seus custos, porém possuem uma atividade muito superior as primeiras, o que leva ao uso de uma menor quantidade para a hidrólise do amido, compensando o seu emprego (FORGATY & KELLY, 1979; WISEMAN, 1987).

O milho é um produto agrícola bastante difundido no Brasil, contudo possui um baixo valor no mercado. Sendo assim, ao germinar as sementes desta cultura, obteremos o malte de milho que possui uma quantidade elevada das enzimas α e β -amilases e estas ao serem recuperadas em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 agregariam valor a este produto através de um subproduto de grande aceitação no mercado e que possui pouca competitividade no país, já que aqui estas enzimas são pouco produzidas.

Neste trabalho caracterizou-se o sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl₂, segundo a metodologia apresentada por ALBERTSSON (1986), encontrando-se para isto, as curvas de equilíbrio líquido-líquido (Binodais) e as “tie lines” do sistema, para diferentes valores de pH e massas molares de PEG.

As enzimas amilases recuperadas em PEG passaram por um estudo cinético comparativo com as enzimas ‘in natura’ do malte do milho, para a observação do comportamento catalítico, de tal forma que se verificasse se o polímero atuava como inibidor ou ativador das mesmas.

Foram feitas as otimizações da partição das enzimas α -amilase e β -amilase de malte de milho, baseando-se em planejamentos fatoriais, utilizando o pH, o comprimento da “tie line” e a massa molar do PEG como fatores que influenciam no valor do coeficiente de partição das enzimas no sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl₂.

Após a determinação das melhores condições no sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl₂ (pH, “tie line” e massa molar do polímero), a serem utilizadas na recuperação das enzimas, foram avaliadas as condições ideais de operação da coluna de extração líquido-líquido, com agitação promovida por palhetas rotativas e fluxo em contracorrente, sendo admitidas às alimentações do solvente e do concentrado, e retirada dos refinado e extrato nas partes inferior e superior da coluna, respectivamente.

A otimização dos dados foi feita através da análise de Superfície de Resposta (RSM), com modelos obtidos por delineamento em planejamento fatorial, utilizando os métodos do ponto central e estrela, sendo a avaliação da significância destes e do ajuste de dados feita pela análise de variância (ANOVA), descrita em BARROS NETO (1995 e 2001).

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Sistemas bifásicos aquosos

O processo onde um componente é separado de uma mistura de líquidos através da adição de um outro componente líquido consiste num sistema bifásico aquoso denominado de Extração Líquido-Líquido ou Extração em Duas Fases Aquosas.

Quando as concentrações dos polímeros excedem um certo valor, duas fases aquosas são formadas, as quais são compatíveis com as células e preservam a função biológica de proteínas e ácidos nucleicos, com acentuada estabilidade. Os sistemas bifásicos aquosos (SBA) são formados quando pares polímero/ polímero ou polímero/ sal são misturados com água acima de concentrações críticas (concentrações de saturação) (ALBERTSSON, 1986), como está mostrado na Figura 2.01.

A Figura 2.01 é a representação de um diagrama de fases do sistema polímero P/ polímero A, com concentrações expressas em termo de percentagens em massa nas fases leves e pesadas, sendo a linha curva que separa os sistemas aquosos chamada de binodal. Os pontos B e C, são chamados de nós, e as retas BC e B'C', de linhas de amarração ("tie line"), sendo K o ponto crítico, onde os volumes das duas fases teoricamente tornam-se iguais (ZASLAVSKY, 1995).

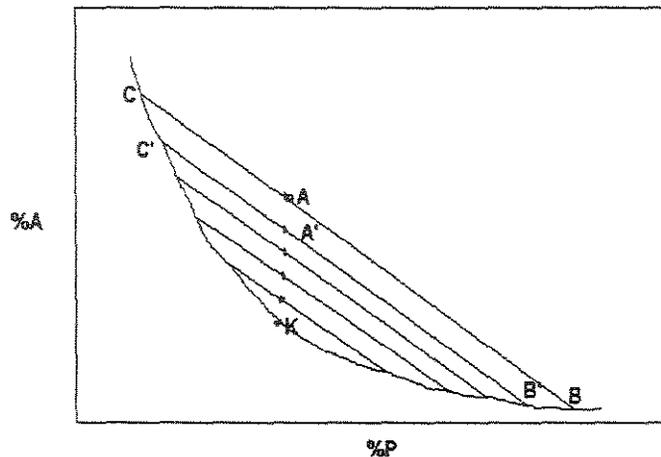


Figura 2.01 – Diagrama de fases polímero P/ polímero A.

Em 1986, ALBERTSSON deduziu a expressão para a razão volumétrica (V_r) das fases superior (V_s) e inferior (V_l) dos sistemas bifásicos:

$$V_r = \frac{V_s}{V_l} = \frac{d_l AC}{d_s AB} \quad (2.01)$$

Como as densidades das fases superior (d_s) e inferior (d_l) não são muito diferentes da densidade da água, a razão dos volumes das duas fases pode ser obtida aproximadamente a partir das distâncias AB e AC da linha de amarração.

Cada sistema bifásico aquoso é caracterizado por um único diagrama de fases, o qual contém a composição das fases em equilíbrio para o sistema, que são de fundamental importância para a determinação da eficiência de separação (partição) do componente entre as fases, além de fornecer subsídios para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos visando à predição destes dados (OLIVEIRA, 1999).

2.1.1 – História do SBA

A história a seguir foi contada por Per - Aka Albertsson, o precursor dos sistemas bifásicos aquosos usando polietileno glicol, como polímero extrator das substâncias a serem separadas em meio bifásico líquido/ líquido.

Ao terminar a graduação em 1954, Per - Aka Albertsson começou a estudar com o professor Arne Tiselius do Departamento de Bioquímica da Universidade de Uppsala, na Suíça, tendo como supervisor o professor Håkan Leyon, que era especialista em microscopia eletrônica com cloroplastos. Albertsson, sempre teve preferência por cloroplastos e materiais semelhantemente coloridos, como ficoeritrinas, ficocianinas, eritrocitos, algas verdes, e outros cloroplastos, em seus trabalhos; devido ao fenômeno impressionante que estes possuem de serem coloridos. Inicialmente eles interessaram-se por pirenoídes, que são estruturas de características de cloroplastos de algas verdes. Tentaram isolar pirenoídes de algas unicelulares *Chlorella pyrenoidosa* por muitos anos, usando várias técnicas de centrifugação, para purificar pirenoídes de células desintegradas de *Chlorella*, sem sucesso. O principal problema não foi somente a instabilidade dos pirenoídes obtidos, mas também a separação destes de partículas celulares complexas (ALBERTSSON, 1986).

Então foram encorajados pelo professor Tiselius a usar cromatografia, o qual foi um dos pioneiros no desenvolvimento de eletroforese e cromatografia de proteínas e ainda introduziu as colunas de hidroxilapatite na análise cromatográfica de proteínas. As separações com células ocorreram sem problema, porém para o caso das organelas celulares, particularmente partículas de cloroplastos, os experimentos falharam, por causa da adsorção irreversível. Nas típicas experiências de cromatografia com hidroxilapatita, as substâncias a serem separadas, são inicialmente dissolvidas em soluções padrão de fosfato e depois se faz passar um eluente padrão a baixas concentrações. As partículas de cloroplastos adsorvidas na coluna não desorveram, formando uma faixa verde no topo da

coluna que não se mexia sobre a ação de diferentes eluentes padrão. Na presença de fosfato (1 – 2 M), novamente os cloroplastos ficaram firmemente adsorvidos (ALBERTSSON, 1986).

Após vários experimentos frustrados, decidiram usar um detergente com nome de polietileno glicol. Os sedimentos de hidroxilapatita contendo os cloroplastos firmemente adsorvidos foram misturados a uma solução de polietileno glicol, dissolvidos em fosfato 1 M. A intensa coloração verde dos cloroplastos adsorvidos a hidroxilapatita, foi sendo transferida para a camada líquida acima da solução padrão de fosfato, e a hidroxilapatita retornou à sua coloração original, branca, enquanto que, os cloroplastos eram completamente purgados. Devido à alta concentração do fosfato, o polietileno glicol formou uma fase líquida separada, a qual aparentemente tinha uma intensa afinidade com os cloroplastos que eluíam da hidroxilapatita. Esta foi a primeira experiência feita com sistema bifásico aquoso polimérico líquido-líquido. Depois, Albertsson descobriu que o polietileno glicol não era um detergente e sim um dos componentes usado na fabricação destes. Assim, considerou seu experimento como sendo um erro gratificante (ALBERTSSON, 1986).

Nos anos de 1958 – 1960 desenvolveram estudos sobre: a relação entre o peso molecular do polímero ou a área superficial da proteína ou vírus, com o coeficiente de partição, isolamento e purificação de microssomos de cérebro de ratos, e purificação e concentração de vírus. Este laço entre o peso molecular e partição foram estudados e demonstrados em sistemas usando antígenos-antibióticos, trabalho este que gerou a tese de PhD de Albertsson, além de ser publicado em 1960 no seu livro, que foi republicado em 1971, 1974 e 1986; e traduzido em várias línguas, como o russo e o japonês (ALBERTSSON, 1986).

Em 1962, Albertsson foi trabalhar no Departamento de Zoologia da Universidade da Califórnia, Los Angeles. Onde foi incumbido de construir uma coluna de distribuição em contracorrente do tipo “thin layer” (camada fina), de forma que esta reduzisse o tempo

de residência do aparato construído por Craig. Nas colunas “thin layer”, houve uma redução do tempo de residência para que se formem as fases, para poucos minutos. Este tipo de coluna apresenta cavidades superficiais nos pratos de vidro sinterizado (plaxiglass), o que permitiu que ocorresse a primeira separação de partes de cloroplastos intactas. A primeira unidade de colunas do tipo “thin layer” foi construída com 30 a 60 cavidades sendo que depois passaram a usar 120 e até 180 cavidades. Após seu retorno a Uppsala apresentou em um “Work Shop”, no Instituto de Química, uma versão automática do “thin layer” de distribuição em contracorrente, aparelho que ainda é usado atualmente (ALBERTSSON, 1986).

No mesmo ano, durante uma visita de observação ao Departamento de Bioquímica da Universidade de Estandford, juntamente com Arthur Kornberg, aplicaram um sistema polímero/ polímero do tipo polietilo glicol/ dextrano na purificação da enzima DNAPolimerase, de extrato bacteriano, usando uma alta concentração de NaCl, o qual possibilitou a separação de enzimas de restos de células. A enzima foi recuperada em uma segunda etapa da partição, em um sistema polietileno glicol/ fosfato de amônio. Atualmente este modelo é aplicado em larga escala pela biotecnologia em purificação de enzimas por partição em fases aquosas (ALBERTSSON, 1986).

Em todos estes trabalhos anteriores assumiu-se que a partição do sal era igual para ambas às fases, já que os polímeros são predominantemente não iônicos. Entretanto, estudos detalhados revelaram que alguns sais particionavam mais que outros; diferenças pequenas, porém significativas, que foram comprovadas para sais semelhantes de uma mesma família, como os cloretos de lítio, de sódio, e de potássio (ALBERTSSON, 1986).

Isto sugeriu o aparecimento imediato de um potencial elétrico, gerado entre as fases. O potencial é pequeno, mas influencia na partição de proteínas, ácidos nucléicos e partículas celulares, devido à presença de varias cargas elétricas nestas. Este potencial foi estimado com o uso de eletrodos, que permitiu verificar uma relação linear entre os logaritmos dos coeficientes de partição e a malha de cargas das proteínas, determinadas por

titulação. Percebeu-se então a partição poderia ser usada na determinação do ponto isoelétrico de proteínas, por partição cruzada e também por estimativa da malha de cargas da proteína. Também foi descoberto que, com o uso de grupos carregados, ligados ao polietileno glicol por ligações covalentes, um potencial interfacial é acrescido, e este aumenta ainda mais a faixa de seletividade em separação de proteínas, do polímero (ALBERTSSON, 1986).

Assim, foi estabelecida a relação entre o coeficiente de partição e rede de cargas das moléculas, como sendo uma função exponencial desta. Desta forma, pode-se dar um alto grau de seletividade ao método variando a quantidade de cargas, o que foi comprovado por vários autores na separação de vírus mutantes, cloroplastos, eritrócitos de células quaisquer de diferentes idades, células de colóreas em diferentes estágios do seu ciclo de crescimento e outras células. Também foi demonstrada claramente a dependência entre a partição e a superfície das moléculas, o que tornou necessário o uso de uma técnica complementar de separação, como a centrifugação. Os experimentos com cloroplastos e células sanguíneas demonstraram que os sistemas bifásicos aquosos reduzem ao máximo a fragilidade das organelas e células, estes se adequam satisfatoriamente devido à baixa tensão interfacial, fazendo com que o polímero gere um efeito protetor das organelas e células (ALBERTSSON, 1986).

Atualmente estes métodos já foram bastante desenvolvidos para aplicação em bioquímica, biologia molecular, biologia celular e biotecnologia, embora ainda haja muita controvérsia sobre estes sistemas, principalmente em estudos de modelos termodinâmicos dos mesmos.

2.1.2 – Estudo das fases

2.1.2.1- Fatores que influenciam o comportamento das fases

O diagrama de fases sofre influências da massa molar do polímero, da temperatura, hidrofobicidade e do pH; contudo estes efeitos ainda não foram totalmente estudados (DIAMOND & HSU, 1992).

a) Massa molar do polímero – o aumento da massa molar do polímero diminui a concentração de polímero necessária para a formação das duas fases, e quanto maior a diferença entre as massas molar dos polímeros, mais assimétrica será a binodal (ZASLAVSKY, 1995);

b) Hidrofobicidade do Polímero – a tendência que o polímero tem a separação de fases, está correlacionada ao número de grupos hidrofóbicos presentes nele. Quando se usa dois ou mais polímeros em um SBA, deve-se observar que quanto maior a diferença de hidrofobicidade dos polímeros, menor a concentração de polímeros a ser usada (ALBERTSSON, 1986);

c) Temperatura – os SBAs se comportam de maneira diferente sobre influência da temperatura, sendo seus efeitos muito variados e ainda não definidos. Para o sistema PEG/ sal as duas fases serão formadas a temperaturas relativamente altas, para polímero/ polímero formar-se-ão duas fases a baixas temperaturas, enquanto que, o sistema metilcelulose/ dextrana é estável ao efeito da temperatura (ZASLAVSKY, 1995);

d) pH – o aumento do potencial hidrogeniônico desloca a binodal no sentido das menores concentrações de polímero e sal (HUDDLESTON et al., 1991);

e) Adição de Sais – o efeito da adição de sais no diagrama de fases varia de acordo com o SBA: se o sistema for constituído de polímeros não iônicos (PEG e Dextrana), as binodais praticamente não são afetadas pela adição de baixas concentrações de sais monovalentes, já as adições de sais acima de 0,1 M alteram significativamente a binodal, bem como o uso de sais polivalentes. Para polímeros carregados, a separação das fases depende da força iônica dos sais, enquanto que, nos sistemas polímero/ sal, quanto maior a carga do ânion, mais baixa a concentração de sal necessária para que ocorra a separação das fases.

2.1.2.2 – Propriedades físico-químicas das fases

Os sistemas bifásicos dependem muito das propriedades de suas fases, o que torna necessário estudar a influência destas sobre aqueles.

a) Viscosidade – como regra geral, quanto maior a massa molecular dos polímeros maior será sua viscosidade. As fases de um SBA apresentam viscosidade, dependendo do tipo de polímero usado, dependente da concentração do polímero, podendo ser líquida ou gel. Ao usar PEG's com massa molecular inferior a 1000, em sistemas PEG/Dextrana, a última forma uma fase sólida ou gel (ALBERTSSON, 1986).

b) Densidade das Fases – Como as fases apresentam aproximadamente 80% em peso de água, logo suas densidades não variam muito aquém de 1,0 (KULA, 1985).

c) Tensão Interfacial – é em geral pequena, pois os polímeros são usados sempre nas concentrações próximas do ponto crítico. Contudo os sistemas polímero/ sal apresentam uma maior tensão interfacial que os sistemas polímero/ polímero (KULA, 1985).

d) Pressão Osmótica – em geral é pequena em ambas as fases, devido à massa molar dos polímeros ser elevada. Se a concentração dos polímeros for elevada, a dependência da pressão osmótica com a massa molar não é válida. Ao estabelecer o equilíbrio entre as fases a pressão osmótica torna-se igual para ambas as fases (ALBERTSSON, 1986).

2.2 – Estudo da partição

A partição ou coeficiente de partição (K) é a razão entre as concentrações de equilíbrio das fases superior (leve), C_s , e inferior (pesada), C_i , da substância a ser particionada em um SBA, dada pela expressão:

$$K = \frac{C_s}{C_i} \quad (2.02)$$

O coeficiente de partição de uma biomolécula é constante para um dado sistema e em uma pequena faixa de concentração (CABRAL & AIRES BARROS, 1993).

Em 1992, DIAMOND & HSU expressaram a influência de fatores ambientais e da estrutura das moléculas, em SBA, sobre valor de K na forma logarítmica abaixo:

$$\ln K = \ln K_{\text{ambiente}} + \ln K_{\text{estrutura}} \quad (2.03)$$

No estudo da partição de partículas em suspensão, têm-se considerado três regiões de partição, as quais são as regiões: superior, inferior, e interfacial. Esta última desempenha um papel muito importante na partição, pois absorve quantidades significativas de material biológico. Isto não é observado na partição de materiais solúveis (ALBERTSSON, 1986, SILVA & FRANCO, 2000).

2.2.1 – Fatores que afetam a partição de biomoléculas

a) Concentração dos Polímeros – quando a concentração dos polímeros é aumentada, a partição tende para uma das fases, pois está sendo desviada da concentração crítica (DIAMOND & HSU, 1992). Há uma exceção a essa regra, quando se trabalha com partículas celulares, o aumento da concentração favorece a partição na interface (ALBERTSSON, 1986).

b) Massa Molar do Polímero – a partição favorece ao polímero de menor massa molar, desde que os outros fatores (C, T, MM, C_{sal}) sejam mantidos constantes para um mesmo tipo de SBA (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

c) Massa Molar da Substância a ser Particionada – quanto maior a molécula, maior é a superfície exposta à interação com os componentes das fases. A equação de BRÖNSTED descreve qualitativamente a partição da molécula em função da massa molar:

$$K = e^{(\lambda M/kT)} \quad (2.04)$$

d) Adição de Sais – os SBAs sofrem grande interferência pela adição de sais, efeito este chamado de “salting-out”. Em sistemas polímero/ sal, a partição do material biológico é fortemente influenciada pela concentração do sal, pois a “*tie line*” é aumentada promovendo a transferência deste material da fase rica em sal para a fase rica em polímero, ou caso este material não seja solúvel no polímero, ocorrerá precipitação na interface (KULA et al., 1982). Os íons “salting-out” possuem uma forte tendência de se solvatarem, aumentando a tensão superficial da água e a influência do meio sobre os aminoácidos apolares das proteínas, pela remoção de moléculas de água estruturadas nestes, podendo promover a precipitação dos mesmos, devido à interação hidrofóbica destas porções apolares. No entanto, os íons “salting in” ou caotrópicos, ao contrário, previnem a interação hidrofóbica por desorganizar a estruturação da água no meio. A seguir na Figura 2.02, está

ilustrada a série de Hofmeister, que representa os ânions e os cátions que influenciam na precipitação de proteínas. As setas indicam o sentido de aumento ou diminuição da hidrofobicidade do meio, respectivamente (BAILEY & OLLIS, 1986).

Salting-out

←

Ânions: $\text{PO}_4^{-3} > \text{SO}_4 > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$

Saltin-in

→

Cátions: $\text{NH}_4^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Ba}^{2+}$

Figura 2.02 – Série de Hofmeister (BAILEY & OLLIS, 1986).

e) Interações Hidrofóbicas – para proteínas que contenham superfície ou regiões com ligantes hidrofóbicos, seu coeficiente de partição será alterado, sendo particionado mais facilmente (ALBERTSSON, 1986).

f) Afinidade Bioespecífica - se o polímero tiver acoplado um ligante bioespecífico, este terá preferência a partição seletiva da biomolécula influenciada pelo ligante, ex: PEG-celulose tem afinidade com a albumina do soro bovino (SHANBHAG & JOHANSSON, 1974).

g) Conformação da Biomolécula – algumas proteínas apresentam coeficiente de partição constante para uma faixa de pH devido a alterações conformacionais, formando dímeros. A partição da proteína é independente da carga líquida da mesma e, portanto do pH. Em SBAs com potencial interfacial zero podem ser obtidos pelo uso de sais ou misturas de sais, que favorecerá a partição da biomolécula presente (SHANBHAG & JOHANSSON, 1974).

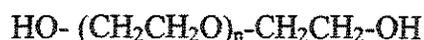
h) Quiralidade da Biomolécula – quando se usam polímeros quirais como o dextrano, amido ou celulose, em SBA's as formas enantioméricas das biomoléculas se particionam diferentemente nas fases que se apresentam ricas em polímeros D ou L, dependendo da sua forma de apresentação (EKBERG et al., 1985).

i) Temperatura – a temperatura possui uma grande influência na partição, pois, um pequeno aumento elevará a composição do polímero no diagrama e a partição da biomolécula poderá elevar ou diminuir dependendo dos materiais utilizados (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

2.3 – Polímeros utilizados em sistemas bifásicos aquosos

2.3.1 – Polietileno glicol (PEG)

O PEG é um polímero sintético neutro de cadeia linear ou ramificada, obtido por polimerização do óxido de etileno e está disponível em várias massas molares, é solúvel em água e em solventes orgânicos. Sua estrutura simplificada está representada abaixo:



Onde n varia conforme a massa molar do polímero, por exemplo: para o PEG 3450, n é igual a 77, para o PEG 4000, o valor de n é aproximadamente igual a 90 e para o PEG 8000 o valor de n gira em torno de 180.

As hidroxilas terminais são normalmente usadas para combinações destes com ligantes que possuam afinidade específica por outros grupos de biomoléculas. O PEG está disponível comercialmente com os nomes de poliglicol E ®, carboulax ® e pluracol E ®, dependendo do fabricante. Se sua massa molar for inferior a 1000 Da o PEG é tido como

óxido de etileno, apresentando-se como um líquido incolor estável ou pasta. Porém, se sua massa molar for superior a 1000 Da, o PEG, encontra-se na forma de um pó ou flocos brancos. Estes podem ser armazenados à temperatura ambiente, embora a 4°C a oxidação das soluções seja retardada. A oxidação do PEG altera a coloração da solução, que passa de incolor para castanho, isto ocorre devido à liberação de grupos ácidos que diminuem o pH da solução (BAMBERGER et al., 1992; HARRIS, 1992).

Por excluir outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles, possuir uma alta capacidade de formar fase em meio aquoso, não provocar a diminuição da atividade das biomoléculas, é de grande importância para a biotecnologia. O PEG está sujeito a modificações químicas, que tornam possível melhorar sua solubilidade e aumentar o tamanho da molécula, com ao adicionar ligantes. A adição de ligante ao PEG é de grande utilidade na partição, pois estes ficam mais seletivos a biomoléculas, aumentando o índice de recuperação das mesmas. Sendo biodegradável e atóxico, a sua descarga não é problemática. Na operação em larga escala em sistemas bifásicos aquosos PEG/ sal, as dificuldades de reciclagem se concentram basicamente na fase salina (BAMBERGER et al., 1992; CHAVES, 2000; HARRIS, 1992).

2.3.2 – Poli (α -1,6 - glicose) ou dextrano

O dextrano, como é conhecido o polímero poli (α -1,6 - glicose), é muito utilizado em sistemas bifásicos aquosos polímero/ polímero. É encontrado no comércio em faixas de massas molar variando entre 10 kDa a 2000 kDa. A fração T500, proveniente de Pharmacia Biotechnology, é a mais comumente utilizada nestes sistemas. Esta apresenta um desvio de polimerização que apresenta uma mistura de massas molares (M_w) dos polímeros que o compõem, entre 450 KDa a 500 kDa e um número e massa molecular médio (M_n), acima de 180 kDa. A razão M_w/M_n , conhecida como polidispersão, é uma medida da homogeneidade da fração da massa molar. O valor 1,0 indica que a amostra é monodispersa. Geralmente, o dextrano puro possui uma polidispersão próxima da unidade, agregando valor a este produto (CHAVES, 2000; KUBEK, 1994; TJERNELD, 1992).

Apesar do sistema PEG/ dextrano ser clássico, o dextrano é extremamente caro para ser utilizado industrialmente devido ao seu elevado custo de purificação. Sua utilização só é viável, quando o produto a ser purificado possuir um alto valor agregado. Como alternativa está sendo proposto atualmente o uso do dextrano não purificado, que mantém as propriedades de partição do sistema, reduzindo substancialmente os custos associados à aplicação deste em grande escala. Contudo, estes sistemas possuem alta viscosidade e conseqüentemente uma separação muito lenta (KRONER et al., 1982).

2.3.3 – Hidroxipropil amido ou reppal PES

Um polissacarídeo natural e de fácil disponibilidade na natureza, é o amido, o qual é encontrado principalmente nas sementes de alguns cereais (como o milho, o arroz e o trigo, etc) e em tubérculos como a mandioca e a batata.

O amido não é apropriado para a aplicação em sistemas bifásicos aquosos, devido à sua fácil degradação por alguns microrganismos e enzimas (amilases) e à formação de géis. Para evitar este inconveniente é necessário modificar sua estrutura por adição de outras moléculas.

Um destes substituintes é o grupo hidroxipropil, e pela substituição deste na molécula do amido, obtém-se os chamados Reppal PES. A utilização do Reppal PES no lugar do dextrano em sistemas bifásicos provocou uma redução no custo dos reagentes necessários à formação das fases em sete vezes (TJERNELD, 1992).

Na recuperação de proteínas recombinantes de *Schistosoma mansoni*, CHAVES (2000) observou que sistemas bifásicos aquosos PEG/ sal desnaturavam as proteínas em maior quantidade que o PEG/ Reppal PES 100, embora este último apresentasse o inconveniente de ser mais caro que os sistemas salinos.

2.3.4 – Uso de outros polímeros como alternativa para SBAs

Diferentes polímeros, como o dextrano bruto (KRONER et al., 1982), derivados do amido (TJERNELD, 1989, VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1993), álcool polivinílico (TJERNELD, 1989), malto dextrina (SZLAG & GIULIANO, 1988), derivados de celulose (SKUSE et al., 1992); goma de guar (VENANCIO et al., 1995) e arabinogalactano (CHRISTIAN et al., 1998), têm sido utilizados na busca do sistema bifásico aquoso mais adequado à recuperação ou purificação de materiais diversos, principalmente os de importância biotecnológica.

Em um trabalho recente VIEIRA (1999) utilizou o polímero da goma de cajueiro *Anacardium occidentales L.* em sistema bifásico aquoso polímero/polímero, com baixo custo na obtenção das fases, mostrando ser bastante viável a utilização do mesmo na recuperação de biomoléculas em sistemas bifásicos aquosos.

2.4 – Equipamentos utilizados nas extrações líquido-líquido

O grande número de equipamentos desenvolvidos na extração líquido-líquido demonstra o crescimento destas técnicas nos últimos anos, isto se dá devido (HUMPHEY et al., 1984; MATIASSON & KAUL, 1986):

- I. à economia de energia, se comparado com a destilação;
- II. evitar a degradação de compostos biológicos;
- III. ao desenvolvimento de equipamentos mais eficientes e que permitam o contato mais efetivo entre as fases;
- IV. possibilidade de “scale-up”.

O desenvolvimento de novos equipamentos para efetuar extração líquido-líquido têm tornado este método mais competitivo em relação aos outros processos de separação. Em 1997, SOUZA desenvolveu uma coluna de extração do tipo “thin layer”, muito parecida com inventada por ALBERTSSON (1986), com pratos perfurados que a subdividia em cinco compartimentos, sendo a agitação proporcionada por palhetas rotativas. Este a usou na recuperação de ácido acético em sistema bifásico aquoso contendo Butanol/ solução de ácido acético. A mesma foi ainda utilizada por RABELO (1995) em um estudo paralelo, para verificar sua eficiência de extração.

Em 1999, RABELO desenvolveu uma micro-coluna de campânulas pulsantes e a utilizou em seu estudo na partição de proteínas como a citocromo b5 e a enzima ascorbato oxidase em sistema de duas fases aquosas PEG/ Sais de fosfato. Esta alcançou em seu estudo, um maior tempo de contato entre as fases e altas taxas de transferência de massa na coluna, sem desnaturar as proteínas. Esta mesma coluna foi utilizada por MORO (1999) na extração de tripsina por micelas reversas, utilizando um agente tensoativo surfactante aniônico AOT (2-etil-hexil-sulfossucinato de sódio). Deste trabalho conclui-se que a recuperação das proteínas em sistema contínuo foi maior que em sistema em batelada. Em seu trabalho LEITE (2001) estudou a recuperação de tripsina em sistema bifásico aquoso PEG/ policaju na mesma coluna anterior, obtendo 40 % de índice de recuperação da proteína na fase rica em policaju.

2.4.1 – Classificação dos extratores

É de uso comum na linguagem técnica o uso de denominações diferenciadas aos termos comuns da engenharia. Os processos de separação por sistemas bifásicos aquosos não ficaram de fora desta regra, por exemplo: a alimentação da fase rica no soluto a ser recuperado e/ ou purificado, é chamada de alimentação do concentrado, enquanto que a saída empobrecida do soluto é tida como refinado. Já a entrada da fase líquida destinada à recuperação do soluto é chamada de alimentação do solvente e a saída desta é tida como extrato, já que a mesma reteve a maior parte do soluto (RABELO, 1995).

Alguns fenômenos são comuns durante a operação de uma coluna de extração líquido-líquido. Dentre estes, serão citados os principais:

- O “hold up”, que é o termo designado à fração de retenção da fase dispersa dada pela razão entre os volumes da fase dispersa e o volume total da coluna.
- A inundação da coluna é a ocorrência de retorno de uma das alimentações passando a operar em paralelo a outra corrente, promovida pelo uso de condições extremas de operação da coluna.
- Ocorrência de “backflow” é o retorno axial da fase contínua, ocorre devido à inversão de fluxo desta fase com relação àquele esperado.
- Ocorrência de “backmixing” é o retorno axial da fase dispersa. O fluxo da fase dispersa é invertido fazendo com que o gradiente de concentração caia e assim a taxa de transferência de massa seja reduzida (HANSON, 1968).

Em extrações líquido-líquido os sistemas mais comumente empregados são os em batelada ou descontínuos e os contínuos ou diferenciais. A seguir estes serão mais detalhadamente estudados.

2.4.1.1 – Extratores descontínuos ou sistemas de contato e separação de fases em estágios

São sistemas compostos por vários estágios em série de tanques misturadores - decantadores, horizontais, onde a solução e o solvente são misturados até atingir o equilíbrio em ambas as fases. Após a decantação da fase pesada, é feita a separação das fases antes de passarem para o próximo estágio. Este equipamento possui alta eficiência de separação, sendo desvantagem o espaço físico que ele ocupa. A Figura 2.03 mostra o esquema simplificado de um extrator descontínuo em quatro estágios.

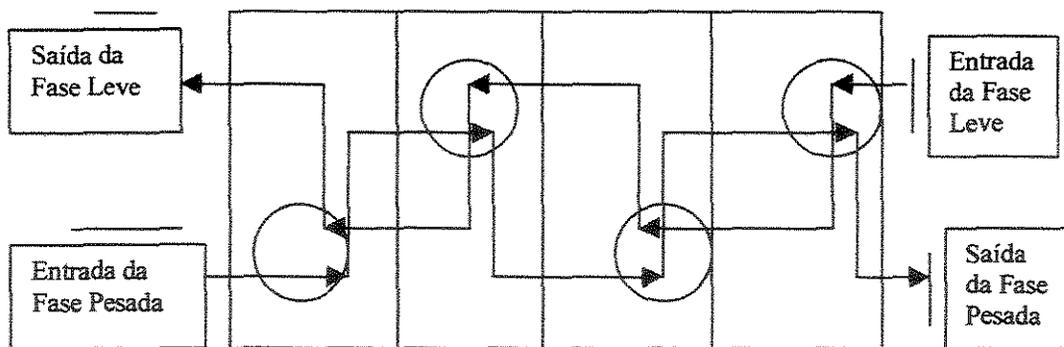


Figura 2.03 – Esquema de um extrator descontínuo.

2.4.1.2 – Sistema de Contato Diferencial (SCD) ou Contínuo

São normalmente colunas verticais onde o escoamento das fases ocorre em contracorrente, devido à diferença de densidades entre as mesmas, sendo que a fase leve é alimentada na parte inferior e a fase pesada na parte superior da coluna. Estes equipamentos são compactos e ocupam menos espaço físico que os anteriores e estão subdivididos em:

1. Colunas sem agitação mecânica e separação por gravidade

O contato entre as fases é promovido puramente pela ação da força gravitacional, devido à diferença entre as densidades das fases. São equipamentos de baixo custo operacional, ocupam pouco espaço físico, porém de pouca eficiência. Na Figura 2.04 estão mostrados os exemplos mais conhecidos deste tipo de coluna.

2. Colunas com agitação mecânica e separação pela gravidade

O contato é feito, além da ação da gravidade, pela ação de agitadores mecânicos ou pulsação, o que aumenta a transferência de massa entre as fases. Estes equipamentos

ocupam pouco espaço físico, com custo médio, e boa eficiência de separação. Na Figura 2.05 estão mostrados os exemplos mais conhecidos deste tipo de coluna.

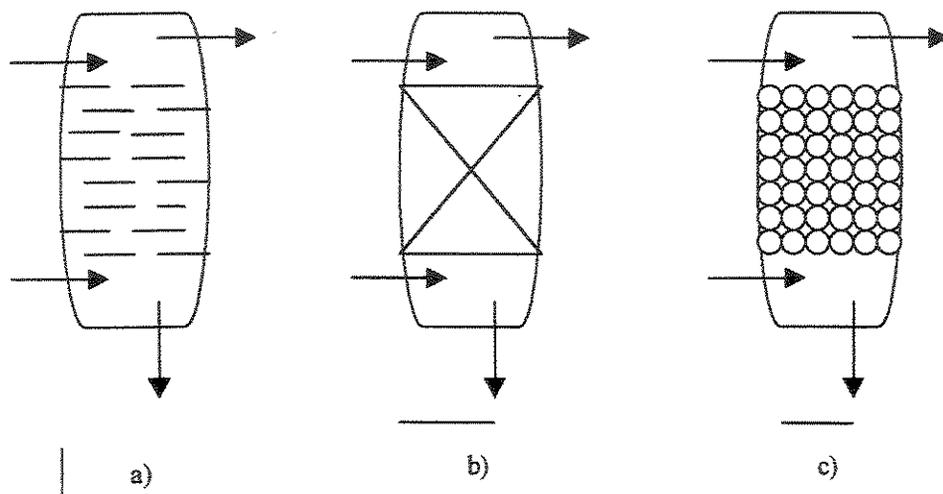


Figura 2.04 – Esquema das colunas de extração sem agitação mecânica e separação por gravidade, a) coluna de pratos perfurados, b) coluna tipo spray e c) coluna com pratos recheados.

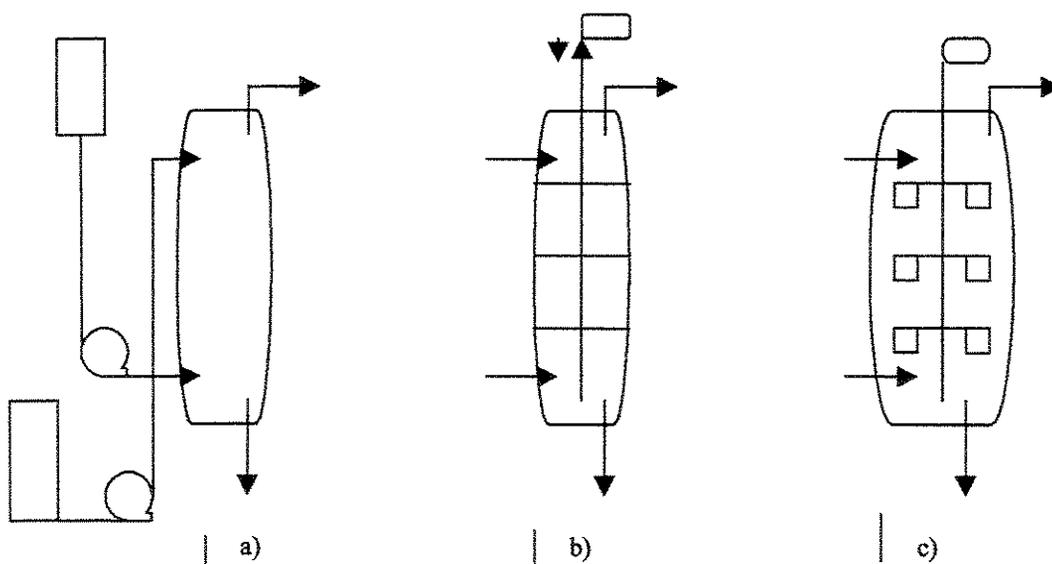


Figura 2.05 – Esquema de colunas com agitação mecânica, a) Coluna de fluxo pulsado, b) Coluna de pratos rotativos c) Coluna de discos rotativos (RDC).

3. Extratores centrífugos

A transferência de massa é feita pela ação da força centrífuga. São os equipamentos mais recentes, possuem alta eficiência de separação, ocupam pouco espaço físico, porém possuem alto custo de implantação; são exemplos: os extratores Podbielniak, Liwesta e de Laval (LEITE, 2001; MORO, 1999; RABELO, 1999).

2.5 – Estudo da transferência de massa em extratores de palhetas rotativas

A segunda lei da termodinâmica descreve que os sistemas que não estão em equilíbrio tendem a atingir o equilíbrio com o tempo, assim, em sistemas que contém dois ou mais componentes cujas concentrações variam de ponto a ponto, haverá um deslocamento natural de massa da região mais concentrada para a menos concentrada, o que levará a redução da diferença de concentração do sistema.

Neste tipo de aparelho, a alimentação é feita em contracorrente e a transferência de massa ocorre numa dispersão de gota que flui através da fase contínua por ação da gravidade. A variação da concentração numa gota é dependente da densidade, do coeficiente de transferência de massa, da área interfacial e do tempo de contato; só que estas variáveis dependem do diâmetro da gota (HANSON, 1968).

Como em sistemas líquido – líquido a agitação causa a diminuição do tamanho da gota e com isto ocorre um aumento na sua área superficial. Sendo a taxa de transferência de massa uma função da área interfacial, logo com o aumento da área superficial da gota ocorrerá o aumento da área interfacial elevando assim, a eficiência de extração do sistema.

Porém, a partir de um certo tamanho, a gota se comporta como uma esfera rígida, sem circulação de massa em seu corpo, reduzindo a difusão molecular e desta forma, diminuindo a interação entre as gotas e a taxa de transferência de massa na fase dispersa (ROD, 1966).

A coalescência da gota da fase dispersa numa fase contínua é de extrema importância para que ocorra a separação das fases. Quanto menores forem as gotas, maior a tendência à emulsificação da solução, enquanto que, quanto maior forem estas gotas, mais rápida será a coalescência destas, ocorrendo com maior facilidade a separação das fases (HANSON, 1968).

Em colunas de extração líquido – líquido, o coeficiente global de transferência de massa é dado segundo a teoria dos filmes, mostrada na equação abaixo:

$$N = K_{da} (C^* - C)V \quad (2.05)$$

Onde: N é o fluxo de massa da fase contínua para a fase dispersa ($g/s.cm^2$), K_{da} é o coeficiente global de transferência de massa; C^* é a concentração da substância a ser particionada na interface de equilíbrio com a fase contínua (g/cm^3); C é a concentração da substância a ser particionada na fase dispersa (g/cm^3); V é o volume da fase contínua.

Nos sistemas bifásicos aquosos as fases são imiscíveis, considerando-se que a quantidade de soluto transferida entre as fases é pequena, que o coeficiente de partição da substância é independente da sua concentração e que o coeficiente de transferência de massa é constante a cada ponto da coluna. Ao se fazer à integração da eq 2.05, obtém-se:

$$N = K_{da} \Delta C_{ln} V \quad (2.06)$$

Onde: ΔC_{ln} é a média logarítmica da diferença entre as concentrações.

Um balanço diferencial na coluna nos dá:

$$Q dC_{ent} = K_{da} (C_{ent} - KC_{sai}) dH$$

$$Q (C_{ent} - C_{sai}) = K_{da} \Delta C_{ln} V \quad (2.07)$$

Onde: Q é o fluxo da fase dispersa; C_{ent} é a concentração da substância a ser particionada na entrada da fase dispersa; C_{sai} é a concentração da substância a ser particionada na saída da fase dispersa.

Um rearranjo da equação 2.07 em função de K_{da} , leva à expressão abaixo:

$$K_{da} = Q / V \ln [(C_{ent} K C_i) / (C_{sai} K C_i)] \quad (2.08)$$

Onde: C_i é a concentração da substância a ser particionada na fase inferior; K é o coeficiente de partição da substância no sistema.

A eficiência da transferência de massa em uma coluna de extração líquido-líquido pode ser medida diferenciando o comportamento real do ideal, em termos de transferência de massa. Uma destas formas de medir a eficiência em uma coluna de extração foi proposta por KAWASE em 1990, descrita abaixo.

$$E_k = \{(C_f - C_r) / C_f\} 100 \quad (2.09)$$

Sendo C_f a fração mássica do soluto na alimentação, C_r a fração mássica do soluto no refinado e E_k o índice de recuperação do soluto (RABELO, 1995; SOUZA, 1997).

2.6. Métodos de otimização de processos

Para se estudar um sistema e dele obter os melhores resultados com custo reduzido, em menor tempo e com menor esforço físico, ou seja, obter uma maior produtividade, é necessário que se faça a otimização do mesmo; e uma das técnicas atualmente mais aplicadas para isto, é o delineamento por planejamento fatorial. Este tipo de otimização baseia-se em princípios estatísticos, que tornam os experimentos menos repetitivos, fazendo interação entre todas as variáveis e observando não só a influência destas sobre o resultado como também a interação entre as mesmas, levado à obtenção do modelo que mais se ajusta às condições do sistema em estudo (BARROS NETO et al., 1995).

A modelagem é importante por ser uma abstração do comportamento de um sistema, além de reduzir a quantidade de repetições e observações sobre o mesmo. Entretanto, o potencial econômico e o tempo reduzido proporcionado pelo uso do modelo matemático recebem em contrapeso, o fato que o modelo imita realidades especificadas, não incorporando todos os aspectos do sistema real modelado.

Para a modelagem de um sistema, torna-se necessária a listagem dos fatores que o afetam. Como os modelos de sistemas tornam-se sempre muito complexos, logo o modelo desenvolvido para otimização deste será também complexo. Algumas perguntas corriqueiras sempre são feitas, antes de iniciar a modelagem de um processo, tais como:

- Deve-se assumir a modelagem a que nível, macroscópico ou microscópico?
- O processo pode ser descrito adequadamente por princípios químicos ou físicos?

-
- O que desejo exatamente do modelo e como este influencia exatamente o resultado final?
 - Quais as medidas e os dados que serão avaliados pelo modelo?
 - A composição atual do processo é mínima, quais são os subsistemas básicos mais fáceis de serem analisados?

Os modelos são classificados naqueles baseados em teorias físicas e naqueles baseados em descrições estritamente empíricas. Os modelos matemáticos se baseiam em balanços energéticos físicos e químicos, termodinâmica, cinética de reações químicas e são freqüentemente empregados na otimização. Estes são mais atrativos, por gerarem um modelo geral específico para o sistema além de poder ser desenvolvido antes da construção do sistema. Já os modelos empíricos podem ser planejados com correlações simples entre os dados de entrada e saída, obtidos por quaisquer análises físico-químicas do processo (EDGARD & HIMMELBLAU, 1989).

Para a construção de um modelo deve-se seguir basicamente três etapas: a formulação e definição do problema, as análises preliminar e detalhada, avaliação e a interpretação / aplicação do modelo. A Figura 2.06 mostra as iterações que levam à obtenção do modelo ótimo. Naturalmente temos estes procedimentos em nosso intelecto, contudo uma esquematização do mesmo leva a uma redução do tempo para obtê-lo, já que os passos são bem definidos e organizados.

1. Definição e formulação do problema – esta fase é importante, pois é nela que conseguimos definir o problema e identificar os elementos importantes que afetam a solução do problema. A variação necessária ao modelo, bem como seu potencial pode ser determinado, além de se poder avaliar a estrutura e a complexidade do modelo. Nesta fase define-se:

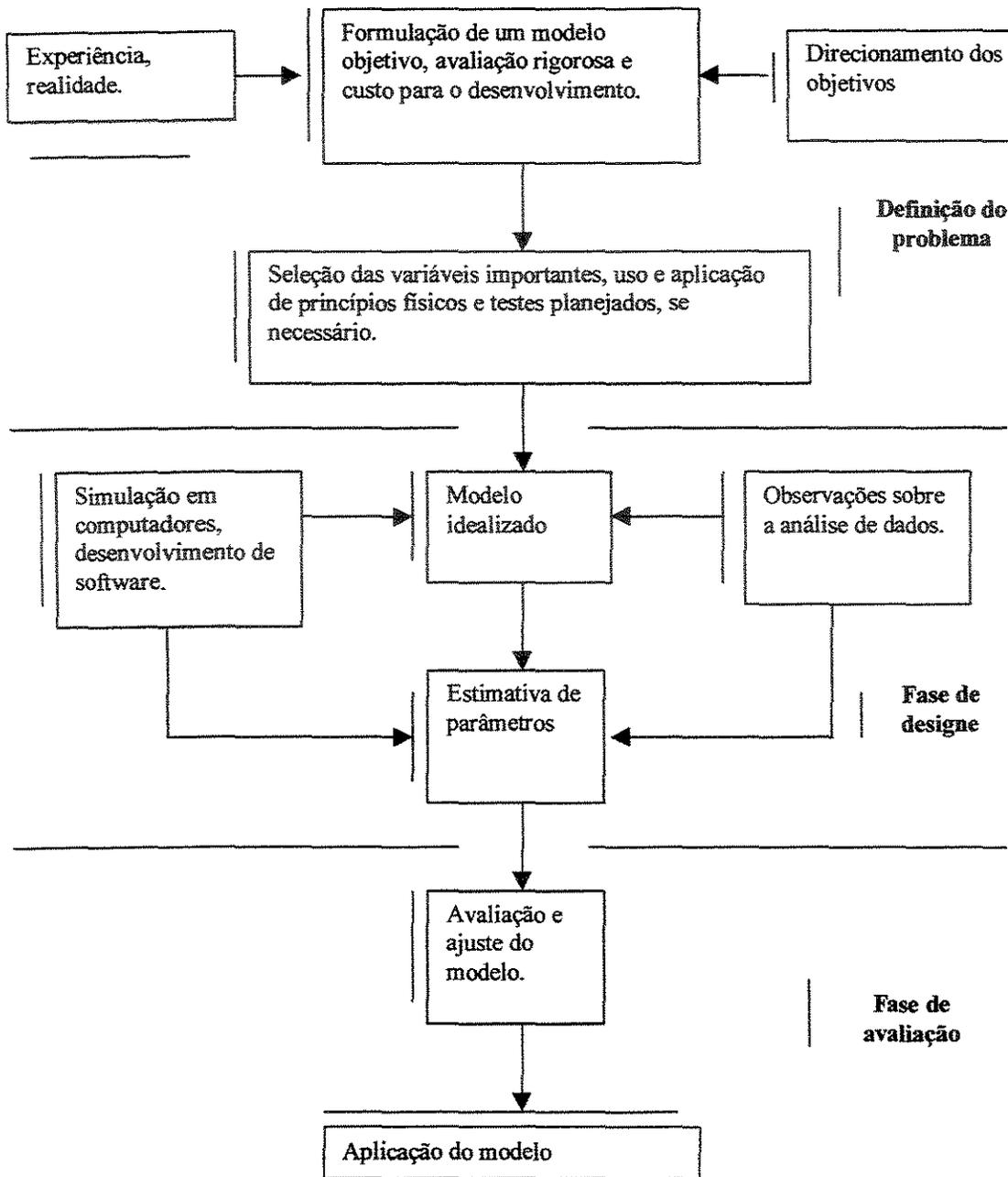


Figura 2.06 – Atividades comuns na elaboração de um modelo, do princípio a sua aplicação (EDGAR & HIMMELBLAU, 1989).

- O número de variáveis independentes a serem incluídas no modelo;
- O número de equações independentes requeridas para descrever o sistema (às vezes definindo até a “ordem” do modelo);
- O número de parâmetros desconhecidos do modelo.

2. Fase de “Design” do modelo – esta fase inclui informações específicas do modelo, basicamente é descrita pela escolha da lógica de programação e algoritmos necessários para aplicação do modelo, formulação da descrição matemática aproximada e simulação do modelo. Inicialmente definem-se as variáveis de entrada e saída e determinem-se quais são os “sistemas” e “ambientes” envolvidos no modelo. Para que o modelo seja implementado é necessário que sejam verificadas a validade e adequação dos “softwares” e “hardware” existentes, os meios de entrada e saída de dados, bem como o desenvolvimento de lógica de “flowsheets” e a definição das relações e estruturas dos programas.

3. Fase de Avaliação – esta é fase de exame final do modelo. A análise do modelo depende dos critérios de avaliação requeridos e de testes previamente planejados na definição do modelo. Estes testes avaliam a sensibilidade do modelo, através da entrada de dados e da correlação entre parâmetros e relações físicas significativas. Este passo também se refere a um diagnóstico feito por análises estatísticas de ajuste de dados (EDGARD & HIMMELBLAU, 1989).

Os modelos podem ser escritos de várias formas matemáticas, dependendo apenas da forma que se deseja enfatizar a estimativa dos coeficientes e da complexidade requerida pelo sistema a ser modelado. Abaixo estão citadas algumas formas de modelagem matemática.

2.6.1 - Método dos mínimos quadrados

É uma das formas mais clássicas de se modelar sistemas. Este método se baseia em critérios matemáticos rigorosos para estimar os coeficientes do modelo, a partir dos dados experimentais. Para cada “ p ” ponto dado, pode-se definir o erro j como sendo a diferença entre as observações Y_j , e prever a resposta do modelo $y_j(\mathbf{x})$.

$$Y - y_j = \varepsilon_j \quad \text{para } j = 1, 2, \dots, p \quad (2.10)$$

As variáveis independentes representadas pelo vetor x podem ser diferentes variáveis ou diferentes funções da mesma variável tais como x , x^2 , x^3 , etc. É assumido que as variáveis independentes são conhecidas exatamente e com um erro mínimo envolvido em cada valor de x substancialmente baixo sobre aquele envolvido em Y . Então se assumirmos que f_1 é uma função somatória do erro absoluto, logo teremos:

$$f_1 = \sum_{j=1}^p |\varepsilon_j| \quad (2.11)$$

Entretanto, um erro clássico criterioso é o somatório dos erros quadrados dado por:

$$f_2 = \sum_{j=1}^p \varepsilon_j^2 \quad (2.12)$$

Usando modelo linear simples $y = b_0 + b_1x$, para demonstrar o princípio de estimativa dos coeficientes do modelo pelo método dos mínimos quadrados, teremos, após a substituição das equações 2.10 e 2.12 na linear:

$$f_2 = \sum_{j=1}^p (Y_j - y_j)^2 = \sum_{j=1}^p (Y_j - \beta_0 - \beta_1 x_j)^2 \quad (2.13)$$

Esta equação possui dois coeficientes não conhecidos, β_0 e β_1 , e p pares de valores experimentais de Y_j e x_j . Ao minimizarmos f_2 encontramos os valores dos coeficientes, já que esta foi obtida a partir de uma equação linear. Logo, ao fazermos as primeiras derivadas parciais de f_2 igual a zero, teremos a condição necessária para o mínimo da função.

$$\frac{\partial f_2}{\partial \beta_0} = 0 = 2 \sum_{j=1}^p (Y_j - \beta_0 - \beta_1 x_j)(-1) \quad (2.14.a)$$

$$\frac{\partial f_2}{\partial \beta_1} = 0 = 2 \sum_{j=1}^p (Y_j - \beta_0 - \beta_1 x_j)(-x_j) \quad (2.14.b)$$

Considerando b_0 e b_1 , como sendo os valores estimados dos coeficientes β_0 e β_1 , respectivamente, obtemos as soluções das equações 2.14. Rearranjando os resultados em função das duas variáveis desconhecidas b_0 e b_1 para as equações lineares, teremos:

$$\sum_{j=1}^p b_0 + \sum_{j=1}^p b_1 x_j = \sum_{j=1}^p Y_j \quad (2.15.a)$$

$$\sum_{j=1}^p b_0 x_j + \sum_{j=1}^p b_1 x_j^2 = \sum_{j=1}^p x_j Y_j \quad (2.16.b)$$

Como o somatório $\sum_{j=1}^p b_0$ é igual a $p(b_0)$ e nos outros somatórios as constantes b_0 e b_1 podem ser removidas dos termos em somatório, então as equações anteriores, se apresentarão como sendo:

$$b_0(p) + b_1 \sum_{j=1}^p x_j = \sum_{j=1}^p Y_j \quad (2.17.a)$$

$$b_0 \sum_{j=1}^p x_j + b_1 \sum_{j=1}^p x_j^2 = \sum_{j=1}^p x_j Y_j \quad (2.17.b)$$

Sendo assim, como temos duas equações e duas incógnitas, pode-se facilmente solucionar o problema acima com a predição dos valores de y experimentais, utilizando a

equação para calcular \hat{Y} . Esta é dada por: $\hat{Y} = b_0 + b_1x$, as análises estatísticas dirão o quanto o modelo está ajustado, ou o quanto este se distancia dos valores reais, pedindo assim um melhor ajuste.

Análogo à análise linear, podemos encontrar a equação para uma função de potencia qualquer, bastando substituir a equação dos erros quadráticos (2.12), na equação desejada e proceder da mesma maneira que para a linear. De modo geral, como percebemos que a dependência da resposta é linear com os coeficientes, e que os valores de x e y são sempre conhecidos, logo podemos generalizar o método dos mínimos quadrados utilizando a equação de uma potência de grau qualquer, expressa abaixo:

$$y = \sum_{i=0}^n \beta_i x_i \quad x_0 = 1 \quad (2.18)$$

Nesta equação x_0 é uma constante, desta maneira a equação apresenta somente uma intersecção. Nesta temos n variáveis independentes x_i , $i = 1, \dots, n$; como meios controláveis e ajustáveis. Obviamente a equação é linear com β_i , podendo não ser linear com x_i , contudo, os valores destas ultimas variáveis, como já são previamente conhecidos, não são objetos de interesse, pois não interferirão ao serem substituídos na equação do modelo, já que utilizamos b_i para predizer os valores β_i , e estes são lineares com a variável dependente. Tomemos como exemplo, um modelo para função quadrática:

$$y = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2x^2 \quad (2.19)$$

Ao se observar à equação 2.18, percebe-se que: $x_0 = 1$, $x_1 = x$ e $x_2 = x^2$, assim, ao introduzirmos a equação 2.19 na equação 2.12, obtém-se:

$$f_2 = \sum_{j=0}^p (Y_j - y_j)^2 = \sum_{j=0}^p (Y_j - \sum_{i=0}^n \beta_i x_{ij})^2 \quad (2.20)$$

As variáveis independentes agora são as designadas por um par de índices sub-escritos, onde o primeiro e o segundo indicam, respectivamente a designação (o tipo) da variável independente e a seqüência de p pontos dados conhecidos ($j = 1, \dots, p$).

A diferenciação parcial de f_2 com os respectivos $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$. Igualando as $n+1$ derivadas parciais a zero, obtemos $n+1$ equações em $n+1$ valores de coeficientes estimados (b_0, b_1, \dots, b_n), como se percebe nas equações 2.21.a, b, c e d, mostradas abaixo:

$$b_0 \sum_{j=1}^p x_{0j}^2 + b_1 \sum_{j=1}^p x_{0j} x_{1j} + b_2 \sum_{j=1}^p x_{0j} x_{2j} + \dots + b_n \sum_{j=1}^p x_{0j} x_{nj} = \sum_{j=1}^p x_{0j} Y_j \quad (a)$$

$$b_0 \sum_{j=1}^p x_{1j} x_{0j} + b_1 \sum_{j=1}^p (x_{1j})^2 + b_2 \sum_{j=1}^p x_{1j} x_{2j} + \dots + b_n \sum_{j=1}^p x_{1j} x_{nj} = \sum_{j=1}^p x_{1j} Y_j \quad (b)$$

$$b_0 \sum_{j=1}^p x_{2j} x_{0j} + b_1 \sum_{j=1}^p x_{2j} x_{1j} + b_2 \sum_{j=1}^p (x_{2j})^2 + \dots + b_n \sum_{j=1}^p x_{2j} x_{nj} = \sum_{j=1}^p x_{2j} Y_j \quad (c)$$

· · · · ·
 · · · · ·
 · · · · ·

$$b_0 \sum_{j=1}^p x_{nj} x_{0j} + b_1 \sum_{j=1}^p x_{nj} x_{1j} + b_2 \sum_{j=1}^p x_{nj} x_{2j} + \dots + b_n \sum_{j=1}^p (x_{nj})^2 = \sum_{j=1}^p x_{nj} Y_j \quad (d)$$

A solução deste sistema pode ser feita naturalmente, em um computador, pela multiplicação das matrizes e vetores gerados pelos dados do planejamento (\mathbf{x}) e experimentais (\mathbf{Y}), ou seja:

$$b = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ b_{n-1} \\ b_n \end{bmatrix} \quad Y = \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ Y_{p-1} \\ Y_p \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{1n} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{2n} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & x_{p1} & x_{p2} & \cdot & \cdot & \cdot & x_{pn} \end{bmatrix}$$

Figura 2.07 – Esquema matricial para cálculo das estimativas dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.

A resolução dos sistemas acima descritos pode ser expressa na forma matricial/vetorial, como sendo:

$$\mathbf{X}^T \mathbf{X} \mathbf{b} = \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \quad (2.22.a)$$

Ou ainda, em torno dos coeficientes desconhecidos:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \quad (2.22.b)$$

2.6.2 – Otimização por planejamento fatorial

Neste tipo de otimização, as variáveis independentes são chamadas de fatores, suas variações são chamadas de níveis e o resultado obtido, é chamado de resposta. A metodologia de avaliação do modelo é baseada na análise de variância (ANOVA) e a análise dos modelos otimizados é feita pelo método avaliação da superfície de resposta (RSM). Este tipo de otimização pode maximizar ou minimizar algumas respostas, sem fugir das especificações exigidas (BARROS NETO, et al., 1995 e 2001).

A análise de variância (ANOVA), é feita por parâmetros estatísticos baseados na distribuição Gaussiana para avaliar os erros dos coeficientes, o ajuste e a significância do modelo são feitos através da comparação entre os dados experimentais com os calculados. Os resultados são expressos na forma da Tabela 2.01, que apresenta as fontes de variação nas formas quadráticas e médias, que facilitam o cálculo das porcentagens de variações explicáveis, do coeficiente de determinação e os testes F, os quais indicarão a significância e o ajuste do modelo (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Tabela 2.01 – Tabela de análise da variância de um modelo linear nas estimativas dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_j - \bar{y})^2$	$p-1$	$MQ_R = SQ_R / (p-1)$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r / (n-p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n-m)$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n-1$	

Fonte: BARROS NETO et al, 1995 e 2001.

Onde: y_i é o valor da resposta no nível i , \bar{y} é a média global das respostas, \bar{y}_i é a média das repetições em um nível i e \hat{y}_i é o valor predito desta resposta no nível i . n_i , n , m e p , são respectivamente: o número de repetições no nível i , o número total de observações ($\sum n_i$), o número de níveis distintos e o número de parâmetros do modelo.

As relações SQ_R/SQ_T e $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$, são chamadas respectivamente de porcentagens de variação explicável e porcentagem máxima de variação explicável.

A medida da significância do modelo é feita pela relação entre variações médias devido à regressão e devido aos resíduos (MQ_R/MQ_r). A primeira mede os desvios quadráticos médios dos valores preditos com relação aos experimentais, enquanto que a segunda representa os resíduos deixados por cada nível i deixados pelo modelo para cada resposta.

Já o ajuste dos dados ao modelo é feito pela relação entre as médias quadráticas da falta de ajuste e dos erros puros (MQ_{faj}/MQ_{ep}). A primeira estima a adequação dos dados ao modelo, enquanto que a segunda estima a variância postulada para as observações.

Todos os dois seguem uma análise estatística segundo uma distribuição Gaussiana, logo suas comparações podem ser feitas com valores do teste F, em níveis previamente estabelecidos. Para o primeiro, quanto maior que F tabelado for o valor, mais significativo é o modelo, enquanto que, o segundo este deverá ser menor que o F tabelado, para poder indicar o ajuste de dados ao modelo (BARROS NETO et al, 1995 e 2001).

O coeficiente de correlação múltipla ou coeficiente de determinação (R^2) é tido como a medida da aproximação variação das observações e y_i devido a regressão à variação total em torno da média. Quanto mais próximo de 1,0 for este valor, mais explicável e mais ajustado será o modelo.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.23)$$

As somas quadráticas dos desvios podem ser relacionadas segundo as equações abaixo.

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (2.24)$$

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (2.25)$$

O cálculo dos erros padrões (ε_p) das estimativas dos parâmetros do modelo é feito através obtenção da raiz quadrada da estimativa da variância ($\hat{V}(b)$) dos elementos do vetor b , dados por:

$$\varepsilon_p = \sqrt{\hat{V}(b)} = \sqrt{(X^T X)^{-1} S^2} \quad (2.26)$$

Onde: S é o desvio padrão das repetições no ponto central. Se a metodologia empregada não for por ponto central, torna-se necessário fazer repetições em cada nível, assim obter um desvio padrão para cada nível e com isto seus erros padrões serão dados por seus desvios padrões quadrados utilizados na equação dos erros padrões.

A metodologia de avaliação da superfície de resposta é baseada na análise da equação de otimização em um gráfico em três dimensões, onde os eixos das abscissas e o das ordenadas são formados pelos dados dos fatores, enquanto que a altura é dada pelos valores experimentais da resposta. Nesta superfície pode-se verificar através de curvas de níveis, que delimitam regiões de aclave e declive, com tonalidades de cores diferentes para facilitar a interpretação do resultado da otimização. (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Para execução de um planejamento fatorial tornar-se-á necessário que sejam especificados os níveis de variações dos fatores, para que estes possam ser avaliados isto é, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos. Sendo k número de fatores, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo chamado por isso de planejamento fatorial 2^k .

Os planejamentos podem ser fatoriais fracionários, completos e modificados. Dentre os fracionários, destacam-se os fatoriais de meia fração, representados por 2^{k-1} , que nada mais é aplicado, normalmente, na triagem de fatores que realmente influenciam sobre a resposta daqueles que não têm importância, já que uma análise completa levaria a uma perda de tempo desnecessária. Os fatoriais completos fazem combinações entre os efeitos dos fatores de maneira a obter uma quantidade de ensaios mínima para a obtenção de um bom modelo. Os fatoriais completos mais comumente utilizados são os que se baseiam no método do ponto central e no método estrela, embora estes empreguem uma quantidade maior de experimentos que o completo simples. Os fatoriais modificados nada mais são que adaptações dos fatoriais completos, realizadas devido a inflexões dos fatores, ou outros motivos (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Em otimizações por planejamento fatoriais, os fatores são codificados de forma a se obter as novas variáveis independentes (x_i) com variação simétrica, de tal forma que os pontos laterais formem uma figura geométrica. Estas variações são chamadas de níveis, e normalmente assumem os valores -1, 0 e +1. Pela nomenclatura específica desta forma de modelagem, os níveis, recebem os seus valores codificados como nome (BARROS NETO et al, 1995 e 2001).

A codificação dos fatores se dá pela elaboração de equações que os normalize, através da subtração dos seus valores intermediários pelos extremos, com divisão posterior pelo desvio destes ao médio. Tomemos como exemplo um estudo cinético qualquer, onde a taxa de reação (r) é influenciada apenas, neste caso, pela pressão (P) e pela temperatura (T) no reator. De um modo geral, sendo os valores médios dos fatores \bar{P} e \bar{T} , suas variações

serão dadas por: ΔP e ΔT ; desta forma, ao considerarmos as variáveis codificadas x_1 e x_2 como sendo respectivamente a representação no modelo dos fatores P e T , teremos as suas equações de codificação de dados como sendo:

$$x_1 = \frac{P_j - \bar{P}}{\Delta P} \quad (2.27.a)$$

$$x_2 = \frac{T_j - \bar{T}}{\Delta T} \quad (2.27.b)$$

Onde P_j e T_j representam os valores dos fatores nos níveis j .

Ao se graficar os fatores em eixos perpendiculares e unir seus pontos (com exceção do central), obtém-se sempre uma figura geométrica. Este tipo de modelagem é chamado de “design” ortogonal, e é de uso comum em planejamento fatorial. Um dos tipos de “design” ortogonal em planejamentos fatoriais é o apresentado pelo método do ponto central, Figura 2.08, que por apresentar um planejamento 2^2 , apresenta uma forma quadrática de representação gráfica dos pontos do modelo. Já o método estrela, de acordo com o próprio nome, apresenta um “design” ortogonal com forma geométrica de uma estrela. Na Figura 2.09, observa-se o “design” em forma de estrela, com a introdução dos níveis necessários à sua formação: $-\alpha$ e $+\alpha$ ($\alpha = \sqrt{2}$), com as suas devidas codificações segundo a regra já explicada. Estes valores são justificados devido ao ângulo de 45° que os novos pontos fazem com os eixos formados de ligação entre os outros pontos.

O valor de α depende da quantidade total de pontos (n_{fat}) do design nas coordenadas $(\pm 1, \pm 1)$ utilizadas no planejamento, segundo Box e Hunter (BARROS NETO et al., 2001) este valor é dado por $\alpha = (n_{fat})^{1/4}$, desde que a variância das estimativas só dependam da distancia em relação ao ponto central, definindo assim um planejamento rodável. KHURI & CORNEL (1996), apresenta varias formas de designs com rotatibilidade

que apresentam valores de α para três variáveis dependendo da quantidade de vértices da figura geométrica. A seguir serão apresentados alguns valores de α e as figuras que os geraram, para três fatores.

1. Seis de um octaedro, o valor de $\alpha = \pm\sqrt{3}$.
2. Doze vértices do icosaedro, o valor de $\alpha = \pm a$ ou $\pm b$.
3. Vinte vértices do dodecaedro, o valor de $\alpha = \pm c$ ou $\pm 1/c$.
4. Se octaedro se encontrar em rotação cilíndrica, o valor de $\alpha = \pm\sqrt{2}$.

Onde: $a = 1,473$, $b = 0,911$ e $c = 1,618$, estes valores são dependentes do raio que a figura geométrica descreve. Existem ainda outros valores para o α , pois depende do tipo de design empregado (KHURI & CORNEL, 1996).

Para que o modelo seja obtido em menor tempo e com maior eficiência deve-se orientar os ensaios de forma organizada e direcionada. Para tanto, foi criada uma tabela com todos os ensaios e dados necessários para direcionar os experimentos de forma objetiva e seqüenciada. A Tabela 2.02 é denominada de matriz de planejamento, nesta estão contidos todos os ensaios que serão realizados em um determinado experimento, formados pela combinação dos níveis +1, -1, $-\alpha$ e $+\alpha$, de cada fator, e as repetições no ponto central. Estas ainda apresentam as devidas codificações e valores das devidas respostas encontradas nos experimentos realizados. Estes dois últimos são utilizados nas matrizes que calcularão os valores dos coeficientes desconhecidos dos modelos.

O tamanho das matrizes de planejamento depende da quantidade de fatores utilizados no modelo. Normalmente, a primeira coluna representa os n ensaios a serem realizados, sendo em seguida apresentados os fatores em colunas ordenadas segundo as suas posições no modelo, vindo após estes, as variáveis codificadas na mesma ordem dos fatores e por final, a tabela apresenta a coluna com as respostas. As linhas seguem a ordem descrita pelos n experimento, sendo que a primeira coluna, geralmente, apresenta os valores do primeiro fator oscilando entre linhas e a segunda coluna, com o segundo fator oscilando em linhas duplas, e a terceira com o terceiro fator, oscilando em linhas quadruplicadas, nos

níveis – e +. Após estas seqüências entre linhas, vêm os pontos centrais em no mínimo triplicata, onde todos os fatores se apresentam no nível 0. Todas as combinações entre os fatores são representadas no “design” ortogonal, mais especificamente pelos pontos da figura. As respostas seguem pela substituição dos dados experimentais obtidos em cada “n” ensaios (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Começaremos admitindo que a superfície de resposta para modelagem do estudo cinético, nessa região, é uma função linear dos fatores e que, portanto a resposta pode ser estimada pela equação.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \quad (2.28)$$

Onde b_0 , b_1 e b_2 são as estimativas dos parâmetros do modelo já citados anteriormente, x_1 e x_2 representam as variáveis codificadas dos fatores pressão (P) e temperatura (T) e sendo y a variável dependente (resposta), que é a taxa de reação (r). As estimativas dos parâmetros podem ser obtidas pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância indicará se o modelo é significativo. Se este for ajustado, a superfície de resposta para a otimização dos dados será então descrita satisfatoriamente pela equação 2.28, que é uma equação de um plano.

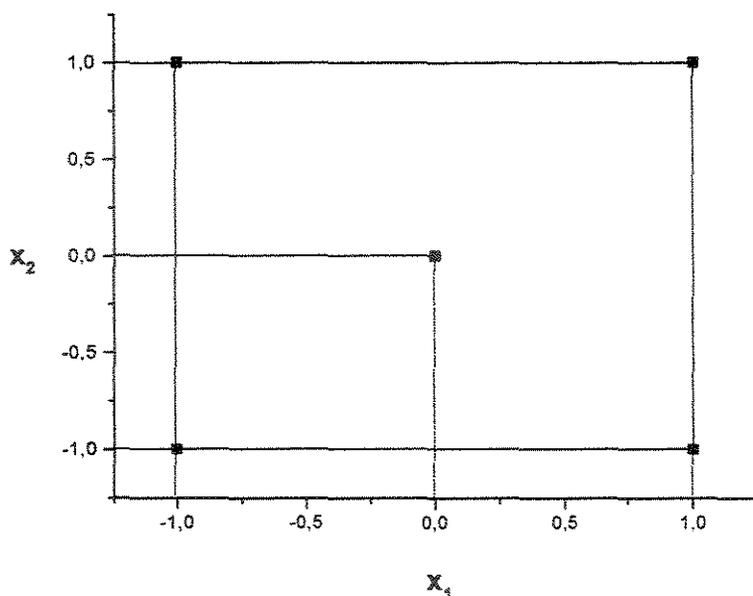


Figura 2.08 – Estimativa de parâmetros usando modelo ortogonal por planejamento fatorial em dois níveis com ponto central (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

Se o modelo linear não for significativo, o passo seguinte, naturalmente, é tentar um modelo quadrático, cuja expressão geral, para duas variáveis é dada pela equação abaixo:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2.29)$$

Esse modelo, no entanto, tem seis parâmetros, e este planejamento tem apenas cinco níveis, isto é, cinco diferentes combinações de valores das variáveis, o que conduz a uma ampliação do planejamento fatorial. A ampliação pode ser feita em várias maneiras. A mais comum é a construção do chamado planejamento em estrela. Para fazer um planejamento em estrela, deve-se fazer uma análise idêntica ao método do ponto central, adicionando-se uma figura geométrica igual à anterior, porém, esta deverá girar 45 graus em relação à orientação de partida. O resultado é uma distribuição octogonal, como mostra

a Figura 2.09. Uma análise geométrica simples leva à conclusão de que os novos pontos estão a uma distância de $\sqrt{2}$ do ponto central (em variáveis codificadas) e, portanto são localizados de acordo com as coordenadas mostradas nas quatro últimas linhas da Tabela 2.02, que é a matriz de planejamento do sistema catalítico em estudo demonstrativo.

Tabela 2.02 – Matriz de planejamento gerada pelo planejamento completo (em estrela e ponto central) para estudar a influência dos fatores pressão (P) e temperatura (T) sobre a taxa de reação (r) em um estudo de cinética reacional.

Ensaio	P (atm)	T (K)	X_1	x_2	Y
1	P_{-1}	T_{-1}	-1	-1	y_1
2	P_{+1}	T_{-1}	+1	-1	y_2
3	P_{-1}	T_{+1}	-1	+1	y_3
4	P_{+1}	T_{+1}	+1	+1	y_4
5	\bar{P}	\bar{T}	0	0	y_5
6	\bar{P}	\bar{T}	0	0	y_6
7	\bar{P}	\bar{T}	0	0	y_7
8	$P_{-\alpha}$	\bar{T}	$-\sqrt{2}$	0	y_8
9	\bar{P}	$T_{-\alpha}$	0	$-\sqrt{2}$	y_9
10	$P_{+\alpha}$	\bar{T}	$+\sqrt{2}$	0	y_{10}
11	\bar{P}	$T_{+\alpha}$	0	$+\sqrt{2}$	y_{11}

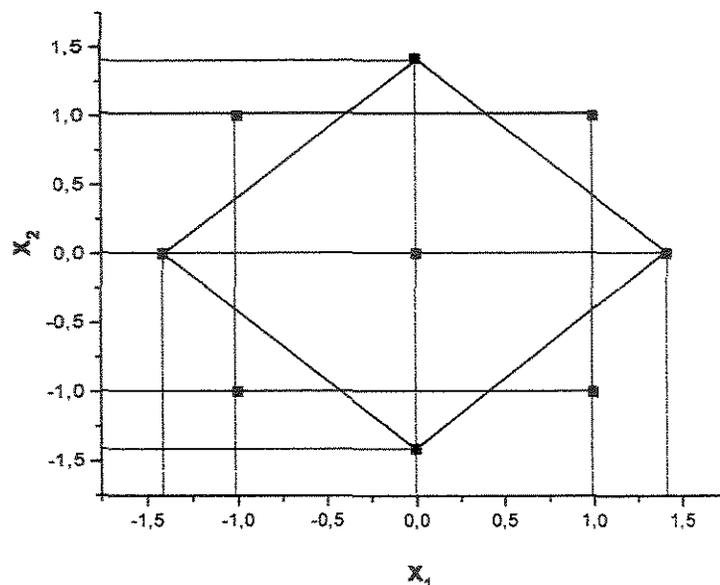


Figura 2.09 – Estimativa de parâmetros usando “design” ortogonal para estimativa de parâmetros por um planejamento fatorial 2^2 pelo método estrela (BARROS NETO et al., 1995 e 2001).

2.6.3 – Aplicação da otimização por planejamento fatorial

Esta metodologia de modelagem é amplamente empregada em pesquisas nas áreas de processos de separação, em reações de síntese e decomposição, na determinação da influência de fatores sobre as propriedades físicas ou químicas de materiais, em métodos analíticos, no desenvolvimento de novos materiais, etc., com intuito de obter uma resposta mais ampla e segura através da análise de dados coletados no campo, na indústria, no laboratório, enfim, nos diversos setores de pesquisa, sejam eles públicos ou privados. Assim, os pesquisadores conseguem avaliar a influência de diversos fatores sobre uma ou mais respostas, podendo a partir do modelo otimizado fazer melhoria nos diversos processos, com uma justificativa firme e sensata. (BARROS NETO, et al., 1995 e 2001).

Em processos industriais ainda em fase de desenvolvimento, o normal é que seja feita a otimização deste, fazendo testes e ajustes em uma planta piloto. A partir desta,

passa-se à produção propriamente dita, em escala ampliada. Contudo, surgem problemas devido à variação de escala. O efeito dos fatores como a agitação, transferência de massa, eficiência do equipamento, etc., varia com o tamanho do equipamento. Além destes, existem os problemas corriqueiros do dia-a-dia da indústria, falta de controle, defeitos e troca de peças do equipamento, variação na matéria prima ou em suas condições de armazenamento, etc. O que leva a necessidade de ajustes finais no modelo (BARROS NETO et al., 2001). Algumas aplicações da otimização por planejamentos fatoriais voltadas para as indústrias de alimentícias, para métodos de analíticos e para a biotecnologia são citadas abaixo:

Recentemente foi estudada a otimização da produção de “snaks” elaborados a partir da mistura de farinhas de aveia e amido de milho com alto teor de amilopectina, através de um delineamento fatorial do tipo 2^5 modificado, tendo como fatores o teor de umidade, a temperatura de extrusão, a rotação do parafuso, diâmetro da matriz, teor de amido modificado e três respostas, sendo elas: volume específico, dureza e fraturabilidade. Contudo, como os modelos gerados tinham cinco fatores, tiveram que fixar o valor de alguns destes fatores no ponto central, de tal forma que a combinação destes valores gerassem gráficos tridimensionais que facilitaram a análise visual da superfície de ação de certos fatores sobre as respostas. Todos os modelos atingiram uma otimização acima de 95,88% e foram significativos, sendo que a melhor regressão foi obtida para o modelo quadrático contendo o volume específico como resposta (KARAN et al., 2001).

A cinética de secagem de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*) foi avaliada por diversos modelos apresentados na literatura, para determinação da constante de secagem da mesma. Como agentes influenciadores desta constante, foram utilizados os fatores temperatura e vazão mássica do ar de secagem, e o tempo de operação do secador. Para desenvolvimento e obtenção dos modelos, foram utilizadas: a metodologia de planejamento fatorial para determinação dos ensaios que foram realizados, a análise de variância para avaliar o ajuste de dados e a significância dos modelos, bem como a metodologia de superfície de resposta para avaliação da aproximação da área otimizada (GUEDES & FARIAS, 2000).

A pirólise e as temperaturas de atomização de vários metais foram utilizadas como fatores em um estudo feito para avaliar a absorção atômica (resposta) de metais usando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS). A otimização dos dados levou as equações que melhores se ajustaram às dependências da absorção aos efeitos, sendo quadrática, linear ou ambas, o que ficou caracterizado para cada metal, segundo a equação: $A = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 T + \beta_3 P^2 + \beta_4 T^2 + \beta_5 P \cdot T$ (PEREIRA-FILHO, et al., 2002).

A otimização baseada em planejamento fatorial foi aplicada no cultivo das microalgas *Spirulina maxima* em meio padrão com ausência e presença de nitrogênio (Sob a forma de KNO_3), utilizando as temperaturas de 25°C e 35°C, tendo como resposta a produção de lipídios por estas algas. O melhor modelo mostrou que a variação da concentração de lipídios totais (LIPT) é linear com a temperatura (T) e que a mesma varia de forma parabólica com a concentração de nitrogênio (N), sendo sua equação dada por: $LIPT = A + B^2T + CN^2$, onde A e B são constantes (MACEDO & ALEGRE, 2001).

Um estudo sobre a produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície com *Acetobacter xylinum*. Para isto foi feito um delineamento por planejamento fatorial composto de pontos axiais com valores de ± 2 (quando o normal é utilizar $\pm \alpha = \pm 1,41$), modificando assim as equações normais dos modelos. Os fatores utilizados foram pH do meio de cultura, a influência da adição de açúcares e ácidos no processo. Contudo, seus resultados não foram bem ajustados ao modelo, dando baixas porcentagens de variações explicáveis, sendo que os modelos quadráticos apresentaram melhor ajuste e suas superfícies de respostas mostraram as condições ótimas para a produção de nata, como sendo 0,66 mol/L de ácido acético e 6,7 g/100 mL de glicose (DANESI & WOSIACKI, 1998).

A influência do pH (x_1) e da concentração de NaCl (x_2) sobre o coeficiente de partição da albumina de soro bovino foi estudada em sistema bifásico aquoso PEG/

Dextrana. Utilizou-se neste trabalho “design” por planejamento fatorial 2^2 , com desvio das variáveis codificadas de 2,0, para o pH, e 0,1 M; para a concentração do sal. Neste aplicou-se a metodologia de planejamento em estrela, com seis ensaios repetitivos no ponto central, o que gerou em um total de 14 experimentos. O modelo proposto para a estimativa dos parâmetros foi $K = \sum_{m+n \leq 4} b_{mn} x_1^m x_2^n$, ou seja, uma equação de potencia de grau 4. A predição dos valores gerou erros baixos para a estimativa dos parâmetros, contudo a correlação múltipla dos modelos gerou entre 0,654 e 0,966, indicando que estes não estão estatisticamente bem ajustados. A superfície de resposta, gerada no “software” matemática, mostrou que a região ótima para a partição e albumina de soro bovino, tende para uma faixa de pH e concentração de NaCl baixos, apresentada pelo melhor modelo: $K = 0,0176 + 0,002907x_1^2 - 0,00374x_1^3 - 0,00176x_2^3 + 0,002508x_2^4$ (GUNDUZ, 2001).

A quitosanase é uma enzima que hidrolisa a quitina, um polisacarídeo linear composto de ligações β -1,4 D-Glucosamina. Estas enzimas são obtidas de bactérias, fungos e vegetais. A quitosana produzida por *Bacillus cereus* foi caracterizada com otimização por planejamento fatorial 2^3 , modificado, tendo como fatores a temperatura e o tempo de reação. Os resultados do modelo otimizado apresentaram baixas correlação múltipla e porcentagem de variância explicável, contudo os dados foram utilizados para definir as melhores condições para a partição das mesmas. As enzimas recuperadas em sistema bifásico aquoso foram obtidas variando concentrações percentuais de PEG, de fosfato e de NaCl a pH 5,8. Os dados obtidos apresentaram como melhor sistema para partição destas enzimas, o composto por: 22% PEG 1500 + 13% Fosfato + 12% NaCl a pH 5,8, com recuperação de 66% das enzimas (PIZA et al., 1999).

Os aminoácidos L-fenilamina, L-tirosina e L-triptofano, e a proteína insulina de soro humano, foram particionadas em sistemas bifásicos aquosos PEG/polímero. Para a otimização dos dados foi feito um planejamento fatorial 3^3 , com os fatores: massa molar dos polímeros, pH e temperatura do sistema; todos em três níveis em design ortogonal de ponto central. Neste, logicamente, foram realizados 27 ensaios com no mínimo triplicatas em todos os pontos, 81 experimento, no mínimo. Seus resultados foram muito confusos,

sem condizer os apresentados pela literatura, seus modelos não foram significativos e apresentaram falta de ajuste de dados, além de não apresentaram boa correlação múltipla. Contudo, suas conclusões sobre a análise de superfície de resposta levaram a referir que a partição sofre uma maior influência do pH e da temperatura que da massa molar do polímero, só que esta influência varia bastante para cada aminoácido ou proteína (BERNARDO, 2000).

A otimização da recuperação das enzimas xilanases da *Penicillium janthinellum* em coluna de extração contínua de campânulas pulsantes em sistema de misturas reversas foi estudada, com um planejamento fatorial 2^2 , contendo a força iônica (A) e o fluxo volumétrico (B) como fatores e a recuperação da xilanase (Y) como resposta. O modelo empírico que mais se ajustou aos dados obtidos experimentalmente foi $Y = 110,17 - 3,75A - 29,45B + 4,2AB$, com uma correlação múltipla de 0,99 e região ótima se aproximando dos menores valores dos fatores (RODRIGUES & TAMBOURGI, 2001).

2.7 – Modelagem matemática de um extrator líquido-líquido diferencial

Como nos separadores em contra-corrente o tempo de contato é pequeno, logo a condição de equilíbrio nunca é atingida, e como resultado disto temos um aumento na transferência de massa. Para se analisar a extração diferencial serão utilizadas: as equações de equilíbrio do sistema, do balanço de massa e da taxa transferência de soluto da fase pesada para a fase leve.

Da equação de equilíbrio entre as fases, temos que:

$$x = Ky^* \quad (2.30)$$

Na qual y^* é a concentração do soluto na fase pesada que poderia estar em equilíbrio com x e K é o coeficiente de partição. Após, um balanço de massa ao longo da coluna diferencial, partindo da sua base até uma altura z obtemos a seguinte equação:

$$Hy + L(0) = Hy_0 + Lx \quad \text{ou} \quad x = H/L(y - y_0) \quad (2.31)$$

Onde y_0 é a concentração do soluto em $z = 0$ e x e y são concentrações deste em uma altura z qualquer sem que haja equilíbrio. A equação 2.31 também é chamada de linha de operação de uma coluna de extração líquido-líquido diferencial.

Com base num balanço de massa diferencial na fase pesada para um volume igual a $A\Delta z$, chega-se a uma expressão da taxa de soluto que é transferida da fase pesada para a fase leve.

$$[\text{Fluxo de soluto acumulado}] = [\text{Fluxo de soluto saindo}] - [\text{Solute Acumulado}]$$

$$0 = -H(y)_z - y]_{z+\Delta z} - rA\Delta z \quad (2.32)$$

Sendo r a taxa de transferência de massa. Ao dividir a equação 2.32 por $A\Delta z$ e fazendo $\Delta z \rightarrow 0$, tem-se:

$$0 = (H/A)dy/dz - r \quad (2.33)$$

Como a taxa de transferência de massa é proporcional à área superficial por unidade de volume, onde o soluto é transferido mais rapidamente quanto menor for o tamanho da bolha. Admitindo-se que a taxa de transferência de massa seja proporcional à distância da concentração em relação ao equilíbrio, portanto, pode-se escrever que:

$$r = Ka(y - y^*) \quad (2.34)$$

Onde a é a área superficial por unidade de volume e K é o coeficiente de transferência de massa. Desta forma, a equação 2.34 torna-se:

$$\frac{dy}{dz} = \frac{Ka}{H} (y - y^*) \quad (2.35)$$

A altura de um extrator diferencial pode ser calculada a partir da equação de equilíbrio, da linha de operação e do balanço de massa na fase pesada. Combinando essas equações, e rearranjando-as, tem-se como resultado:

$$l = \int dz$$

$$l = \frac{\left(\frac{H}{A}\right)}{Ka} \int_{y_0}^{y_1} dy / (y - x / K)$$

$$l = \frac{\left(\frac{H}{A}\right)}{Ka} \int_{y_0}^{y_1} \frac{dy}{\frac{y - H}{LK(y - y_0)}} \quad (2.36)$$

Se fizermos $KL = E$, teremos:

$$l = \frac{\left(\frac{H}{A}\right)}{Ka} \frac{E}{(E - 1)} \ln \left(\frac{(y_1 - x_1)}{y_0} \right) \quad (2.37)$$

Esta é a equação de projeto de extratores líquido-líquido diferencial.

Sendo os termos dentro das barras e entre as chaves são conhecidos como sendo a Altura de Unidade de Transporte e como Número de Unidades de Transferência, chegamos à equação abaixo:

$$I = [AUT] \{NUT\} \quad (2.38)$$

O termo AUT mede a eficiência de separação do equipamento, enquanto que, o termo NUT mede a dificuldade de separação do equipamento (BRESCANCINI, 1995; SOUZA, 1997).

2.8 – O Amido e suas fontes naturais

O amido é, depois da celulose, o carboidrato mais encontrado na natureza, sendo encontrado principalmente no milho, no arroz, no trigo e na mandioca. Na Tabela 2.03, mostramos a composição de amidos naturais para alguns produtos.

Tabela 2.03 - Composição de amido de várias fontes naturais.

Produto natural	% da amilose	% amilopectina
Amido de milho	24,0 - 27,0	70
Amido de arroz	15,0 - 18,5	79
Amido de trigo	20,0 - 25,0	80
Amido de mandioca	16,7 - 25,0	80

FONTE: JOSLYN (1968) e GREENWOOD (1956) in REGULY (1996).

No Brasil, destaca-se como fonte de amido a mandioca (*Manihot spp*) e o milho (*Zea mays*). A mandioca (*Manihot spp*) é usada no preparo de farinha de mesa e também na indústria, já o milho (*Zea mays*) é utilizado tanto para fins industriais (amidos modificados) e *in natura* (consumo humano e animal). A Tabela 2.04 apresenta a composição aproximada dos grãos de milho e sua farinha integral.

Tabela 2.04 – Composição aproximada do grão de milho.

Parâmetros	Valores (%)
Umidade	12,0 - 13,5
Amido	58,0 - 65,0
Açúcares redutores	2,5 - 5,0
Proteína	9,5 - 12,5
Gordura	3,9 - 6,0
Celulose	2,0 - 4,7
Cinzas	1,3 - 2,7

FONTE: REGULY (1996).

O amido dos cereais não é tão facilmente separável como o dos tubérculos, porque a presença concomitante de proteínas, parcialmente solúveis, durante a extração do amido, acarreta problemas de sedimentação e separação, devido à formação de espumas e aglutinação, o que para a centrifugação, processo mais indicado para um rendimento quantitativo em amido, significa perdas. Por outro lado, os tubérculos apresentam na polpa um intrincado complexo de fibras-pectina-amido, o que torna a separação das fibras um problema em determinadas aplicações deste tipo de amido.

O amido, denominado por α -1,4 glicano (ou glucano), é composto quimicamente por duas moléculas enroladas em espira separáveis, de glicanos. Apresenta em sua estrutura

os glicanos: amilose e amilopectina. O primeiro é um polímero linear da glicose, no qual as unidades piranosídicas desta última estão ligadas como α -1,4; constitui essa fração 20 a 26 % da molécula do amido, conforme a matéria-prima natural que a contém; enquanto que o segundo é um polímero ramificado, no qual as unidades piranosídicas também estão em sua grande maioria como α -1,4; porém há 4 a 5 % de ligações α -1,6, o que confere à estrutura uma ramificação tipo arborescente (REGULY, 1996).

A maioria dos microorganismos não possui o sistema enzimático que quebre a molécula do amido, condição necessária para o seu aproveitamento biológico, dada a sua constituição macromolecular. Entretanto aqueles que produzem a amilase podem crescer em meio amiláceo, já que essas enzimas hidrolisam o amido formando a dextrina, maltose e glicose. Isso ocorre com muitas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Mucor* e com bactérias *Bacillus subtilis*.

A hidrólise enzimática em relação às demais é de maior relevância, porque pode desenvolver-se nas condições brandas de temperatura e de concentração iônicas existentes e necessárias aos processos celulares.

Para que possa haver o aproveitamento do amido como fonte energética, dado o seu teor em glicose, o homem utiliza microorganismos que:

- Sejam capazes de hidrolisar o polissacarídeo através do seu “aparelho” enzimático (amilases);
- Sejam capazes de fermentar, ou seja, transformar em outros produtos, o amido hidrolisado disponível.

É importante salientar que existem muitos microorganismos capazes de realizar as atividades acima descritas, entretanto, tem-se buscado também utilizar enzimas com função biológica (atividade enzimática) que permitam realizar a hidrólise do amido disponível

obtidas a partir de produtos agrícolas, tais como vegetais, cereais, entre outros (FOGARTY & KELLY, 1979; REGULY, 1996; WISEMAN, 1987).

2.9 - Milho (*Zea Mays*)

O milho (*Zea mays*) é um monocotilédone pertencente à ordem graminales (ou glumiflorae p.p.), a qual compreende uma única família, a gramineae, que é constituída na sua maioria por plantas herbáceas, conhecendo-se poucas exceções de representantes lenhosos. Tipicamente as flores são muito pequenas, praticamente destituídas de perianto e são protegidas por brácteas e bractéolas secas, reunidas em características inflorescências, com fruto seco, do tipo cariopse e semente com abundante endosperma.

A família gramineae é uma das maiores famílias de angiospermas, e provavelmente a de maior importância econômica para o homem. A maioria das plantas incluídas nesta família é composta de herbáceas, anuais ou perenes, caules do tipo colmo (com nós e entrenós), oco ou cheio, com rizoma desenvolvido ou não, folhas com nervação paralela e com bainha larga, aberta, provida de lígula na base do limbo (no limite deste com bainha). A cada nó está inserida uma só folha com pêlos uni ou bicelulares e estômato característico deste grupo de plantas (JOLY, 1998).

A estrutura de reprodução básica é a espiguiha (espícula), que é um tipo especial de inflorescência destas plantas. Consta de um eixo (ráquila) na base do qual se encontram duas bácteas secas, as glumas, uma inferior ou externa e outra superior ou interna, e de uma a muitas flores, que são pedunculadas ou sésseis. Cada flor é protegida por duas bractéolas secas, as glumelas, uma inferior a lema, e outra superior, a palea. Cada espiguiha contém 50 flores, que são unissexuais, embora para a maioria das espécies desta família seja hermafrodita, dentro da pálea encontramos duas lodículas que têm a função de afastar as glumelas e assim provocar a abertura das flores. Os elementos de reprodução são representados por três estames, ovário súpero, tricarpelar e unioocular, com um estigma

plumoso (dois para as demais espécies), fruto do tipo cariopse e endosperma abundante (JOLY, 1998).

2.9.1 - Fisiologia das Sementes de Milho

Como todo monocotilédone, o milho possui divisões em suas sementes, que são: a camada protetora (casca), a aleurona, o endosperma e o embrião.

O embrião do milho (*Zea mays*) possui três partes:

- O cotilédone;
- O epicótilo (que origina o broto);
- A radícula (que se origina a raiz).

A germinação de sementes ocorre quando o crescimento da radícula rompe o tegumento da semente e aparece como uma raiz jovem. A energia para a germinação da semente vem da respiração do açúcar do endosperma. Contudo, o embrião e o amido estão separados um do outro, ou seja, para que a semente germine deve haver ação de forças externas para ativar suas funções fisiológicas.

Naturalmente, há uma pequena atividade biológica nas sementes, devido à presença das enzimas β -amilase que degrada o amido para produzir a maltose e fornecer energia para manter a atividade biológica nas células da semente.

Ao se fornecer água a semente, suficiente para atingir entre 40% a 45% em peso, esta entra em processo acelerado exponencialmente de atividade enzimática, segundo a equação $A = b e^{at}$, com coeficientes diferentes para as diversas variedades de sementes (SOUZA et al., 2001).

A água entrando na semente e no embrião dissolve uma substância produzida no interior do embrião. Esta substância é conhecida como ácido giberélico (GA). Este é um hormônio vegetal não muito diferente dos esteróides. O GA dissolvido é transportado com a água pelo restante dos tecidos da semente, até chegar à camada de aleurona.

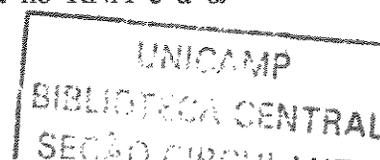
O GA entra no citoplasma dessas células, "ativando" certos genes do DNA nuclear. O DNA é, naturalmente, a molécula hereditária e contém as instruções para fazer todas as proteínas necessárias para a sobrevivência da planta de milho. O mecanismo preciso sobre a "ativação" do DNA pelo GA é ainda desconhecido. É claro, contudo, que o modo de ação é ligar apenas alguns genes específicos do DNA (BORZANI et al., 1986).

Os genes que são "ligados" são transcritos. A informação arquivada em DNA é preciosa, de modo que as células de aleurona fazem uma cópia "descartável" em RNA do gene que está ligado. Esta cópia, como um tipo de projeto, é chamada de RNA mensageiro. O processo de fazer esta cópia é chamado transcrição. O RNA, que foi feito no processo de transcrição é transportado até o citoplasma das células de aleurona.

No citoplasma, o RNA mensageiro junta-se ao ribossomo para começar o processo de produção de uma proteína. Este processo é denominado síntese protéica ou tradução. Neste processo o ribossomo examina a informação mantida na seqüência de bases do RNA.

Os RNA's transportadores carregados com aminoácidos específicos são colocados nas posições especificadas nas instruções do RNA mensageiro e os aminoácidos são agrupados na seqüência certa pelo ribossomo. A seqüência de aminoácidos determina as propriedades da proteína que está sendo montada (BORZANI et al., 1986).

Neste caso, a proteína crítica feita com a informação mantida no RNA é a α -amilase. Esta proteína resulta em uma enzima de grande importância.



Os aminoácidos para a síntese da amilase vêm de um metabolismo existente nas células de aleurona, o que hidrolisa as proteínas armazenadas nestas células. A hidrólise é acelerada por enzimas conhecidas como proteases. Estas enzimas aumentam a taxa na qual a proteína armazenada é cortada em aminoácidos individuais. Os aminoácidos liberados pela hidrólise estão agora livres para serem reunidos na estrutura da amilase pelos ribossomos. Observe na Figura 2.10 o esquema representativo da síntese da α -amilase em um monocotilédone qualquer.

A amilase não é apenas uma proteína, ela é uma enzima que catalisa (acelera) uma reação química particular. Especificamente, as amilases aceleram a hidrólise do amido em suas unidades componentes de açúcar (BORZANI et al., 1986; SOUZA et al., 2001).

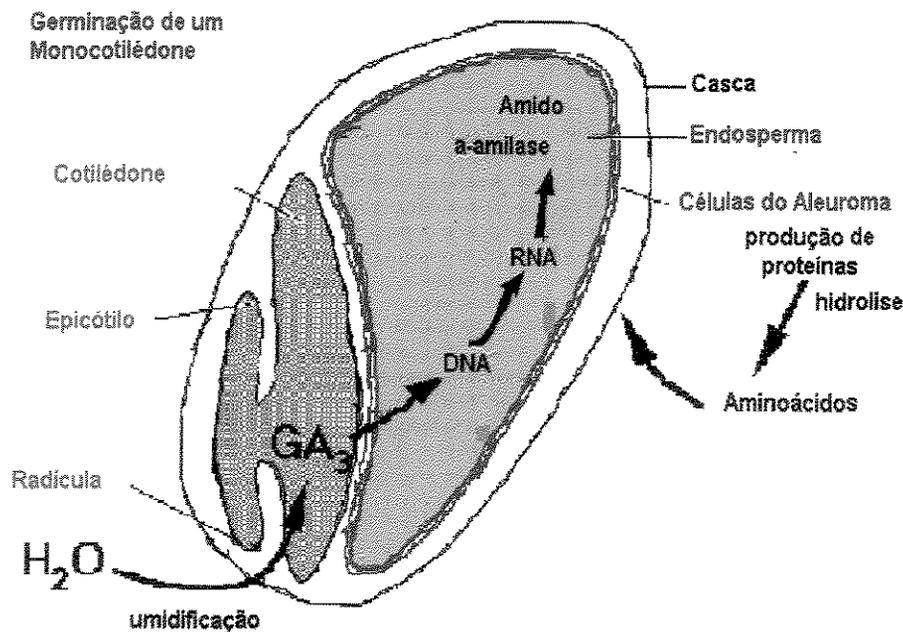


Figura 2.10 – Esquema da síntese da enzima α -amilase pelo DNA, em semente de monocotilédone.

2.9.2 - Armazenamento dos grãos de milho

Após a colheita, as sementes de milho devem ter seu teor de umidade reduzido entre os limites de 10% a 14%, o que torna possível sua armazenagem, acelera a maturação, diminui a possibilidade de ataque de pragas e a ocorrência de doenças, além de diminuir a atividade respiratória. O armazenamento mínimo de grãos deve ser de três semanas para se conseguir a quebra da dormência e, assim, a facilitar a germinação.

2.10 – Enzimas amilolíticas (hidroglicosidases)

Desde o início do século, as enzimas proteases e amilases têm sido utilizadas em processos industriais. Em relação às amilases, podemos destacar como as mais importantes para a biotecnologia até o momento as enzimas α e β amilases.

2.10.1 - A α -amilase

A enzima com código e nome sistemático EC 3.2.1.1; α -1,4 glicano 4-glicanohidroxilase, respectivamente, é comumente conhecida como α -amilase. Esta é uma grande enzima extracelular que hidrolisa aleatória, mas simultaneamente várias ligações α -1,4 não terminais de molécula de amilose, amilopectina, glicogênio e dextrinas, não atuando sobre as ligações α -1-6. Os produtos finais da hidrólise são 70 a 90%, de maltose, oligossacarídeos e dextrinas, a maioria com quatro a oito unidades de glicose, além de pequenas quantidades de D-glicose.

A α -amilase também é chamada de enzima dextrinizante e de liquefação e encontra-se nos tecidos e diversos meios: saliva, pâncreas, cereais, bactérias, fungos. Sua resistência à desnaturação térmica, a qual inativa a enzima, difere conforme sua origem ou biossíntese. Algumas amilases bacterianas, de *Bacillus subtilis*, *B.coagulans*, *B.*

licheniformis e *B. stearothermophilus*, têm ainda atividades ótimas próximo, aos 80°C, sendo algumas ainda ativas acima de 100°C, isto devido à presença de um íon Ca^{2+} em sua estrutura molecular. Estas possuem pH ótimo entre 5,5 a 7,0; peso molecular variando entre 10 kDa a 20 kDa, com 6 a 16 subunidades poliméricas; sendo que a α -amilase de *B. amyloliquefaciens* possui 4 subunidades simultâneas ligadas por um átomo de zinco. A α -amilase é facilmente extraível de grãos moídos com água a 70°C, por cerca de 15 minutos, processo este que inativa a β -amilase. Acredita-se que a ação da enzima se dá devido ao efeito combinado dos seus sítios ativos, os quais são formados por grupos carboxílicos e histidínicos (WISEMAN, 1987; DIXON & WEBB, 1967).

O uso fundamental da α -amilase está na hidrólise do amido, inerente aos seguintes processos industriais:

- Na indústria de panificação, onde se usam α -amilases para aumentar o poder enzimático de farinhas que contêm amilases naturalmente;
- No pré-cozimento de cereais e no preparo de amidos que intumescem a frio (pré-gelatinização a baixa temperatura);
- Nas indústrias de fermentação para álcool e bebidas alcoólicas, a partir de cereais ou tubérculos;
- Na fabricação de xaropes de glicose, via hidrólise pelas amilases;
- No preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos.

2.10.2 - A β -amilase

A enzima com código e nome sistemático EC.3.2.1.1, α -1,4 glicano-maltoidrolase, respectivamente, é comumente conhecida como β -amilase. Esta é uma enzima extracelular, largamente encontrada em grãos de vegetais, degradando a amilopectina e glicogênio, hidrolisando cada segunda ligação α -1,4, mas sempre a partir

dos terminais não redutores das cadeias. Estas enzimas possuem pH ótimo entre 6,5 a 7,0; com massa molar de aproximadamente 50 kDa, a maioria dos seus produtos é quase sempre β -maltose, são inibidas por reagentes sulfídricos, não atuam em ligações α -1,6 e desta forma, a hidrólise total da amilopectina não pode ser realizada pelas mesmas (WISEMAN, 1987; DIXON & WEBB, 1967).

A enzima converte aproximadamente 55% da amilopectina em maltose ficando o restante como grandes moléculas de dextrinas-limite, não fermentáveis. Geralmente a hidrólise de amidos não fracionados cessa quando 60 a 64% de maltose são formados a partir do substrato (CALDWELL, 1996).

A β -amilase está presente na maioria dos vegetais superiores, notadamente nos grãos de aveia, centeio, cevada, soja e trigo, e só recentemente foi encontrada também em microorganismos do gênero *Bacillus* (FOGARTY & KELLY, 1979).

No uso do malte como agente de liquefação e hidrólise de grãos e tubérculos amiláceos, ou seja, no preparo de mostos, principalmente os de cerveja e bebidas alcoólicas, reside a maior aplicação da β -amilase.

2.11 - Maltagem

A maltagem é a técnica de preparo do malte, e consta de operações como a maceração, a germinação e a secagem. O processo altera os grãos e esta alteração afeta a composição dos mesmos, e estes diferem conforme o tipo de malte a ser obtido, sendo para cervejarias ou destilarias.

Se for para cervejarias, que é o caso mais comum para sementes de cevada, os grãos devem ser densos, com endosperma macio e friável, sua maceração será entre 43% a 46% de umidade, após a germinação são secos a 4% de umidade em temperaturas variando

de 70°C a 100°C, o que torna o malte mais escuro, reduz sua atividade enzimática, dá à cerveja uma coloração mais escura, sabor e aroma mais encorpado.

No caso do malte para destilaria, são usados grãos menores, com teor protéico mais elevado, sendo macerados na faixa de 45% a 49% de umidade, secos até porcentagens variando de 5% a 7% em temperaturas variando entre 50°C a 60°C, após a germinação, gerando um malte de maior potencial enzimático e mais claro (BORZANI, 1986).

2.11.1 - Limpeza e classificação dos grãos

A limpeza é geralmente feita usando peneiras, ventiladores ou eletroimãs, isolados ou em conjunto. As peneiras e os ventiladores retiram poeira, pedregulhos, restos de plantas, insetos, sementes estranhas e quebradas e restos de animais, enquanto que o eletroimã retira resíduos metálicos. Após a limpeza, classificam-se as sementes por tamanho, para que haja uma germinação mais uniforme (BORZANI, 1986).

2.11.2 - Maceração

Esta tem por finalidade fornecer às sementes o teor de umidade necessário à germinação. O teor de umidade do grão após 8 horas de maceração é de 31% a 35%, necessitando de um tempo adicional de hidratação para que atinja níveis entre 45% a 46% de umidade. A água utilizada na maceração deve ter características definidas de pH e dureza, podendo ser adicionada cal (CaO), para que se atinja a alcalinidade necessária, e anti-sépticos, tais como hipoclorito ou o permanganato, para que seja evitada a presença de infecções (BORZANI et al., 1986).

A quebra da dormência dos grãos é notada, quando estes começam a liberar gás carbônico, devido ao aumento da respiração, o que ocorre gradualmente com a hidratação das sementes, isto fornece suprimento de água à aleurona, fazendo com que esta sintetize as enzimas necessárias à germinação e facilite o transporte das últimas através do complexo multicelular do endosperma. A aleurona aciona todo o sistema enzimático através da produção de giberilinas naturais, cerca de 12 horas após o início da maceração. Neste período inicial, as reservas de nutrientes do endosperma, representada basicamente pela sacarose, são utilizadas para manter o processo de germinação. O embrião germina após as enzimas amilolíticas, secretadas pela aleurona, originarem as modificações do endosperma. Este complexo enzimático age em seqüência para solubilizar e degradar tecidos multicelulares do endosperma, que inicialmente é rígido e aos poucos vai tornando-se maleável devido à destruição da matriz protéica e dos grânulos de amido (SOUZA et al., 2001).

Na indústria, a maceração é feita em tanques, que podem ser de madeira ou aço inoxidável, que são em geral cilindros de fundo cônico, com 2 m de altura e diâmetro variado, possuindo ou não dispositivos para agitação ou aeração. Estes tanques são alimentados periodicamente com água; neste mesmo período é retirada a água de maceração, a qual carrega uma série de extratos dos grãos, como açúcares, substâncias nitrogenadas e sais minerais. Apesar desta lixiviação, o poder diastásico do grão aumenta e há uma maior solubilização de ácidos orgânicos. Na fração constituída por lipídeos, ocorre um decaimento na concentração de ácidos graxos, como o oleico e o linoleico, aumentando o teor percentual do palmítico (BORZANI et al., 1986).

A utilização de ácido giberílico e seus sais permite um reforço à ação das giberilinas naturais, de forma que as transformações do endosperma iniciam em períodos menores (de 6 a 8 horas) que sem este tratamento (18 horas). Normalmente são utilizadas concentrações de ácidos giberílicos e seus sais em torno de 0,25 a 1,0 mg/L na água de maceração, sendo que os melhores resultados foram obtidos ao utilizar 0,25 mg/L por aspersão, no período de germinação das sementes (BORZANI et al., 1986).

Embora seja um processo comum na maltagem, trabalhos recentes têm demonstrado que os grãos germinados sem maceração podem alcançar teores de umidade de 46%, sintetizando níveis 50% mais elevados de amilases. A maceração, em alguns casos, quando o teor de umidade atinge níveis superiores aos limites toleráveis das sementes, pode levar à redução da porcentagem de germinação por indução da dormência conhecida como “sensibilidade à água” (BORZANI et al., 1986).

2.11.3 - Germinação

Ao grão de cereal germinado sob condições de maltagem, denominamos de malte “verde”. A duração do processo de germinação depende da velocidade com que as enzimas hidrolíticas alteram o endosperma. A faixa de temperatura empregada na germinação está compreendida entre 5°C a 25°C, com o ótimo em torno dos 15°C. O processo de germinação é exotérmico, isto provoca a perda de 2% a 5% de umidade, devido ao calor liberado no processo de respiratório. Esta perda deve ser repostada por aspersão de água. A germinação pode ser feita pelo método tradicional ou mecânico (BORZANI et al., 1986).

O método tradicional é feito em pisos de cimento, onde as sementes maceradas são espalhadas em camadas de 8 a 10 cm (podendo ser maior), constantemente revolvidas e aspergidas, para se obter uma melhor aeração e reduzir as perdas de umidade, das mesmas (BORZANI, 1986). O tempo para que estas atinjam uma maior atividade enzimática, deve coincidir com o tempo de paralisação da germinação das sementes, para tanto, este tempo foi estudado e determinado recentemente para várias variedades de milho, como sendo de quatro dias após a maceração (SOUZA et al., 2001).

A maltagem mecânica ou pneumática reduz os custos e o espaço ocupado, aumenta a produção, mas não acelera o processo bioquímico e fisiológico de transformação do cereal em malte. No mais comum dos processos, chamado de saladin, também denominado de maltagem em caixas, os grãos macerados são postos em caixas retangulares, baixas e longas, onde o ar úmido é introduzido pelas laterais. Hélices verticais

revolvem lateralmente os grãos. Outro processo é o tambor ou Gallard, no qual o cereal macerado é colocado em longas peneiras cilíndricas que giram horizontalmente, enquanto ar saturado e umidade são dirigidos sobre os grãos (BORZANI et al., 1986).

2.11.4 - Secagem

É feita para paralisar a atividade biológica da germinação, a produção de enzimas e as modificações do endosperma. O malte “verde” é seco de modo a preservar seu sistema enzimático, com temperaturas variando entre 20°C a 100°C, de acordo com o tipo de malte a ser obtido.

Para a obtenção do malte claro, faz-se uma pré - secagem das sementes, onde estas passam 20 min a temperaturas variando entre 20°C e 70°C, reduzindo sua umidade entre 8% e 12%; depois passam 2 a 3 min entre 70°C e 95°C, reduzindo sua umidade entre 4% e 5%. Este último período é chamado de cura. Já para o malte escuro, o tempo de cura passará por períodos superiores a 5 min. Estas temperaturas relativamente elevadas para enzimas fazem com que ocorram perdas na atividade enzimática do malte. Se o malte for escuro, as perdas chegam a ficar entre 50% e 60% da atividade da α -amilase e de 70% para a β -amilase, enquanto que no malte claro as perdas ficam próximas dos 30% da atividade da β -amilase e quase que insignificantes para a α -amilase (BORZANI et al., 2001).

2.12 – Sacarificação e Fermentação do Amido

A sacarificação do amido pode ser feita através do uso do uso de ácido clorídrico a altas temperaturas, porém os produtos formados são em sua maioria glicose, possuindo um colorido excessivo e são instáveis. Atualmente este tipo de processo é feito através do uso de endógenos de ação sinérgica, como as enzimas α e β -amilases, as quais, de grão moídos geram produtos aproveitáveis à alimentação humana; as β -amilases formam maltose e dextrinas limites, enquanto que as α -amilases formam glicoses, maltoses e

oligossacarídeos de baixo peso molecular, todos contendo ligações α -1,6. O efeito sinérgico das duas enzimas gera maltose e glicose em grande porcentagem da massa do amido, o qual sofre alterações bruscas em suas propriedades reológicas durante todo o processo de sacarificação. Como resultado deste processo obtém-se um xarope rico em maltose e glicose (WISEMAN, 1987).

Nas grandes indústrias alcoólicas, o amido derivado de milho, batata, cevada e outras fontes naturais é pré-tratado com hidrolases (α e β -amilases, e amiloglicosidases), que conduzem à liquefação e sacarificação deste, antes de ser fermentado a álcool combustível ou comestível, por fermentos e outros microrganismos. As enzimas são adicionadas na forma de malte, que possui outras enzimas além destas, algumas das quais atacam as ligações α -1,6 das dextrinas limites. Recentemente estão sendo usados suplementos de enzimas endógenas bacterianas associadas ao amido (WISEMAN, 1987).

Atualmente, em processos em batelada na América para a produção de álcool comestível, está sendo apresentado o uso de α -amilases bacterianas durante o estágio de cozimento, gelatinização e hidrólise parcial do amido gerando como vantagem a redução da viscosidade da mistura, facilitando o processo de mista e agitação da mesma. Subseqüentemente a mistura é refrigerada, adicionando-se mais α -amilases bacterianas para continuação da hidrólise, a qual é completada após uma nova redução da temperatura de operação entre 55-60°C, com a adição de amiloglicosidases, as quais são estáveis nesta faixa de temperatura. Em seguida, uma malha de fermento é inoculada, para simultâneo esgotamento das dextroses em sacarificação e fermentações contínuas, para que depois o álcool seja finalmente destilado (WISEMAN, 1987).

Em contraste na Alemanha, nos processos em batelada, as α -amilases não são adicionadas no estágio de mistura e sim na hidrólise, a qual é feita em dois estágios, sendo o primeiro chamado de liquefação a temperaturas relativamente altas (80°C), usando α -amilases bacterianas, seguido de um abaixamento da temperatura de liquefação entre 55-

60°C; para o segundo estágio, utilizando α -amilases fúngicas. Para a completa conversão do amido em etanol, são usadas amiloglicosidases de fermento (WISEMAN, 1987).

2.13 -Enzimas

As enzimas são proteínas com funções catalíticas específicas, que com muita eficiência, catalisam as reações químicas do metabolismo. São mediadoras das reações químicas da vida e particularmente de uma única reação.

A catálise enzimática das reações é essencial para os seres vivos, pois sob condições biológicas relevantes as reações não catalisadas tendem a serem lentas. As enzimas facilitam a catálise de uma determinada reação fornecendo ambiente específico e favorável a esta reação. Isto ocorre devido à seletividade decorrente da presença de sítios ativos específicos a um único substrato, nas cavidades de suas estruturas moleculares. Muitas reações comuns, improváveis nas condições do meio ambiente celular, são facilmente realizadas pelas enzimas em meio aquoso extracelular (ou intracelular), como a formação de intermediários carregados eletricamente e instáveis ou a colisão de moléculas com orientação precisa; como por exemplo: as reações necessárias à digestão de alimentos, o envio de impulsos elétricos através dos neurônios para o cérebro, a contração de músculos; todos decorrentes da ação de enzimas (LEHNINGER, 1995).

2.13.1 – Breve histórico sobre enzimas

A palavra proteína surgiu em 1838, citada por Bezelius, e provém do grego: Protéicos – aquele que vem primeiro. Estas são responsáveis pelas funções vitais dos seres vivos, além de serem seu principal constituinte (cerca de 50% do peso seco das células), sendo encontradas praticamente em todas as partes das células. Existem muitas espécies de proteínas, cada uma com sua função, porém as enzimas destacam-se destas por serem catalisadoras biológicas específicas, fazendo com que estas sejam alvo de muitas pesquisas.

A catálise biológica foi descrita no século XIX, onde foi estudada a digestão de carne por secreções estomacais (proteases) e a sacarificação do amido pela saliva e por extratos vegetais (amilases). Louis Pasteur concluiu que estas fermentações eram catalisadas por estruturas celulares, as quais posteriormente chamou de enzimas, e que estas não poderiam ser separadas das células, logo a fermentação não ocorreria sem a presença das células. Esta hipótese prevaleceu funcionando por muitos anos. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que extratos de levedo poderiam fermentar o açúcar a álcool, sem a presença de suas células originárias (leveduras), provando que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando após a remoção das mesmas da estrutura das células vivas. Desde então inúmeros estudos vêm sendo realizados na tentativa de isolar diferentes enzimas de diferentes origens e propriedades catalíticas (LEHNINGER, 1995).

Na década de 30, após a publicação do livro “The Enzymes”, por J.B.S. Haldane e alguns trabalhos com obtenção de cristais de enzimas como a pepsina, tripsina, quimiotripsina e urease por alguns pesquisadores como J. H. Northrop, M. Kunitz e J. B. Sumner descobriu-se que as enzimas eram realmente proteínas com atividade catalítica específica. Desta década em diante as pesquisas sobre enzimas despontaram como o campo mais promissor nas áreas de bioquímica, biotecnologia, bioengenharia etc. Em pouco tempo já se conheciam mais de 1500 enzimas diferentes; atualmente este número ultrapassa os 2000 (HALPERN, 1997).

2.13.2 – Estrutura das enzimas

As enzimas apresentam cadeias lineares de resíduos aminoácidos, com cadeias enroladas irregularmente e estruturas tridimensionais compactas. As cadeias polipeptídicas originam unidades globulares. Suas organizações estruturais são muito complexas e com vários níveis distintos, de acordo com os estudos da química das proteínas, os quais determinam que as seqüências de resíduos de aminoácidos, pertencem ao nível primário; os arranjos ordenados de cadeias polipeptídicas (estruturas em hélices α ou β), estão no nível

secundário; o domínio topológico adotado pela cadeia, como sendo o nível terciário e os arranjos tridimensionais das diferentes subunidades polipeptídicas, fazem parte do nível quaternário (DEVELIN, 1997; HALPERN, 1997; MONTGOMERY, 1996; VOET & VOET, 1995).

Como as maiorias das enzimas são constituídas de cadeias peptídicas, enlaçadas umas às outras em uma disposição esférica (sub-unidades), podemos classificá-las desta maneira, como: oligômeros, se suas sub-unidades forem iguais (protómeros) ou de complexo multienzimático, se forem constituídas de sub-unidades diferentes. As enzimas oligômeras apresentam uma das sub-unidades com função catalítica e outra como reguladora; já os complexos multienzimáticos apresentam, em geral, atividades catalíticas distintas para suas diferentes sub-unidades (DEVELIN, 1997; HALPERN, 1997; MONTGOMERY, 1996; VOET & VOET, 1995).

A forma de arranjo estrutural das enzimas é influenciada pelas interações proteína/proteína, as quais formam em sua superfície áreas de reconhecimento que permitem a agregação de outras substâncias (“Clusters”). As superfícies de contato das enzimas possuem uma conformação estrutural que permite a transmissão de “mensagens” por alterações conformacionais (através de impulsos eletrônicos), definindo o mais provável princípio da atividade complexadora das enzimas e as interações entre as suas sub-unidades oligoméricas ou em uma proteína monomérica (DEVELIN, 1997; HALPERN, 1997; MONTGOMERY, 1996; VOET & VOET, 1995).

2.13.3 – Classificação e nomenclatura das enzimas

Como já foi visto anteriormente, após a descoberta da verdadeira estrutura funcional das enzimas, houve um rápido crescimento da enzimologia, principalmente com a descoberta de novas enzimas e isto gerou uma dificuldade em sua terminologia. A ausência de regras de nomenclatura enzimática levou ao aparecimento de situações absurdas, como: uma mesma enzima apresentar vários nomes, ou enzimas diferentes apresentarem um

mesmo nome. Sendo assim, em 1955, a Assembléia Geral da União Internacional de Bioquímica, na cidade de Bruxelas, decidiu constituir a comissão internacional sobre enzimas, que criou um código de regras sistemáticas que servem de guia para a nomenclatura enzimática. Este código de regras foi terminado em 1978 e recebeu o nome de Recomendações do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (HALPERN, 1997).

Esta comissão definiu que os nomes sistemáticos das enzimas deverão obedecer às regras definidas que descrevem tanto quanto seja possível a catálise da enzima, para que não haja confusão com outras enzimas. Também ficou definido o uso de alguns nomes triviais para algumas enzimas comumente conhecidas. As regras se baseiam nos princípios descritos abaixo:

O primeiro princípio geral diz que os nomes das enzimas, em particular as terminadas em ase, só são aplicados a enzimas individualizadas, isto é, entidades analíticas, não podendo ser utilizados para sistemas com mais de uma enzima. Quando se deseja nomear um conjunto de enzimas, utiliza-se a designação sistema e usa-se como complemento a reação catalítica global das mesmas. Levando em consideração, como exemplo, a reação de oxidação do succinato, logo ao conjunto de enzimas que fazem parte da catálise desta reação deverão ser chamados de sistema succinato oxidase, onde o primeiro elemento representa o conjunto de enzimas e o segundo e terceiro termos representam a reação global que estas enzimas catalisam acrescido do sufixo ase (DIXON & WEBB, 1967; HALPERN, 1997; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

O segundo princípio geral é o da classificação e designação das enzimas. Este diz que as enzimas não podem ser classificadas pela sua massa molar, sua estrutura, sua origem ou seu co-fator associado, e sim que, sua classificação depende única e exclusivamente do tipo de reação que estas catalisam. Tomemos como exemplo a enzima α -amilase, que pela nomenclatura da IUPAC assume: EC 3.2.1.1 α -1,4-glicano 4-glicanohidroxilase, a qual indica que esta hidrolisa ligações α -1,4 de um dos polímeros de glicose mais conhecidos, o

amido. Outra enzima a 3.2.1.4 β -1,4-glicano 4-glicanohidrolase, ou celulase, também catalisa a hidrólise de um polímero de glicose muito comum e abundante na Terra, a celulose, só que atua sobre as ligações β -1,4 (DIXON & WEBB, 1967; HALPERN, 1997; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

O terceiro princípio geral se baseia na divisão das enzimas em grupos segundo o tipo de reação que estas catalisam, sem se importar com o sentido da reação. Estes fatos, em conjunto com o(s) nome(s) do(s) reagente(s) darão base para a classificação, nomenclatura e número de código a serem atribuídos às enzimas (DIXON & WEBB, 1967; HALPERN, 1997; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

A IUPAC (“International Union Pure Applied Chemistry”) estabeleceu a divisão dos grupos de enzimas por suas reações globais, em seis grandes classes de enzimas numeradas de 1 a 6, estas classes foram divididas em sub-classes e estas ainda apresentam divisões internas também em subclasses (as sub-sub-classes).

A designação sistemática das enzimas em um texto, quando esta for mencionada pela primeira vez, deve ser precedida do seu devido número de código, bem como da sua origem.

Basicamente a regra da IUPAC se resume em (HALPERN, 1997; RICARDO & TEIXEIRA, 1983):

- a. Todo número de código é antecedido da abreviação EC (“Enzyme Commission”);
- b. A parte numérica é composta por quatro elementos, onde:
 - O primeiro número indica a classe de reação catalítica à qual a enzima pertence;

- O segundo e o terceiro números referem-se às suas sub-classe e sub-sub-classe, respectivamente;
- O quarto número representa o número de série da enzima na respectiva sub-sub-classe.

Exemplo: A enzima álcool desidrogenase, tem como designação sistemática: EC 1.1.1.1 álcool NAD⁺ oxireductase, devido a esta ser uma oxireductase (classe 1), atuar sobre o grupo álcool (sub-classe 1), ter o NAD⁺ como aceitador de equivalentes redutores (sub-sub-classe 1) e seu número de série na sub-sub-classe ser 1.

Abaixo temos as classes de reações enzimáticas e suas devidas sub-classes, segundo a IUPAC.

1. OXIREDUCTASES:

Todas as enzimas pertencentes a esta classe catalisam reações de oxiredução entre dois substratos. Sua reação global é dada por:



Suas sub-classes são divididas conforme os grupos catalisados por estas enzimas.

1. CH – OH;

Ex: Tendo o NAD ou NADP como acceptor de elétrons (sub-sub-classe 1).

EC 1.1.1.1 Álcool: NADP oxireductase, que também é chamada de álcool desidrogenase (diferenciando da citada anteriormente por não possuir o íon Zn²⁺ em sua estrutura).

2. Aldeídos e Cetonas;

Ex: Tendo o citocromo como acceptor de elétrons (sub-sub-classe 2).

EC 1.2.1.1 formiato: citocromo b_1 oxiredutase, ou como é mais conhecida: formiato desidrogenase.

3. CH – CH;

Ex: Com outros aceptores de elétrons (sub-sub-classe 99).

EC 1.3.99.1 Succinato: (acceptor) Oxidoredutase, ou trivialmente como succinato desidrogenase.

4. CH – CNH₂;

Ex: Com o O₂ como acceptor elétrons (sub-sub-classe 3).

EC 1.4.3.1 D-aspartato: O₂ oxiredutase, sendo seu nome trivial dado por D-aspartato oxidase.

5. CH – NH;

Ex: EC 1.5.3.1 Sarcosina: O₂ oxiredutase, ou simplesmente sarcosina oxiredutase.

6. NADH ou NADPH;

Ex: Tendo a quinina como grupo acceptor (sub-sub-classe 5).

NAD(P)H₂: quinina oxiredutase, ou então, quinina redutase.

7. Compostos outros compostos nitrogenados;

Ex: EC 1.7.99.a Óxido nítrico: (acceptor) oxidoredutase, e trivialmente seu nome é óxido nítrico redutase.

8. Grupos Sulfurados;

Ex: Com um grupo nitrogenado como acceptor (sub-sub-classe 6).

EC 1.8.6.1 Glutato: polionitrato oxiredutase, ou simplesmente, nitrato éster redutase.

9. Grupos Heme;

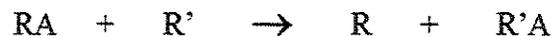
10. Grupos difenólicos;

11. H₂O₂;

12. H₂;
13. Doadores simples com Introdução de O₂;
14. Pares de doadores de elétrons com introdução de O₂;
15. Radicais super – óxidos;
16. Oxidam íons metálicos;
17. –CH₂ –;
18. Ferroxina reduzida;
19. Flavoxina reduzida;
20. Todos os outros grupos não citados anteriormente.

2. TRANSFERASES:

Nesta classe estão todas as enzimas que catalisam a transferência de grupos funcionais entre doadores e receptores destes grupos. A reação global desta classe é dada por:



Suas sub-classes estão divididas conforme o tipo de grupos que estas transferem:

1. Grupos de carbono;

Ex; Com transferência de radical metil (sub-sub-classe 1).

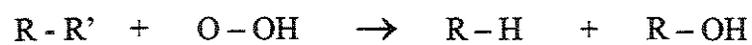
EC 2.1.1.2 S-adenosilmetionina: guanidinoacetato N-metiltransferase, ou pela nomenclatura trivial, guanidinoacetato metiltransferase.

2. Resíduos de aldeído ou cetona;
3. Grupos acílos

-
4. Grupos glicosílos
 5. Grupos alquilos ou arilos
 6. Grupos azotos
 7. Grupos fosfatos
 8. Grupos contendo enxofre.

3. HIDROLASES:

Esta classe é composta com todas as enzimas que hidrolisam os substratos, ou seja, catalisam a cisão de ligações entre moléculas fixando em um dos ramos o radical -OH e no outro o radical -H. Basicamente sua reação global segue o modelo abaixo:



Suas sub-classes estão divididas conforme os grupos que estas enzimas hidrolisam.

1. Grupos ésteres
2. Ligações glicosídicas
3. Grupos éteres
4. Grupos peptídicos
5. C - N
6. Anidrido de ácidos
7. C - C
8. Haletos
9. P - N
10. S - N

11. C – P

4. LIASES:

As enzimas que pertencem a esta classe catalisam reações que acrescentam ou removem ligações duplas em seus substratos. Sua reação global pode ser simplificada como sendo:



Suas sub-classes estão divididas conforme o grupo em que estas enzimas atuam.

1. C – C;
2. C – O;
3. C – N;
4. C – S;
5. C – haleto;
6. P – O;
7. Demais ligações;

5. ISOMERASES:

As enzimas participantes desta classe catalisam reações de rearranjos moleculares, formando isômeros.

Suas sub-classes são as seguintes:

1. Racemases e isomerases;

-
2. Isomerações cis – trans;
 3. Oxi - redução intramolecular
 4. Transferências intramoléculas;
 5. Liases intramolecular;
 6. Outras isomerasas.

6. LIGASES:

Estas enzimas catalisam a condensação de duas moléculas, onde a energia necessária para a reação é quase sempre fornecida pela hidrólise do ATP.

Suas sub-classes estão divididas em:

1. C – O;
2. C – S;
3. C – N;
4. C – C;
5. Ésteres fosfóricos.

2.14 – Cinética Enzimática

É o estudo do caminho mais provável para se definir a equação da taxa da reação de um sistema reacional catalisado por enzimas.

Para que seja possível a compreensão deste estudo consideremos o caso mais simples onde o substrato (S) é transformado no produto (P) em uma reação catalisada por uma enzima (E). Com as condições experimentais do meio reacional em estudo pré-

definidas (pressão, temperatura, pH, concentrações inicial de substrato e de enzimas, etc). Agora suporemos que seja possível medir a concentração do substrato (ou do produto) com o decorrer do tempo, a partir do instante em que esta teve início. Estas medidas nos levarão a uma curva do tipo mostrada na Figura 2.11, a qual traduz a variação da velocidade de reação com o consumo de substrato (formação do produto) com o tempo. Na realidade o único instante em que conhecemos com certeza a concentração do substrato é o tempo inicial, por isto as velocidades de reações enzimáticas são calculadas nos instantes iniciais. É comum indicar a velocidade inicial (V_0), numericamente igual à tangente à curva de formação do produto com o tempo (HALPERN, 1997; PETER et al.; 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

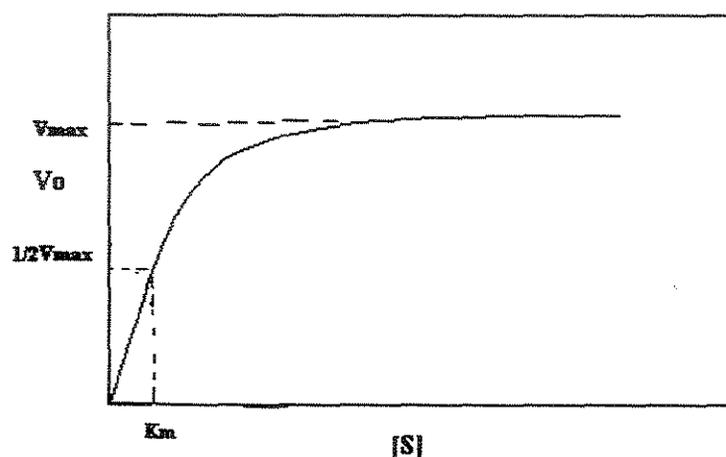


Figura 2.11 – Curva de desenvolvimento cinético de um sistema reacional enzimático.

Os primeiros estudos comprovaram que a velocidade de reação enzimática é proporcional à concentração de enzimas ($V_0 \propto [E]$) e que esta velocidade possui uma dependência hiperbólica com a concentração do substrato.

Para baixas concentrações de substrato, a velocidade é aproximadamente proporcional à sua concentração (o que indica uma reação de primeira ordem em relação ao substrato), porém para altas concentrações do substrato, a velocidade tende para um valor

assintótico, designado pela velocidade máxima (V_{max}), onde V_0 é tido como constante em relação à concentração do substrato (reação de ordem zero) (FRIEDMAN, 1994; PETER, et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

No início do século XX, trabalhos realizados por Henri e posteriormente por Leonor Michaelis e Maud Menten levaram à formulação da Teoria do mecanismo de reação enzimática mais conhecida até o presente momento; a qual segue os seguintes passos:

- Em reação rápida, enzima e substrato formam o complexo denominado de enzima-substrato (ES).
- Em reação lenta, o complexo enzima-substrato forma o produto e liberta a enzima.

E esta reação é representada pela equação seguinte:

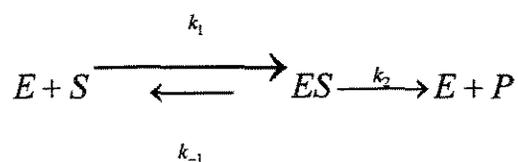


Figura 2.12 – Esquema de uma reação enzimática global, simples.

Onde: k_1 , k_{-1} e k_2 são constantes cinéticas.

Como notação tomamos $[E]$, $[S]$ e $[ES]$, como as respectivas concentrações de E, de S e de ES. Se admitirmos que o sistema reacional está em equilíbrio, podemos definir K_s , como sendo a constante de dissociação do complexo ES, dada por:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2.39)$$

Esta suposição é conhecida como hipótese de equilíbrio e só é válida quando $k_{-1} \gg k_2$, ou seja, não foi levada em consideração a complexação da enzima com o produto para retornar ao complexo enzima substrato ($E + P$ em ES) para determinação da velocidade inicial (V_0), já que $[P] = 0$ (VOET & VOET, 1995).

Em 1925, Briggs e Haldane propuseram uma hipótese de equilíbrio rápido, onde as constantes k_{-1} e k_1 são aproximadamente iguais. Estes cientistas verificaram que fazendo-se medidas em pequenos intervalos de tempo, onde a variação da concentração do complexo ES é tão pequena que pode ser considerada constante; desta maneira eles conseguiram observar um estado estacionário (ou pseudo-estacionário) para ES . Para que isto ocorra é necessário que a concentração do substrato seja muito superior à de enzimas, o que acontece na maioria dos sistemas *in vitro*. Desta forma, de acordo com a definição de velocidade de reação, temos (FRIEDMAN, 1994; HALPERN, 1997; VOET & VOET, 1995):

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (2.40)$$

Como é muito difícil medir $[ES]$, logo esta grandeza será substituída, para isto consideraremos a hipótese de estado estacionário e igualaremos as duas equações de velocidade (de formação e decomposição do complexo ES), como descrito abaixo (PETER et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995):

$$V_{ES} = k_1[E][S] \quad (2.41)$$

$$V_{-ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (2.42)$$

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (2.43)$$

Como no meio reacional a enzima se encontra na forma livre (E) e na forma complexada (ES), logo a concentração de enzimas total (E_0) pode escrita como:

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (2.44.a) \quad \text{ou} \quad [E] = [E]_0 - [ES] \quad (2.44.b)$$

E assim por substituição da equação 2.44 na equação 2.43, obtém-se:

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (2.45)$$

Fazendo-se as seguintes considerações:

$$V_{m\acute{a}x} = k_2 [E]_0 \quad (2.46) \quad \text{e} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.47)$$

Obteremos assim, a equação de Michaelis – Menten, dada por:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.48)$$

Na equação 2.48, V_{max} é a velocidade máxima da reação e K_m é a constante de Michaelis–Menten. Quando observamos um estado de equilíbrio rápido ($k_1 \gg k_2$), constatamos que a constante de Michaelis-Menten se aproxima da constante de dissociação do complexo enzima-substrato (HALPERN, 1997; PETER et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995):

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s \quad (2.49)$$

A equação 2.48 também comprova a variação hiperbólica de V_0 com $[S]$. Vejamos um estudo de dois casos abaixo, os quais apresentam limites de concentração de substrato.

i) Para baixas concentrações de substrato ($[S] \ll K_m$); pode-se adotar uma forma simplificada da equação 2.48, dada abaixo:

$$V_0 \approx \frac{V_m [S]}{K_m} \quad (2.50)$$

ii) Para altas concentrações de substrato ($[S] \gg K_m$); a equação 2.48 toma a forma da equação 2.46, já que $V_0 \approx V_{max}$, o que está de acordo com as observações já mencionadas para os extremos cinéticos de ordem zero e ordem um, em relação ao substrato $[S]$ (HALPERN, 1997; PETER et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995).

Para que seja entendido o significado de V_{max} e K_m , serão feitas as seguintes igualdades:

$$V_0 = k_2 [ES] = k_2 [E]_0 V_{máx} \quad (2.51)$$

Esta equação indica que a velocidade máxima se observa quando todas as enzimas estão na forma complexada, ES, ou seja, todas as enzimas estão saturadas de substrato. Agora, ao fazermos $[S] = K_m$ e substituindo na equação 2.48, obteremos:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}}{2} \quad (2.52)$$

Através desta expressão podemos concluir que o K_m corresponde à concentração do substrato onde se observa que a reação alcançou um valor médio da velocidade máxima e a concentração de enzimas está 50% saturada.

Outro mecanismo possível é se considerarmos que o produto é transformado a partir do complexo enzima-substrato (ES), ou seja, há mais um reagente no meio, o qual é denominado de complexo enzima-produto (EP). Ao se considerar que o passo limitante, agora, é a liberação do produto do centro ativo da enzima então, ao se levar em consideração as condições da hipótese de Michaelis-Menten; de estado estacionário para EP. A Figura 2.13 representa a equação global de reação descrita pelo mecanismo acima.

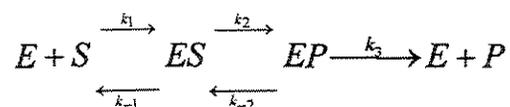


Figura 2.13 – Esquema de uma reação enzimática com formação do complexo enzima-produto.

Sendo assim, tem-se que:

$$[EP] = K_2 [ES] \quad (2.53)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad (2.54)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EP] \quad (2.55)$$

Desta forma: $V_0 = k_3[EP]$ (2.56)

Um rearranjo na equação 2.55 levará a:

$$[E] = [E]_0 - [ES] - [EP] \quad (2.55.a)$$

Pela substituição desta na equação 2.54, se obtém:

$$[EP] = \frac{\frac{K_2}{1+k_2} [E]_0 [S]}{\frac{K_s}{1+K_2} + [S]} \quad (2.57)$$

E a partir desta, substituída na equação 2.56, chega-se finalmente a:

$$V_0 = \frac{\frac{K_2 k_3}{1+k_2} [E]_0 [S]}{\frac{K_s}{1+K_2} + [S]} \quad (2.58.a)$$

Ou ainda:

$$V_0 = \frac{k_{cat} [E]_0 [S]}{K_m + [S]} \quad (2.58.b)$$

Onde: k_{cat} é uma constante catalítica chamada de “turnover number” e V_{max} , agora, dependerá da constante de equilíbrio, e k_{cat} representa o número máximo de moléculas de substrato convertidas por unidade de tempo por moléculas de enzimas, sua unidade é o recíproco do tempo, já que $k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0}$ (2.59), refere-se então a condição de saturação.

Para o mecanismo de Michaelis-Menten, $k_{cat} = k_2$, isto significa que ela é a constante da reação de primeira ordem da conversão do complexo ES para o complexo EP. A razão k_{cat}/K_m é um bom indicador da eficiência catalítica da enzima, e é evidenciada quando $[S]$ é muito baixa, ou seja, a concentração de enzima livre ($[E]$) é praticamente igual à de enzima total ($[E]_0$), e assim a equação da velocidade se reduz a:

$$V_0 = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_m} \quad (2.60)$$

Sendo assim, k_{cat}/K_m é uma constante de segunda ordem aparente da reação entre E e S, e sua relação é dada por (HALPERN, 1997; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995):

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2} \quad (2.61)$$

2.14.1 - Método para determinação da velocidade máxima e a constante de Michaelis-Menten

1- Como a representação gráfica da equação 2.48 é hiperbólica, o valor de V_{vax} não pode ser obtido exatamente, pois este se torna assintótico. Contudo, ao se linearizar a expressão de Michaelis-Menten em função de $1/V_0$ e $1/[S]$, chegaremos a:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{máx}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} \quad (2.62)$$

Esta expressão é chamada de equação de Lineweaver-Burk, que é uma relação linear onde $1/V_{máx}$ é o seu coeficiente linear e $K_m/V_{máx}$ é o seu coeficiente angular. Ao tocar no eixo das abscissas, esta reta fornece o valor $-1/K_m$ (recíproco negativo da constante de Michaelis-Menten), como se observa na Figura 2.14, que é uma representação esquemática da linearização desta equação (FRIEDMAN, 1994; HALPERN, 1997; MORRIS, 1979; PETER, et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995).

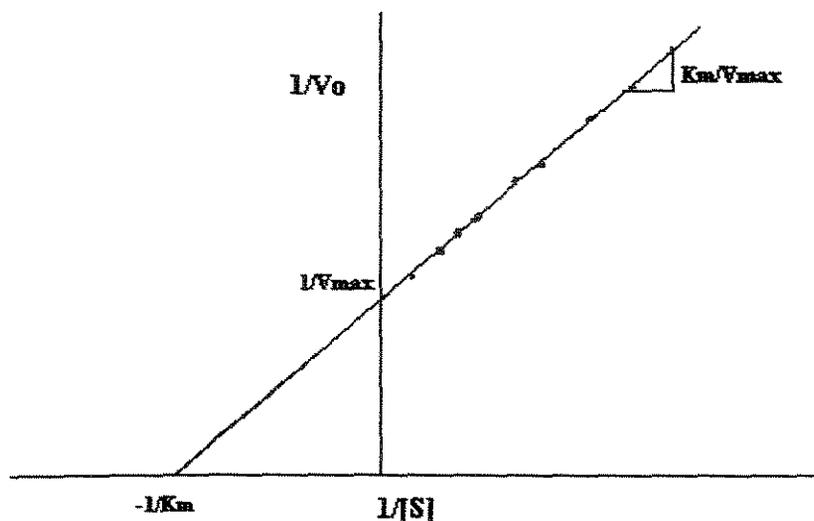


Figura 2.14 – Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten linearizada por Lineweaver-Burk (MORRIS, 1979).

Existem outros métodos de linearização da equação de Michaelis-Menten, como a representação gráfica de $[S]/V_0$ em função de $[S]$, de Hanes-Woolf, a de Eadie-Hofstee que sugere V_0 em função de $V_0/[S]$, além de um menos popular, porém eficaz, que é o método de Eisenthal cornish-Bowden. Este último método reescreve a equação de Michaelis-Menten considerando pares de valores experimentais de V_0 e de $[S]$ como constantes e V_{max} e K_m como variáveis. A equação de Michaelis-Menten modificada é expressas abaixo (MORRIS, 1979; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995).

$$V_{max} = V_0 + \frac{V_0 K_m}{[S]} \tag{2.63}$$

Esta equação define uma reta de declive $V_0 / [S]$, interceptando o eixo das abscissas em $-[S]$ e o das ordenadas em V_0 . Naturalmente, um segundo par de valores experimentais V_0 e $[S]$ definem uma outra reta, que cruza a anterior em um único ponto. Esta intersecção define o valor de K_m e V_{max} que satisfazem, simultaneamente, as duas equações. Todos estes pontos gerados pelas retas em V_0 e $[S]$ darão a curva de cinética enzimática, como está mostrado na Figura 2.15.

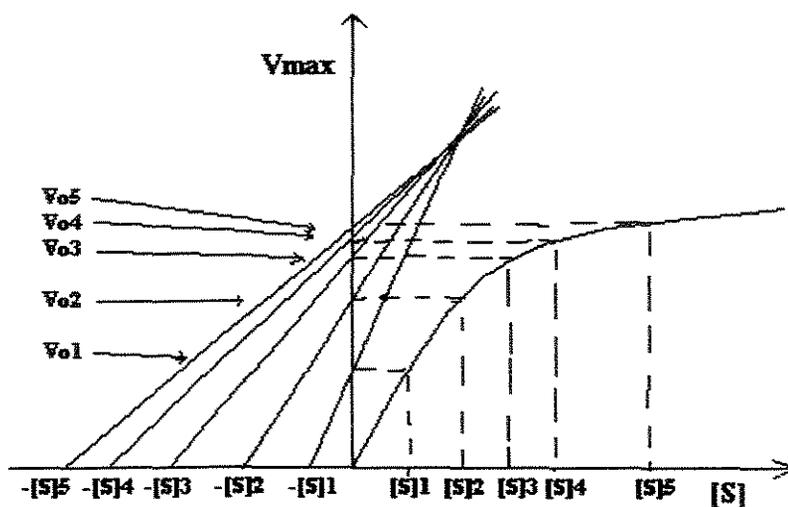


Figura 2.15 – Representação gráfica do método de linearização da equação de Michaelis-Menten por Eisenthal Cornish-Bowden.

2.14.2 – Fatores que afetam a velocidade de reação enzimática

2.14.2.1 – Efeito do pH

A maioria das enzimas é bastante sensível à alteração de pH do meio; pois é muito comum a elas apresentarem um certo valor de faixa de pH ótimo à sua atividade, o que faz com que decresça a velocidade de reação enzimática, quando o valor de pH foge da faixa ótima. O efeito do pH sobre as enzimas dá-se de várias maneiras, serão citadas as mais comuns:

i - Como H^+ algumas vezes é o substrato ou o produto da reação biológica, particularmente em reações de hidrólise e de oxi-redução, sendo assim, a sua concentração será alterada com o tempo, podendo deslocar o equilíbrio da reação para um dos lados.

ii- Quando o centro ativo da enzima inclui aminoácidos ionizáveis (His, Lys, Asp, etc) a sua atividade exigirá que estes se apresentem em uma das formas protonizadas definidas, o que só é possível em um determinado pH.

iii - A ligação de prótons ou íons a aminoácidos que não fazem parte do centro ativo, induzem a enzima a uma nova conformação estrutural, o que altera a afinidade entre as enzimas e o substrato.

iv - Em valores de pH extremos as repulsões eletrostáticas introduzidas na estrutura tridimensional da enzima podem levar a uma desnaturação e conseqüente desativação da mesma (HALPER, 1997; MORRIS, 1979, PETER et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

Abaixo será estudada a influência do pH segundo Michaelis-Menten; considerando as mesmas condições das análises de cinética enzimática a temperatura e pressão, constantes. Para isto, serão introduzidas novas variáveis E^+ , E^- , ES^+ e ES^- , como sendo as formas de apresentação das enzimas e dos complexos enzimas-substrato, em estados de ionização positivo e negativo e H^+ que é a representação conhecida a todos do íon hidrogênio, além de suas devidas concentrações que serão identificadas pelas representações entre barras.

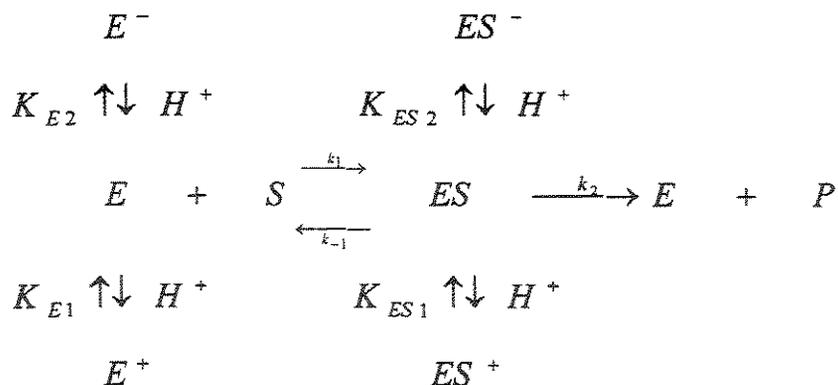


Figura 2.16 – Esquema representativo da interferência do pH em uma reação enzimática.

Por conclusões óbvias, obteremos as seguintes expressões:

$$K_{E1} = \frac{[H^+][E]}{[E^+]} \tag{2.64}$$

$$K_{ES1} = \frac{[H^+][ES]}{[ES^+]} \tag{2.65}$$

$$K_{E2} = \frac{[H^+][E^-]}{[E]} \tag{2.66}$$

$$K_{ES2} = \frac{[H^+][ES^-]}{[ES]} \tag{2.67}$$

Admitindo $[E]_{0L}$ e $[ES]_{0C}$, como sendo as representações do total de enzimas na formas livres e complexadas teremos:

$$[E]_0 = [ES]_{0C} + [E]_{0L} \quad (2.68)$$

$$[E]_{0L} = [E^+] + [E^-] + [E] \quad (2.69)$$

$$[ES]_{0C} = [ES^+] + [ES^-] + [ES] \quad (2.70)$$

A equação para o total de enzimas livres é obtido após a substituição das equações 2.64 e 2.66 em 2.69, bem como para a equação do total de enzimas-substrato; como se vê abaixo:

$$[E]_{0L} = [E] \left(\frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right) = [E]f_1 \quad (2.71.a)$$

$$[ES]_{0C} = [ES] \left(\frac{[H^+]}{K_{ES1}} + 1 + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right) = [ES]f_2 \quad (2.71.b)$$

Onde: f_1 e f_2 são fatores resultantes da interferência do pH sobre a catálise enzimática, dados por:

$$f_1 = \left(\frac{[H^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[H^+]} \right) \quad (2.72)$$

$$f_2 = \left(\frac{[H^+]}{K_{ES1}} + 1 + \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \right) \quad (2.73)$$

Considerando o estado estacionário em ES teremos:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \quad (2.74.a)$$

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k_2)[ES]}{k_1[S]} = K_m \frac{[ES]}{[S]} \quad (2.74.b)$$

Por uma análise idêntica as anteriores, ter-se-ão:

$$[E]_{0L} = K_m \frac{f_1[ES]}{[S]} \quad (2.75)$$

$$[E]_0 = [ES] \left(K_m \frac{f_1}{[S]} + f_2 \right) \quad (2.76)$$

Pela substituição da equação 2.74 na equação 2.40, levará a seguinte expressão da equação cinética por Michaelis-Menten para o efeito do pH sobre a reação enzimática.

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0}{K_m \frac{f_1}{[S]} + f_2} \quad (2.77.a)$$

Por um rearranjo, chega-se à:

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m \frac{f_1}{f_2} + [S]} \quad (2.77.b)$$

Fazendo $V'_{max} = V_{max} / f_2$ e $K'_m = K_m (f_1 / f_2)$ a equação 2.77.b assume a forma definitiva com o mesmo comportamento das anteriores, expressa abaixo (PETER, et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995):

$$V_0 = \frac{V'_{max}[S]}{K'_m + [S]} \quad (2.77.c)$$

2.14.2.2 – Efeito da temperatura

Dentro de um intervalo relativamente pequeno de temperatura a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima, comumente, aumenta no início e depois diminui; á medida que a temperatura é elevada faz parecer que existe um ótimo de temperatura no qual a enzima é mais ativa. A Figura 2.17 mostra o efeito da temperatura sobre a velocidade de catálise de uma enzima. Este comportamento é resultante de dois eventos simultâneos:

- i) Um aumento verdadeiro na velocidade da reação catalisada, decorrente do aumento da temperatura.
- ii) Uma queda na atividade enzimática progressiva, decorrente da desnaturação das enzimas devido ao aumento da temperatura (MORRIS, 1979; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995).

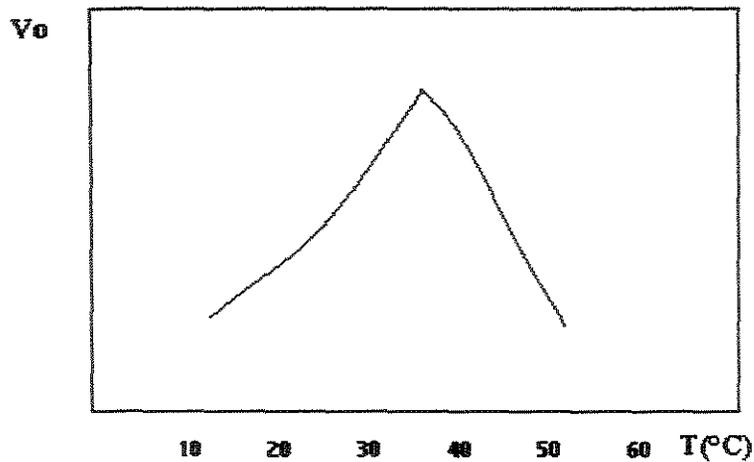


Figura 2.17 – Representação gráfica do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de uma enzima.

Na realidade as enzimas, mesmo a qualquer temperatura, tenderão a diminuir sua atividade com o tempo, devido à ocorrência de desnaturação parcial destas com o decorrer do tempo. Desta forma, a temperatura “ativa” de uma enzima é um termo sem significado, desde que não sejam mencionados o tempo de exposição, o pH e a força iônica do meio (HALPERN, 1997; MORRIS, 1979; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995).

O aumento da temperatura acelera a velocidade de reação enzimática, devido ao aumento da energia térmica das moléculas facilitar a ultrapassagem da barreira de energia de ativação, acelerando a reação (Teoria dos Estados de Transição). O efeito da temperatura sobre a velocidade de uma reação enzimática pode ser estudado pela equação de Arrhenius:

$$K = Z e^{\frac{-E}{RT}} \quad (2.78)$$

Onde: Z é a constante de Arrhenius, a qual por comparação com a Teoria das Colisões, pode ser expressa por:

$$Z = n_A n_B \sigma_{AB}^2 \sqrt{8\pi RT \left(\frac{M_A + M_B}{M_A M_B} \right)} \quad (2.79)$$

Aplicando-se o logaritmo natural à equação 2.78 e considerando-se duas temperaturas diferentes (T_1 e T_2), obtém-se:

$$\ln K_2 - \ln K_1 = \frac{E_{at}(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2} \quad (2.80)$$

Sendo E_{at} a energia de ativação, a qual pode ser determinada experimentalmente construindo-se o gráfico de $\ln K$ contra $1/T$, já que sua inclinação é $-E_{at}/R$ e R é uma constante de valor conhecido e tabelado (HALPERN, 1997; MORRIS, 1979; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995).

Observando o mecanismo simples proposto para um processo enzimático irreversível de um único substrato, tem-se que as magnitudes das constantes de velocidade sofrerão uma variação decorrente da alteração da temperatura, pois:

$$\frac{\ln V_{2\max}}{\ln V_{1\max}} = \ln \left(\frac{k_{22}[E]_0}{k_{21}[E]_0} \right) = \ln \left(\frac{k_{22}}{k_{21}} \right) = E_{at} \left(\frac{T_2 - T_1}{RT_1 T_2} \right) \quad (2.81)$$

Onde: K_i é a constante de equilíbrio da reação e k_{2i} é a constante cinética de formação do produto, T_i é a temperatura absoluta (em Kelvin), $V_{i\max}$ é a velocidade máxima, todas estas variáveis dependem das condições da reação i (FRIEDMAN, 1994; MORRIS, 1979; HALPERN, 1997; RICARDO & TEIXEIRA, 1983).

Isto quer dizer que uma alteração na temperatura, leva a uma mudança no valor de K_s (k_1/k_{-1}), mudando assim, as concentrações de ES no estado estacionário, além de mudar a velocidade de decomposição de ES, provocando a variação de k_2 . A Figura 2.18 demonstra uma forma pratica de determinação da energia de ativação de uma determinada reação.

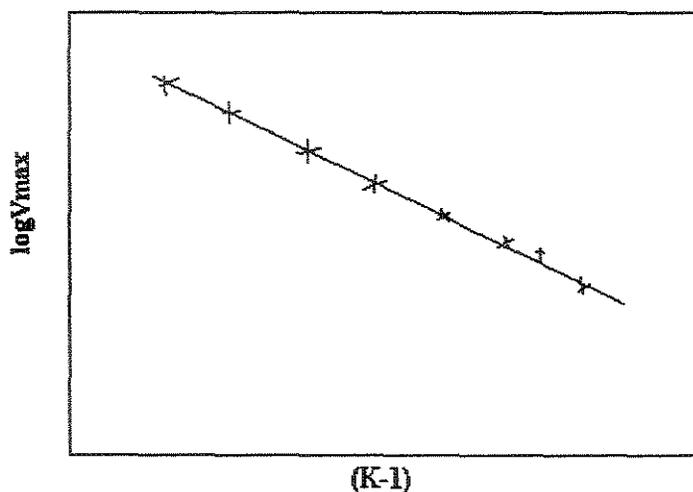


Figura 2.18 – Metodologia gráfica para a determinação da energia de ativação de uma reação catalisada por enzimas, seguindo o método de Arrhenius.

A seguir, na Figura 2.19 está representado o diagrama de energias de um sistema reacionário catalisado e não catalisado por enzimas.

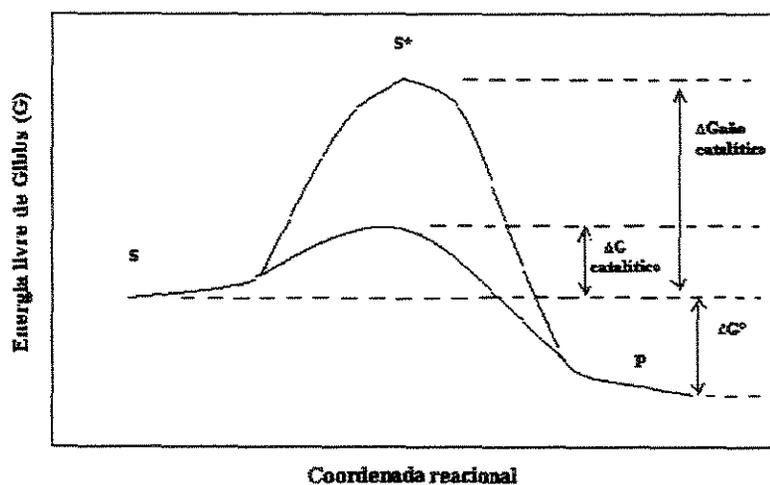


Figura 2.19 – Diagrama de uma reação catalisada (ΔG catalítico) e não catalisada (ΔG não catalítico) por enzimas, onde S* representa o complexo ativado.

2.14.2.3 – Efeito de ação de inibidores

Os inibidores são substâncias que quando postas no meio reacional junto com as enzimas, ligam-se aos centros ativos destas, fazendo com que haja uma queda na atividade enzimática, diminuindo assim a velocidade de reação. Muitos inibidores apresentam estruturas semelhantes à do substrato ou do produto, fazendo com que as enzimas confundam suas estruturas, e ao se ligarem às mesmas, provocam a inativação dos sítios ativos. A inibição pode ser competitiva, não competitiva e mista (HALPERN, 1997).

- **A Inibição Competitiva**

Neste tipo de inibição a ligação do inibidor com a enzima, não leva a formação do produto. Estes inibidores, geralmente, são entidades que se ligam ao centro ativo das enzimas impossibilitando a ligação da enzima com o substrato. Estes possuem estruturas semelhantes à do substrato ou do produto da reação, resultando assim, em afinidade pelos centros ativos da enzima. Os inibidores são utilizados para estudar a estrutura tridimensional do complexo enzima-substrato (inibidor) e o mecanismo reacional. Possuem ainda aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, além de outras indústrias biotecnológicas. A lavantina, por exemplo, é um fármaco utilizado na redução o nível de colesterol no plasma sanguíneo e a sua ação baseia-se na inibição competitiva da enzima que atua na síntese de colesterol no fígado (HMG-CoA redutase) (HALPERN, 1997).

A análise reacional da inibição competitiva pode ser observada no esquema de Michaelis-Menten, onde se supõe que a enzima livre (E), o inibidor (I) e complexo enzima-inibidor (EI) estão sempre em equilíbrio, e ao aplicar-se a hipótese de estado estacionário sobre complexo enzima-substrato (ES) observa-se as reações apresentadas na Figura 2.20 (HALPERN, 1997; MORRIS, 1979; PETER, et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995):

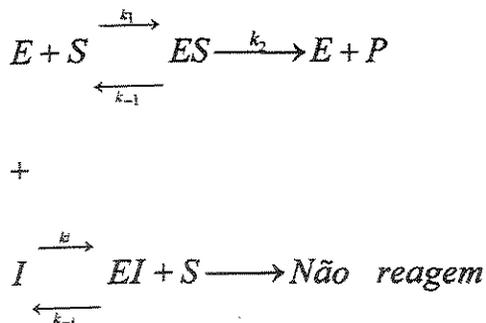


Figura 2.20 – Esquema demonstrativo da ação de inibidores competitivos sobre uma reação enzimática.

A partir da reação global e considerando-se as mesmas suposições anteriores e que $K_I = k_{-1}/k_1$, pode-se chegar às seguintes equações:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (2.83.a) \quad \text{ou} \quad [E] = \frac{[EI]K_I}{[I]} \quad (2.83.b)$$

$$[E] = \frac{k_{-1} + k_1}{k_1} \frac{[ES]}{[S]} \quad (2.43.a) \quad \text{ou} \quad [E] = \frac{K_m [ES]}{[S]} \quad (2.43.b)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (2.84)$$

Com a substituição da equação 2.83.b na equação 2.43.b, obtém-se:

$$[EI] = \frac{K_m [ES][I]}{K_I [S]} \quad (2.85)$$

Pela substituição desta equação e da equação 2.43.b, na 2.84, chega-se a:

$$[E]_0 = \frac{K_m [ES]}{[S]} + [ES] + \frac{K_m [ES][I]}{K_I [S]} \quad (2.86.a)$$

Ou ainda:

$$[E]_0 = [ES] \left[1 + \left(\frac{K_m}{[S]} \right) \left(\frac{[I]}{K_I} + 1 \right) \right] \quad (2.86.b)$$

Um rearranjo da equação acima em função de ES leva a expressão abaixo:

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{K_m \left(\frac{1+[I]}{K_I} \right) + [S]} \quad (2.86.c)$$

E por fim, a substituição da equação 2.86.c na equação 2.40, chega-se à expressão que define a taxa da reação enzimática com inibição, ou simplesmente: equação da inibição competitiva.

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_m \left(\frac{1+[I]}{K_I} \right) + [S]} \quad (2.87.a)$$

Esta equação ainda pode ser escrita de outra maneira mais simplificada, para isto, vamos chamar de fator de inibição a letra grega α ($\alpha = \frac{1+[I]}{K_I}$), e a substituiremos na

equação 2.87.a, o que nos leva a equação da inibição competitiva final (PETER et al., 1987; RICARDO & TEIXEIRA, 1983; VOET & VOET, 1995):

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{\alpha K_m + [S]} \tag{2.87.b}$$

A partir desta equação se chega às mesmas conclusões que a equação de Michaelis-Menten sem inibição; ou seja:

- Se $[S] \sim \alpha K_m$ o valor de $V_0 \sim V_{max}/2$.
- Se $[S] \rightarrow \infty$ o valor de $V_0 \sim V_{max}$.

• **Inibição Não-Competitiva**

Neste tipo de inibição, o substrato e o inibidor devem se ligar a locais distintos na enzima, ou seja, a ligação do inibidor não impede a ligação do substrato e vice-versa, contudo, a ligação do inibidor provoca alterações conformacionais no centro ativo inviabilizando a catálise. Pelas mesmas suposições anteriores para os mecanismos de reação apresentados segundo Michaelis-Menten e que as constantes dos complexos EI e ESI são parecidas, a expressão da velocidade será regida pela reação global apresentada na Figura 2.21 (HALPERN, 1997):

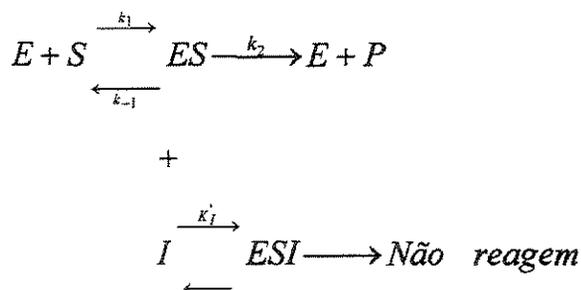


Figura 2.21 – Esquema de uma reação enzimática com inibição não-competitiva.

Por uma análise do sistema reacional como os feitos anteriormente, obtém-se as seguintes equações básicas:

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (2.88.a) \quad \text{ou} \quad [ES] = \frac{K'_I [ESI]}{[I]} \quad (2.88.b)$$

$$[E] = \frac{K_m [ES]}{[S]} \quad (2.89)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESI] \quad (2.90)$$

Fazendo-se o mesmo procedimento requerido para a inibição competitiva, com as substituições da equação 2.88.b na equação 2.89 e com posterior substituição da equação obtida neste passo junto com a equação 2.89 na equação 2.90, chega-se a:

$$[E]_0 = [ES] + \frac{K_m [ES]}{[S]} + \frac{[ES][I]}{K'_I} \quad (2.91)$$

Um rearranjo desta equação em função de ES leva a seguintes expressões:

$$[ES] = \frac{K'_I [E]_0 [S]}{K_m K'_I + [S] K'_I + [S][I]} \quad (2.92.a)$$

Ou ainda:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_m + (1 + \frac{[I]}{K_I})[S]} \quad (2.92.b)$$

E com a substituição desta última na equação 2.40, tem-se:

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + (1 + \frac{[I]}{K_I})[S]} \quad (2.93)$$

Pela mesma análise da inibição competitiva, chega-se a:

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (2.94)$$

Onde: α' ($\alpha' = \frac{1+[I]}{K_I}$) é o fator de inibição não competitiva (PETER et al., 1987;

VOET & VOET, 1995).

- **Inibição mista**

Neste tipo de inibição se observa a ocorrência os dois tipos de inibição simultaneamente, ou seja, ocorre tanto à inibição dos centros ativos quanto a inibição devido à mudança conformacional da estrutura enzimática. A análise cinética deste caso, também leva em conta as suposições de Michaelis-Menten, além da presença de dois complexos inibidores, o EI e o ESI, logo também se encontrarão na equação final de cinética as constantes K_I e K'_I , bem como os fatores de inibição α e α' (HALPERN, 1997; PETER et al., 1987).

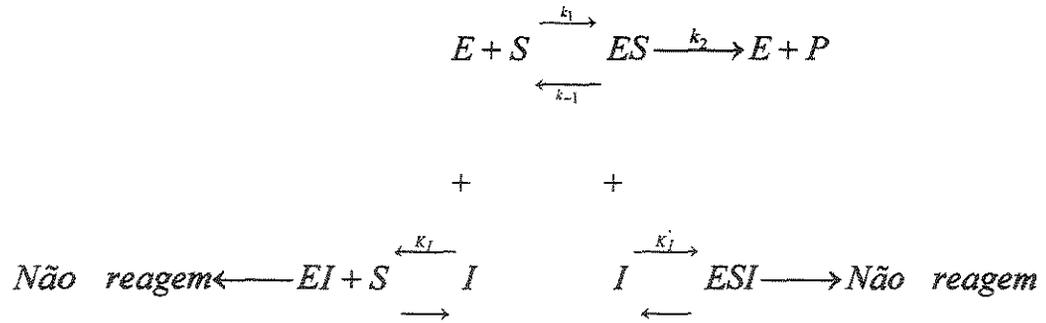


Figura 2.22 – Esquema da influência de inibidores mistos em reações enzimáticas.

Utilizando a reação acima e os mesmos métodos de modelagem matemática anteriores obtém-se:

$$V_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} \tag{2.95}$$

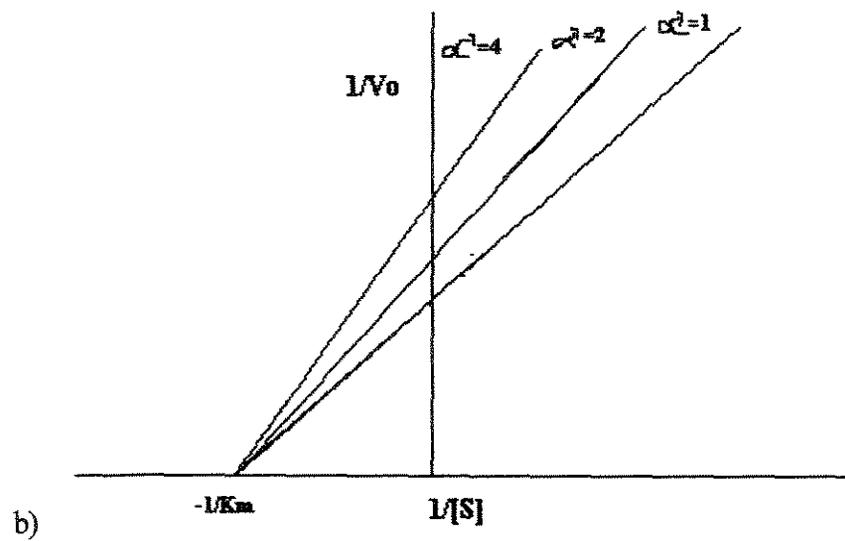
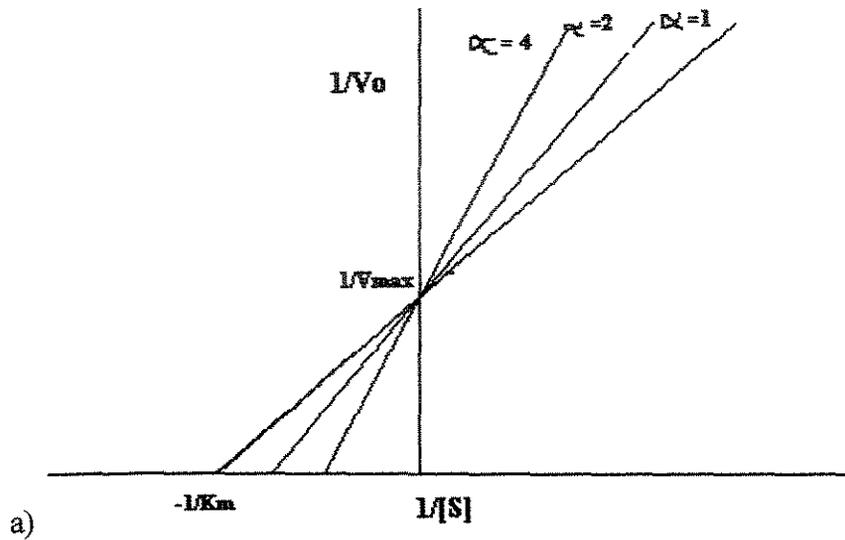
A linearização, segundo Lineweaver-Burk, das equações de inibição de Michaelis-Menten podem ser expressas por:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{\alpha K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} \qquad \text{Equação linear da inibição competitiva (2.96)}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha'}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} \qquad \text{Equação linear da inibição não-competitiva (2.97)}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{\alpha'}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{\alpha K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} \qquad \text{Equação linear da inibição mista (2.98)}$$

As Figuras 2.23. a, b e c, mostram as análises gráfica da linearização, segundo Lineweaver-Burk, das equações de cinética com inibição. Estas figuras comparam os desvios gerados pela presença dos inibidores com a reta original (sem inibição), representados pelos fatores α e α' (HALPERN, 1997; PETER et al.,1987; VOET & VOET, 1995).



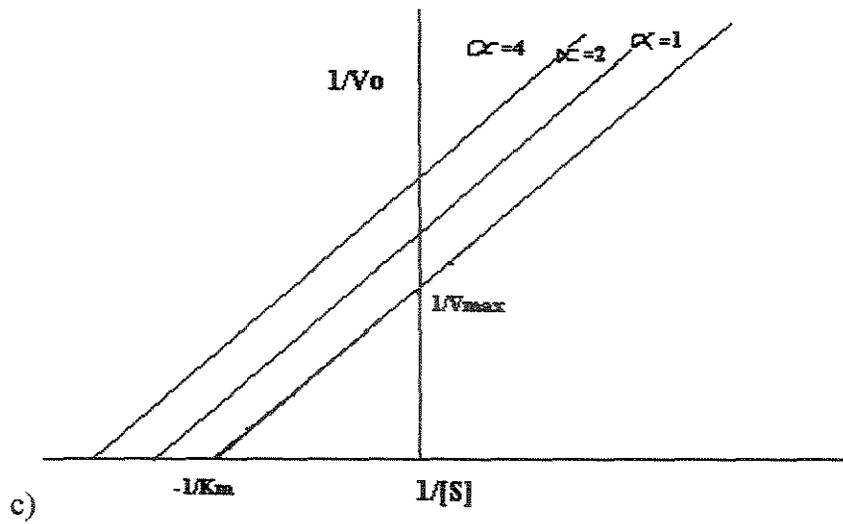


Figura 2.23 – Representação gráfica das equações linearizadas das inibições competitiva (a), não competitiva (b) e mista (c), por Lineweave – Burk.

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 - Material de consumo

3.1.1.1 - Reagentes

A Tabela 3.01 apresenta os reagentes utilizados durante o desenvolvimento dos trabalhos, bem como suas devidas procedências.

Tabela 3.01 – Reagentes utilizados durante a realização dos experimentos.

Reagentes	Procedência
Ácido Clorídrico PA	VETEC
Ácido Fosfórico	VETEC
Ácido Ortofosfórico PA	Synth
Álcool Etílico PA-ACS (95% v/v)	QUIMEX
Amido Solúvel PA	MERK
Azul Brilhante de Coomassi G	SIGMA
Cloreto de Cálcio PA	Synth
Cloreto de Sódio PA	Synth
Dextrina Branca	VETEC
Fosfato Dibásico de Sódio PA	VETEC
Fosfato Monobásico de Potássio PA	VETEC
Hidróxido de Sódio PA	VETEC

Tabela 3.01 – Reagentes utilizados durante a realização dos experimentos.

(continuação)

Reagentes	Procedência
Hidroximetil – Aminoetano PA (TRIS)	VETEC
Iodo PA	VETEC
Iodeto de Potássio PA	Synth
Polietileno Glicol (PEG) 8000	Fluka
Polietileno Glicol (PEG) 6000	VETEC
Polietileno Glicol (PEG) 4000	Synth
Sulfato de Cobre Penta Hidratado PA	VETEC
Soro de Albumina Bovina	INLAB

3.1.1.2 – Enzimas α -amilase e β -amilase

As enzimas foram obtidas da germinação de sementes selecionadas de milho (*Zea mays*) da EMBRAPA – SE.

3.1.2 - Materiais diversos

- Algodão;
- Papel filtro tamanho A4 n° 40;
- Papel alumínio;
- Papel toalha.

3.1.3 - Materiais permanentes

3.1.3.1 - Equipamentos

A Tabela 3.02 apresenta os equipamentos utilizados durante o desenvolvimento dos trabalhos, bem como seus modelos e procedências.

Tabela 3.02 – Equipamentos utilizados durante a realização dos experimentos.

Material	Modelo	Procedência
Agitador magnético	257	FANEM
Agitador Vortex	CERTOMAT® MV	B. Braun Biotech Int.
Balança Analítica	-	-
Banho-Maria	-	-
Bomba dosadora	BP 601	Milan
Bomba dosadora	Master flex®	Cole-Parmer
Bureta automática	TitruLine alpha	Schott
Centrífuga	LS-3 Plus	CELM
Estufa	-	S. FABBE Ltda
Espectrofotômetro Visível	432 C	FEMTRO
Micro Coluna de Extração Palhetas Rotativas (250 mL)	-	-
Micro Pipetas (2-1000µL)	Finnpipette®	Labsystems
Rota-vapor	LABOROTA4000	Heidolph

3.1.3.2 – Vidraria

A Tabela 3.03 apresenta as vidrarias utilizadas durante o desenvolvimento dos trabalhos, bem como suas procedências.

Tabela 3.03 – Vidrarias utilizadas durante a realização dos experimentos.

Material	Procedência
Balões Volumétricos (25-2000 mL)	PIREX
Béqueres (50-4000 mL)	PIREX
Buretas (25-50 mL)	PIREX
Cubetas Espectrofotométricas	
Dessecadores	PIREX
Pipetas Graduadas (1-10 mL)	PIREX
Pipetas Volumétricas (2 – 50 mL)	PIREX
Placas de Petri	PIREX
Provetas (5-1000 mL)	PIREX
Termômetros (-20 a 100°C)	
Tubos de Ensaio	

3.2 - Métodos

3.2.1 – Preparo das Soluções

3.2.1.1 - Soluções Tampão

Foram preparadas as soluções tampão pH 5,0; 6,0 e 7,0 a partir de soluções de ácido fosfórico, e sais de fosfato mono e di-básicos a 15 mM, seguindo a metodologia descrita por MORITA & ASSUMPCÃO (1995). Para isto, prepararam-se soluções padrão de ácido fosfórico, fosfato monobásico de potássio (solução A) e fosfato dibásico de sódio (solução B) e misturou-se em um béquer, contendo um eletrodo de prata cloreto de prata, para medir o pH do meio, até atingir o pH desejado. Preparou-se a solução tampão acetato pH 4,8, a partir da mistura de ácido acético glacial 0,2 M e acetato de sódio 0,2 M, para o uso na determinação da atividade enzimática pelo método Wohlgenuth modificado, apresentado em REGULY (1996). Também foi preparada a solução tampão tris-HCl no pH 6,5; segundo a metodologia usada por BRADFORD (1976).

3.2.1.2 - Soluções Estoque de PEG

Estas soluções foram preparadas dissolvendo-se as várias massas molares de PEG usados (4000, 6000 e 8000 Da) até se obter concentrações a 50 % (w/w) nos tampões fosfato de potássio 15 mM, a cada pH.

3.2.1.3 - Solução de CaCl₂

Foi preparada dissolvendo-se CaCl₂ sólido padrão analítico, em tampão fosfato 15 mM nos pH's 5,0; 6,0 e 7,0, além de outros pHs utilizados no planejamento descrito na Tabela 4.01, de forma a obter uma solução a 0,25 M. Preparou-se uma solução de sais a

base de cloreto, com concentrações de 6,0g/L de CaCl_2 e 3 g/L de NaCl , dissolvidos em tampão acetato pH 4,8, para extração das enzimas contidas no malte á serem utilizadas na determinação da sua atividade enzimática, preparada seguindo a metodologia descrita por REGULY (1996).

3.2.2 – Metodologia de estudo dos diagramas de fases do SBA PEG / CaCl_2

Os diagramas de fases dos sistemas (binodais) foram obtidos segundo o método descrito por ALBERTSSON (1986). Os pontos que determinaram as binodais foram determinados em tubos graduados, onde era colocada uma certa quantidade de solução do PEG a 50 % (w/w) e com posterior gotejamento de uma solução de CaCl_2 a 0,25 M, anotando-se a massa do sistema quando este iniciava a formação de uma segunda fase, o que dá um ponto de concentração alta de PEG e baixa de sal. O mesmo foi feito para a obtenção de pontos com porcentagem alta de sal, no qual se colocou uma solução tampão fosfato no pH desejado, e a esta se adicionou CaCl_2 sólido (Padrão Analítico), agitou-se o tubo em vórtex e gotejou-se a solução do PEG a 50 % (w/w), até que se observasse o início do aparecimento de uma segunda fase. Com estas massas foram determinadas as porcentagens de cada componente e ao se colocar os dados de % CaCl_2 (w/w) versus % PEG (w/w) se obteve a binodal do sistema PEG/ CaCl_2 , para cada massa molar de PEG e cada pH do sistema.

3.2.3 - Obtenção das “tie lines”

Os pontos que deram origem às “tie lines” foram obtidos em tubos graduados de 15 mL, onde foram colocadas quantidades da solução de PEG utilizada a 50 % (w/w), solução de CaCl_2 a 0,25 M e CaCl_2 sólido PA (quando necessário), tais que se observasse a formação das fases superior e inferior com volumes iguais. Todos os pontos encontrados foram repetidos no mínimo três vezes. Para cada sistema PEG/ CaCl_2 a pH e massa molar do polímero variado, foram encontrados três pontos os quais ao passarem por um tratamento pelo método dos mínimos quadrados geraram a reta chamada de “tie line” (linha

de amarração) e obedeceram a uma correlação mínima de 0,999. O prolongamento da linha de amarração até o choque com a binodal, determinou o ponto crítico de cada sistema.

3.2.4 - Determinação da concentração de proteína total

A proteína total foi quantificada pelo método de BRADFORD (1976). Este método é baseado no fato que o corante azul brilhante de coomassie G coexiste em duas formas de cor diferentes: a cor vermelha e a azul. Assim, a forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma por ligação da parte cromófora do corante à proteína. A curva de calibração foi feita a partir de diluição de uma solução estoque de albumina de soro bovino (BSA) entre 0 a 100 mg/L, a estas diluições adicionou-se a solução contendo o corante e a leitura da absorbância foi feita a 595 nm.

3.2.5 - Metodologia de obtenção do coeficiente de partição das enzimas α e β - amilases

Cada ponto das linhas de amarração foi reproduzido em tubos graduados com massa total do sistema entre 6 a 8 g. A estes foi adicionado, com o auxílio de uma microseringa, 400 μ L do extrato de malte em CaCl_2 0,25 M, tamponado nos pH's indicados nas Tabelas 4.13 e 4.14, na fase inferior do sistema. Assim que o sistema atingiu o equilíbrio difusivo (entre 12 a 48 horas) e coletou 100 μ L de amostra de cada fase. A determinação da concentração de proteínas total (enzimas α e β amilases) nas fases superior e inferior foi realizada através do método de BRADFORD (1976) modificado. Dividindo os valores das concentrações de proteína da fase superior (C_S) pela da fase inferior (C_I), obteve-se o chamado coeficiente de partição (K) do sistema bifásico aquoso em estudo. Como está expresso na equação 3.01.

$$K = \frac{\text{Concentração de } \alpha \text{ e } \beta \text{ amilase na fase superior}}{\text{Concentração de } \alpha \text{ e } \beta \text{ amilase na fase inferior}} \quad (3.01)$$

3.2.6 - Obtenção das enzimas

As sementes de milho (*Zea mays*) foram selecionadas manualmente e com peneira, depois foram pesadas para a obtenção do seu peso inicial seco. Estas passaram por um processo de umidificação, onde foram postas em um béquer de 2,0 L contendo água até a total cobertura das mesmas. Continuamente a água era retirada (2 em 2 horas) pesada a massa de sementes úmidas e adicionada novamente água até que as sementes alcançaram 40 – 45 % de umidade com relação a sua massa inicial. Estas foram levadas à germinação em escala laboratorial, nas condições ambientais de temperatura e pressão, sendo a umidade controlada por aspersão com borrifador. Após o 4º ou 5º dia estas sementes foram recolhidas do meio germinativo e posta para secar, em uma estufa à temperatura variando entre 50-55 °C, depois passaram por um processo de moagem, armazenada em sacos plásticos e guardado em geladeira a 5°C (LIMA et al., 2001; SOUZA et al., 2001).

3.2.7 - Determinação da atividade enzimática

Foi realizada baseando-se no método de Wohlgenuth, modificado por Sandstedt, Kneen & Blish (1959) e pelo método do Miles Laboratory/ EUA (1958) apresentados em REGULY (1996). O primeiro consiste na observação do tempo de descoloração de uma solução do complexo iodo/ amido, pela enzima α amilase e comparando com uma solução padrão do complexo iodo/ dextrina. A unidade de atividade enzimática, neste caso, é o SKB, que indica a quantidade de amido dextrinizada por um grama de amilase em uma hora. O segundo consiste em medir através de espectrofotômetro a absorbância a 540 nm gerada pelo teor de glicose, na partir da solução contendo amido e as enzimas amilolíticas, utilizando como reagente o ácido 2- dinitrosalicílico (DNS).

3.2.8 – Estudo cinético enzimático das enzimas α e β -amilases

Foram feitos estudos comparativos de cinética enzimática entre as enzimas α e β -amilases do extrato em malte de milho e do extrato em PEG 4000. Utilizou-se o pH 5,0 e as temperaturas de 75°C e 55°, já que estas variáveis estão próximas das condições ótimas das α -amilase e β -amilase, respectivamente. Para tanto, foram preparadas soluções de amido a 10 g/L e 0,2 g/L em pH 5,0, e a partir destas fez-se as devidas diluições para fornecer concentrações dentro das especificações da metodologia que se baseia nas condições limite do substrato (HIRANO, 2001; PETER et al., 1987). Possibilitando desta forma, observar se o PEG atuava como inibidor o ativador destas enzimas, enquanto que a temperatura definiu qual das enzimas encontra-se mais ativa no extrato em PEG 4000.

Usou-se como base matemática para obtenção dos modelos cinéticos a metodologia de Michaelis-Menten, que se baseia na determinação das velocidades iniciais de reação nas condições limites do sistema reacional, ou seja:

- 1- Para baixas concentrações de substrato ($[S] \ll K_m$);
- 2- Para altas concentrações de substrato ($[S] \gg K_m$).

A linearização do modelo foi feita seguindo a metodologia de Lineweave-Burk. A determinação da concentração de açúcares redutores gerados no meio foi feita segundo o Método do Milles Laboratory (REGULY, 1996). As constantes de Michaelis-Menten, de cinética e da velocidade máxima foram obtidas após a regressão linear dos recíprocos da concentração de substrato (amido) contra os recíprocos das velocidades iniciais encontradas (HIRANO, 2001; PETER et al., 1987; FRIEDMAN, 1994).

3.2.9 – Otimização dos sistemas estudados

3.2.9.1 – Otimização da partição das enzimas α e β -amilases em PEG/ CaCl₂

Neste estudo foi investigada a influência do pH, do comprimento da “tie line” (concentração do polímero e do sal), e da massa molar do polímero, sobre o coeficiente de partição das enzimas α e β -amilases (sem observar o efeito sobre a atividade enzimática), através de otimização por um planejamento fatorial 2³. Esta metodologia foi empregada visando a redução da quantidade de experimentos a serem realizados e uma melhor avaliação dos resultados obtidos. Os modelos foram obtidos seguindo as metodologias do ponto central o qual gera os modelos lineares. Os cálculos matriciais para a obtenção das estimativas dos parâmetros dos modelos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados. Os modelos testados foram os seguintes:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (3.02)$$

Onde: Os b_i correspondem às estimativas dos parâmetros do modelo, y representa a resposta (variável independente), coeficiente de partição, que pode se apresentar sob a forma de normal K ou $\ln K$, e x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis codificadas dos fatores pH, comprimento da “tie line” e da massa molar do PEG.

Cada fator foi variado em três níveis para o planejamento pelo método do ponto central (-1, 0 e +1), com triplicata nos pontos centrais em ambos, sendo um total de onze ensaios, descritos nas Tabelas 4.13 e 4.14, as quais já apresentam os melhores resultados da otimização da partição destas enzimas. Os níveis de cada fator foram dados por: 5,0; 6,0 e 7,0 para o pH; 1,0; 2,0 e 3,0 para o comprimento da “tie line” e 4000 Da, 6000 Da e 8000 Da para a massa molar do polímero, respectivamente.

O pH foi escolhido nesta faixa, pois está nas vizinhanças do ótimo das amilases, as “tie lines” representadas variam a composição das fases segundo as Tabelas 4.01 a 4.09 e as massas molares foram assim por apresentarem a diferença igual entre os seus valores. Para facilitar o planejamento, foram escolhidas as variações de cada fator, como sendo: $\Delta pH = 1,0$; $\Delta TL = 1,0$ e $\Delta MM = 2000$ Da. As codificações utilizadas foram as seguintes:

$$x_1 = pH_j - 6,0 \quad (3.03)$$

$$x_2 = TL_j - 2,0 \quad (3.04)$$

$$x_3 = \frac{MM_j - 6000}{2000} \quad (3.05)$$

Note que os sub-escritos indicam os fatores no nível j qualquer.

As análises de significância do modelo, do ajuste de dados, o cálculo das médias quadráticas dos erros de cada parâmetro, da correlação múltipla e das porcentagens de variâncias explicáveis, foram feitos pela metodologia da análise de variância, descrita por BARROS NETO (1995 e 2001), com as devidas fórmulas apresentadas na Tabela 2.01.

A otimização foi observada através da análise das superfícies de resposta (RSM) geradas pelas equações dos modelos otimizados, plotando-se os fatores dois a dois, com o terceiro fixo no ponto central, versus a resposta desejada (KARAN et al., 2001).

3.2.9.2 – Otimização da extração em coluna de palhetas rotativas

Sabendo-se através de pesquisas bibliográficas, que para se obter um modelo considerável, os experimentos são compreendidos de vários e demorados ensaios, fêz-se um planejamento fatorial 2^2 pelos métodos do ponto central e estrela. Sendo os cálculos matriciais para obtenção dos parâmetros dos modelos, também, feitos pelo método dos mínimos quadrados. Os modelos testados foram os seguintes:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \quad (3.06)$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3.07)$$

Onde: Os b_i correspondem às estimativas dos parâmetros do modelo, y representa o índice de recuperação (I_R) e x_1 e x_2 são os fatores rotação das palhetas (R_p) e razão entre as vazões de alimentação do concentrado (Q_c) e do solvente (Q_s) ($R_Q = Q_c/Q_s$), sob a forma de variáveis codificadas.

Cada fator foi variado em três níveis para o planejamento segundo o método do ponto central (-1, 0 e +1), além dos níveis $\pm\alpha$, para o planejamento em estrela, com triplicata nos pontos centrais em ambos, sendo um total de onze ensaios, apresentados nas Tabelas 4.17 e 4.18, as quais apresentam também as respostas otimizadas das extrações contínuas. Os fatores assumiram os níveis: 75,00; 100,0 e 125,0 para a rotação das palhetas e 1, $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{2}$ para a razão entre vazões, respectivamente. Os níveis $\pm\alpha$, foram obtidos segundo as equações de codificação de cada fator, utilizando os seguintes desvios para cada fator: $\Delta R_p = 25,0$ rpm e $\Delta R_Q = -1/4$. As codificações utilizadas foram as seguintes:

$$x_1 = \frac{R_{pi} - 100,0}{25} \quad (3.08)$$

$$x_3 = \frac{R_{Oj} - 3/4}{-1/4} \quad (3.09)$$

As análises de significância do modelo, do ajuste de dados, do cálculo das médias quadráticas, dos erros puros de cada estimativa de parâmetro, da correlação múltipla e das porcentagens de variâncias explicáveis, foram feitas pela metodologia da análise de variância (ANOVA). A otimização foi observada através da análise das superfícies de resposta (RSM) geradas pelas equações dos modelos otimizados todos descritos por BARROS NETO (1995 e 2001).

3.2.10 – Recuperação das enzimas α e β -amilases em coluna extração líquido-líquido com palhetas rotativas

Após a caracterização do sistema bifásico aquoso, foi feita a recuperação das enzimas amilases em batelada, utilizando um sistema com volume compreendido entre 6 a 8 mL, nas diferentes “tie lines”, pHs e massas molares de PEG, para a otimização da recuperação destas enzimas. Baseando-se nestes dados, foi ampliado o volume do sistema para 250 mL, na melhor “tie line” e pH ótimo de extração (obtidos na otimização anterior), em uma coluna de extração líquido-líquido, com agitação mecânica promovida por palhetas rotativas com área livre de aproximadamente 18%, e com a alimentação do solvente entrando em baixo (na lateral esquerda) da coluna e saindo como extrato na parte superior esquerda, sendo a alimentação do concentrado admitida pela parte superior direita da coluna e saindo pelo fundo da mesma na forma de refinado, como está mostrado na Figura 3.01.

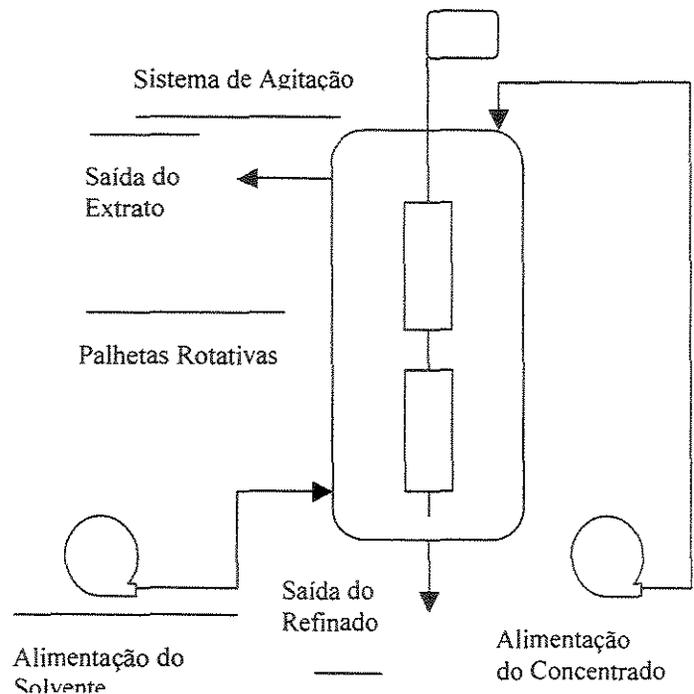


Figura 3.01 – Esquema do sistema de extração contínuo utilizado na recuperação das enzimas α e β -amilases de milho em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 .

O agitador e as bombas foram previamente calibrados, obtendo-se assim uma relação que fornecia a agitação e as vazões para facilitar a variação destes fatores entre os ensaios, sem parar o funcionamento da coluna.

Foi feita a determinação da concentração de proteínas totais no concentrado (C_0) antes da partida da extração contínua. Preencheu-se a coluna com as devidas concentrações de PEG e CaCl_2 da “tie line” otimizada, liberou-se as alimentações do concentrado e do solvente e pôs-se as palhetas em agitação, acionando em seguida o cronômetro, no tempo zero de operação da coluna. Neste mesmo tempo, foram coletadas as amostras zero do extrato e do refinado para determinação da concentração de proteínas totais em ambas (C_e e C_r , respectivamente). Inicialmente, a cada 3 minutos coletava-se uma amostra de ambas as saídas. Após meia hora o tempo de coleta passou para 5 minutos, em uma hora para 10 e por final foram feitas mais duas coletas em intervalos de aproximadamente meia hora. Em

todas as amostras foi determinado o teor de proteína total segundo BRADFORD (1979), inclusive as do concentrado, no início deste parágrafo.

Os dados de concentração de proteínas totais adimensionais do extrato (C_e/C_0) e do refinado (C_r/C_0) foram “plotados” em função do tempo de operação da coluna de extração líquido-líquido, para determinação do tempo necessário para a extração entrar em estado estacionário. A determinação do índice de recuperação (I_R) foi feita admitindo-se que este era aproximadamente igual a razão entre a concentração adimensional do extrato pela concentração adimensional do refinado (C_{AE}/C_{AR}).

A análise das melhores condições de operação da coluna para a extração contínua das enzimas amilases foi feita pela otimização em planejamento fatorial 2^2 , pelos métodos do ponto central e estrela, com avaliação da superfície de resposta pelo método RSM, já descritos anteriormente no capítulo 2.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS OBTIDOS

4 – RESULTADOS OBTIDOS

4.1 – Diagrama de fases

4.1.1. Efeito do pH sobre o diagrama de fases

Para observar o efeito do pH sobre o comportamento dos diagramas de fases do sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 , foi necessário fixar a massa molar do polímero e variar o pH. Ao se graficar as binodais em uma mesma figura, de acordo com as Figuras 4.01 até 4.03, pode-se verificar que a influência dos pH's sobre os SBAs, não apresenta comportamento definido, pois as binodais alternam de posição a cada pH e para cada figura, ou seja a cada massa molar do polímero as binodais comportam-se de forma diferente. Para os sistemas bifásicos PEG/ sais de fosfato estudados por VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994), quando o pH diminui, a proporção de $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ aumenta e devido à rejeição do PEG por grupos (ânions) multivalentes uma maior concentração de sal e/ ou polímero será necessário para obter um sistema bifásico.

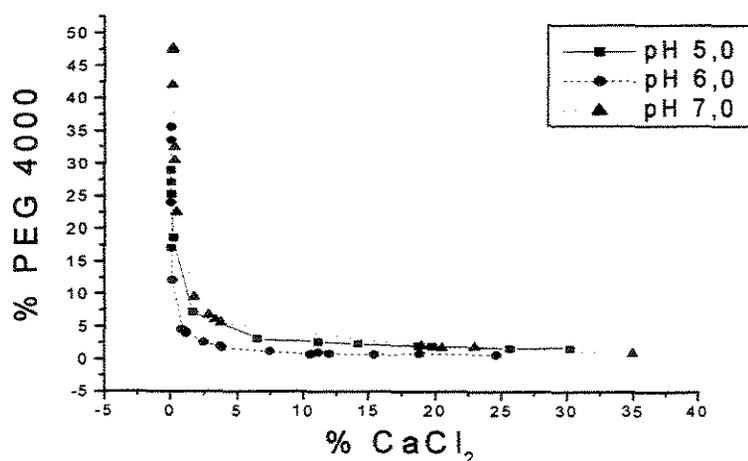


Figura 4.01 – Comportamento do SBA PEG 4000/ CaCl_2 em diferentes pHs estudados.

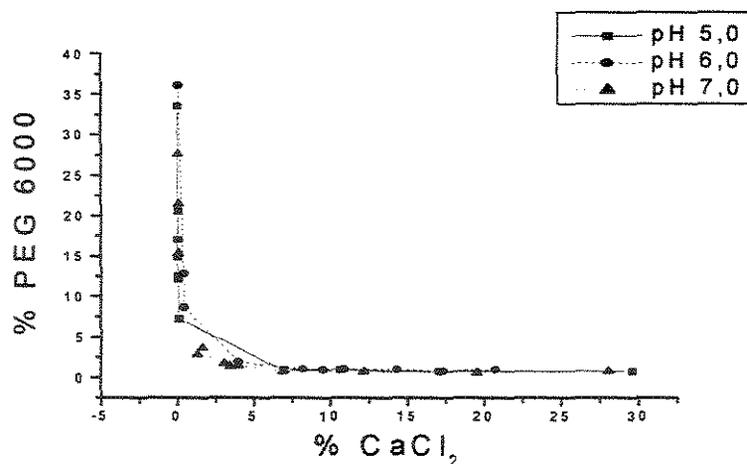


Figura 4.02 – Comportamento do SBA PEG 6000/ CaCl₂ em diferentes pHs estudados.

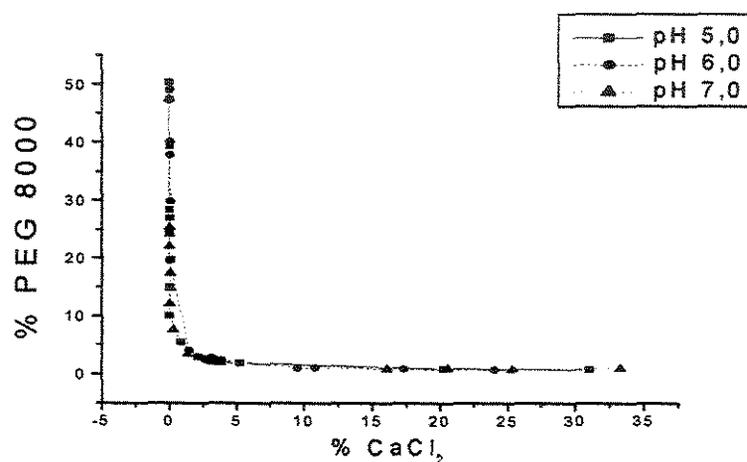


Figura 4.03 – Comportamento do SBA PEG 8000/ CaCl₂ em diferentes pHs estudados.

4.1.2. Efeito da massa molar do PEG sobre o diagrama de fases

Neste estudo foram construídos os diagramas de fases para os sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂, com intuito de observar o comportamento destes sistemas ao se fixar o pH e variar a massa molar do polímero. Observando-se as Figuras 4.04 até a Figura 4.06, não se percebe deslocamento entre as binodais afastando-se dos eixos, no sentido do PEG

8000 para o PEG 4000, ou seja, quanto menor a massa molar do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases, como os descritos na literatura por: ALBERTSSON (1986); VENÂNCIO et. al. (1995); SZLAG & GIULIANO (1988) e ZASLAVSKY (1995), isto demonstra que este sistema requer um estudo mais aprofundado para caracteriza-lo.

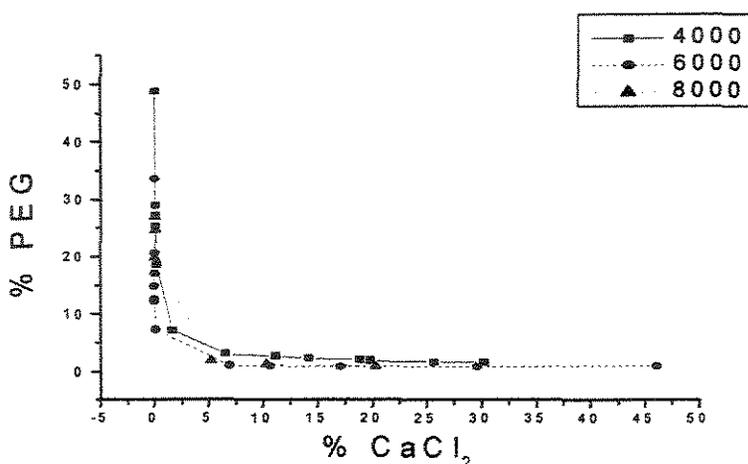


Figura 4.04 – Comportamento do SBA PEG/ CaCl_2 a pH 5,0, para diferentes massas molares de PEG.

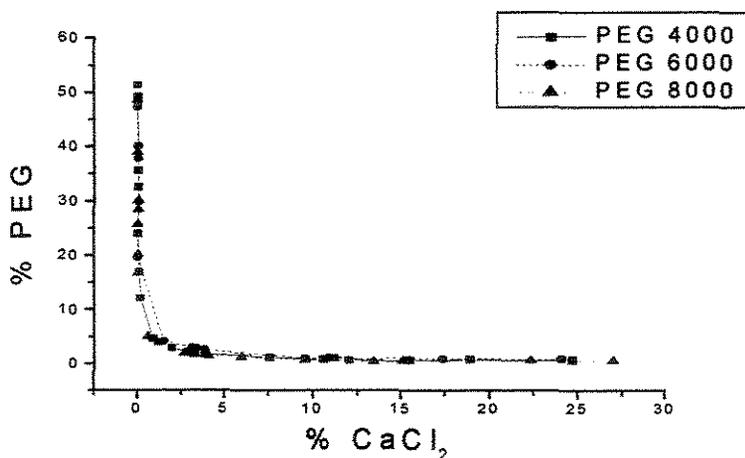


Figura 4.05 – Comportamento dos SBAs PEG/ CaCl_2 a pH 6,0; para diferentes massas molares de PEG.

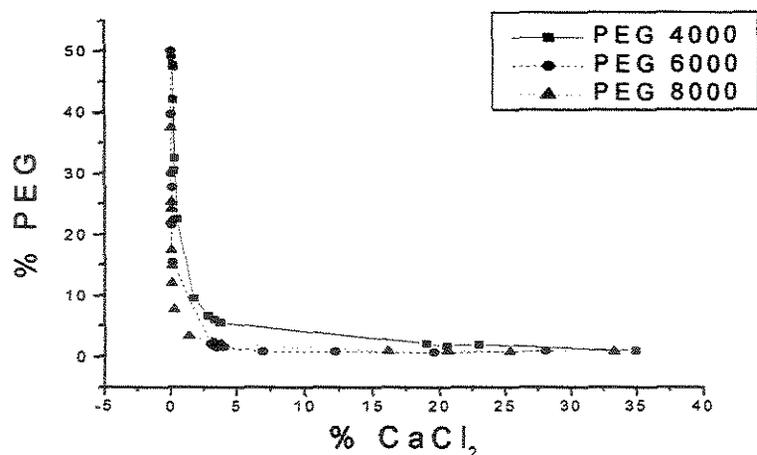


Figura 4.06 – Comportamento dos SBAs PEG/ CaCl₂ a pH 7,0; para diferentes massas molares de PEG.

4.2 – Estudo do comportamento das “tie lines”

As Tabelas 4.01 até 4.09 apresentam os dados das composições médias mais prováveis das “tie lines” dos sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂. Estas tabelas estão organizadas de cima para baixo, onde na primeira linha encontram-se os pontos de mistura de cada “tie line”, em seguida aparecem as composições das fases do SBA, de topo e de fundo (segunda e terceira linhas respectivamente). É perceptível também que as composições das “tie lines” afastam-se dos eixos das concentrações do sal e do polímero à medida que estas aumentam. Os valores das composições não se alteram muito, mesmo quando os polímeros são comparados entre si e a diferentes pHs. Através da observação das Figuras 9.10 até 9.18 (em anexo), que são as representações gráficas das “tie lines” dos SBA’s para cada PEG e cada pH, se constata que todos os pontos críticos encontram-se na inclinação das curvas, colaborando com os dados fornecidos pela literatura.

Tabela 4.01 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 4000/CaCl₂ a pH 5,0.

Composição (%)								
“Tie lines” 3			“Tie lines” 2			“Tie lines” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
72,92	1,82	25,26	77,97	1,77	20,26	82,99	1,73	16,26
44,21	0,04	45,75	62,69	0,06	37,25	72,64	0,11	27,25
92,80	3,58	4,62	91,87	3,35	4,78	91,93	3,05	5,02

Tabela 4.02 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 6000/CaCl₂ a pH 5,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
72,09	1,73	26,18	76,74	1,68	21,58	81,39	1,63	16,98
50,21	0,01	49,78	59,53	0,01	40,46	68,18	0,02	31,80
94,14	4,06	1,80	94,22	3,95	1,83	94,30	3,85	1,85

Tabela 4.03 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 8000/CaCl₂ a pH 5,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
71,93	1,76	26,31	77,48	1,55	20,97	82,80	1,34	15,86
49,66	0,01	50,33	60,76	0,02	39,22	71,64	0,03	28,33
94,43	3,16	2,41	94,67	2,72	2,61	94,90	2,13	2,97

Tabela 4.04 – Dados das composições médias “tie lines” do SBA PEG 4000/CaCl₂ a pH 6,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
72,08	1,82	26,10	74,08	1,72	24,2	80,21	1,55	18,24
48,74	0,03	51,23	51,97	0,03	48,0	67,45	0,05	32,50
94,77	3,26	1,97	94,89	3,04	2,07	95,00	3,00	2,00

Tabela 4.05 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 6000/CaCl₂ a pH 6,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
73,50	1,86	24,64	78,56	1,75	19,69	83,24	1,71	15,05
52,61	0,04	47,25	62,19	0,06	37,75	72,65	0,10	27,25
93,68	3,87	2,45	93,97	3,37	2,66	93,98	3,15	2,87

Tabela 4.06 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 8000/CaCl₂ a pH 6,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
72,94	1,80	25,26	78,56	1,46	19,80	82,09	1,23	16,68
51,43	0,02	48,55	60,99	0,03	38,98	71,55	0,05	28,40
95,10	3,26	1,64	95,41	2,75	1,84	95,44	2,69	1,87

Tabela 4.07 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 4000/
CaCl₂ a pH 7,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
72,08	1,82	26,10	74,08	1,72	24,20	80,21	1,55	18,24
57,80	0,20	42,00	67,26	0,29	32,45	77,00	0,50	22,50
90,71	3,78	5,51	90,66	3,35	5,99	90,44	2,84	6,72

Tabela 4.08 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 6000/
CaCl₂ a pH 7,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
73,02	1,83	25,15	77,63	1,77	20,60	82,11	1,72	16,17
49,97	0,03	50,00	60,21	0,04	39,75	70,04	0,06	29,90
94,66	3,52	1,82	94,78	3,33	1,89	94,97	3,00	2,03

Tabela 4.09 – Dados das composições médias das “tie lines” do SBA PEG 8000/
CaCl₂ a pH 7,0.

Composição (%)								
“Tie line” 3			“Tie line” 2			“Tie line” 1		
H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG	H ₂ O	CaCl ₂	PEG
72,08	1,77	26,21	76,02	1,72	21,36	84,22	1,64	14,24
49,74	0,01	50,25	59,37	0,01	40,62	74,21	0,04	25,75
94,32	3,56	2,12	94,49	3,30	2,21	94,56	3,18	2,26

4.3– Avaliação do coeficiente de partição das enzimas α e β -amilases

De acordo com as Tabelas 4.10 a 4.12, é possível verificar que houve uma diminuição do coeficiente de partição (K) com o aumento da massa molar do polímero, o que está de acordo com a literatura (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). A influência da massa molar do polímero pode ser atribuída ao maior número de grupos hidrofílicos nas cadeias de PEG mais curtas, o que reduz a hidrofobicidade global e aos efeitos de volume excluído, que aumentam com o aumento da massa molar do polímero (SARMENTO et al., 1994; HUDDLESTON et al., 1991).

Com relação à influência exercida pelo pH sobre o coeficiente de partição, constatou-se que este último aumenta com o aumento do pH (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Estudos realizados por VENÂNCIO e colaboradores (1995) e por ALMEIDA e colaboradores (1998) demonstram que houve um leve aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH. Segundo OLIVEIRA (1999) isto pode ser explicado com base nas propriedades hidrofóbicas do PEG, que pode se ligar aos resíduos hidrofóbicos da proteína. No presente estudo como as amilases apresentam-se na conformação estrutural básica, após o seu ponto isoelétrico ($pI = 5,4$), a fase orgânica tende a atrair maior quantidade de enzima a medida que aumenta o pH.

Analisando-se a influência do comprimento da “tie line” no coeficiente de partição verificou-se que ocorreu um aumento deste com o aumento do comprimento da linha de amarração, pois ocorre um aumento da concentração de PEG no sistema (DIAMOND & HSU, 1992). De acordo com RABELO (1999) este fato pode ser atribuído, principalmente, a mudanças na composição relativa das fases, promovendo um crescimento na concentração de sal na fase inferior enquanto que na fase superior, ela permanece relativamente constante e igual à sua solubilidade limite no PEG. Isso provoca um “salting out” de proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG.

Tabela 4.10 – Coeficientes de partição e concentração de proteínas totais nas fases do sistema PEG 4000/ CaCl₂.

"Tie lines"									
pH	1			2			3		
	C _{S1} (g/L)	C _{I1} (g/L)	K ₁	C _{S2} (g/L)	C _{I2} (g/L)	K ₂	C _{S3} (g/L)	C _{I3} (g/L)	K ₃
7,0	1,22	0,32	3,76	1,18	0,29	4,11	1,49	0,28	5,27
6,0	1,12	0,35	3,23	1,19	0,30	4,00	1,27	0,39	4,67
5,0	1,21	0,42	2,91	1,22	0,34	3,63	1,54	0,38	4,00

Tabela 4.11 – Coeficientes de partição e concentração de proteínas totais nas fases do sistema PEG 6000/ CaCl₂.

"Tie lines"									
pH	1			2			3		
	C _{S1} (g/L)	C _{I1} (g/L)	K ₁	C _{S2} (g/L)	C _{I2} (g/L)	K ₂	C _{S3} (g/L)	C _{I3} (g/L)	K ₃
7,0	1,12	0,38	2,95	1,14	0,36	3,17	1,32	0,30	4,49
6,0	1,22	0,42	2,89	1,32	0,44	2,99	1,49	0,41	3,66
5,0	1,07	0,43	2,49	1,10	0,49	2,26	1,26	0,36	3,56

Tabela 4.12 – Coeficientes de Partição e concentração de proteínas totais nas fases do sistema PEG 8000/ CaCl₂.

"Tie lines"									
pH	1			2			3		
	C _{S1} (g/L)	C _{I1} (g/L)	K ₁	C _{S2} (g/L)	C _{I2} (g/L)	K ₂	C _{S3} (g/L)	C _{I3} (g/L)	K ₃
7,0	1,02	0,38	2,68	1,12	0,38	2,95	1,25	0,37	3,38
6,0	1,12	0,42	2,67	1,12	0,42	2,67	1,22	0,38	3,21
5,0	1,16	0,63	1,84	1,12	0,54	2,07	1,46	0,46	3,17

4.4 – Estudo dos fatores que influenciam na partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂

Apos elaborados dos planejamentos descritos no capítulo anterior e montadas as Tabelas 4.13, 4.14, que descrevem os ensaios realizados para testar os modelos lineares com K e $\ln K$, respectivamente. Empregou-se para isto o método do ponto central. As tabelas apresentam os valores de coeficientes de partição (K) obtidos em cada ensaio, e que mais se ajustaram aos modelos (e não as médias, descritas nas tabelas anteriores), para que assim se possa fazer uma adequada descrição do comportamento deste coeficiente sob influência dos fatores pH , "tie line" (TL) e massa molar do polímero (MM_{PEG}) em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl₂.

Tabela 4.13 – Matriz de planejamento baseada no método do ponto central para estudar a influência dos fatores sobre a partição em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂. Modelo tendo K como resposta.

Ensaio	pH	TL	MM_{PEG}	X_1	x_2	x_3	K
1	5,0	1,0	4000	-1	-1	-1	2,84
2	7,0	1,0	4000	+1	-1	-1	3,76
3	5,0	3,0	4000	-1	+1	-1	4,00
4	7,0	3,0	4000	+1	+1	-1	5,27
5	5,0	1,0	8000	-1	-1	+1	1,84
6	7,0	1,0	8000	+1	-1	+1	2,68
7	5,0	3,0	8000	-1	+1	+1	3,01
8	7,0	3,0	8000	+1	+1	+1	3,93
9	6,0	2,0	6000	0	0	0	3,05
10	6,0	2,0	6000	0	0	0	3,09
11	6,0	2,0	6000	0	0	0	2,99

Tabela 4.14 – Matriz de planejamento baseada no método do ponto central para estudar a influência dos fatores sobre a partição em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂. Modelo tendo $\ln K$ como resposta.

Ensaio	pH	TL	MM_{PEG}	X_1	x_2	x_3	$\ln K$
1	5,0	1,0	4000	-1	-1	-1	1,04
2	7,0	1,0	4000	+1	-1	-1	1,32
3	5,0	3,0	4000	-1	+1	-1	1,39
4	7,0	3,0	4000	+1	+1	-1	1,66
5	5,0	1,0	8000	-1	-1	+1	0,61
6	7,0	1,0	8000	+1	-1	+1	0,98
7	5,0	3,0	8000	-1	+1	+1	1,10
8	7,0	3,0	8000	+1	+1	+1	1,37
9	6,0	2,0	6000	0	0	0	1,12
10	6,0	2,0	6000	0	0	0	1,13
11	6,0	2,0	6000	0	0	0	1,10

Estes resultados obtidos experimentalmente foram testados nos modelos pelo método dos mínimos quadrados dando como respostas às equações que descrevem o comportamento do coeficiente de partição (K) sob ação do pH , da composição das “tie lines” (TL) e da massa molar do PEG (MM_{PEG}). As respectivas estimativas dos parâmetros dos modelos são apresentadas nas equações 4.01, 9.01, 9.02 e 9.03 (os três últimos em anexo), tendo como resposta K e $\ln K$, respectivamente. Nestas se encontram as estimativas dos parâmetros e os erros padrões abaixo de a cada uma delas.

A seguir observa-se a equação do modelo que mais se ajustou aos dados experimentais (equação 4.01), que foi o plano tendo $\ln K$ como resposta. Vários autores também comprovaram este comportamento logarítmico natural da partição sob influência

de fatores como os aqui estudados, a concentração de sal e dos polímeros (incluídas nas composições das “tie lines”), o tamanho da molécula a ser particionada, adição de ligantes (ALBERTSSON, et al., 1990), hidrofobicidade do polímero, (JOHANSSON, et al., 1995), além de outros (SILVA & FRANCO, 2000).

$$\ln K = 1,164 + 0,148 \text{pH} + 0,195 \text{TL} - 0,170 \text{MM}_{\text{PEG}} \quad (4.01)$$

$$(\pm 0,005) \quad (\pm 0,005) \quad (\pm 0,005) \quad (\pm 0,005)$$

A análise da variância dos modelos foi feita pela metodologia ANOVA. Na Tabela 4.15 observa-se os resultados da avaliação do ajuste do modelo otimizado. É notável que o modelo possui uma boa significância, pois F_{calc1} é maior que F_{tab1} , e que o mesmo também possui um bom ajuste de dados, já que F_{calc2} é menor que F_{tab2} , o que indica estatisticamente que o modelo é significativo. Nota-se também que: o modelo apresenta um bom coeficiente de determinação, pois está se aproximando do seu valor máximo 1,0; além de ótimas porcentagens de variação explicável e de máxima variação explicável, indicando que o modelo não possui muitos desvios devido à regressão ou a erros experimentais.

Quando os dados dos coeficientes de partição foram graficados geraram as Figuras 4.07 até 4.12 que se referem ao modelo ótimo, que melhor descreveu o comportamento da partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl_2 , sob influência do pH, da composição das “tie lines” e da massa molar do PEG.

As Figuras 4.07 até 4.12, são as representações gráficas em plano e em superfície da equação do modelo ótimo para descrever a influência dos fatores sobre o coeficiente de partição, contendo $\ln K$ como resposta. Percebe-se que todas estas demonstram uma tendência da partição aumentar com o aumento do pH e do comprimento da “tie line”, porém esta reduz com o aumento da massa molar do polímero. As superfícies de resposta demonstram o ajuste dos dados ao modelo, enquanto que as curvas de níveis facilitam a compreensão das tendências do coeficiente de partição sob a ação dos fatores. Para que

estas figuras fossem geradas, tornou-se necessária a grficação de pares de fatores versus a resposta, já que as superfícies só podem descrever três eixos. Enfatizando as análises feitas anteriormente.

Tabela 4.15 – Análise da variância do modelo otimizado da partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂, tendo *lnK* como resposta.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	F _{tab}
Regressão	0,711	3	0,237		
Resíduos	0,018	7	0,003	91,861	4,38
Falta de Ajuste	0,018	5	0,004		
Erro Puro	0,000	2	0,000	15,073	19,30
Total	0,727	10			
% de variância explicável				98,72	
% máxima variância explicável				99,94	
Coeficiente de Determinação (R ²)				0,9772	

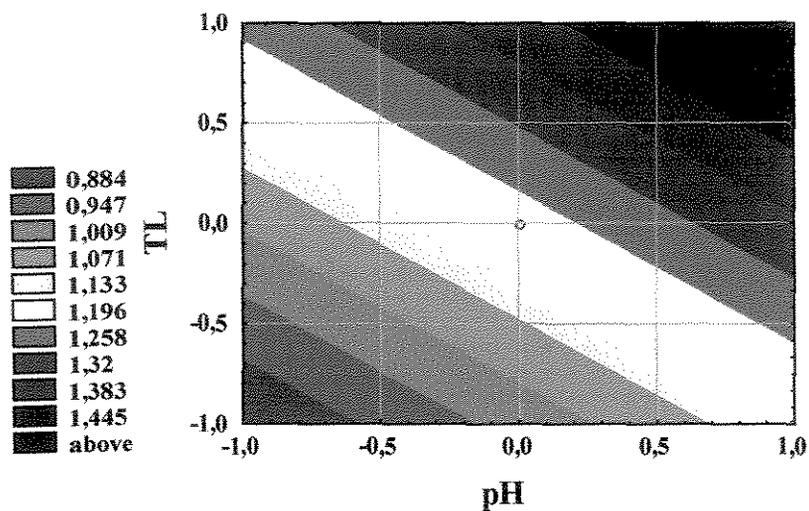


Figura 4.07 – Curvas de níveis que melhor descrevem a influência mútua do pH e da “tie line” sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

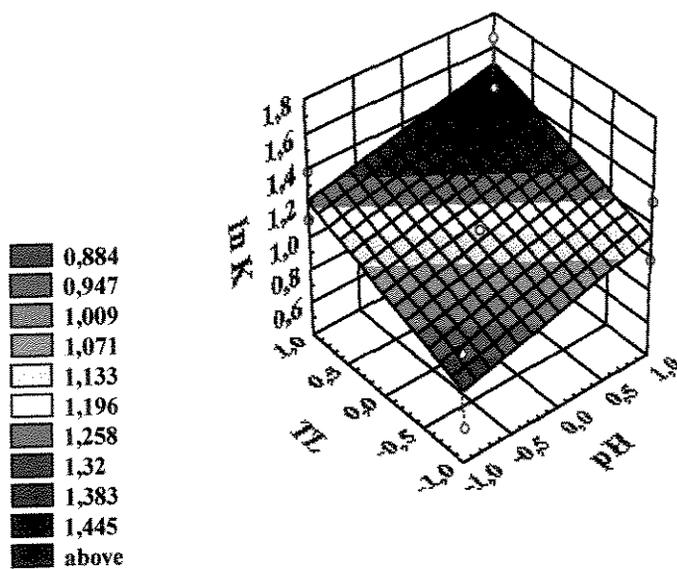


Figura 4.08 – Superfície de resposta que melhor descreve a influência mútua do pH e da “tie line” sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

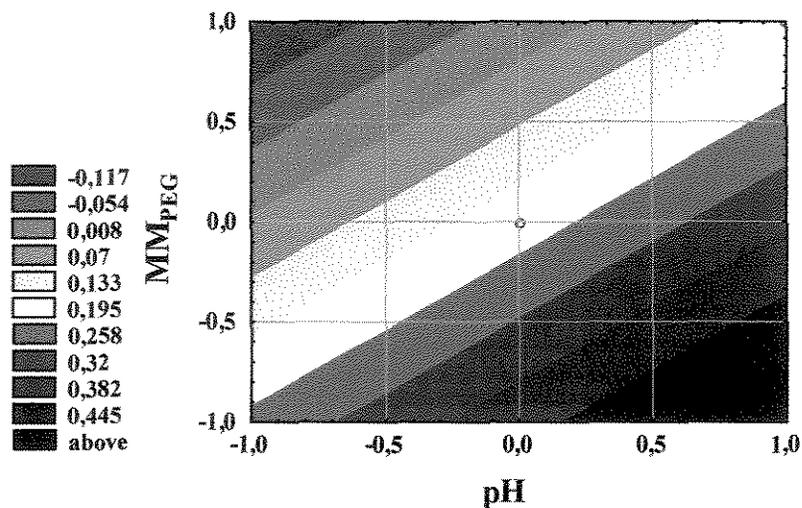


Figura 4.09 – Curvas de níveis que melhor descrevem a influência mútua do pH e das massas molares do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

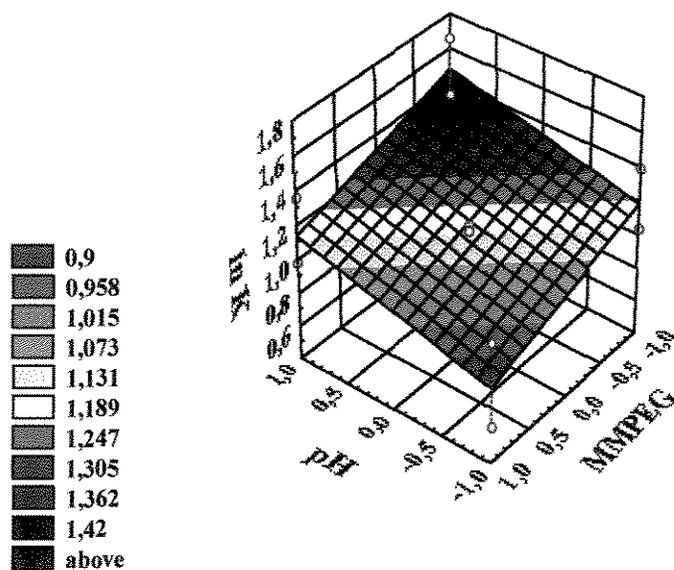


Figura 4.10 – Superfície de resposta que melhor descreve a influência mútua do pH e das massas molares do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

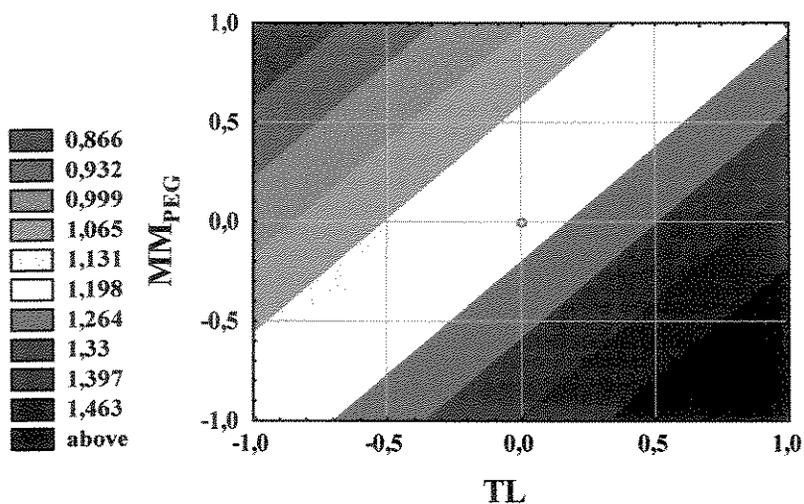


Figura 4.11 – Curvas de níveis que melhor descrevem a influência mútua da “tie line” e da massa molar do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

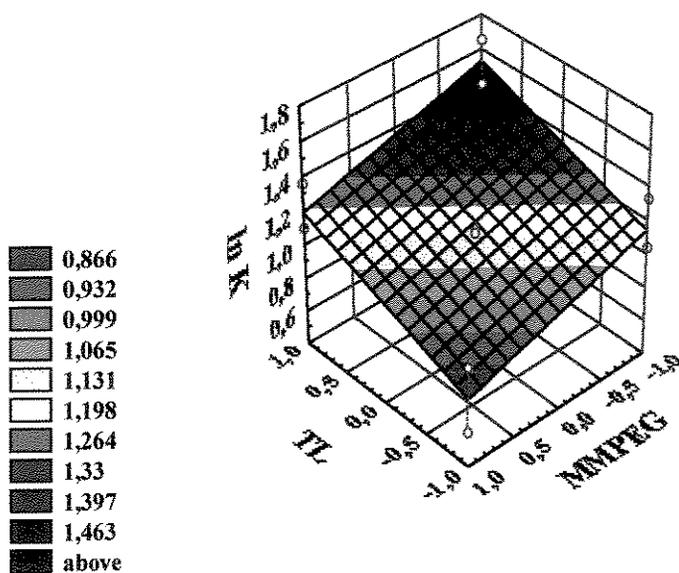


Figura 4.12 – Superfície de resposta que melhor descreve a influência mútua da “tie line” e das massas molar do PEG sobre a partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂.

4.5 – Análise da atividade enzimática

Através da análise da Tabela 4.16 podemos observar que o extrato enzimático apresenta atividade na presença do PEG e CaCl_2 , já que o primeiro é não antigênico e nem imunogênico com uso liberado FDA (“Food and Drug Administration”) e o segundo, apresenta o cátion que faz parte da estrutura da α -amilase, o que valida o uso deste polímero e deste sal na purificação destas enzimas.

Nas “tie lines” observamos que para um polímero num devido pH, os valores da atividade específica podem ser considerados constantes (com exceção da “tie line” 1, pH 7,0, PEG 4000). Com relação às massas molares não há um comportamento definido, contudo os maiores valores de atividade específica foram encontrados para o PEG 8000 em pH 5,0.

De um modo geral, verificou-se que a atividade enzimática não apresentou um comportamento modelável, entretanto o pH 5,0 apresentou os maiores valores, indicando um maior grau de pureza de enzimas amilolíticas sobre o material protéico total, e como no item anterior ficou caracterizado que a “tie line” 3 do SBA PEG 4000/ CaCl_2 apresentou os maiores valores de partição, logo este sistema no pH 5 é o melhor a ser utilizado na recuperação das enzimas amilolíticas.

Tabela 4.16– Atividades enzimáticas dos extratos enzima/ PEG’s.

ATIVIDADE ESPECÍFICA (SKB/ g de Proteína Total)									
pH	5,0			6,0			7,0		
Tie Line	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PEG									
4000	0,34	0,34	0,27	0,07	0,07	0,06	0,22	0,18	0,48
6000	0,20	0,17	0,36	0,02	0,06	0,20	0,09	0,08	0,13
8000	0,50	0,45	0,46	0,26	0,12	0,15	0,05	0,12	0,10

4.6 – Estudo cinético comparativo entre os extratos enzimáticos em malte de milho e em PEG 4000

Este estudo foi baseado exclusivamente na equação modelo de cinética enzimática por Michaelis-Menten, que usa as concentrações de substrato nos limites inferior e superior da curva gerada pela equação de cinética. A aplicação de uma regressão linear dos recíprocos das concentrações do substrato e das velocidades iniciais na equação linearizada da curva de cinética enzimática, segundo a metodologia aplicada por Lineweaver-Burk (MORRIS, 1979; VOET & VOET, 1995), foi usada para determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e de cinética da reação (k_{cat}), e a velocidade máxima de reação (V_{max}).

As Figuras 4.13 e 4.15 mostram a comparação entre as curvas de cinética enzimáticas, por Michaelis – Menten, das enzimas α e β -amilases em malte de milho e em PEG 4000. Todas as curvas foram determinadas em micro-bioreatores de 5,0 mL, contendo como substrato o amido em concentrações variadas e em tampão fosfato pH 5,0 (próximo do ótimo das duas enzimas) e a temperaturas de 75 ± 2 °C e 55 ± 2 °C e (ótimos da α e β -amilases, respectivamente). Percebe-se que em ambas figuras as curva geradas pelas enzimas em PEG, apresentam valores maiores em suas regiões assintóticas que as curvas geradas pelas enzimas em malte de milho. Sendo assim, as primeiras possuem velocidades máximas maiores que as segundas, já que nesta região se encontram os valores quase constantes de V_{max} . Isto indica que as enzimas em extrato de malte possuem uma atividade menor que as enzimas em extrato de PEG 4000, pois necessitam de um tempo maior para hidrolisar totalmente uma mesma massa de amido.

O que também pode ser comprovado ao se observar as Figuras 4.14 e 4.16, que se referem às curvas anteriores linearizadas pelo método de Liweneaver-Burk. Nestas últimas figuras pode-se comparar melhor às atividades das enzimas em malte de milho com as recuperadas em PEG, pois o coeficiente linear destas retas é o recíproco da velocidade máxima, logo aquela que apresentou um menor valor deste coeficiente possui uma maior

atividade enzimática (apresenta uma maior constante cinética, para uma mesma concentração de enzimas). Este fato comprova que o PEG é agente ativador destas enzimas como já foi percebido por outros autores (MALINOWSKI, 2001), além de ser um meio propício para a catalise sem contaminação dos produtos (HARRIS, 1992).

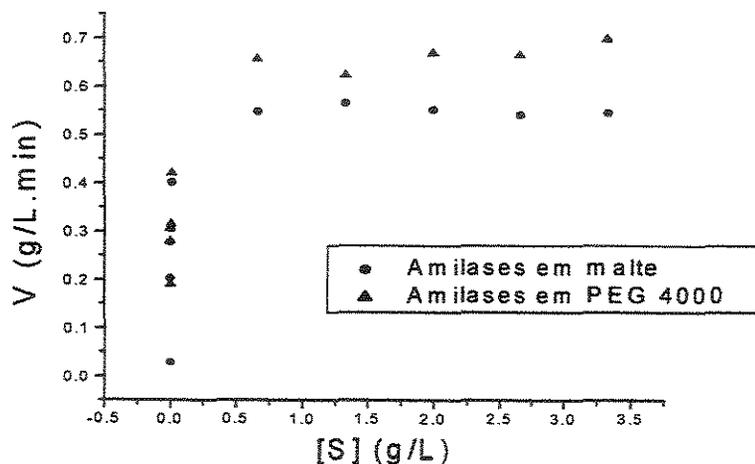


Figura 4.13 – Curvas cinéticas de hidrólise do amido pelas amilases em extrato do malte de milho e em extrato de PEG 4000, a pH 5,0 e 75°C.

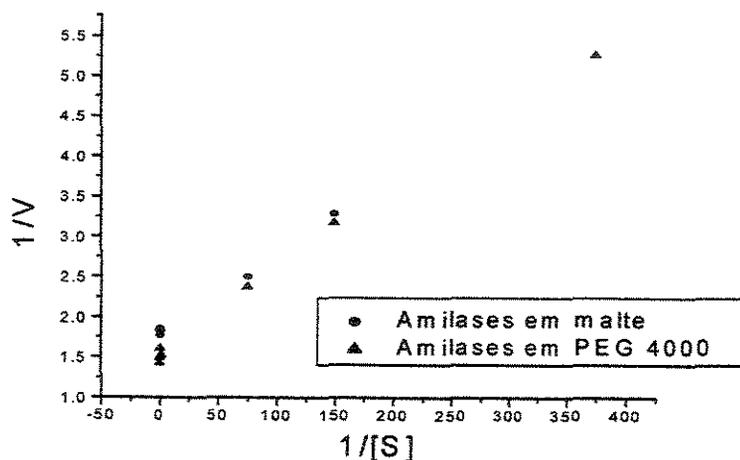


Figura 4.14 – Linearização pelo método de Lineweaver – Burk das curvas de hidrólise do amido pelas amilases em malte e em PEG 4000, a pH 5,0 e 75°C.

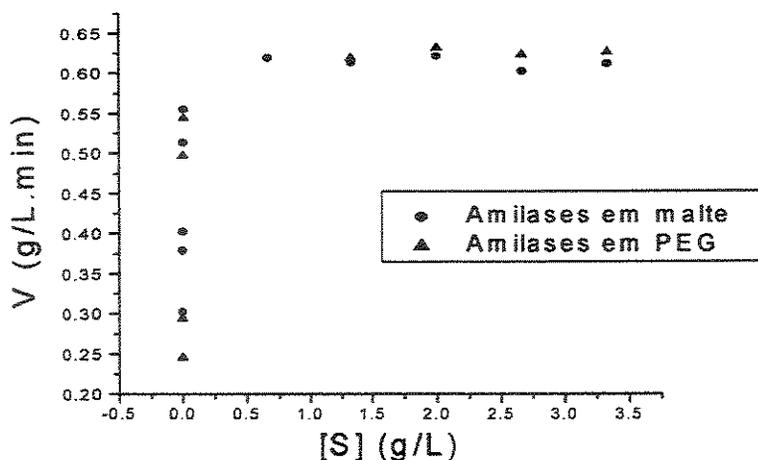


Figura 4.15 – Curvas cinéticas de hidrólise do amido pelas amilases em extrato do malte de milho e em extrato de PEG 4000, a pH 5,0 e 55°C.

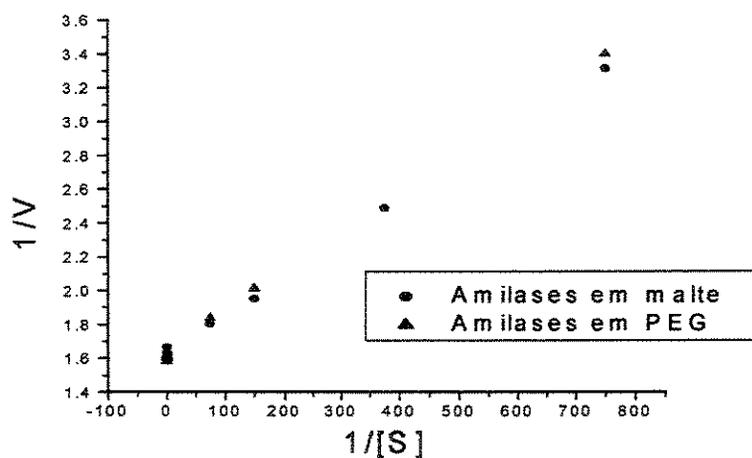


Figura 4.16 – Linearização pelo método de Lineweaver – Burk das curvas de hidrólise do amido pelas amilases em malte e em PEG 4000, a pH 5,0 e 55°C.

As Figuras 4.17 e 4.18 representam a comparação entre as curvas de cinética normal e linearizada das enzimas recuperada em PEG nas temperaturas de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 2^\circ\text{C}$. Observa-se por comparação que em ambas há uma superação dos dados das enzimas em PEG a 75°C sobre as enzimas em PEG a 55°C , de forma que ambas as figuras demonstram que na primeira temperatura as enzimas possuem uma atividade maior, ou

seja, há uma maior percentagem das α -amilases que as β -amilases no extrato enzimático em PEG, já que as primeiras possuem atividade ótima a pH e temperatura próximos de 5,0 e 75°C, respectivamente, e as segundas enzimas perderem sua atividade à medida que se eleva a temperatura além do seu ótimo (55°C). Este fato também é comprovado pelos dados obtidos após linearização das equações de cinética, já que a velocidade máxima (V_{max}) e a constante catalítica (k_{cat}) do extrato enzimático em PEG a 75° superam os valores destas constantes para o extrato enzimático em PEG a 55°C.

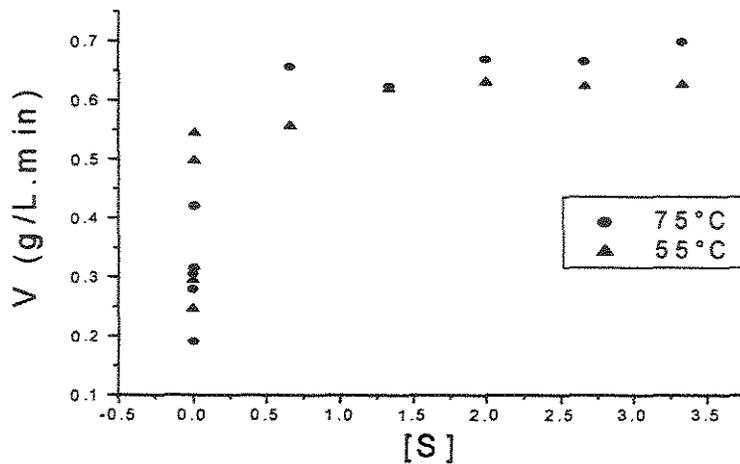


Figura 4.17 – Comparação entre as curvas de cinética de hidrólise do amido nas temperaturas de 55°C e 75°C, utilizando as amilases em PEG 4000, a pH 5,0.

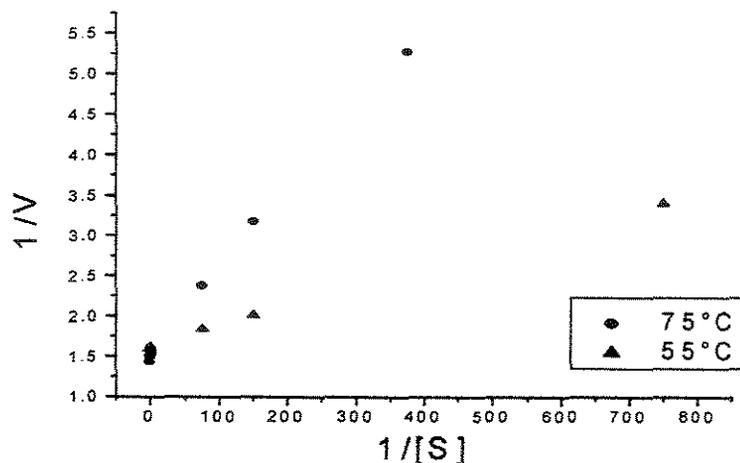


Figura 4.18 – Comparação entre as curvas de hidrólise do amido linearizadas nas temperaturas de 55°C e 75°C, utilizando as amilases em PEG 4000, a pH 5,0.

Abaixo são apresentadas as equações 4.02, 4.03, 4.04 e 4.05 que mostram os valores dos parâmetros dos modelos de cinética enzimática, segundo Michaelis-Menten linearizados por Lineweaver – Burk. As equações de números pares representam as curvas de cinética linearizadas para as enzimas em malte de milho e as de números ímpares representam as enzimas recuperadas em PEG 4000, a 75 e 55°C, respectivamente. Abaixo destas equações se observa: os valores das suas respectivas correlações múltiplas (R^2), da velocidade máxima ($V_{máx}$), da constante de Michaelis – Menten (K_m) e da constante catalítica (k_{cat}), com suas devidas unidades. Para os cálculos das constantes cinéticas, considerou-se as concentrações de enzimas ($[E]$), como sendo às medidas das concentrações de proteína total nos extratos, as quais foram: 0,01014 g/L e 0,004979 g/L, nos extratos enzimáticos em malte e em PEG, respectivamente.

1 - Modelo cinético linearizado para as enzimas em extrato de PEG a 75°C.

$$\frac{1}{V} = 0,0101 \frac{1}{[S]} + 1,533$$

$$R^2 = 0,9964 \quad V_{máx} = 0,6523 \text{ (g / L.min)} \quad (4.02)$$

$$K_m = 0,006588 \text{ (g / L)} \quad k_{cat} = 131,0 \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

2 - Modelo cinético linearizado para as enzimas em extrato do malte de milho a 75°C.

$$\frac{1}{V} = 0,0097 \frac{1}{[S]} + 1,808$$

$$R^2 = 0,9970 \quad V_{máx} = 0,5529 \text{ (g / L.min)} \quad (4.03)$$

$$K_m = 0,01754 \text{ (g / L)} \quad k_{cat} = 54,51 \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

 3 – Modelo cinético linearizado para as enzimas em extrato de PEG a 55°C.

$$\frac{1}{V} = 0,0024 \frac{1}{[S]} + 1,616$$

$$R^2 = 0,9981 \quad V_{máx} = 0,6189 \text{ (g / L.min)} \quad (4.04)$$

$$K_m = 0,001485 \text{ (g / L)} \quad k_{cat} = 124,3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

4 - Modelo cinético linearizada para as enzimas em extrato do malte de milho a 55°C.

$$\frac{1}{V} = 0,0024 \frac{1}{[S]} + 1,538$$

$$R^2 = 0,9991 \quad V_{máx} = 0,6504 \text{ (g / L.min)} \quad (4.05)$$

$$K_m = 0,003690 \text{ (g / L)} \quad k_{cat} = 64,17 \text{ (min}^{-1}\text{)}$$

4.7 – Extração contínua das enzimas α e β -amilases

4.7.1 – Análise do comportamento do sistema de extração utilizado

O sistema escolhido para a extração é decorrente da otimização da recuperação, anteriormente estudada (itens 4.3, 4.4 e 4.5), onde se observou que o polímero que apresentou maior coeficiente de partição foi o PEG 4000, com maiores atividades enzimáticas específicas a pH 5,0; caracterizando uma maior recuperação destas enzimas sobre o teor de proteínas totais. Sendo assim, a extração contínua da enzima α e β -amilases foi realizada em uma micro-coluna de palhetas perfuradas rotativas, de área livre 18% em sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl₂ a pH 5,0 e com a composição da “tie line” 3.

Os experimentos foram organizados segundo a metodologia de otimização por planejamento fatorial, já descrita no capítulo anterior, e os ensaios foram realizados seguindo a ordem observada na Tabela 4.17. Esta tabela apresenta a matriz de planejamento usada para a otimização do processo de extração contínua das enzimas. As colunas da tabela apresentam os ensaios realizados para otimização do processo, com seus devidos fatores: rotação das palhetas (R) e razão entre as vazões de alimentação do concentrado e do solvente (R_Q), bem como suas variáveis codificadas (x_1 e x_2 , respectivamente) e as respostas, os índices de recuperação (I_R), determinados experimentalmente. Entre linhas, é possível observar os ensaios realizados, com seus respectivos níveis e respostas encontradas para cada um destes.

Observando-se a Tabela 4.17, nota-se que o índice de recuperação está aumentando à medida que os níveis tendem para seus menores valores, ou seja, quanto menor for a rotação das palhetas e a razão entre as alimentações do concentrado e o solvente, maior será a recuperação. Contudo, percebe-se também que só é máxima nos níveis em que ambos se apresentam em valores mínimos e não nos níveis em que apenas um dos fatores está no mínimo, veja a comparação do ensaio em que ambos os fatores se apresentam em nível -1, com ensaios em que os mesmos se apresentam em pontos centrais, ou mesmo um dos fatores estando em $-\alpha$ (-1,41) e o outro no ponto central. Isto demonstra que além dos fatores influenciarem sobre a resposta, também há interação entre os mesmos.

Todas as Figuras 4.19 até 4.22 demonstram a tendência do índice de recuperação aumentar com a redução da rotação das palhetas e da razão entre as vazões. O que indica que a transferência de massa entre as fases durante o processo contínuo de extração é melhor quanto menores forem os valores de agitação das palhetas e razão entre as vazões. Isto ocorre, devido ao aumento do tempo de contato entre as fases promover um efeito significativo na elevação da taxa de transferência de massa (HANSON, 1968; ROD, 1966).

Isto é explicado devido à dependência da variação da concentração em uma gota com a área interfacial e o tempo de contato, já que o coeficiente de transferência de massa e

as densidades das fases são considerados constantes, para este sistema estudado. No entanto, estas dependem do diâmetro da gota, que diminuirá com o aumento da agitação levando conseqüentemente a um aumento da área superficial da mesma e a um aumento na taxa de transferência de massa. Contudo, a um dado tamanho da gota, esta assumirá um comportamento de esfera de corpo rígido, o que reduz a difusão e a interação entre as gotas e logicamente a taxa de transferência de massa reduzir-se-á (HANSON, 1968; ROD, 1966).

Como a extração estava promovendo nos seus valores máximos a formação de uma terceira fase e/ ou a ocorrência de inundação, pode-se constatar que a coluna estava operando em seus limites de operação (agitação e alimentações máximas). O que explica o fato da taxa de transferência de massa ser reduzida com o aumento da rotação das palhetas e razão entre vazões, já que a primeira promoveu a redução do tamanho das gotas a ponto de apresentarem comportamentos próximos de esferas de corpos rígidos e a segunda promover a redução do tempo de contato entre as fases.

As Figuras 9.25 até 9.35 (em anexo), demonstram o comportamento da concentração de proteínas totais nas saídas do extrato e do refinado, durante o decorrer do tempo de extração, em sistemas bifásicos aquosos PEG 4000/ CaCl₂ a pH 5,0. Todas as figuras apresentam comportamento parecido, onde inicialmente as concentrações no topo e na base da coluna são máximas e mínimas, decrescendo e ascendendo com o decorrer do tempo, respectivamente, até que atinjam patamares de valores considerados praticamente constantes, decretando um estado estacionário de operação da coluna. O valor do índice de recuperação (I_R) no estado estacionário depende do nível em que a coluna está operando as suas variáveis de controle, os fatores rotação das palhetas e a razão entre as vazões de alimentação, como já foi discutido no parágrafo anterior.

Através da análise das Figuras 9.25 até 9.35, é possível constatar a influência da rotação das palhetas e da razão entre as vazões de alimentação, sobre o tempo para que a extração entrasse em estado estacionário, é mutua e pode ser modelável. Estas apresentaram valores de tempo, para que a coluna atinja os estados estacionários melhores, quando um

destes fatores apresentava-se em nível mínimo. O menor destes foi para o ensaio 3, com a rotação das palhetas em nível -1 e a razão entre vazões de alimentação em nível +1, sendo o em 10 minutos tempo necessário para o estado estacionário. Em média, os experimentos apresentaram os tempos para que se atinjam os estados estacionários próximos de 60 minutos.

Tabela 4.17 – Matriz de planejamento contendo os dados obtidos após a conclusão da otimização da extração contínua das enzimas α e β -amilases, em SBA PEG 4000/ CaCl₂, a pH 5,0.

Ensaio	R (rpm)	R_Q	x_1	x_2	I_R
1	75,00	1/1	-1	-1	10,47
2	125,0	1/1	+1	-1	5,332
3	75,00	½	-1	+1	7,340
4	125,0	½	+1	+1	0,4830
5	100,0	¾	0	0	4,529
6	100,0	¾	0	0	4,438
7	100,0	¾	0	0	4,595
8	64,60	¾	-1,41	0	9,961
9	100,0	2/5	0	-1,41	2,335
10	135,4	¾	+1,41	0	1,532
11	100,0	11/10	0	+1,41	8,353

4.7.2 – Otimização da extração contínua

Neste item será discutido a otimização da extração contínua das enzimas α e β -amilases, em sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl₂, em uma micro-coluna de extração líquido-líquido com palhetas rotativas com área livre de 18%. Os modelos a serem testados

foram de formas linear e quadrática obtidos pelo método do ponto central e estrela, respectivamente.

As Figuras 4.19 e 4.21 e as Figuras 4.20 e 4.22 e as equações 4.06 e 4.07, apresentam as superfícies de resposta, as curvas de níveis e as equações obtidas dos modelos linear e quadrático, respectivamente. Todas as figuras comprovam o que já foi explicado anteriormente sobre a tendência do coeficiente do índice de recuperação (I_R) aumentar com a redução da rotação das palhetas e da razão entre as vazões.

As Tabelas 4.18 e 4.19 apresentam as análises de validade dos modelos pela metodologia ANOVA. É possível se observar que ambos os modelos apresentam boa significância, já que $F_{cal,1}$ é muito maior que $F_{tab,1}$, porém os dados não se ajustaram ao modelo linear $F_{cal,2}$ é muito maior que $F_{tab,2}$, enquanto que para o modelo quadrático isto se inverte, indicando que os dados se ajustam a este modelo. Esta análise também é comprovada ao observarmos a porcentagem de variância máxima explicável, a porcentagem de variância explicável e o coeficiente de determinação. A primeira é ótima para ambos os modelos, já que está relacionada com os desvios quadráticos das repetições (SQ_{ep}) no ponto central e quanto menores estes forem, maior será a porcentagem de variação máxima explicável dos modelos. Já as outras variações, são parecidas e dependentes da regressão, ou seja, quanto maior a aproximação dos desvios quadráticos devido à regressão (SQ_R) dos desvios quadráticos totais (SQ_T), maior será a aproximação destas variações aos seus máximos, mais ajustado estará o modelo.

A análise da variância dos modelos indica que modelo quadrático é significativo e descreve perfeitamente o comportamento do índice de recuperação (I_R) sob efeito da rotação das palhetas perfuradas com área livre de 18% e razões entre vazões das alimentações do concentrado e do solvente nas faixas utilizadas durante o processo de extração contínua das enzimas amilases em uma micro-coluna de extração líquido-líquido, utilizando o sistema bifásico aquoso PEG 4000/ $CaCl_2$ a pH 5,0 com composição da “tie line” 3, descrita anteriormente. Sendo assim, a equação modelo 4.07, pode ser utilizado

para prever os valores do índice de recuperação destas enzimas desde que as condições utilizadas no processo se enquadrem às do experimento aqui descrito.

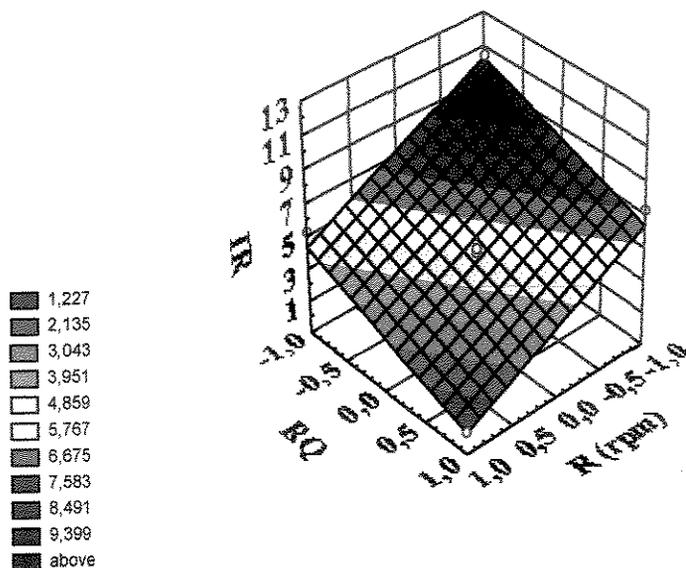


Figura 4.19 – Superfície de resposta para o modelo linear da extração contínua - Método do ponto central.

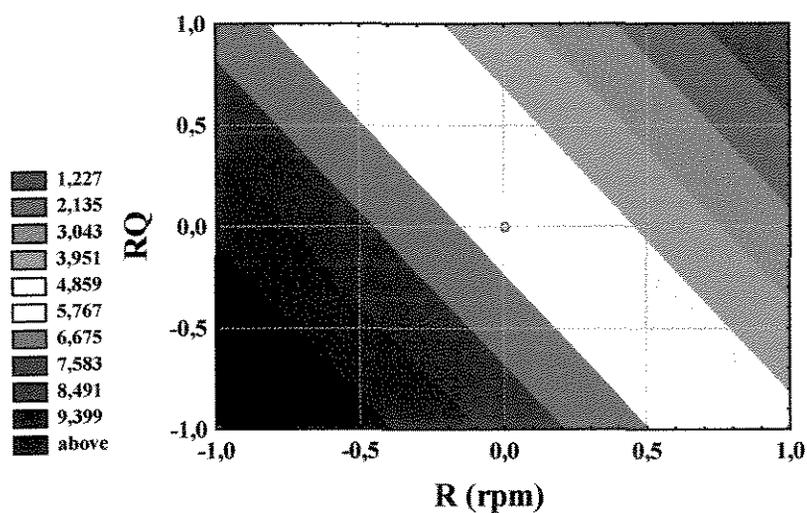


Figura 4.20 – Curvas de nível para o modelo linear da extração contínua das enzimas α e β -amilases – Método do ponto central.

A expressão abaixo representa a equação do modelo linear otimizado da extração contínua das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl_2 – Método do ponto central. Observa-se que cada estimativa de parâmetros apresenta, relacionado abaixo, seu respectivo erro padrão.

$$I_R = 5,313 - 2,999R - 1,995R_Q \quad (4.06)$$

$(\pm 0,030) \quad (\pm 0,039) \quad (\pm 0,039)$

Tabela 4.18 – Análise da variância (ANOVA) do modelo linear da extração contínua das enzimas α e β -amilases em SBA PEG 4000/ CaCl_2 a pH 5,0.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{Calc.}}$	F_{Tab}
Regressão	51,896	2	25,948		
Resíduos	4,043	4	1,011	25,674	6,94
Falta de Ajuste	4,030	2	2,015		
Erro Puro	0,012	2	0,006	324,269	19,00
Total	93,231	6			
% de variância explicável				55,66	
% máxima variância explicável				99,99	
Coeficiente de Determinação (R^2)				0,5566	

A Figura 4.21 mostra a superfície de resposta da recuperação sob a ação dos fatores rotação das palhetas e razão entre as alimentações. Observe que a superfície foi dividida em regiões de colorações graduadas e diferentes que indicam os máximos e os mínimos obtidos pela equação do modelo otimizado. Entretanto, percebe-se que os pontos

de máximo não alcançaram a região de maiores valores de partição, o que indica que a coluna estava operando em regiões intermediárias ao ótimo de operação da mesma. O que é perceptível através da análise dos valores experimentais, já que ao se aumentar os valores das variáveis de controle do sistema (os fatores) a partição se reduzia bruscamente, devido à instabilidade da região onde a coluna foi operada. Isto acusa que se deve mudar a região de trabalho, baixando os valores dos fatores, para uma melhora nos valores da recuperação, o que poderá ser feito em trabalhos futuros.

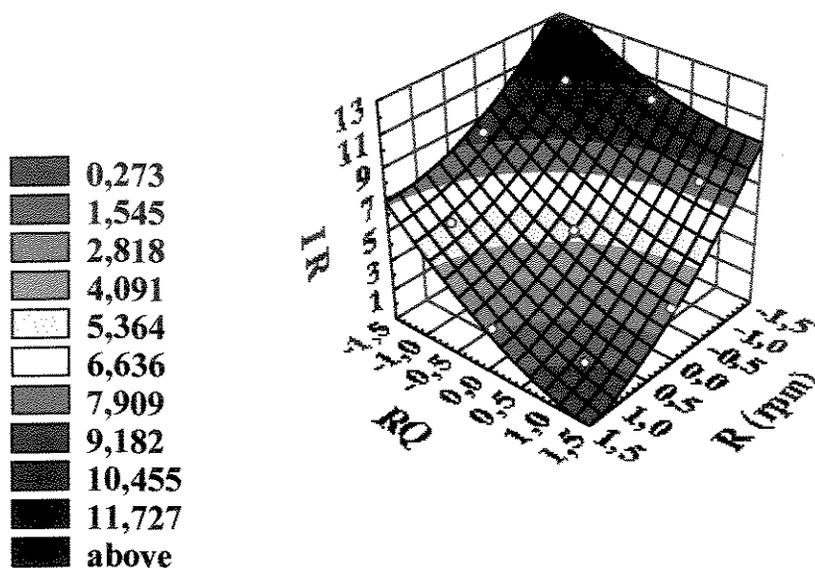


Figura 4.21 - Superfície de resposta para o modelo quadrático da extração contínua das enzimas α e β -amilases - Método estrela.

Através de análise da Figura 4.22 que mostra as curvas de níveis obtidas pela análise da equação do modelo otimizado da extração contínua das enzimas α e β -amilases, pode-se comprovar o que foi dito anteriormente sobre a análise da superfície de resposta. Esta figura mostra as curvas obtidas por uma visão da projeção da superfície de resposta sobre o plano da rotação das palhetas e da razão entre vazões. Desta forma, ela demonstra as regiões de máximo e de mínimo para facilitar a compreensão, porém sem analogia ao controle do equipamento. As curvas mais escuras (marrom) mostram que a região de ótimo de operação da coluna ainda não foi totalmente explorada e desta forma, ao se reduzir os valores dos fatores se alcançará maiores valores para o índice de recuperação (I_R), o que é de boa valia a qualidade e valor do produto.

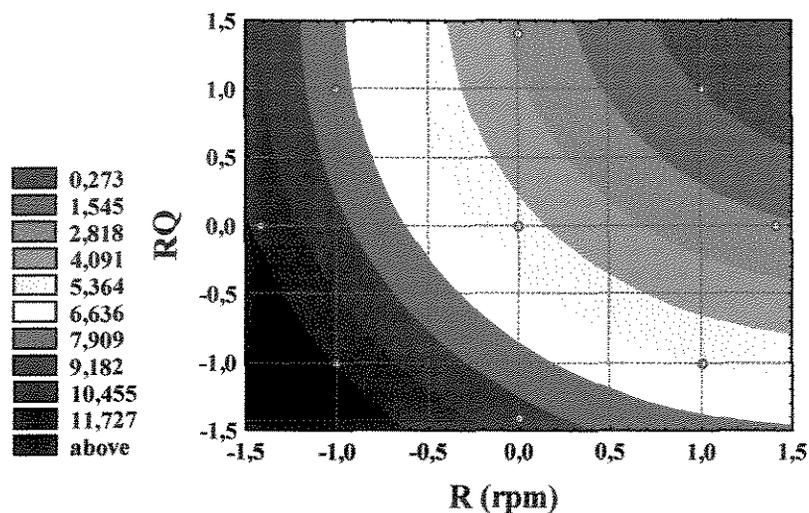


Figura 4.22 – Curvas de nível para o modelo quadrático da extração contínua das enzimas α e β -amilases – Método estrela.

A expressão abaixo representa a equação do modelo quadrático otimizado da extração contínua das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl_2 – Método estrela. Observa-se que cada estimativa de parâmetros apresenta, relacionado abaixo, seu respectivo erro padrão.

$$I_R = 4,520 - 2,994R - 2,056R_Q + 0,705R^2 + 0,504R_Q^2 - 0,430RR_Q \quad (4.07)$$

$$(\pm 0,046) \quad (\pm 0,028) \quad (\pm 0,028) \quad (\pm 0,033) \quad (\pm 0,033) \quad (\pm 0,039)$$

Tabela 4.22 – Análise da variância (ANOVA) do modelo linear da extração contínua das enzimas α e β -amilases em SBA PEG 4000/ CaCl₂ a pH 5,0.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{Calc.}	F _{Tab}
Regressão	109,551	5	21,910		
Resíduos	0,302	5	0,060	368,860	5,06
Falta de Ajuste	0,289	3	0,096		
Erro Puro	0,012	2	0,006	15,528	19,16
Total	109,871	10			
% de variância explicável				99,71	
% máxima variância explicável				99,99	
Coeficiente de Determinação (R ²)				0,9971	

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5 – CONCLUSÕES

Os estudos visando à caracterização do sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl₂ permitiram as seguintes conclusões:

◇ As binodais apresentaram comportamentos assintóticos com os eixos PEG/ CaCl₂, mostrando que para a formação de duas fases, neste sistema, devem ser utilizadas baixas concentrações de PEG e sal, que é de grande valia, já que um menor uso destes reduz os custos do processo.

◇ O pH e as massas molares não apresentaram efeito sobre o comportamento das binodais, o que demonstra a necessidade de um estudo mais aprofundado deste sistema; embora vários autores ainda demonstrem que estes efeitos sobre os SBA's não possui comportamento totalmente definido (DIAMOND & HSU, 1992).

◇ Como os pontos de mistura para determinação das “tie lines”, apresentaram baixas concentrações de PEG e sal, logo, se utilizará pouco reagente para obter a razão volumétrica no SBA PEG/ CaCl₂.

◇ A modelagem da dependência da partição de proteínas totais com o pH, a composição da “tie line” e a massa molar do PEG, em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂, mostrou que 75% dos modelos apresentaram significância estatística. Com boas porcentagens de variações explicáveis, ótima percentagem de máxima variação explicável e correlações melhores que às apresentadas por GUNDUZ (2001) e BERNARDO (2000).

◇ O modelo que obteve um ajuste estatisticamente significativo foi o modelo linear contendo *lnK* como resposta, já que suas correlações estiveram próximas de 1,0 e pelos testes F de comparação entre dados, baseado na curva Gaussiana, ele mostrou que não

apresenta variação significativa dos dados com relação à média global, nem tão pouco acumulou resíduo devido a erros experimentais.

◇ Os coeficientes de partição das enzimas α e β -amilase nos SBA's PEG/ CaCl₂, comportaram-se segundo a literatura e seus valores chegam a ser seis vezes maior que os encontrados por FURUYA et al. (1995 e 1996) e BLÁSQUEZ et al. (1998), quando estes estudaram as mesmas enzimas em SBAs PEG/ Dextrano e PEG/ MgSO₄, respectivamente.

◇ Como a atividade enzimática específica, é um indicador do grau de pureza da enzima no material protéico total, logo, como as maiores atividades enzimáticas se apresentaram nos extratos PEG/ enzima a pH 5,0 e como a maior partição se apresentou no PEG 4000, então, estes resultados caracterizam a “tie line” 3 do SBA PEG 4000/ CaCl₂ a pH 5,0; como o melhor sistema a ser utilizado na purificação das enzimas.

◇ Na extração contínua das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl₂ a pH 5,0; numa micro-coluna de extração líquido-líquido com palhetas rotativas perfuradas de área livre de 18%, observou-se que as concentrações de proteína total das saídas do extrato e do refinado se comportaram como descrito na literatura, com ambas as curvas assintóticas e reversas, sendo que a curva de proteínas do extrato decai enquanto que a da saída do refinado ascende com o tempo. O tempo para que a coluna atinja o estado estacionário foi de aproximadamente 60 min, nas condições usadas.

◇ A partição durante a extração contínua alcançou valores duas vezes maiores que a extração em batelada, além de que, o tempo para que sejam atingidos os estados de equilíbrio na transferência de massa em sistema contínuo é reduzido para cerca de uma hora, enquanto que no sistema em batelada este foi de dois dias. Estes fatos mostram que o emprego da primeira é mais viável economicamente que o da segunda.

◇ A otimização da extração contínua das enzimas α e β -amilases mostrou que o modelo que melhor descreve a partição no estado estacionário se apresenta na forma quadrática com os fatores rotação das palhetas e razão entre as alimentações do concentrado e do solvente. Este modelo obteve ótima correlação múltipla e ótimas porcentagens de variação explicável e máxima explicável, bem como todos os testes Fs deram significância e ajuste ao mesmo. Desta forma este modelo pode ser utilizado para prever os valores da partição, no estado estacionário, destas enzimas nas condições usadas no experimento.

◇ A operação da coluna durante a extração requer cuidados minuciosos com o controle das variáveis, pois se ocorrer um leve descuido no valor de uma destas variáveis a partição poderá cair bruscamente, já que a equação de controle que rege o coeficiente de partição no estado estacionário de operação da coluna é quadrática com os fatores rotação das palhetas e razão entre as vazões, ou seja, a um leve descuido no controle destas, a coluna deixará de estar operando em níveis de máximo de partição para operar em níveis de mínimo, o que acarreta prejuízos econômicos devido à obtenção de produtos de péssima qualidade.

◇ O estudo cinético enzimático comparativo entre as enzimas α e β -amilases nas formas de malte de milho e de extrato em PEG 4000, ambos a pH 5,0 e temperaturas de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 2^\circ\text{C}$, demonstrou que as enzimas recuperadas em PEG 4000 possuem uma maior velocidade máxima, para ambas as temperaturas, que as enzimas em malte de milho, o que já foi comprovado durante a partição em batelada, onde o valor da atividade específica do extrato enzimático em PEG foi superior ao extrato enzimático em malte a temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$). Também se pode concluir que há uma maior atividade das enzimas α -amilases que as β -amilases, já que ao serem comparados as constantes cinéticas e a velocidade de máxima de reação, obtidos nas devidas temperaturas e pH ótimos de cada enzima (75°C e 55°C), percebeu-se que os valores da primeira superaram os valores da segunda.

◇ Este trabalho foi de grande validade, pois agregou valor a uma cultura muito difundida nacionalmente, que possui baixo valor no mercado, o milho, pois através do emprego do mesmo na maltagem para gerar as enzimas α e β -amilases, e posterior recuperação destas em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 aumentará a atividade enzimática destas, atividade esta, muito desejada pelas indústrias alimentícias e outros tipos de indústrias, que se utilizam destas enzimas. Com o aumento da atividade enzimática, será elevada a procura das enzimas amilolíticas de malte de milho recuperadas em PEG, para que possam ser utilizadas em processos fermentativos que decomponham o amido, como a produção de farinhas modificadas para panificações, produção de cerveja, produção de álcool a partir do amido, e outros.

CAPÍTULO VI

SUGESTÕES

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das idéias surgidas pela constante aceitação de conhecimento sobre o assunto durante o desenvolvimento deste trabalho, pode-se sugerir alguns temas para possam ser trabalhados futuramente:

- Otimizar as condições de operação da coluna de extração em regiões que se aproximam do máximo, para que desta forma possam ser encontradas regiões de máximos estáveis, e desta maneira contribuir para um melhor controle da operação coluna na recuperação destas enzimas;
- Estudar o processo de extração contínua com a variação da área livre da palheta, bem como otimizar as condições de operação da coluna de extração utilizando, além das demais variáveis independentes estudadas neste trabalho, a área livre das palhetas.
- Recuperar outras enzimas no SBA PEG/ CaCl_2 , tais como a bromelina, a papaína, a celulase, a tripsina, quitosana, etc.
- Estudar a recuperação das amilases de malte milho em diversos sistemas bifásicos PEG/ policaju, PEG/ Reppal, PEG/ Dextrana, PEG/ NaCl , PEG/ Fosfato, e outros, para compara as partições entre eles e assim definir qual o melhor sistema a ser utilizado na recuperação destas enzimas.
- Utilizar amilases de microrganismos na recuperação com o SBA PEG/ CaCl_2 e comparar suas atividades com as amilases de malte milho.
- Ampliar a escala do experimento, e estudar a influência da altura da coluna, da agitação e da área livre das palhetas e da razão entre as alimentações sobre a transferência de massa e a partição, durante a operação da coluna.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA JUNIOR, B. *Movimento e Estilos Literários*. Coleção Margens do Texto, editora Scipione, São Paulo – SP, 1995, p 70.

ALBERTSSON, P. -Å. History of aqueous polymer two- phase partition. In: *Partition in aqueous two phase systems*. Walter, H., Brooks, D. E. and Fischer D. (Eds.). Academic Press, Orlando - USA, 1985, p.1-8.

ALBERTSSON, P. - Å. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3ª ed., John Willey, New York - USA, 1986, 324 p.

ALBERTSSON, P.-Å.; JOHANSSON, G. & F. TJERNELD, Aqueous two-phase separations: in: *Separation Processes in Biotechnology*. Serie Bioprocess Technology. Juan A. Asenjo (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York - USA, 1990, p 287 - 327.

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. *Biochemical engineering fundamentals*, 2ª edition: chemical engeneering series, ed. Mcgraw-Hill international, New York - USA, 1986. Cap 11: Product Recovery Operations, 739 - 789.

BAMBERGER, S.; BROOKS, E. D.; SHARP, K. A., VAN ALSTINE, J. M. and WEBBER T. J. Preparation of Phase Systems and Measurement of Their Physicochemical Properties. In: *Partition in Aqueous Two-phase Systems: Theory, Methods, Uses, and Application to Biotechnology*. Walter, H., Brooks, D. E. and Fischer D (Ed.). Academic Press, Orlando - USA, 1985, p.86-131.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Vol. 1, 1ª edição, Série Manuais, Editora da UNICAMP, Campinas – SP, 1995, p 302.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Vol. 1, 1ª edição, Coleção Livros - Textos, Editora da UNICAMP, Campinas – SP, 2001, p 406.

BERNARDO, S. *Partição de aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, e da proteína insulina humana, em sistema aquoso bifásico contendo polímero, copolímero e sais*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Campinas - SP, 2000. 132 p. Dissertação (Mestrado).

BLÁSQUEZ, G. CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P. & ALARCÓN, F. J., Partition coefficients of α -amylase in aqueous two-phase systems PEG+MgSO₄.7H₂O at 298 K, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379: 191-197, 1998.

BORZANI, W. AQUARONE, E. & LIMA, U. A. *Biotecnologia: Tecnologia das Fermentações*. Vol. 01. 3ª Reimpressão. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo – SP. 1986, 304 p.

BODHANKAR, S. S.; HARIHAR, V. & GAIKAR, V.G. Partition of amino acids in aqueous two-phase system of polyethylene glycol/sodium sulfate in presence of surfac active additives. *Bioseparation*. 6: 47-54, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254, 1976.

CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. *Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems: In Recovery process for biological materials*. JOHN WILEY and SONS Ltd (eds), New York, p. 273-301, 1993.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; AIRES-BARROS, M. R.; TAMBOURGI, E. B.; CABRAL, J. R. S., Recovery of Recombinant Cutinase With Reversed Micelles in a Continuous Perforated Rotating Disc Contactor. *Biotechnol. Tech.* 8, 413-418, 1994.

CALDWELL, W. M. and ADAMS, M. Química dos Carboidratos. In: *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. REGULY, J. C. Vol. 1, Ed. UFPel, 1996, 330 p.

CASTRO, M. J. M. and CABRAL, J. M. S. *Biotechnology Advances* v.6, 1998, p.151.

CHAVES, A. C., *Produção de Proteínas Recombinadas de Schistosoma mansoni Utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas*. Lisboa - Portugal: Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa. 2000, 136 p. Tese (Doutorado).

CHAVES, A. C.; LUCENA-SILVA, N.; ABATH, F.G.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A. L. F. & CABRAL, J. M. S., Partition of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins from *E. Coli*. Extract in aqueous two phase system. In: FOURTH ITALIAN CONFERENCE ON CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING, 1999. Proceedings... v.01, p. 511-514.

CHAVES, A. C.; LUCENA-SILVA, N.; ABATH, F.G.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A. L. F. & CABRAL, J. M. S., CHAVES, A.; LUCENA-SILVA, N.; ABATH, F.G.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A. L. F. & CABRAL, J. M. S., *Growth kinetics of a recombinant E. Coli expressing a tegumental antigen of S. mansoni*. In: 8th EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 1997, Budapest-Hungary. *Proceedings* ... v.01, 1997, p.

CHAVES, A. C.; LUCENA-SILVA, N.; ABATH, F.G.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A. L. F. & CABRAL, J. M. S., Extraction of recombinant *S. mansoni* antigen from an impure *E. Coli* cellular extract using aqueous two phase systems. In: IV IBERIAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY and I IBERO-AMERICAN MEETING ON BIOTECHNOLOGY, 1998, Guimarães – Portugal. *Proceedings... Bethel*: V.01, 1998, p.

CHAVES, A. C.; SANTOS, R. A. A.; LUCENA-SILVA, N.; ABATH, F.G.C.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A. L. F. & CABRAL, J. M. S., Influence of the pH on extraction of recombinant *S. mansoni* antigen from *E. Coli* cellular extract using aqueous two phase system. In: XXVIII REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 1999, Caxambu-MG. *Proceedings... Bethel*: V.01, 1999, p.

CHUNG, T.-W., CHUNG, C-H & LUE, Y.-F., A Colorimetric Method for Determining Distearoylphosphatidylethanolamine±Polyethylene Glycol 2000 in Blood Suspension, *Analytical Biochemistry* 285 : 270-287, 2000.

COSTA, M. J. L.; CUNHA, M. T.; CABRAL, J. M. S. & AIRES-BARROS, M. R., Scale-up of recombinant cutinase recovery by whole broth extraction with PEG-phosphate aqueous two-phase. *Bioseparation* 9: 231-238, 2000.

CRAIG, L. C. and CRAIG, D. *Techniques of Organic Chemistry*. Weimberger (Eds.), Interscience, New York, v.4, 1956.

DANESI, E. D. G. & WOSIACKI, G. Otimização da Produção de Nata (Celulose Bacteriana) por Fermentação em Superfície. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.1, 1998.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. *Bioquímica: Aulas práticas*. Série Didática, 3ª edição, editora da UFPR, Curitiba – PR, 1993, 120 p.

DEVELIN, T. M. *Textbook Biochemistry with Clinical Correlations*, Fourth editions, Edited by Wiley-Linss, New York-NY, USA, 1997. Chapter 4: Enzymes, classification, kinetics and control, 127 - 179.

DIAMOND, A.D., HSU, J.T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemistry Engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.

DIXON, M. & WEBB E., *Enzymes*, second edition, sixth impression, by Spottiswood, Ballantyne co. Ltd, London and Colchester, ed. Longmans and co. ltd. London, Great Britain, 1967, 950 p.

EDGARD, T. F. & HIMMELBLAU, D. M. *Optimization of Chemical Processes*. 1ª edition, Chemical Engineering Series, McGraw-Hill International Editions, printed in Singapore, 1989, 654 p.

FERREIRA, J. S. *Avaliação do Coeficiente de Partição do Colesterol entre Duas Fases: Solução Saponificada e Hidrocarbonetos*. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. 136 p. Dissertação (Mestrado).

FOGARTY, W. M. & KELLY, C. T. *Topics in Enzyme and Fermentation. Biotechnology*; V.3, Chichester, G, Howood- J. Wiley & Sons, 1979, p.

FRIEDMAN, P. J. *Biochemistry: An Illustrated Review with Questions and Explanation*, Fifth Edition, Library of Congress, New York-NY, USA, 1994. Chapter 5: Enzymes, p 31 - 42.

FURUYA, T.; IWAI, Y.; TANAKA, Y.; UCHIDA, H., YAMADA, S. & ARAI, Y. Measurement and correlation of partition coefficients of hydrolytic enzymes for dextran + poly(ethylene glycol) + water aqueous two-phase systems at 20°C. *Fluid phase Equilibria* 110: 115-128, 1995.

FURUYA, T.; YAMADA, S.; ZHU, J.; YAMAGUCHI, Y. IWAI, Y. & ARAI, Y. Measurement and correlation of liquid-liquid equilibria and partition coefficients of hydrolytic enzymes for DEX T500 + PEG20000 + water aqueous two-phase systems at 20°C, *Fluid phase Equilibria* 125: 89-102, 1996

GAVA, A. J. *Princípios de tecnologia de alimentos*. 7ª Edição, Editora Nobel. São Paulo – SP, 1988. Cap. II: Microbiologia de Alimentos, p 57 - 75.

GUEDES, A. M. M. & FARIA, L. J. G. Determinação da Constante de Secagem de Urucum(*Bixa orellana L.*) em Secador Convectivo de Leito Fixo. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.2, n.1, 73-83, 2000.

GUNDUZ, U. Optimization of bovine serum albumin partition coefficient in aqueous two-phase systems. *Bioseparation* 9: 277-281, 2001.

HALPERN, M. J. *Bioquímica*, 1ª edição, editora Lidel, Lisboa, Portugal, 1997, 233 - 303.

HANSSON, C. Recent research in solvent extraction. *Chemical Engineering*. 9: 135-142; 1968.

HARRIS, J. M. *Poly (ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications*. 1ª edition, Plenum Press, New York and London, 1992, p. 388.

HATTON, T. A. *Comprehensive Biotechnology*, COONEY, C. L. and HUMPHREY, A. E. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, v. 2, 1985, p 439-448.

HENTSCH, M.; WARNERY, P.; RENKER, A. & FLASCHEL, E. Study of the simultaneous partitioning of proteins and surfactant in reverses micellar two-phase systems- Potential impactt upon purification efficiency. *Bioseparation* 6: 67-76, 1996.

HIRANO, Z. M. B.; FILHO, H. H. S.; MULLER, G. C. K. & SCHMIDT, S. R., *Bioquímica: Manual Prático*. Coleção livros Didáticos 5, 1ª edição, Editora Edifurb, Blumenal – SC, 2001, 178 p.

HORTON, H. R.; MORAN, L. A.; OCHS, R. S.; KAW, J. D. & SCRIMGEOUR, K. G., *Principles of Biochemistry*. Second editions, Edited by Pretice Hall, New York-NY, USA, 1996, Chapters 5 and 6: Properties of enzymes and Mechanisms of Enzymes, p 119 - 180.

HUDDLESSTON, J. G., OTTOMAR, K. W., NGONYANI, D. M., LIDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. *Enzyme Microbiology and Biotechnolog*. v. 13, p. 24-32, 1991.

JAWETZ, E.; MELINICK, J. L. & ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 2ª Ed.. Tradução: Carlos Eduardo de Vasconcelos Sorya, Homero Coutinho Salazar. Revisão: Ítalo Suassuna e Ivone Rocco Suassuna. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro – RJ – Brasil. 1970. Cap. 6: Cultivo de Microrganismos, p 77 - 93.

JOHNSSON, G.; HARMAN, A. & ALBERTSSON, P-A, Partition of Proteins in Aqueous two phase systems containing charged poly(ethylene glycol). *Eur. J. Biochem.* 33: 379-386, 1973.

JOHANSSON, H.-O.; KARLSTRÖM, G. MATTIASSON, B. & TJERNELD, F., Effects of hidrofobicity and counter ions on the partition of amino acids in termosering Ucon-water two-phase systems. *Bioseparation* 5: 269 - 279, 1995.

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. Vol. 4, 12ª Edição, Companhia Editora Nacional, São Paulo-SP, Brasil, 1998, p 278 - 281.

KARAM, L. B.; GROSSMANN, M. V. E. & SILVA, R. S. S. F. Mistura de farinha de aveia e amido de milho com alto teor de amilopectina para produção de “snacks”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(2), 158-163, 2001.

KHURI, A. I. & CORNELL J. A. *Response surfaces: designs and analyses*. 2nd ed., revised and expanded. Marcel Dekker, inc. New York – USA, 1996, p509.

KUBEK, D. J. Liquid-liquid extraction: in *Protein Purification Process Engineering*, v.18, editad by Roger G. Harrison, serie Bioprocess technology, by Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1994, p 87 - 114.

KULA, M. R., KRONER, K. H. and HUSTED, T. H. Purification of enzumes by liquid-liquid extraction. *Advances in Biochemistry Engineerin*, vV. 24, p. 73-118, 1982.

KULA, M. R. *Comprehensive Biotechnology*. COONEY, C.L. and HUMPREY, A. E. (eds), Pergamon Press, New York, v. 02, 1985, p. 451-471.

LEITE, P. B. *Extração de proteínas em um sistema de duas fases aquosas numa micro-coluna pulsada*. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. p 83. Dissertação (Mestrado).

LEITE, P. B. & TAMBOURGI, E. B. Partição de tripsina em um sistema de duas fases aquosas formados por goma de cajueiro e PEG. In: 8th INTERNATIONAL CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE – CHEMPOR'2001, 2001, Lisboa - Portugal. *Proceedings ...*, 2001, v.01, p 621 - 625, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M., *Principios de Bioquímica*. 2^a edição, Tradução: Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi, Sarvier editora de livros médicos ltda, São Paulo-SP, Brasil, 1995, Cap 8: Enzimas, p 147 - 178.

LIMA, U. A. BORZANI, W. AQUARONE, E. & SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos*. Vol. 03. 1^a ed. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo – SP. 2001, 598 p.

LINTOMEN, L. Avaliação do Processo de Extração Líquido-Líquido para Recuperação e Purificação do Ácido Cítrico. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 94 p. Dissertação (Mestrado).

MACEDO, R. V. T. & ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em dois níveis de temperatura – Parte II: produção de lipídios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21(2), 183-186, 2001.

MAEDA, K.; NAMURA, Y.; GUZMAN, L. A. & HIROTA, S., Crystallization of fatty acids using binodal of two liquid phases. *Chemical Engineering Science*, v.53, nº5, 1103 - 1105, 1998.

MALINOWSKI, J. J. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology- Research review paper. *Biotechnology advances*, v.19 n.7: 525-538, 2001.

MATIASSON, B. & KAUL, R. Use of aqueous two-phase systems for recovery and purification in biotechnology. In: *Separation, Recovery, and Purification and Biotechnology*. American chemical Society, 1986, p 79 – 92.

MISTRY, S. L.; KAUL, A.; MERCHUK, J. C. & ARSENJO, J. A., Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction, *Journal of Chromatography A* 741: 151-163, 1996.

MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. W., SPECTOR, A. A. & CHAPPELL, D., *Biochemistry: A Case-Oriented Approach*, Sixth editions, Edited by Mosby year Book, inc., San Louis-Missouri, USA, 1996, Chapter 3: Enzymes and Biologic Catalysis, p 64 - 95.

MORAIS, A. L. F. Projeto por Computador de Extrator Líquido-Líquido. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 138 p. Tese (Doutorado).

MORITA, T. & ASSUMPCÃO, R. M. V. (Eds.). *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*. Padronização–Preparação–Purificação. 2ª edição, 9ª reimpressão, Edgard Blücher Ltda, São Paulo - SP, 1995, p 276.

MORO, J. R. *Extração de tripsina numa microcoluna agitada por campânulas pulsadas*. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 108 p. Dissertação (Mestrado).

MORRIS, J. G. *Físico-química para biólogos*. Tradução: Márcia Navarro Cipolli. 1ª Ed., Editora Polígono, Editora da USP. São Paulo – SP , 1972. Cap II: Cinética de Reações Catalisadas por Enzimas, p 323 - 367.

OLIVEIRA, L. A. D. *Caracterização do Sistema bifásico aquoso polietileno glicol /polissacarídeo de goma do cajueiro*. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Campinas, 1999. 100 p. Dissertação (Mestrado).

PHARMACIA-BIOTECH. *Hydrophobic interaction chromatography, principles and methods*. Amesham Pharmacia – Biotech. Uppsala, Swenden, 1994.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.& ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. *Química Nova*, V.25, n.2, 246-253, 2002.

PETER, H. W.; AHLERS, J. & MOREIRA, R. A., *Cinética Enzimática*, 1ª edição, Editora da UFC, Fortaleza-CE, Brasil, 1987, 242 p.

PIZA, F. A. T., SILOTO, A. P., CARVALHO, C. V. & FRANCO, T. T. Production, characterization and purification of chitonase from *Bacillus cereus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, ISSN 0104-6632, v.16 n.2, São Paulo-SP, 1999.

RABELO, A. P. B. *Estudo e desenvolvimento de uma microcoluna de campânula pulsantes para a purificação de proteínas*. Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 234 p. Tese (Doutorado).

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. Vol. 1, Editora Universitária - UFPel, 1996, 330 p.

RICARDO, C. P. & TEIXEIRA, A. *Enzimas*. Vol.03, 4ª edição, coleção formação universitária. Didática editora, Porto – Portugal, 1993, p 162.

ROD, V. Calculating mass transfer with longitudinal mixing. *British Chemical Engineering*, 2 (6): 483-487, 1966.

RODRIGUES, E. M. G. & TAMBOURGI, E. B. Continuous extraction of xylanase from *Panicillium janthinellum* with reversed micelles using experimental design mathematical model. *Biotechnology Letters* 23: 365-367, 2001.

SARMENTO, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Líquid-líquid extraction of recombinant protein, Cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of poly (etilene glycol) and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, 668, 117-120, 1994.

SARUBO, L. A.; OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; DUARTE, H. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. & TAMBOURGI, E. B., New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly (ethylene glycol). *Journal of Chromatography B*. 743: 379-384, 2000.

SARUBO, L. A.; OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; DUARTE, H. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; TAMBOURGI, E. B.; HIROSE, A. L. K., Extração de tripsina numa microcoluna pulsante em sistemas de duas fases aquosas. In: 8th INTERNATIONAL CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE – CHEMPOR'2001. *Proceedings...*, v. 1: 2001, p 605-611.

SARUBO, L. A.; OLIVEIRA, L. A.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. & TAMBOURGI, E. B. Properties of PEG-cashew-nut tree gum aqueous bifasic system: Influence of temperature. In: 8th INTERNATIONAL CHEMICAL ENGINEERING CONFERENCE – CHEMPOR'2001. *Proceedings...*, v. 1: 2001, 613-619.

SCHMIDELL, W. BORZANI, W. AQUARONE, E.; & LIMA, U. A. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Vol. 02. 1^a ed., Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo – SP – Brasil. 2001, 547 p.

SCRIBAN, R. *Biotecnologia*, 1^a edição, Tradução: M^a de Ermantina Galvão Gomes Pereira; Olga Hide Shimabukuro; Elza Trassi Mariano; Almerinda Rastelli Montenegro de Menezes Robin & Blanche Pereira de Castro Torres, Editora Manole Ltda, São Paulo-SP, Brasil, 1985.

SÉ, R. A. G. Equilíbrio Líquido – Líquido em Sistemas Bifásicos Aquosos Poliméricos Contendo Eletrólitos. Campinas - SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 100 p. Dissertação (Mestrado).

SILVA, M. E. & FRANCO, T. T. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*: V.17, n.1, São Paulo, mar. 2000.

SKOOG, B., Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. *J. Blood transf. Immunopathol.* 37: 435-349, 1979.

SOUZA, R. R. *Estudo e Desenvolvimento de um Extrator de Palhetas Rotativas*. Campinas - SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 208 p. Tese (Doutorado).

SOUZA, R.R.; SANTANA, J.C.C.; e CHAVES, A.C. Estudo da Atividade Enzimática na Germinação de Semantas de *Zea mays*. In: XXI CONGRESSO DE MICROBIOLOGIA, Foz do Iguaçu - RS, 2001. *Proceedings...*v.01, 2001, p 339.

TJERNELD, F. Aqueous two-phase partitioning on an industrial scale. In: poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Edited by Harris, J. M. Plenum Press, New York and London, 1992, p 85 - 102.

TSÉ-TUNG, M. Sobre a prática e a contradição. 1ª edição, editora Expressão Popular Ltda, São Paulo - SP, 1999, p 20.

VILLELA, G. *Bioquímica dos microrganismos*. 1ª ed., editora da imprensa Universitária da UFPE. Recife – PE – Brasil. 1972. Cap 5: Crescimento de Microrganismos, p 185 - 217.

VOET, D. & VOET, J. G. *Biochemistry*. 2ª Ed. Printed by John Wiley & Sons Inc. New York – USA. 1995. Section 13 – 2: Enzyme Kinetics, p 351 - 367.

VOGEL, A. I. *Análise Química Quantitativa*. 5ª edição, Revisada por G.H. Jeffery, J. Bassett; J. Mendham; R. C. Denney, Tradução: Horácio Macedo, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. – LTC, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, 1992.

WALTER, H.; BROOKS, D. E. & FISHER, D. *Partition in aqueous two-phase systems: Theory, Methods, uses and applications to biotechnology*. 1ª edition, Academic Press Inc., New York, Orlando, San Diego, Austin, Montreal, Sydney, Tokyo and London, 1985, 708p.

WENZEL, G. E. *Bioquímica Experimental dos Alimentos*. Coleção manual Universitário, Vol. 7. 1ª edição, editora UNISINOS, São Leopoldo –RS, Brasil, 2001, 218 p.

WISEMAN, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Second edition, edited by Ellis Horwood limited a division of John Wiley Sons, New York, EUA, 1987, 460 p.

ZANCAN, G. T. (Org.). *Bioquímica: aulas práticas*. Departamento de Bioquímica. 6 ed. Curitiba: Editora da UFPR, 1999, 178 p.

ZUBAY, G. L. *Biochemistry*. Fourth edition, McGraw Hill comp, USA, 1998. Part 3: Catalysis, p 157 - 264.

APÊNDICE

8 – APÊNDICES

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Partition of Enzymes α and β - Amylases from Maize Malt (*Zea mays*) in Aqueous Two -Phase System PEG 6000/ CaCl_2* . Journal Chemical & Engineering Technology (J Wiley). Abstract will be printed after ECCE-4 (accepted in April of 2003).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; João B. S. Jr; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Optimization of the Recovery Amylases from Maize Malt (*Zea mays*) in ATPS PEG 6000/ CaCl_2* . Journal Chemical & Engineering Technology (J Wiley). Abstract will be printed after ECCE-4 (accepted in April of 2003).

SANTANA, J. C. C.; FERREIRA, G. B.; EVANGELISTA, A. F.; SOUZA; R. R. & JORDÃO, J. ESTUDO DA PARTIÇÃO DAS ENZIMAS α e β -AMILASES DE *Zea mays* EM SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG 8000/ CaCl_2 . *Revista Caderno UFS*, 2003. (Trabalho aceito em dezembro de 2002, a publicar em 2003).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Recovery of Amylolytic Enzymes of Corn Malt (*Zea mays*) in Aqueous two-phase system PEG 6000 / CaCl_2* . 6^a ITALIAN CONFERENCE ON CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING - 6^aICHAp, Pizza, Italy, 2003. Chemical Engineering Transation, V.03, Topic V: SEPARATION TECHNOLOGY AND TRANSFER (Full paper accepted in April 2003).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Recuperação das enzimas α e β - amilases de *Zea mays* em SBA PEG 4000 e 6000/ CaCl_2* . XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES – SINAFERM, Santa Catarina, 2003 (Trabalho completo aceito a publicar em 2003).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Recovery of Amylolytic Enzymes of Corn Malt (*Zea mays*) in Aqueous two-phase system PEG 6000 / CaCl_2* . 6^a ITALIAN CONFERENCE ON CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING -

6^aICHAp, Pizza, Italy, 2003. Abstract Book - Chemical Engineering Transation, V.03, Topic V SEPARATION TECHNOLOGY AND TRANSFER (Abstract accepted in 2002).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Partition of Enzymes α and β - Amylases from Maize Malt (*Zea mays*) in Aqueous Two -Phase System PEG 6000/ CaCl_2* . 4^a CONFERENCE EUROPEAN OF ENGINEERING CHEMICAL, 4^a CEEC, Granada, Espanha, 2003. Abstract Book - Chapter 11: BIOCHEMICAL & FOOD ENGINEERING, part 1: Separation Process in Biotechnology (accepted in March 2003).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; João B. S. Jr; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Optimization of the Recovery Amylases from Maize Malt (*Zea mays*) in ATPS PEG 6000/ CaCl_2* . 4^a EUROPEAN CONFERENCE OF CHEMICAL ENGINEERING, ECCE-4, Granada, Espanha, 2003. Abstract Book - Chapter 9: PROCESS SYSTEM ENGINEERING & CAPE, part 2: Computer Aided Modelling.Simulation and Optimization (accepted in April 2003).

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Caracterização do Sistema Bifásico Aquoso para uso na Partição das Enzimas α e β - Amilases*. XXX Encontro Nacional de Meios Porosos – ENEMP 2002, São Carlos – SP. (www.ufscar/eventos/enemp) resumo PI 24, 2002.

G. B. Ferreira; A. F. Evangelista; J. C. C. Santana; E. Jordão; R. R. Souza. *Comportamento do sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2* . 54^a REUNIÃO ANUAL DA SBPC, Goiânia, 2002. (CD) Anais/ Resumos da 54^a Reunião Anual da SBPC.

ANEXOS

9 – ANEXOS

9.1 – Binodais dos sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂

As Figuras 9.01 ate 9.09 representam as “binodais” obtidas neste trabalho para o SBA PEG /CaCl₂.

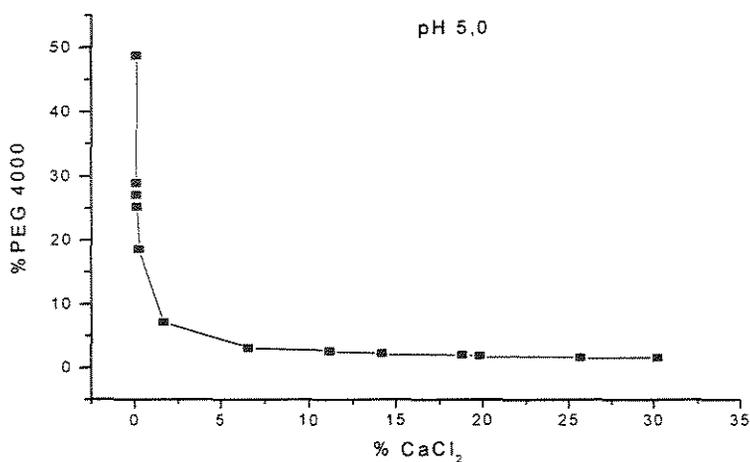


Figura 9.01 – Curva de equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 5,0.

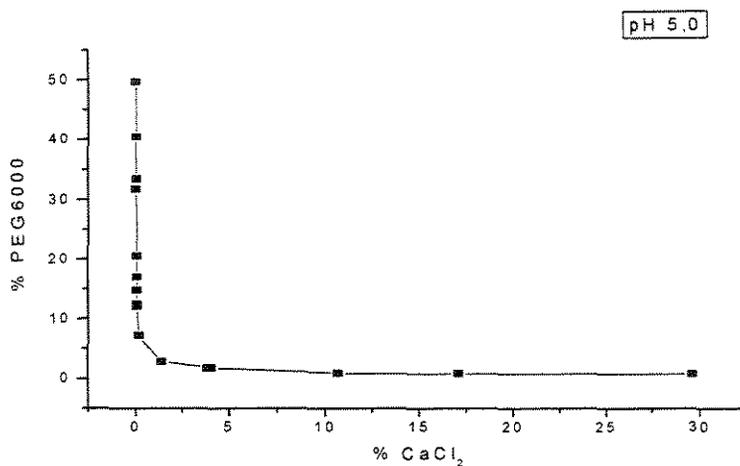


Figura 9.02 - Curva de equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 6000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 5,0.

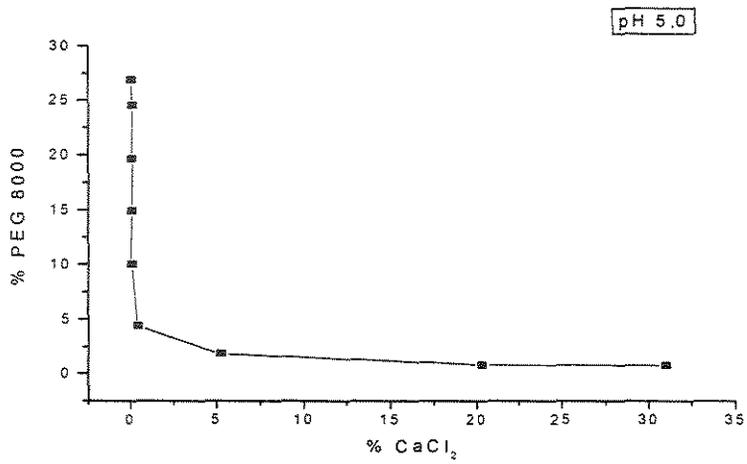


Figura 9.03 - Curva de equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 8000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 5,0.

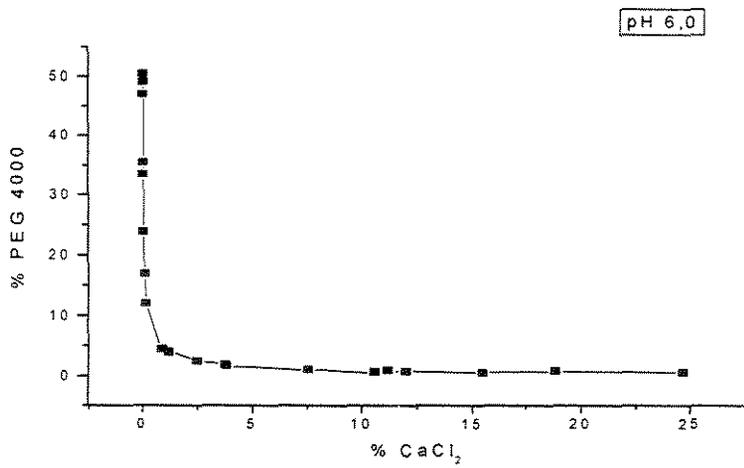


Figura 9.04 - Curva de equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 6,0.

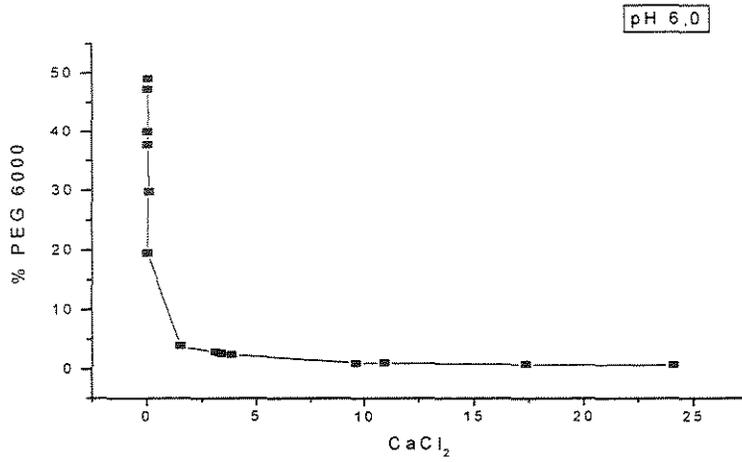


Figura 9.05 – Curva equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 6000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 6,0.

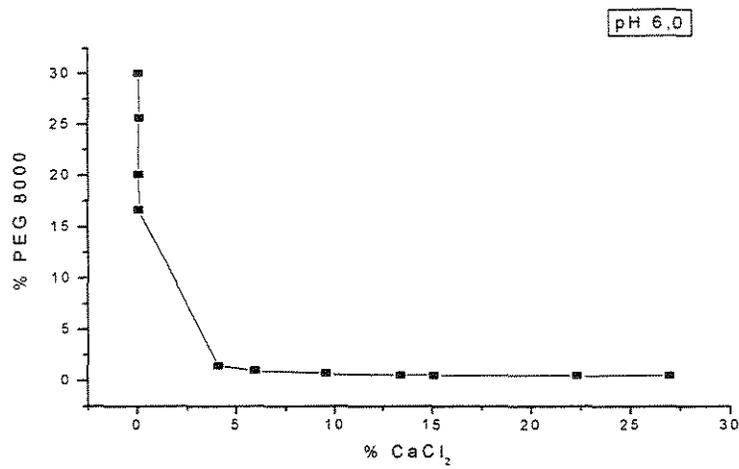


Figura 9.06 – Curva equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 8000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 6,0.

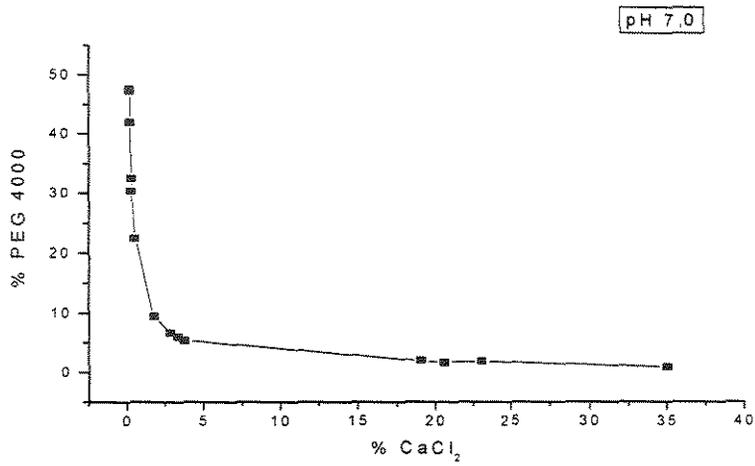


Figura 9.07 – Curva equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 4000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 7,0.

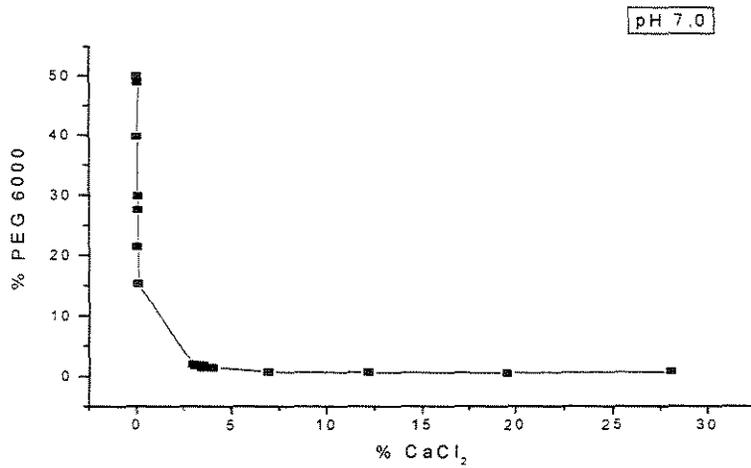


Figura 9.08 – Curva equilíbrio líquido- líquido do sistema bifásico aquoso PEG 6000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 7,0.

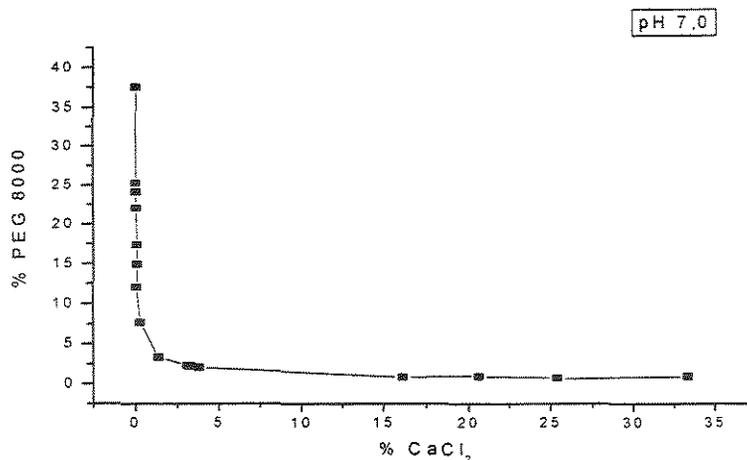


Figura 9.09 – Curva equilíbrio líquido - líquido do sistema bifásico aquoso PEG 8000/ CaCl₂ (Binodal) a pH 7,0.

9.2 – Tie lines dos sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂

As Figuras 9.10 ate 9.18 representam as “tie lines” obtidas neste trabalho para o SBA PEG /CaCl₂.

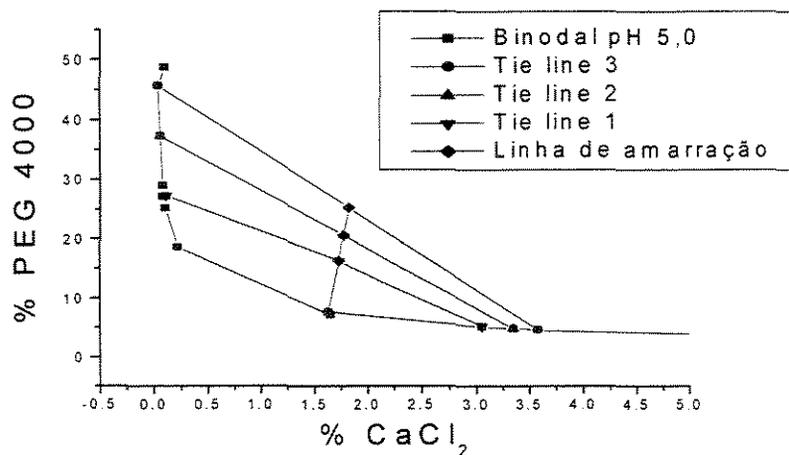


Figura 9.10 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 5,0.

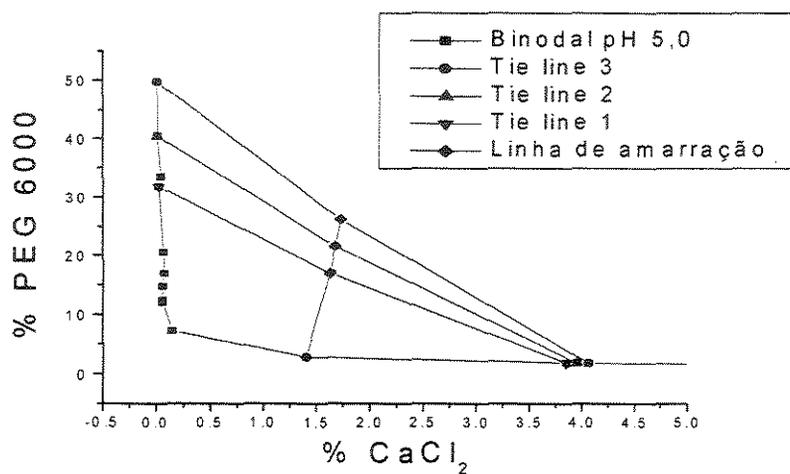


Figura 9.11 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 5,0.

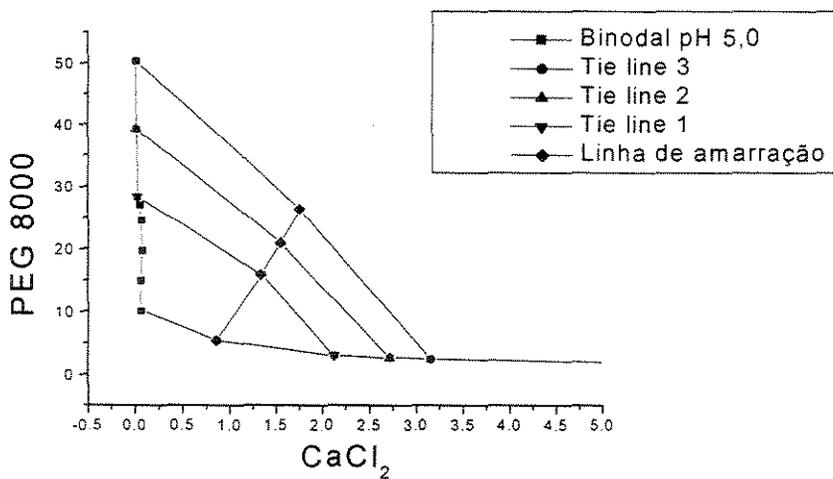


Figura 9.12 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 5,0.

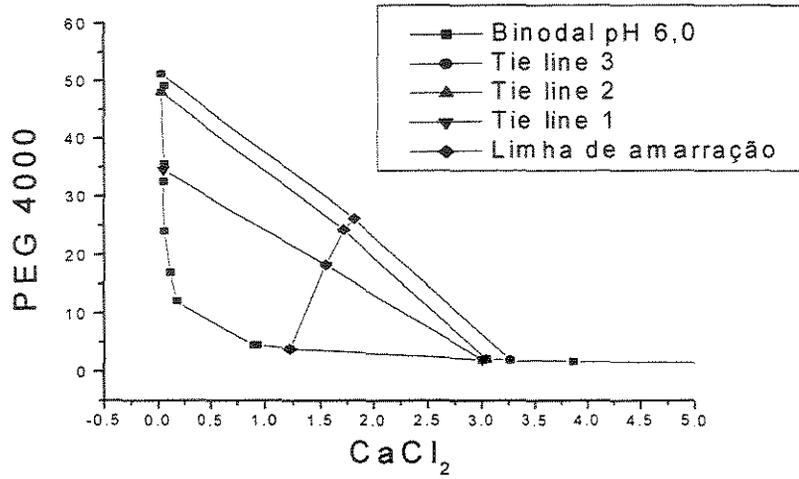


Figura 9.13 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 6,0.

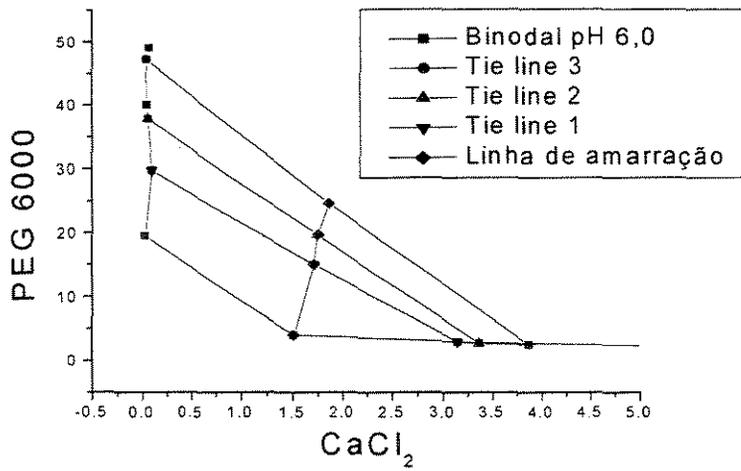


Figura 9.14 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 6,0.

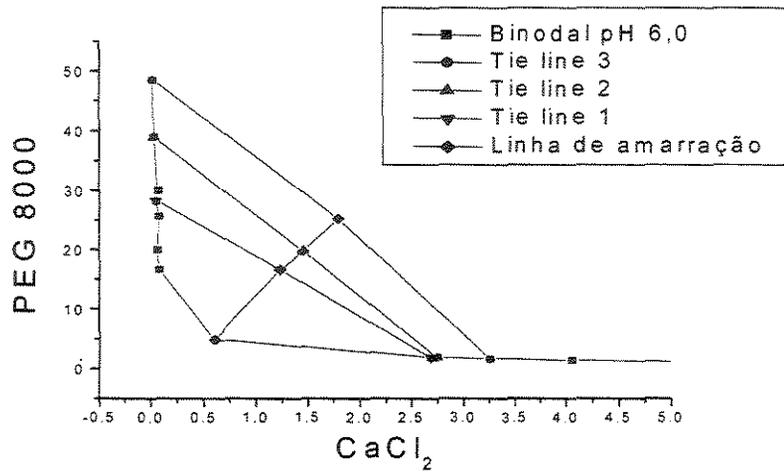


Figura 9.15 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 6,0.

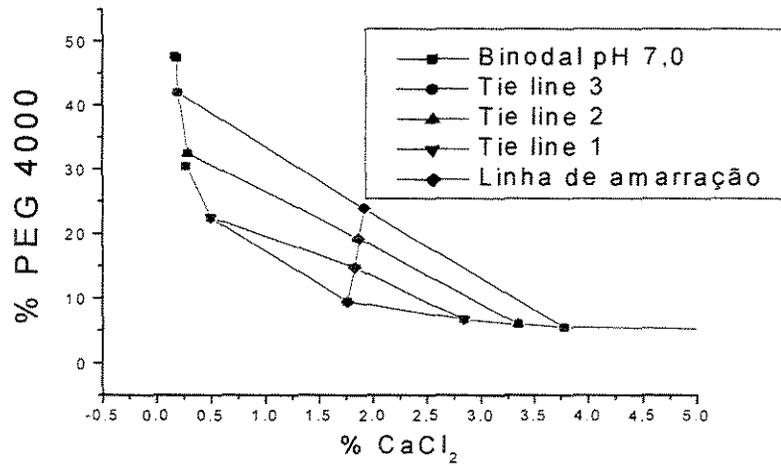


Figura 9.16 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 7,0.

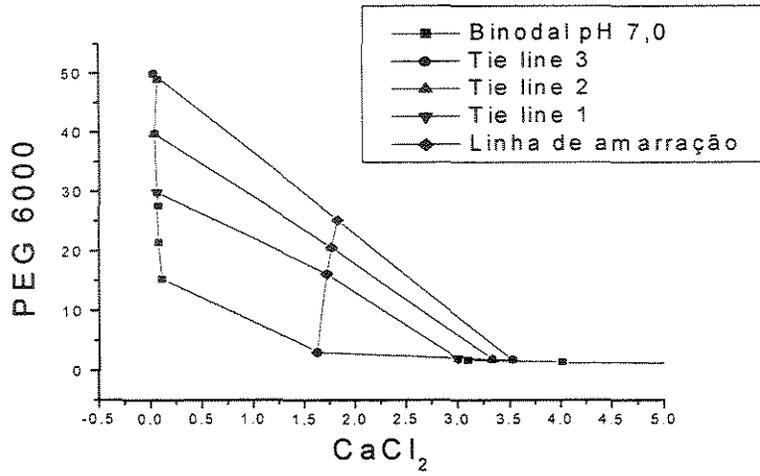


Figura 9.17 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 7,0.

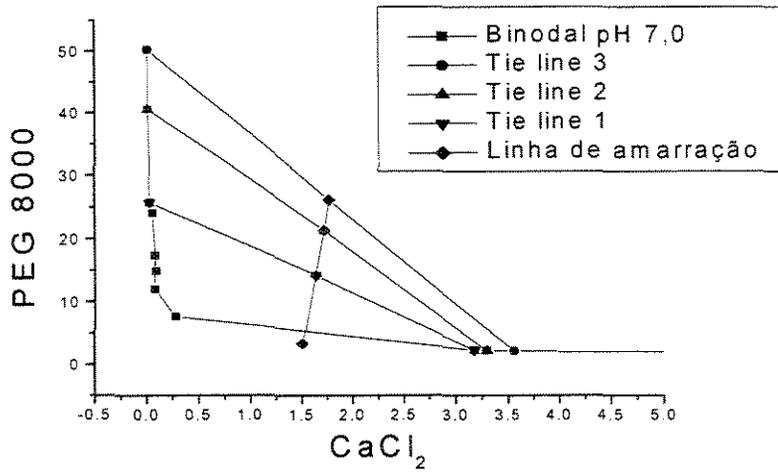


Figura 9.18 – Comprimentos das linhas de amarração (“tie lines”) a pH 7,0.



9.3 – Otimização da partição de proteínas em SBA PEG/ CaCl₂

9.3.1 Análise de variância dos modelos que não se ajustaram

A regressão pelo método dos mínimos quadrados dos dados obtidos experimentalmente do coeficiente de partição (K) seguindo os modelos utilizados para prever a influência dos fatores pH , composição das “tie lines” (TL) e massa molar dos polímeros, gerou a equação 9.01, 9.02 e 9.03 que representam os modelos de comportamento linear como K e $\ln K$, obtido pelo método do ponto central. Suas análises de variância seguem nas tabelas 9.01, 9.02 e 9.03, que demonstram a falta de ajuste dos dados aos modelos, através da análise dos testes F, embora alguns deles apresentaram correlações múltiplas e porcentagens de variâncias próximas de seus máximos.

$$K = 3,314 + 0,494 pH + 0,636 TL - 0,551 MM_{PEG} \quad (9.01)$$

(±0,015) (±0,018) (±0,018) (±0,018)

Tabela 9.01 – Análise da variância do modelo linear para a otimização da partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂, tendo **K** como resposta.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	F _{tab}
Regressão	5,188	3	1,729		
Resíduos	2,803	7	0,400	4,319	4,38
Falta de Ajuste	2,798	5	0,560		
Erro Puro	0,005	2	0,003	220,880	19,30
Total	7,991	10			
% de variância explicável				64,923	
% máxima variância explicável				99,937	
Coeficiente de Determinação (R ²)				0,6492	

$$\begin{aligned}
 \ln K = & 1,166 + 0,149 pH + 0,196 TL - 0,169 MM_{PEG} \dots \\
 & (\pm 0,005) \quad (0,005) \quad (0,005) \quad (0,005) \\
 \dots & - 0,014 pH.TL + 0,011 pH.MM_{PEG} + 0,024 TL.MM_{PEG} \\
 & (0,005) \quad (0,005) \quad (0,005)
 \end{aligned}
 \tag{9.02}$$

Tabela 9.02 – Análise da variância do modelo 9.02 para a otimização da partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂, tendo *lnK* como resposta.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{caic}	F _{tab}
Regressão	0,721	6	0,120		
Resíduos	0,018	5	0,004	53,120	4,95
Falta de Ajuste	0,011	2	0,006		
Erro Puro	0,000	2	0,000	23,223	19,00
Total	0,731	10			
% de variância explicável				98,54	
% máxima variância explicável				99,94	
Coeficiente de Determinação (R ²)				0,9854	

$$\begin{aligned}
 K = & 3,282 + 0,539 \text{ pH} + 0,681 \text{ TL} - 0,5063 \text{ MM}_{\text{PEG}} \dots \\
 & (0,015) \quad (0,018) \quad (0,015) \quad (0,015) \\
 & \dots + 0,009 \text{ pH.TL} - 0,099 \text{ pH.MM}_{\text{PEG}} - 0,076 \text{ TL.MM}_{\text{PEG}} \\
 & (0,015) \quad (0,015) \quad (0,015)
 \end{aligned}
 \tag{9.03}$$

Tabela 4.03 – Análise da variância do modelo na forma de um plano gerado pela equação 9.03 para a otimização da partição de proteínas em sistemas bifásicos aquosos PEG/ CaCl₂, tendo *lnK* como resposta.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	F _{tab}
Regressão	0,821	6	0,134		
Resíduos	0,426	5	0,085	16,057	4,95
Falta de Ajuste	0,421	2	0,211		
Erro Puro	0,005	2	0,002	83,125	19,00
Total	0,799	10			
% de variância explicável				102,8	
% máxima variância explicável				99,94	
Coeficiente de Determinação (R ²)				1,028	

9.4 - Curvas de extração contínua das enzimas α e β - amilases

As Figuras 9.25 ate 9.35 apresentam às curvas de extração contínua em SBA PEG 4000/ CaCl₂, a pH 5,0; em coluna de palhetas rotativas com área livre de 18%, a cada ensaio.

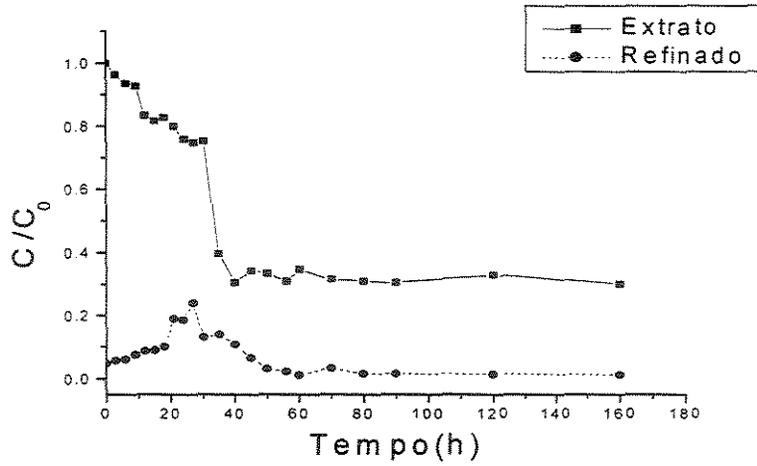


Figura 9.25 – Ensaio 01 – Rotações = 75 rpm e razão entre vazões = 1/1.

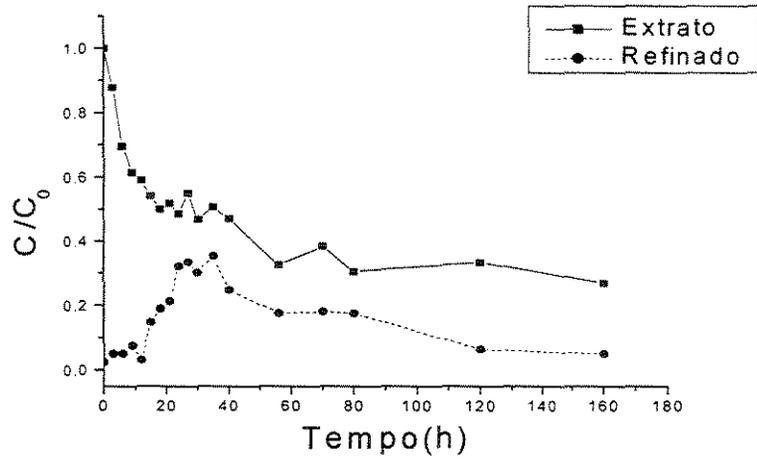


Figura 9.26 – Ensaio 02 – Rotações = 125 rpm e razão entre vazões = 1/1.

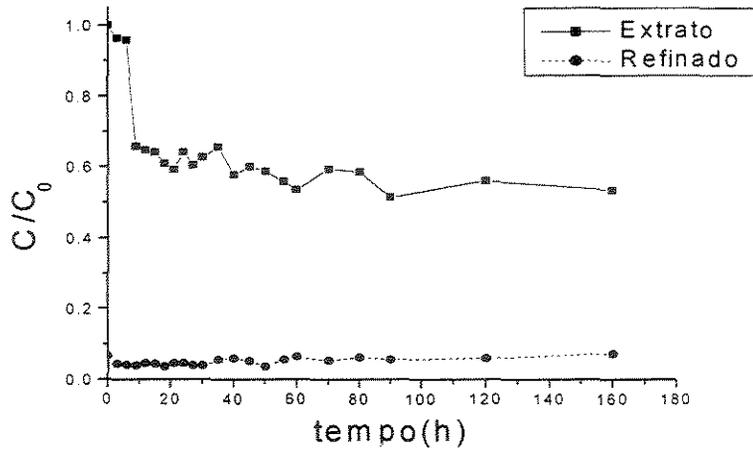


Figura 9.27 – Ensaio 03 – Rotações = 75 rpm e razão entre vazões = 1/2.

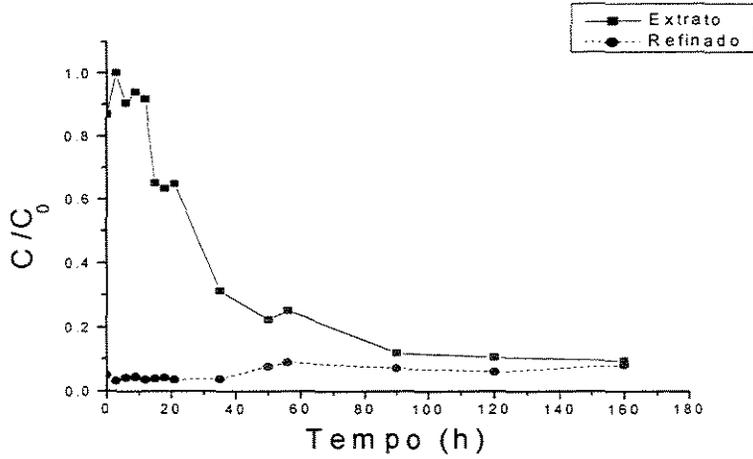


Figura 9.28 – Ensaio 04 – Rotações = 125 rpm e razão entre vazões = 1/2.

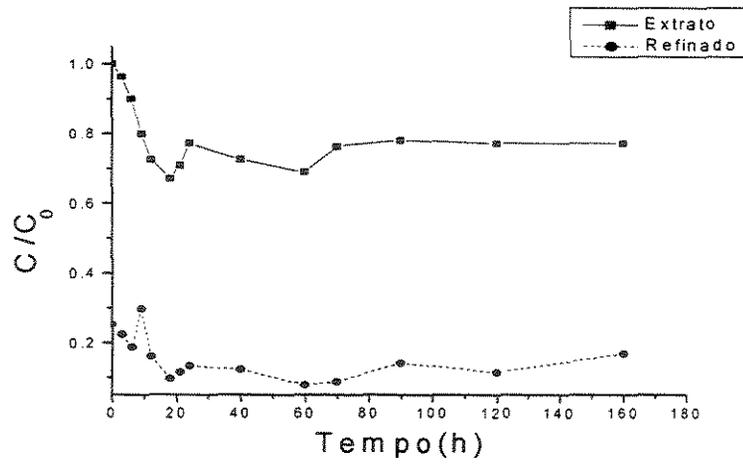


Figura 9.29 – Ensaio 05 – Rotações = 100 rpm e razão entre vazões = 3/4.

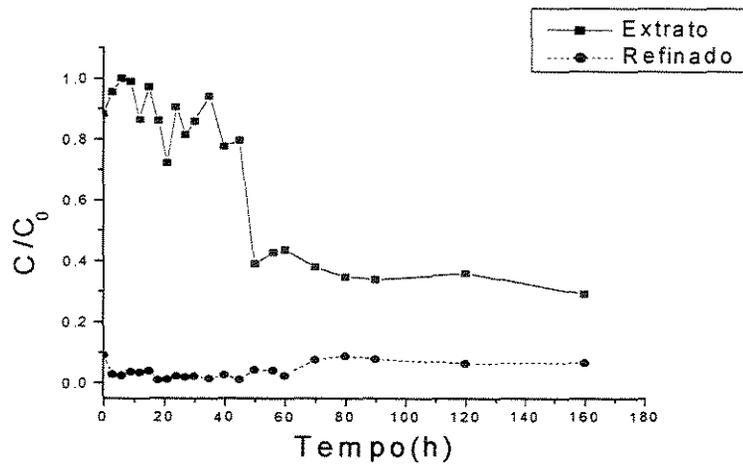


Figura 9.30 – Ensaio 06 – Rotações = 100 rpm e razão entre vazões = 3/4.

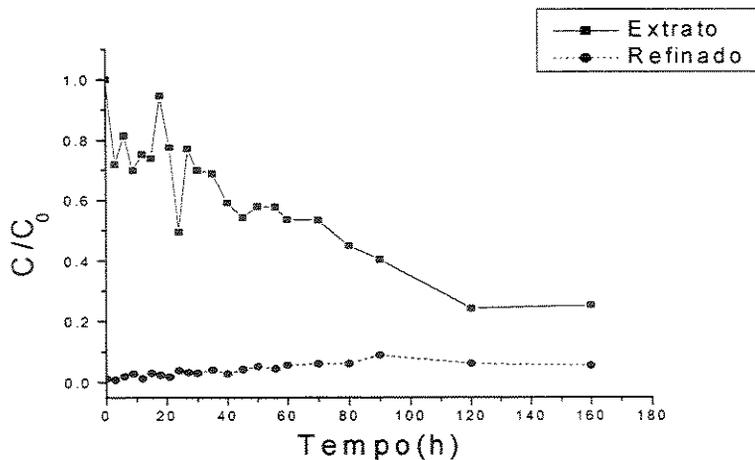


Figura 9.31 – Ensaio 07 – Rotações = 100 rpm e razão entre vazões = 3/4.

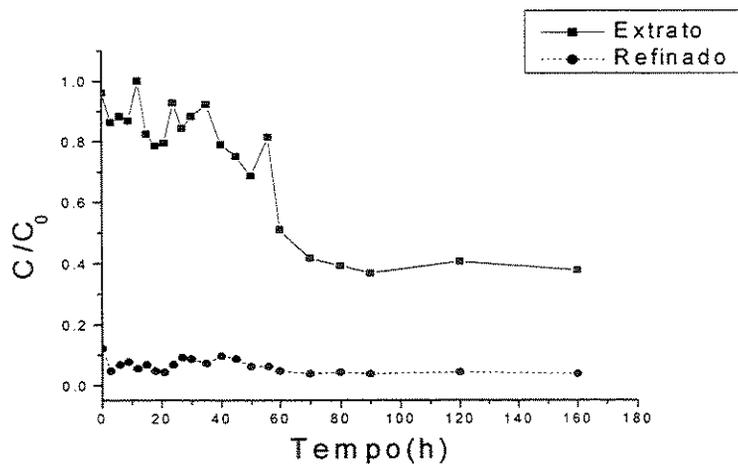


Figura 9.32 – Ensaio 08 – Rotações = 64,6 rpm e razão entre vazões = 3/4.

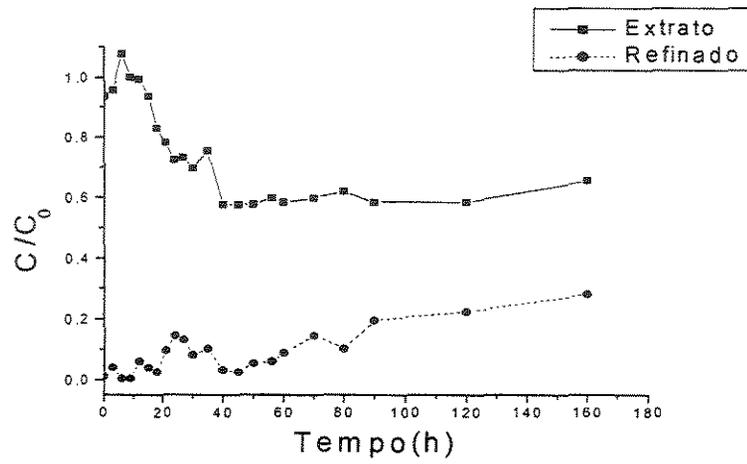


Figura 9.33 – Ensaio 09 – Rotações = 100 rpm e razão entre vazões = 2/5.

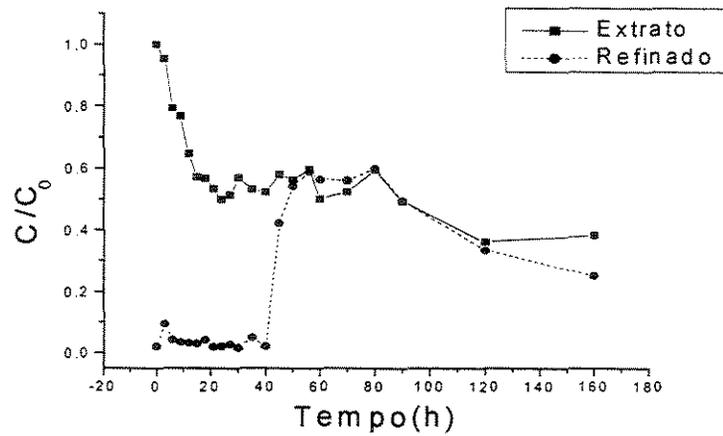


Figura 9.34 – Ensaio 10 – Rotações = 135 rpm e razão entre vazões = 3/4.

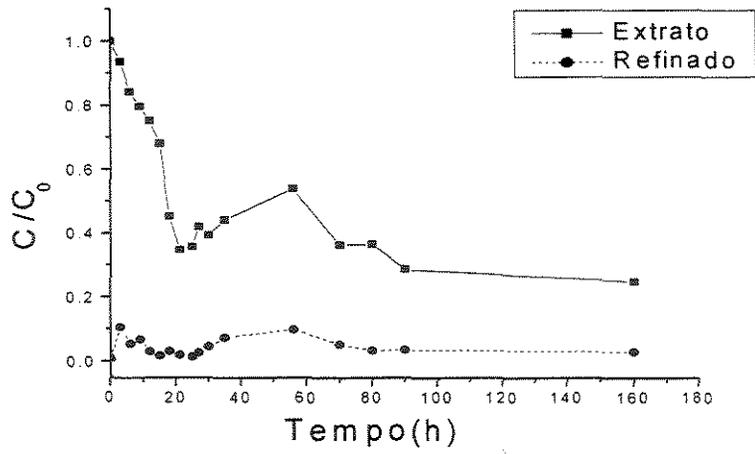


Figura 9.35 – Ensaio 11 – Rotações = 100 rpm e razão entre vazões = 11/10.