

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DO PROCESSO DE
SECAGEM DE α -AMILASE POR MICROONDAS A VÁCUO

Autor: Sérgio Santos de Jesus
(Químico – UFRJ)

Orientador: Dr. Rubens Maciel Filho

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas – São Paulo

Abril - 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA UNICAMP
J499d
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49624
PROC 16.83 10 2
C _____ D.X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 14/06/02
Nº CPD _____

CMO0169430-6

BIB ID 245753

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

J499d Jesus, Sérgio Santos de
Desenvolvimento e análise do processo de secagem
de α -amilase por microondas a vácuo / Sérgio Santos de
Jesus.--Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Rubens Maciel Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Secagem. 2. Aquecimento por microondas. 3.
Atomização. 4. Secagem por congelção. I. Maciel
Filho, Rubens. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

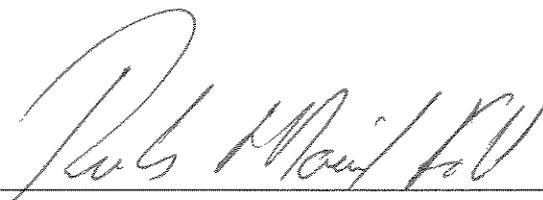
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

200826502

Dissertação de Mestrado defendida por **Sérgio Santos de Jesus** e aprovada em **22 de abril de 2002** pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Orientador)



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch (FEQ/UNICAMP)

Titular



Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura (FZEA/USP)

Titular

Dr. Carlos Eduardo Calmanovici (Rhodia-Brasil)

Suplente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e a minha querida mãe Eunice Santos pela força e ajuda durante esses anos de mestrado, sentirei muita saudade, pois a distância agora impedirá de eu dar um “pulinho” aí no Rio;

A meus irmãos, minhas tias, sobrinhos, enfim todos os meus familiares e vizinhos lá do Rio de Janeiro;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (proc. 99/12379-5) e Auxílio a Pesquisa (proc. 01/00571-0);

Ao professor Rubens Maciel Filho pela orientação, além da amizade e incentivo;

A todos meus amigos do LOPCA/LPDS em especial ao Eduardo Coselli (urso), Eduardo Inglês, Igor, Rodrigo, Basilino (papito), Cristiano, Batistella, Magno, Jeferson, Elenise, Rubão, Mário, Edinara e Marcela;

A grande amiga do LPDS Paula Sbaite pela amizade neste final de tese e pela sua grande ajuda, não só por algumas microscopias, mais pelas dicas, valeu!!

Aos meus amigos do LEB em especial aos alunos que estudaram ou ainda estão estudando, entre eles Kathia Assis, Ana Paula, Everaldo, Eliana, Luciana Igrashi, Gicela, Joseane, Junko e Carlo;

Aos meus alunos de Iniciação Científica: Andressa Cappi, Giovana Stein, Fábio Nicolich e Ricardo Romero, pela preciosa ajuda;

A todos os professores da FEQ, em especial para a professora Telma Franco pela ajuda inicial, a profa. Maria Regina Wolf Maciel pela amizade e incentivo, ao prof. Theo pela ajuda na discussão dos resultados e alguns aspectos teóricos relacionados à fenômenos de transporte, ao prof. Gustavo Pain e Martin Aznar;

Aos meus amigos do Rio de Janeiro que sempre me acompanharam, Ana Lúcia, Luís Fábio, Ana Paula e Aline;

Ao meus amigos de moradia Renata, Flávio e Heleno! que conviveram comigo ao longo destes anos que sempre me ajudaram, além da minha grande amiga a “doida” da Débora (COPPE/UFRJ);

A todos da moradia estudantil, em especial ao pessoal da A5, F6 e J8A;

A minha grande amiga Ana Paula Coelho que desde a graduação me ajudou, valeu!!!

Ao todos os funcionários da FEQ em especial a Silvana, Eunir, Lú (SIFEQ), Ana Rita, Alexandre, Célia, Carlos, Noca, Robertos, Valdemir e Marta, além é claro do pessoal da faxina;

A minha amiga que me ajudou muito no início do mestrado: Neuza Amaral;

A turma 1999/1 e 1999/2 entre eles Evelyn, Adriana, Francisleo, Kiki, Rosalinda, Eliana e Chimentão, além da Juliana Venturini;

Aos meus amigos do Laboratórios Geral e de Processos (FEA) pelo uso de seus equipamentos e ao Celso (DTF) e Sandro (DESQ) pelas análises térmicas;

Ao laboratório de Proteínas e de Microscopia Eletrônica do IB pelo uso de seus equipamentos e dicas, em especial ao Zeca, Dulce e Antônia;

Ao CENAPAD em especial ao Hermes e Luís Henrique pelo uso do software e pelo ajuda na modelagem molecular;

A minha eterna orientadora, a professora Eliana Flávia da EQ-UFRJ pela amizade e sugestões;

Enfim todos os meus amigos não só de Campinas e Rio de Janeiro mais de todo o mundo que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

ÍNDICE

SIMBOLOGIA	xvii
TABELA DE AMINOÁCIDOS	xix
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
II.1 Alfa-amilases	5
II.1.1 Aplicações industriais	9
II.2 Secagem	10
II.2.1 Fundamentos teóricos	11
II.2.2 Modelos matemáticos para secagem	15
II.2.2.1 Modelos de Isoterma de Sorção	15
II.2.2.1.1 Modelo de BET	20
II.2.2.1.2 Modelo de GAB	23
II.2.2.1.3 Modelo de HENDERSON	25
II.2.2.2 Modelos cinéticos de secagem	28
II.2.2.2.1 Modelos empíricos	29
II.2.2.2.1.1 Modelo exponencial	30
	xi

V.1.3 Secagem por microondas a vácuo	58
V.2 Parte Experimental	62
V.2.1 Secador de microondas a vácuo	62
V.2.2 Metodologia	63
V.2.2.1 Planejamento experimental	63
V.2.2.2 Metodologia da secagem	64
V.3 Resultados e Discussão	64
V.3.1 Estudo cinético da secagem e modelagem matemática	64
V.3.2 Estudo da influência da pressão e da potência na atividade enzimática e na atividade de água do material desidratado	68
V.3.2.1 Influência sobre a atividade enzimática	68
V.3.2.1.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade enzimática	69
V.3.2.2 Influência sobre a atividade de água	73
V.3.2.2.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade de água	73
V.3.3 Análise morfológica	77
V.3.4 Isoterma de sorção	79
V.4 Conclusões	81
VI. SECAGEM DE α-AMILASE POR LIOFILIZAÇÃO	83
VI.1 Introdução	83
VI.2 Parte Experimental	89
VI.2.1 Liofilizador	89
VI.2.2 Metodologia	90
VI.2.2.1 Congelamento	90
VI.2.2.2 Metodologia da secagem	90
VI.3 Resultados e Discussão	91

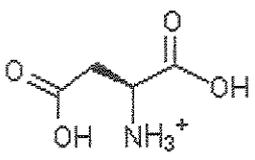
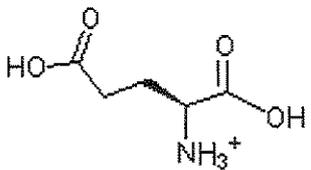
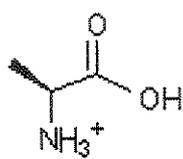
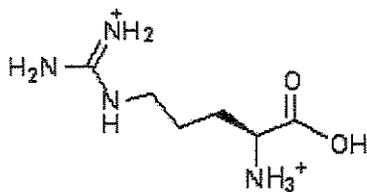
VI.3.1 Taxas de congelamento	91
VI.3.2 Influencia da atividade de enzimática e da atividade de água no tempo de liofilização	91
VI.3.3 Análise morfológica	94
VI.3.4 Isotermas de sorção	95
VI.3.5 Cinética da secagem em função do tipo de congelamento e modelagem matemática	100
VI.4 Conclusões	103
VII. SECAGEM DE α-AMILASE POR ATOMIZAÇÃO	105
VII.1 Introdução	105
VII.2 Parte experimental	109
VII.2.1 <i>Spray dryer</i>	109
VII.2.2 Metodologia	110
VII.2.2.1 Planejamento experimental	110
VII.2.2.2 Metodologia da secagem	111
VII.3 Resultado e Discussão	112
VII.3.1 Estudo da influência da vazão de alimentação e da temperatura na atividade enzimática e na atividade de água do material desidratado	112
VII.3.1.1 Influência sobre a atividade enzimática	112
VII.3.1.1.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade enzimática	113
VII.3.1.2 Influência sobre a atividade de água	117
VII.3.1.2.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade de água	117
VII.3.2 Análise morfológica	120

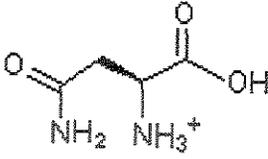
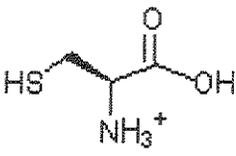
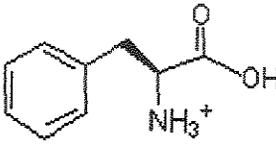
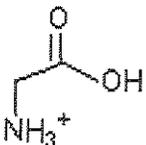
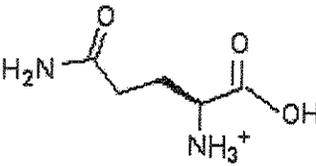
VII.3.3 Isoterma de sorção	123
VII.4 Conclusões	125
VIII. CONCLUSÕES & SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	127
VIII.1 Conclusões finais	127
VIII.2 Sugestões para trabalhos futuros	128
IX. BIBLIOGRAFIA	129
APÊNDICE	145
A. MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR	145
A.1 Introdução	145
A.1.1 O programa ECEPP	147
A.1.1.1 Modelo matemático	149
A.1.1.1.1 Cálculo do desvio médio quadrado	152
A.2 Metodologia	153
A.2.1 Material	153
A.2.2 Método Computacional	154
A.3 Resultados e Discussão	156
A.4 Conclusões	160
A.5 Bibliografia	161

SIMBOLOGIA

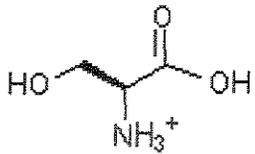
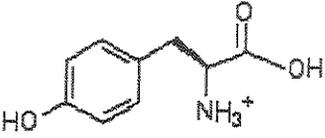
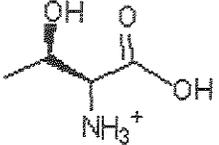
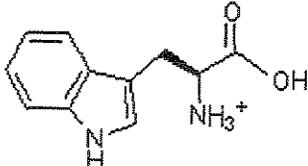
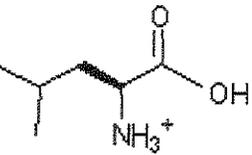
aa	Aminoácido
AE	Atividade enzimática
a_w	Atividade de água
m.s.	massa seca
Da/kDa	Dalton/kilodalton
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
m/v	massa/volume
PM	Peso molecular
PI	Ponto Isoelétrico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

TABELA DE AMINOÁCIDOS

Símbolo	Nome e classificação	Estrutura em pH = 1	PM	pK
Asp	<i>(L) Ácido Aspártico</i> a) Dicarboxílico b) Polar carregado		133,11	2,97
Glu	<i>(L) Ácido Glutâmico</i> a) Dicarboxílico b) Polar carregado		147,13	3,22
Ala	<i>(L) Alanina (*)</i> a) Alifático b) Não polar		85,10	6,02
Arg	<i>(L) Arginina</i> a) Básico b) Polar carregado		174,20	10,76

Asn	(L) Asparagina a) amida de aa. dicarboxílico b) Polar não carregado		148,11	5,41
Cys	(L) Cisteína a) Sulfurado b) Polar não carregado		121,16.	5,02
Phe	(L) Fenilalanina a) Aromático b) Não polar		165,19	5,91
Gly	(L) Glicina (**) a) Alifático b) Polar não carregado		75,07	5,97
Gln	(L) Glutamina a) Amida de aa. dicarboxílico b) Polar não carregado		162,13	5,65

His	<p>(L) Histidina</p> <p>a) Básico</p> <p>b) Polar carregado</p>		155,16	7,58
Ile	<p>(L) Isoleucina</p> <p>a) Alifático</p> <p>b) Não polar</p>		131,18	6,02
Leu	<p>(L) Leucina</p> <p>a) Alifático</p> <p>b) Não polar</p>		131,18	5,98
Lys	<p>(L) Lisina</p> <p>a) Básico</p> <p>b) Polar carregado</p>		146,14	9,74
Met	<p>(L) Metionina</p> <p>a) Sulfurado</p> <p>b) Não polar</p>		149,21	5,75
Pro	<p>(L) Prolina</p> <p>a) Iminoácido</p> <p>b) Não polar</p>		115,13	6,1 0,0

Ser	(L) Serina		105,10	5,6
	a) Hidroxilado b) Polar não carregado			8,0
Tyr	(L) Tirosina		181,19	5,6
	a) Aromático b) Polar não carregado			5,0
Thr	(L) Treonina		119,12	6,5
	a) Hidroxilado b) Polar não carregado			3,0
Trp	(L) Triptofano		204,33	5,8
	a) Aromático b) Não polar			8,0
Val	(L) Valina		117,15	5,9
	a) Alifático b) Não polar			7,0

(*) Na fronteira entre não polares e polares não carregados.

(**) Classificado como polar, embora seu grupo R=H seja muito pequeno para influenciar a polaridade.

Fonte: VASCONCELLOS *et al.*, 1996.

RESUMO

A secagem de enzimas constitui um verdadeiro desafio para a indústria de alimentos, farmacêutica, entre outras. A escolha de um método apropriado de secagem vem despertando o interesse em pesquisas com o intuito de além de preservar sua atividade enzimática original seja economicamente viável. Atualmente a secagem de enzimas é realizada em secadores tipo *spray dryer* e liofilizador. Na secagem por *spray dryer* o longo tempo de exposição do material a altas temperaturas pode ocasionar a perda parcial ou total de sua atividade e no caso da liofilização o excessivo consumo de energia, confere ao produto após seco um apreciável aumento no valor comercial. A secagem por microondas a vácuo apresenta como um método viável, pois a sua principal vantagem está sobretudo na exposição do material a um curto tempo a altas temperaturas, o que pode resultar na total preservação de sua atividade, além da redução de custos no consumo de energia, ocasionando um produto de melhor qualidade e economicamente mais barato. Dentre as enzimas utilizadas comercialmente merecem destaque as α -amilases. Elas atuam nos mais variados setores industriais, sendo utilizadas na fabricação de cerveja, bebidas destiladas, desengomagem de tecidos, bem como em suplementos digestivos. Nesta dissertação foi investigada a eficiência do processo de secagem da enzima α -amilase por *spray dryer* e liofilização frente a secagem por microondas sob condições de vácuo. O material desidratado pelas três técnicas foi analisado quanto à sua atividade enzimática, atividade de água e morfologia. Foi verificado através do planejamento experimental em estrela que a secagem por microondas sob vácuo é influenciada principalmente pela potência; para a secagem em *spray dryer* a ação da temperatura e da vazão de alimentação foram considerados como fatores importantes na atividade enzimática e na atividade de água; no estudo de secagem por liofilização foi verificado que o método de congelamento não influencia muito na qualidade do produto após a liofilização, sendo que o congelamento com nitrogênio líquido foi o mais apropriado. Através dos resultados obtidos foi verificado que a secagem por microondas a vácuo a pressão e potência moderada (0,63 bar e 550 W) foi similar ao processo de liofilização, porém cabe ressaltar que o produto obtido para ambas as técnicas apresentou pouca solubilidade em água, na liofilização o tempo de processo e o alto consumo de energia pode ser considerado como um fator limitante na escolha desta técnica. Neste caso a secagem por microondas sob condições de vácuo pode ser considerado como um método promissor.

Palavras-chave: Secagem, calor de microondas, atomização, secagem por congelamento.

ABSTRACT

The enzyme drying is a real challenge for the food and pharmaceutical industries among others. The choice of an appropriate drying method has caused an increasing interest in researches with intents of preserving its original enzymatic activity and making the process economically possible. At present enzymes drying is done in spray and freeze drying. In the spray drying the long period of material exposure to high temperatures can cause a partial or total activity loss and with the freeze drying the excessive energy use gives the product after dry a considerable gain in its commercial value. The drying through vacuum microwaves shows to be a feasible method once its main advantage is about all in the material's brief exposure to high temperatures, what helps in its total activity preservation, besides the reduction in energy consumption costs, resulting in a cheaper and better quality product. Among the enzymes used commercially the alpha-amylases is one of great importance. They act in the most different industrial sections, being used in the beer and distilled drinks manufacturing, in desize cotton fabrics as well as for digestive auxiliary. In this work the efficiency of the spray drying and freeze drying techniques for drying the Alpha-amylases enzyme compared to the vacuum microwaves drying technique was considered. The material dehydrated by all the three techniques was analyzed concerning its enzymatic and water activity as well as its morphology. Through the experimental design in star it was seen that drying through vacuum microwaves is influenced mainly by the power. In spray drying the temperature and feeding flow were considered the main influencing factors in the enzymatic and water activity. Finally, through freeze drying it was seen that the freezing method doesn't influence much the product's quality after the freeze drying and the freezing with nitrogen was considered the most appropriate. The results showed that the drying with vacuum microwaves at moderate pressure and power (0,63 bar and 550 W) was similar to the dry freezing technique, on the other hand the product obtained by both techniques had low solubility in water. In the freeze drying the time necessary and the high energy consumption can be considered as a limitation factor when choosing a technique. In this case the drying through vacuum microwaves is considered a better choice.

Key word: Drying, heating for microwave, atomization, freeze drying.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O crescente emprego de materiais biológicos nos mais variados setores industriais vem despertando o interesse em pesquisas de forma a obtê-los a baixo custo de modo a tornar seu emprego competitivo com os produtos químicos normalmente utilizados.

Há vários anos o emprego de enzimas em indústrias de alimentos, farmacêutica, têxteis, papel e celulose vem sendo utilizadas por serem economicamente viáveis.

Dentre as inúmeras aplicações das enzimas pode-se citar seu emprego na fabricação de bebidas alcoólicas, em algumas formulações como: detergentes, biosensores, pomadas, em “kits” para imunoenaios e diagnósticos médicos e atualmente na degradação de compostos aromáticos e no controle do meio ambiente.

A produção de enzimas brutas envolve tecnologias sofisticadas como: seleção de microorganismos da natureza, seleção do meio de cultura, escolha das condições ambientais que induzem a formação da enzima, clarificação, concentração e estabilização do caldo fermentado com a finalidade de se obter a preparação enzimática (FALCH, 1991).

Dentre as enzimas utilizadas comercialmente merecem destaque as α -amilases. Elas atuam nos mais variados setores industriais, sendo utilizadas na fabricação de cerveja, bebidas destiladas, na panificação, desengomagem de tecidos, bem como em suplementos

bebidas destiladas, na panificação, desengomagem de tecidos, bem como em suplementos digestivos (VASCONCELLOS *et al.*, 1996).

Por outro lado, a conservação de enzimas envolve tecnologias sofisticadas e caras na qual a mais utilizada é a secagem por atomização e por liofilização (ADAMIEC *et al.*, 1995). Além disso, estes métodos apresentam vários inconvenientes como na atomização o longo tempo de exposição do material a altas temperaturas pode ocasionar a perda parcial ou total de sua atividade, na secagem por liofilização há um grande consumo de energia, o que confere ao produto após seco um apreciável aumento no seu valor comercial (GUNASEKARAN, 1999).

Hoje em dia é de grande interesse a obtenção de um método que além de preservar a atividade enzimática original seja economicamente mais viável.

Neste contexto torna-se interessante o desenvolvimento de novas tecnologias em secagem de enzimas.

A utilização da energia de microondas para secagem de materiais biológicos tem sido um meio alternativo para otimizar os métodos convencionais de secagem. Quando energia de microondas é aplicada em tais materiais, o calor é gerado dentro do produto. Portanto, a temperatura do material aumenta ligeiramente, conseqüentemente, a taxa de remoção de água é mais rápida do que com a secagem convencional. Assim, a maior vantagem da secagem por microondas é economia de tempo, além do espaço requerido para sua instalação ser bem reduzido quando comparado com os outros tipos de secadores. Em alguns casos, o aquecimento por microondas pode ser muito eficiente para remover água ligada a um material. Com o aquecimento convencional isto só ocorre depois que o material inteiro está numa alta temperatura para que haja a quebra das estruturas da água absorvida. Com aquecimento por microondas, entretanto, as microondas podem excitar as moléculas unidas de água diretamente.

A secagem por microondas de produtos biológicos tem sido estudada por vários anos como um meio potencial para reduzir o tempo total de secagem. Entretanto, sempre há uma perda de qualidade, geralmente quando os produtos são secos completamente numa temperatura não uniforme e quando possuem uma diferente distribuição de umidade em sua estrutura. Algumas estratégias utilizadas para melhorar a qualidade do produto seco

pulsada ou intermitente e secagem por microondas a vácuo.

A secagem por microondas sob condições de vácuo apresenta-se como um método potencial, visto que sua principal vantagem está sobretudo na exposição do material a um curto tempo a altas temperaturas, o que pode resultar na total preservação da atividade enzimática original, além da redução de custos no consumo de energia, ocasionando um produto de melhor qualidade e economicamente mais barato.

Hoje em dia é também de fundamental relevância adquirir conhecimentos teóricos e computacionais para melhor compreensão dos fenômenos relacionados a estrutura e conformação molecular. Com o avanço de novas tecnologias foi possível realizar estudos de dinâmica conformacional para a predição de certos fenômenos que até então eram apenas realizados experimentalmente.

A modelagem dinâmica de proteínas e enzimas têm ocupado grande destaque em pesquisas nos mais diversos campos de aplicação como um modo de se obter informações úteis para a síntese de fármacos, de drogas e também para a compreensão de alguns fenômenos vitais como a biossíntese de enzimas e estudos mais específicos de sua ação no corpo humano (KLEPEIS *et al.*, 1998).

Nesta dissertação foi investigada a eficiência do processo de secagem da enzima α -amilase por atomização e liofilização frente a secagem por microondas sob condições de vácuo, através de uma montagem desenvolvida neste trabalho. Foram verificados os efeitos das condições operacionais na qualidade do produto e qual dos métodos estudados foi mais eficiente.

Procurou-se desta forma estudar os aspectos básicos de cada processo de secagem aplicados a enzima α -amilase para que futuramente em outros trabalhos possa ser aperfeiçoado cada técnica e a realização de estudos com outros tipos de enzimas. Foi dado ênfase principalmente nas análises de atividade enzimática e atividade de água, pois a conservação desses materiais dependem principalmente destes dois fatores.

Face a essa gama de informações procurou-se também através dos dados obtidos experimentalmente e dados obtidos através de modelagem molecular explicar alguns aspectos conformacionais da enzima α -amilase e quais os fatores mais relevantes que implicam na sua perda de atividade durante o processo de desidratação.

aspectos conformacionais da enzima α -amilase e quais os fatores mais relevantes que implicam na sua perda de atividade durante o processo de desidratação.

Para uma melhor compreensão, esta dissertação está dividida em capítulos de forma independente uns dos outros. No capítulo VIII são feitas conclusões gerais de todos os processos utilizados de forma que são realizadas análises comparativas referentes aos resultados obtidos por cada técnica de secagem. Espera-se que desta forma cada processo utilizado neste trabalho seja compreendido de forma independente e que logo após o leitor possa verificar as vantagens e desvantagens de cada método.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 Alfa-amilases

Alfa-amilases (α -1,4 glucan 4-glucano-hidrolase, EC 3.2.1.1) são endoenzimas que atuam dentro da cadeia amilácea de forma aleatória, rompendo ligações α -1,4. Algumas delas podem também atacar as ligações α -1,6, mas com uma eficiência muito baixa (DIXON, 1964; LÉVÊQUE *et al.*, 2000).

As α -amilases podem ser produzidas por bactérias, fungos, animais e vegetais. No ser humano elas estão presentes principalmente no intestino (amilopsina, secretada pelo pâncreas) e na saliva (ptialina) favorecendo a produção de cárie dental (VASCONCELLOS *et al.*, 1996; DOUGLAS *et al.*, 2000; VAN STADEN & MULAUDZI, 2000). Sendo consideradas enzimas termorresistentes, atuando na faixa de temperatura de 30 a 95°C (NOVO NORDISK, 2000; EGAS, 1997), o que possibilita a sua utilização em processos realizados a temperaturas elevadas.

As α -amilases bacterianas produzidas por microorganismos do gênero *Bacillus* têm peso molecular variando de 22.500 a 80.000 Da (Tabela II.1). Uma linhagem microbiana pode produzir mais de uma α -amilase com pesos moleculares diferentes, mas com a mesma ação catalítica (HAYASHI, *et al.*, 1988).

VALLE *et al.* (1959) verificaram que todas as α -amilases bacterianas possuem cálcio ligado a molécula e a força de ligação entre o íon e a proteína depende da origem da enzima, e que algumas α -amilases de *Bacillus subtilis* além do cálcio também contêm zinco ligado à molécula.

EGAS (1997) verificou também que a utilização de íons cálcio no meio aumenta a estabilidade da enzima a altas temperaturas. Em experimentos realizados com α -amilase de *Thermus filiformis* Ork A2 foi verificado que a adição de cálcio aumentou o tempo de atividade da enzima quando esta foi exposta a temperaturas superiores a 80°C. No mesmo estudo foi verificado também que na presença de um agente quelante como EDTA houve a inibição da atividade aminolítica, sendo esta inibição revertida na presença de cálcio ou estrôncio.

As α -amilases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 do interior das moléculas de polímeros de glicose como amido, glicogênio e seus produtos de degradação (Figura II.1). Sua ação é rápida, formando dextrinas de baixa massa molecular, variando de 500 a 3.000 (VASCONCELLOS *et al.*, 1996). Após a formação destas dextrinas, sua ação é bem mais lenta, formando vagarosamente açúcares como glicose, maltose, maltotriose, maltotetrose e oligossacarídeos maiores (HAYASHI *et al.*, 1988).

ALLEN & SPRADLIN (1974) verificaram que a ação das α -amilases é mais rápida em cadeias longas com progressiva perda de atividade durante a sacarificação.

Segundo LÉVÊQUE *et al.* (2000) as α -amilases de *Bacillus* podem ser divididas em sacarificantes e liquificantes segundo seu modo de ação. As α -amilases sacarificantes produzem açúcar redutor duas vezes mais que as liquificantes. Além disso nenhum produto de hidrólise das α -amilases sacarificantes é atacada pelas α -amilases liquificantes (Figura II.1). De acordo com OKADA *et al.* (1969) as α -amilases liquificantes não atuam sobre oligossacarídeos com um número de unidades de glicose inferiores a seis.

As α -amilases cobrem uma ampla faixa de temperatura, dependendo do microorganismo produtor, a temperatura ótima das α -amilases de *Bacillus* variam numa escala de 30 a 90°C (NOVO NORDISK, 2000).

Estudos comparativos feitos por OGASAHARA *et al.* (1970) verificaram que as resistências térmicas das α -amilases produzidas por *Bacillus subtilis* e por *Bacillus stearothermophilus* são bem distintas. Esses pesquisadores observaram que α -amilases de

B. subtilis perdem 60% de atividade inicial após serem submetidas por 30 minutos à 60°C, enquanto a outra se mantém totalmente ativa quando submetida ao mesmo tratamento.

Estudos semelhantes feito por MEDDA & CHANDRA (1980) verificaram que α -amilases de *Bacillus licheniformis* tinha 80% de sua atividade enzimática destruída quando submetida por uma hora a 90°C e pH 7,0, enquanto que para *Bacillus coagulans* mantinha apenas 15% da sua atividade inicial quando submetida por uma hora à 80°C e pH 7,0.

O pH ótimo de atividade das α -amilases também varia. Para bactérias pode-se ter α -amilases alcalinas e ácidas. As linhagens do gênero *Bacillus* podem ter atividades enzimáticas máxima na faixa de pH variando de 3,5 a 10,6 (HAYASHI *et al.*, 1988).

Tabela II.1 Algumas propriedades de α -amilases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*.

Microorganismo	Peso molecular (Da)	pH ótimo	Temperatura ótima de atuação (°C)
<i>Bacillus stearothermophilus</i> 503-4	-	4,6-5,1	55-70
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	48.000	5,0-6,0	65-75
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	53.000	5,4-6,0	-
<i>Bacillus cheniformis</i> CUMC 305	28.000	9,5	91
<i>Bacillus licheniformis</i>	22.500	5,0-8,0	76
<i>Bacillus coagulans</i> CUMC 512	-	7,5-8,5	85
<i>Bacillus subtilis</i>	-	5,8	63
<i>Bacillus subtilis</i> 168	53.000	5,5	-
<i>Bacillus subtilis</i> W2	-	6,3	65
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	5,9	65
<i>Bacillus acidocaldarius</i> agnano 101	68.000	3,5	75
<i>Bacillus</i> sp – H 167	HI-1	73.000	10,5
	HI-2	59.000	10,5
	H-II	80.000	10,5
<i>Bacillus</i> no. A-40-2	70.000	10-10,5	55

Fonte: SALVA, 1990.

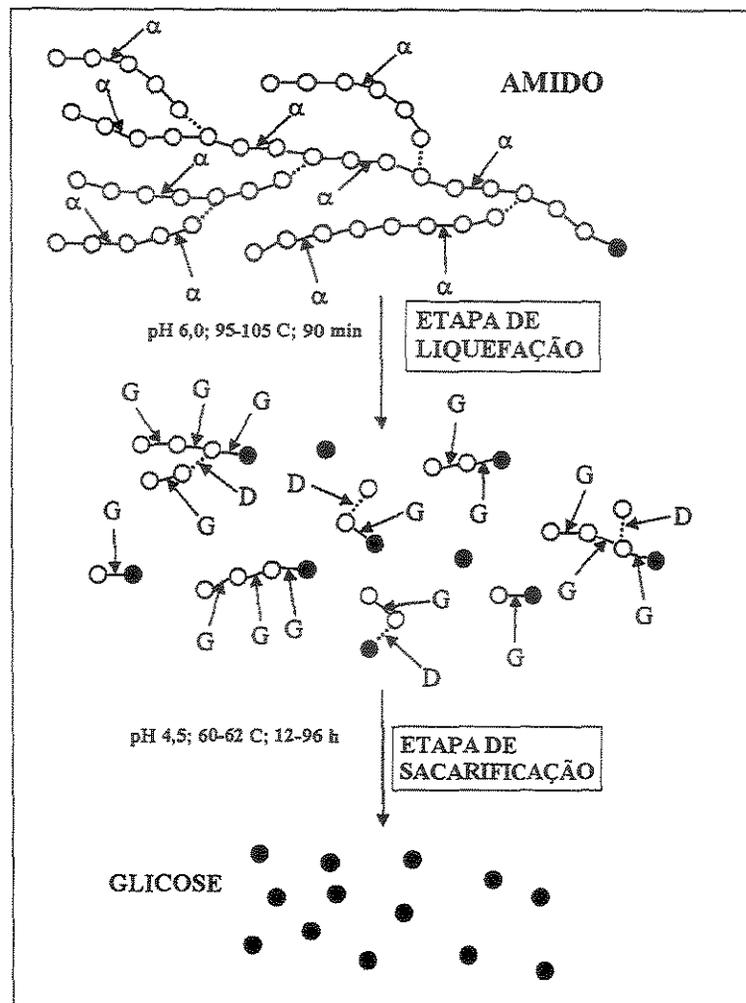


Figura II.1 Hidrólise enzimática de amido em glicose e teste padrão da ação de enzimas aminolíticas. Onde: ___: ligações glicosídicas α -1,4;: ligações glicosídicas α -1,6; α : α -amilase; G: glicosidase; D: enzima desramificadora (pullulanase); O : resíduo de α -D-glicose não redutor; ● : resíduo de α -D-glicose redutor

Fonte: LÉVÊQUE *et al.* 2000.

II.1.1 Aplicações industriais

Devido à sua ampla faixa de temperatura e pH e por ser uma enzima termorresistente as α -amilases podem ser utilizadas em diversos setores industriais.

Dependendo da sua origem teremos diferentes tipos de aplicação.

As α -amilases de plantas têm grande importância fisiológica na conversão do amido em açúcares redutores durante a germinação da semente, quando o estoque de amido deve ser rapidamente mobilizado para fazer face ao processo de crescimento. Neste momento, a α -amilase, que se encontra sob forma inativa, é rapidamente convertida a sua forma ativa dando início ao processo de germinação. Devido à este fato, as α -amilases são utilizadas no processo de “maltação” sendo “malte” o nome dado aos cereais em germinação que são largamente usados na fabricação de cervejas, bebidas destiladas e na panificação (VASCONCELLOS *et al.*, 1996; VAN STADEN & MULAUDZI, 2000).

As α -amilases de origem microbiana também têm grande aplicação comercial. As α -amilases de bolores, como de *Aspergillus niger*, chamadas de Takadiastases têm considerável relevância no processo de sacarificação do arroz, afim de se obter o sakê, e são também utilizadas como suplemento digestivo (VASCONCELLOS *et al.*, 1996). As α -amilases bacterianas, especialmente as do gênero *Bacillus*, são de interesse industrial como agentes solubilizantes de amido e auxilia na desengomagem de tecidos, sendo capazes de atuar em altas temperaturas (70-75⁰C) (NOVO NORDISK, 2000; VASCONCELLOS *et al.*, 1996). As α -amilases também são utilizadas em testes de análises clínicas para verificação de distúrbio pancreático (pancreatite aguda), na fabricação de alimentos infantis e de sucos de frutas, e em xaropes de glicose e de chocolate (SALVA, 1990; VISSERS *et al.*, 1999).

II.2 Secagem

A secagem é um dos mais efetivos métodos de se preservar produtos biológicos. Dependendo do tipo de produto, pode-se classificá-los como (MANCINI *et al.*, 1997): secos com teor de umidade variando de 15% a 25%, desidratados com teor de umidade máxima de 5% e cristalizados um produto com teor de umidade inferior a 25%, em que a água é substituída por açúcares sob formas variadas.

Um baixo conteúdo de umidade faz com que os produtos sejam menos suscetíveis ao ataque microbiano e a reações de deterioração indesejáveis. Os mais importantes conceitos da secagem de produtos biológicos são (GUNASEKARAN, 1999):

i. Velocidade da operação - como produtos com altos conteúdos de umidade são deterioráveis, é essencial que se abaixe o conteúdo de umidade rapidamente antes que qualquer dano ocorra.

ii. Eficiência da energia - a secagem de materiais é uma operação altamente energética. Isto é devido ao alto conteúdo de umidade da maioria destes materiais e do grande calor latente de vaporização da água. A água fisicamente e quimicamente presa na estrutura requer mais energia para sua remoção comparada à água líquida na mesma temperatura e condições de pressão.

iii. Custo de operação - devido a altos gastos com desidratação destes materiais, o custo total de secagem por unidade de massa de material seco é a maior preocupação. Este é um dos fatores para inovações em tecnologia da secagem. Assim, a secagem deve ser eficiente energeticamente e também economicamente aceitável.

iv. Qualidade dos materiais desidratados – assegurar a qualidade dos produtos desidratados é o requerimento mais importante para qualquer operação de secagem. A qualidade desses produtos deve ir além da proteção a microorganismos.

II.2.1 Fundamentos teóricos

A secagem é uma operação muito utilizada, desempenhando importante papel em quase todos os setores da indústria de consumo, sendo muitas vezes, a etapa final de uma série de operações unitárias. Entre outros, a secagem visa a conservação do material (alimentos, vacinas, antibióticos, por exemplo), o armazenamento por um longo período de tempo, a redução dos custos de transporte, etc.

A secagem é definida, usualmente, como um processo de remoção de água (ou de um solvente) de um material por evaporação, pela ação de um agente externo, normalmente o calor. Quando o calor necessário para esta evaporação é fornecido ao material ocorrem transferências simultâneas de massa e calor tanto internamente, quanto entre sua superfície externa e o ambiente que o envolve. No processo de secagem, faz-se necessário o fornecimento de certa quantidade de energia ao material, energia esta que dependerá do próprio produto e dos teores iniciais e finais de umidade (MENON & MUJUNDAR, 1995).

Basicamente, no processo de secagem, a mistura ar/vapor d'água fornece uma certa quantidade de calor ao material úmido, ao mesmo tempo em que absorve a umidade presente no material. Esquemáticamente, o processo está representado pela Figura II.2.

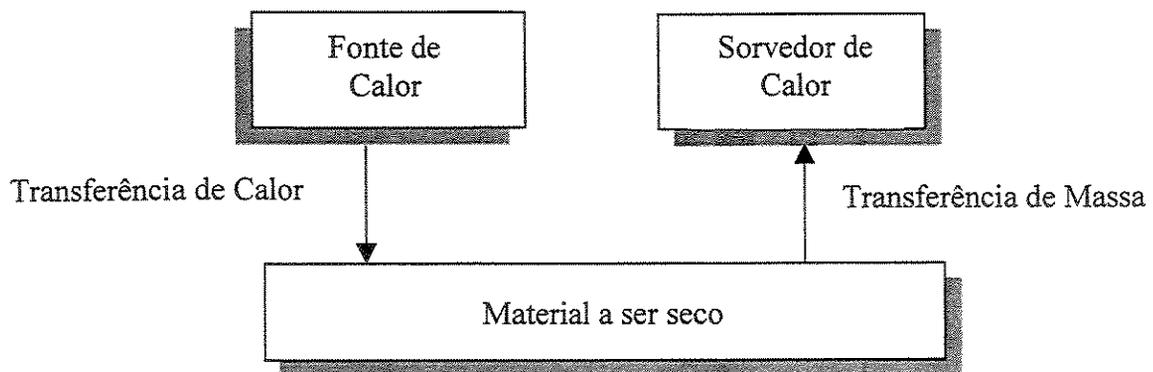


Figura II.2 Esquema simplificado do processo de secagem

Fonte: CORNEJO, 1987

O conhecimento dos mecanismos de transferência de água do interior do material para sua superfície é de fundamental importância para a descrição do fenômeno da secagem. Segundo a literatura, esta migração poderia se dar por meio dos seguintes

mecanismos, PERRY & CHILTON (1980), TOBINAGA & PINTO (1992), WAANANEN *et al.* (1993), PINTO (1996):

- (i) transporte de vapor d'água:
- difusão devido ao gradiente de concentração;
 - difusão de Knudsen;
 - difusão térmica;
 - escoamento viscoso;
 - vaporização / condensação.
- (ii) transporte de água líquida:
- difusão devido ao gradiente de concentração;
 - escoamento capilar;
 - difusão superficial;
 - movimento por gravidade.

A constatação de qual, ou quais mecanismos, estariam atuando na secagem de um determinado material é bastante complexa. Em geral, um mecanismo tem predominância em um dado instante do processo, mas não é raro que diferentes mecanismos atuem em fases distintas ou até mesmo em uma mesma fase do ciclo completo de secagem. Assim, é normal a simplificação pela escolha de quais mecanismos poderiam ser desprezados ou incorporados por outros, normalmente mais simples e "tratáveis" matematicamente, em função da estrutura do sólido e das condições operacionais do processo de secagem. Dentro deste contexto, uma breve análise dos mecanismos propostos acima traz os seguintes aspectos:

- a difusão de Knudsen ocorre quando o diâmetro dos poros do material é comparável ao livre percurso médio das moléculas de vapor, sendo importante somente em condições de alto vácuo ;

- a difusão térmica ("efeito de Soret") – transferência de massa causada por um gradiente de temperatura - só deve ser considerada no caso da ocorrência de gradientes de temperatura significativos no interior do material em alguma fase da secagem;

- o escoamento viscoso, devido a gradientes de pressão total, deve ser analisado na secagem à vácuo em temperaturas moderadas ou nas secagens convectiva e por contato a altas temperaturas, no caso de haver uma rápida geração de vapor durante a secagem;

- vaporizações e condensações sucessivas (a água se vaporiza em uma região mais quente do sólido, migra como vapor e se condensa quando encontra uma região de água ainda líquida a uma temperatura menor, transferindo calor latente e realimentando o processo) podem ocorrer em temperaturas próximas ou acima da ebulição da água ou com materiais sujeitos ao aquecimento em uma superfície e a secagem (evaporação) na outra;

- a difusão superficial de água líquida normalmente não é levada em conta na maioria das teorias de secagem porque só é significativa para teores de umidade muito baixos ;

- finalmente, o movimento por gravidade é frequentemente desconsiderado em função dos poros da grande maioria dos sólidos terem dimensões muito pequenas.

Pela análise acima, não é sem motivo que muitos autores consideram a difusão (líquido e/ou vapor) e o escoamento capilar como os principais mecanismos de migração da água durante o processo de secagem.

Em qualquer processo de secagem, os componentes mais importantes são o agente de secagem e o material a ser seco. Consequentemente, as propriedades de cada material devem ser estudadas e bem conhecidas.

A intensidade da secagem, a qual reflete a troca do conteúdo de umidade com o tempo, é influenciada significativamente pelos parâmetros do processo de secagem, tais como temperatura, umidade relativa do ar, velocidade do ar e também pelo diâmetro da partícula (STRUMILLO & KUDRA, 1986).

O comportamento de um processo de secagem é representado pela curva de secagem (conteúdo de umidade X , em tempo função do tempo t) e a curva de cinética de secagem (taxa de secagem R , em função do conteúdo de umidade X), como ilustrado pelas Figuras II.3 e II.4, respectivamente.

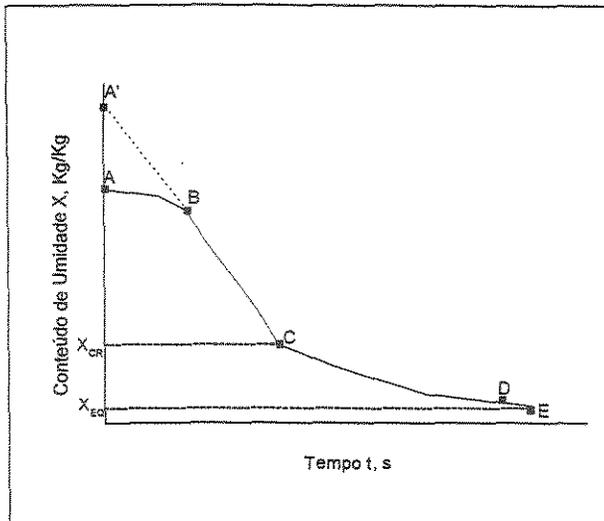


Figura II.3 Curva de secagem

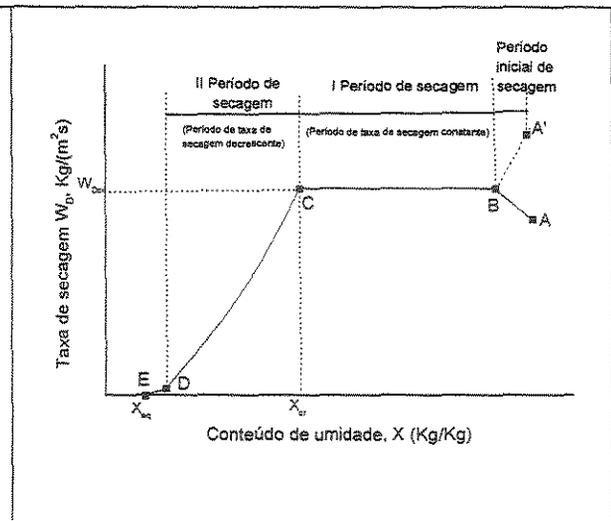


Figura II.4 Curva da taxa de secagem

Fonte: STRUMILLO & KUDRA, 1986.

O período inicial de secagem é ilustrado pela curva A-B. Neste período de entrada em regime o produto é geralmente mais frio que o ar de secagem e a pressão parcial do vapor d'água à superfície do produto é menor, portanto a transferência de massa e por consequência a velocidade de secagem são muito menores. Esse fenômeno persiste enquanto que a transferência de calor compensa exatamente a transferência de massa. Após um curto tempo a relação $X = f(t)$ toma um caráter linear, linha B-C, chamado de período de taxa de secagem constante. Durante este período a quantidade de água disponível no produto é muito grande e a água evapora como água livre: a pressão de vapor d'água à superfície é constante e igual à pressão de vapor da água pura à temperatura do produto, temperatura esta igual à de bulbo úmido do gás. A queda linear do conteúdo de umidade com o tempo vai até o ponto crítico C com umidade X_{cr} . Após este ponto a linha torna-se uma curva (C-D), que aproxima-se assintoticamente ao conteúdo de umidade de equilíbrio, X_e (ponto E), chamado período de taxa de secagem decrescente. No fim deste período, o produto está em equilíbrio com o ar e a velocidade de secagem é nula.

II.2.2 Modelos Matemáticos para Secagem

O desenvolvimento de modelos matemáticos para secagem tem obtido significativo progresso ultimamente (LEFEUVRE *et al.*, 1978; LEVEUVRE, 1981; OFOLI & KOMOLPRASERT, 1988, TUNER, 1994). Muitos modelos vão de complicadas equações acopladas de calor, massa e onda a modelos empíricos expressando transferência de massa através de parâmetros de natureza fenomenológica incorporando muitos parâmetros do processo, como potência e vácuo. VAN BRAKEL (1980) apontou algumas áreas problemáticas na modelagem de sistemas de secagem, como algumas mudanças características nos alimentos. Essas áreas têm que ser levados em consideração quando se está modelando a umidade contida em um material e os perfis de temperatura de um sistema de secagem.

II.2.2.1 Modelos de Isoterma de Sorção

A umidade que o produto alcança, quando deixado em contato com uma determinada condição atmosférica por um longo tempo, é definida como umidade de equilíbrio (GUSTAFSON & HALL, 1974).

A umidade de equilíbrio é particularmente importante na secagem porque ela representa o valor limite para uma dada condição de umidade relativa e temperatura (NOGUEIRA, 1991).

As isotermas de sorção são a representação gráfica da dependência da atividade de água em relação ao conteúdo de umidade de matérias alimentícias a temperaturas e pressões definidas, e são normalmente determinadas experimentalmente. Elas podem ser de adsorção ou de dessorção, conforme tenha sido feita a determinação da umidade do produto, seja ao longo de um processo de umidificação ou de secagem.

A ocorrência de diferenças entre as isotermas de adsorção e dessorção para um mesmo produto, em condições idênticas de determinação, é muito comum, e esse fenômeno é conhecido como histerese. Segundo LABUZA (1968) várias teorias foram propostas para explicar a histerese, mas todas elas são baseadas na água condensada nos capilares, o que significa que a histerese deveria ocorrer somente a valores de atividade de água maiores que 0,500-0,600.

A isoterma de sorção de um material pode ser descrita através de um gráfico da quantidade de água absorvida como função da umidade relativa ou atividade do vapor ao redor do material. Esta quantidade de água é aquela que é mantida depois que o equilíbrio foi alcançado a uma temperatura constante. A atividade da água ou umidade é definida pela Equação II.1:

$$\text{Atividade} = a_w = \frac{p}{p_0} = \frac{\%UR}{100} \quad (\text{II.1})$$

onde: p = pressão de vapor de água exercida pelo alimento

p_0 = pressão de vapor da água pura à temperatura T_0

T_0 = temperatura de equilíbrio do sistema

UR = Umidade relativa

Essa curva isoterma pode ser obtida em uma de duas direções. Uma isoterma de adsorção é feita colocando um material completamente seco em várias atmosferas de umidade relativa crescente e medindo o peso ganho devido à água, LABUZA (1968).

A isoterma de dessorção é feita colocando um material inicialmente úmido sob as mesmas umidades relativas, mas nesse caso medindo a perda de peso.

Em geral, esses métodos utilizam uma das seguintes técnicas:

A primeira é aquela onde o material é colocado em um dessecador a vácuo contendo soluções de sal saturadas que dão uma certa umidade relativa em equilíbrio. Soluções de sal para várias umidades necessárias para isotermas de alimentos têm sido compiladas por WINK & SEARS (1950), RICHARDSON & MALTHUS (1955) e ROCKLAND (1960).

Em uma segunda técnica, como a usada por TAYLOR (1961), a pressão de vapor da água em equilíbrio com um alimento em uma dada quantidade de umidade é medida por um sistema manométrico sensível. Um problema inerente em ambas as técnicas está na medição da quantidade de umidade do material. Esse problema tem sido revisto em detalhe por STITT (1958).

A Figura II.5 mostra uma isoterma típica para produtos alimentícios com o fenômeno de histerese. Esta isoterma pode ser dividida em várias regiões segundo o estado da água presente, sendo que:

- **região A:** corresponde à adsorção de até uma monocamada de água;

- **região B:** ocorre a adsorção de camadas adicionais sobre esta monocamada;
- **região C:** ocorre a condensação da água nos poros do alimento, seguido pela dissolução do material solúvel presente.

A medida da atividade de água é realizada colocando-se uma amostra do produto estudado em contato com ar de umidade relativa conhecida e constante, e aguardando-se o equilíbrio, situação em que o teor de umidade da amostra deixa de variar.

A umidade relativa do ar a ser colocado em equilíbrio com a amostra é obtida com o emprego de soluções saturadas de sais, ácidos ou glicerol. As soluções saturadas de sais, constituindo-se num sistema de três fases (vapor-líquido-sólido) exercem pressões parciais de vapor d'água constantes, independentes de um incremento de líquido no sistema, enquanto a solução permanece saturada, e portanto, são mais adequadas.

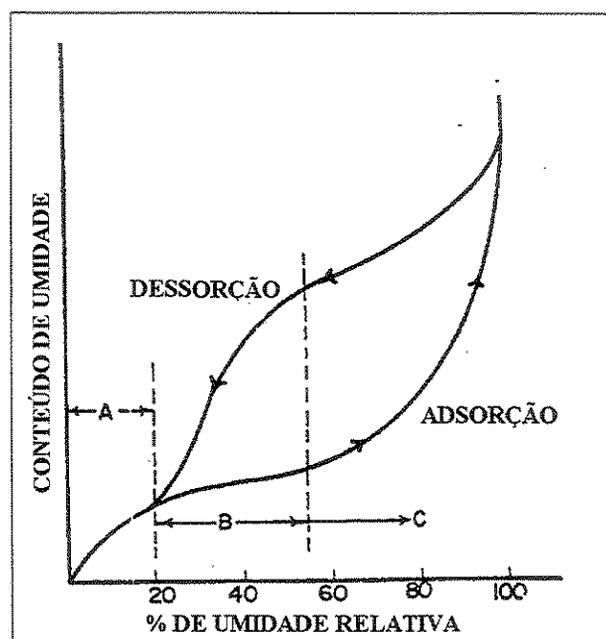


Figura II.5 - Isotermas de sorção apresentando o fenômeno de histerese.

Fonte: LABUZA (1968)

As isotermas de sorção de umidade em alimentos fornecem informações indispensáveis ao desenvolvimento de processos (e.g. concentração, desidratação, etc.), de equipamentos e de embalagem. Elas permitem a determinação do valor da monocamada de água ligada ao alimento. De acordo com TEIXEIRA NETO (1987), não se deve retirar água em quantidade inferior à monocamada, pois parece ser este o limite abaixo do qual se

iniciam uma série de reações químicas indesejáveis no alimento, além de representar a região à partir da qual haveria um dispêndio maior de energia para a eliminação da água residual do alimento.

Modelos matemáticos que descrevem isotermas de sorção são de fundamental importância, pois com um certo número de pontos experimentais é possível ajustar uma isoterma teórica e desta forma fazer a correspondência entre teor de umidade do alimento (X_{eq}) e atividade de água (a_w) podendo-se extrapolar valores de difícil determinação experimental.

Para a modelagem de sorção de água em materiais porosos capilares, estão disponíveis cerca de 77 diferentes equações com grau variado de validade (RAO & RIZVI, 1986).

A Tabela II.2 apresenta alguns modelos descritos na literatura.

Tabela II.2 Modelos para unidade de equilíbrio

<i>Modelo</i>	<i>Nome do modelo</i>
$X_{eq} = \frac{X_m C a_w}{1 + C a_w}$	LANGMUIR (1918)
$X_{eq} = \frac{X_m C a_w}{(1 - a_w)[1 + (C - 1)a_w]}$	BET (1938)
$X_{eq} = \left(\frac{-K}{\ln a_w} \right)^{\frac{1}{n}}$	HALSEY (1948)
$X_{eq} = \left(\frac{\ln(1 - a_w)}{-kT} \right)^{\frac{1}{c}}$	HENDERSON (1952)
$X_{eq} = -\frac{1}{b} \ln \left[\frac{(T + C) \ln a_w}{-K} \right]$	CHUNG & PFOST (1967)
$X_{eq} = \left(\frac{\ln(1 - a_w)}{-k(T + C)} \right)^{\frac{1}{n}}$	HENDERSON & THOMPSON (1968)
$X_{eq} = -\frac{1}{CT^n} \ln \left(\frac{\ln a_w}{-KT^m} \right)$	CHEN & CLAYTON (1971)
$X_{eq} = \frac{X_m C K a_w}{[(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)]}$	GAB (VAN DEN BERG, 1985)
$X_{eq} = K \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^n$	OSWIN (CHINNAN & BEAUCHAT, 1985)
$X_{eq} = K_1 a_w^{n_1} + K_2 a_w^{n_2}$ onde: $n_1 < 1$ e $n_2 > 1$	PELEG (1993)

Fonte: MARINOS-KOURIS & MAROULIS (1995).

Neste trabalho serão testados três modelos, sendo dois com fundamentos teóricos (BET e GAB) e um empírico (HENDERSON).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

II.2.2.1.1 Modelo de BET

A equação de BET (BRUNAUER *et al.*, 1938) é o modelo mais conhecido e usado, fornecendo um bom ajuste dos dados para uma grande variedade de alimentos situado na região de $0,050 < a_w < 0,450$.

As considerações básicas feitas são:

- a) Q_1 , o calor de sorção para primeira camada, é constante e igual ao ΔH_v (calor de vaporização) total mais um calor constante devido à interação do sítio ΔH_{BET} .
- b) Q_1 para todas as camadas acima da monocamada é igual a ΔH_{BET} , o calor de vaporização.
- c) Sorção ocorre somente em sítios específicos.

A aproximação cinética clássica para isotermas tem sido a LANGMUIR (1918). Esse modelo descreve a adsorção de uma monocamada de vapor na superfície do material. A isoterma pode ser derivada tanto de um balanço da taxa de vaporização-condensação ou de um tempo de residência de vibração molecular; ela pode também ser derivada termodinamicamente (LABUZA, 1968). Essas técnicas dão todas, essencialmente, o mesmo resultado, como mostrado na Equação II.2:

$$X_{eq} = X_m \left(\frac{ba_w}{K + ba_w} \right) \quad (II.2)$$

onde: X_{eq} = conteúdo de umidade de equilíbrio [kg de água/kg m.s]

X_m = conteúdo de umidade na monocamada [mesmas unidades de X]

k_0 = constante de Boltzman = $1,38 \times 10^{-16}$ erg/°C

$K = 1/p_0$

p_0 = pressão de vapor da água a T_0

T_0 = temperatura absoluta [K]

a_w = atividade de água

$$b = \frac{k_0}{RT_0} \exp\left(\frac{\Delta H_{BET}}{RT}\right) = cte$$

R = constante dos gases [cal/g mol K]

ΔH_{BET} = variação do calor de sorção [cal/g mol]

A Equação (II.2) pode ser rearranjada em uma forma mais adequada para a plotagem como mostrada na Equação (II.2a):

$$\frac{a_w}{X_{eq}} = \left[\frac{1}{bX_m} \right] + \frac{a_w}{X_m} \quad (\text{II.2a})$$

Um gráfico a_w/X_{eq} contra a_w , resulta em uma reta, cuja inclinação é igual a $1/X_m$. Assim esse valor da monocamada pode ser facilmente calculada. Infelizmente, para a muitos alimentos, o modelo de Langmuir não se encaixa nas seguintes razões:

- A) ΔH não é constante;
- B) Provavelmente ocorre a interação entre moléculas adsorvidas, ao passo que o modelo assume nenhuma alteração;
- C) A adsorção máxima possível é muito maior do que somente em uma monocamada;

O melhoramento do modelo de LANGMUIR foi feito por FREUNDLICH (1926). Ele considerou que a isoterma era composta de uma série de monocamadas na superfície composta por sítios heterogêneos. Nesse caso, a quantidade total adsorvida é igual a soma das isotermas de Langmuir, cada uma com seu próprio calor de adsorção ΔH_{BET} . Isso resulta na equação empírica (II.3):

$$X_{eq} = k a_w^{1/n} \quad (\text{II.3})$$

onde k e n são constantes.

A utilidade principal desses dois modelos está na predição da adsorção de gases que não sejam vapor de água em substratos sólidos como vidro, metais, ou carbono. Uma vez que uma isoterma é feita em uma única temperatura, esses modelos podem prever a quantidade adsorvida em outras temperaturas.

A equação geral para a isoterma BET pode ser derivada cineticamente, da mecânica estatística, e de uma consideração termodinâmica, como revisto por ADAMSON (1963):

$$\frac{X_{eq}}{X_m} = \frac{C a_w}{(1 - a_w)[1 + (C - 1)a_w]} \quad (\text{II.4})$$

onde: $C = k \exp(\Delta H_{BET} / RT)$

k = coeficiente de acomodação / fator de frequência ≈ 1

Geralmente, a equação é arranjada como abaixo:

$$\frac{a_w}{(1 - a_w)X_{eq}} = \frac{1}{X_m C} + \left[\frac{a_w(C - 1)}{X_m C} \right] \quad (\text{II.5})$$

Um gráfico de $a_w/(1 - a_w)X_{eq}$ contra a_w dá uma linha reta.

Como as considerações não são inteiramente verdadeiras para muitos materiais, a isoterma BET é normalmente usada somente entre atividades de 0,050 a 0,450, mas são fornecidos dados suficiente para que a cobertura da monocamada de água possa ser calculada.

A área superficial da água pode ser calculada considerando a área da molécula de água como sendo $10,6 \text{ (\AA)}^2$. A área superficial S_0 , em m^2/g de sólido, é determinada pela equação:

$$S_0 = X_m \cdot \frac{1}{M_{H_2O}} \cdot N_0 \cdot A_{H_2O} = 3.5 \times 10^3 X_m \quad (\text{II.6})$$

onde: X_m = conteúdo de umidade na monocamada em kg água / kg m.s.;

M_{H_2O} = peso molecular da água = 18 g/gmol;

N_0 = número de Avagadro 6×10^{23} moléculas / mol;

A_{H_2O} = área da molécula de água = $10.6 \times 10^{-20} \text{ m}^2$

Pode-se notar que a área superficial medida pela adsorção de água é usualmente muito diferente do que foi predito pelos valores BET do nitrogênio ou por métodos de permeabilidade. BERLIN *et al.* (1966) mostraram áreas superficiais de nitrogênio de alimentos numa faixa de 0.2 a 2.0 m^2/g , e FOX *et al.* (1963) mostraram resultados similares para leite em pó, usando uma técnica de permeabilidade de gás.

Diferentemente desses baixos valores de N_2 , muitos alimentos exibem uma área superficial de água de 100 a 250 m^2/g , isto é muitas ordens de magnitude maior. Isso pode ser pelo fato de que moléculas de água são capazes de plastificar os vários polímeros de cadeia longa que formam a matriz estrutural, expondo, assim, todos os sítios de adsorção interiores (STITT, 1958).

McLAREN & ROWEN (1952) mostraram que, para muitas proteínas, o número de moléculas de água adsorvida é muito próximo ao número de sítios polares na cadeia polimérica.

Daí fica claro que a área superficial do nitrogênio está intimamente relacionada com a distribuição de tamanho da partícula do produto, enquanto que a área superficial da água não.

Muitas modificações foram propostas para a isoterma BET. A principal propõe que a capilaridade define o limite superior para o número de camadas de água que podem ser formadas dentro desta capilaridade. A equação abaixo representa este relacionamento:

$$X_{eq} = \left[\frac{X_m C a_w}{1 - a_w} \right] \left[\frac{1 - (n+1)a_w^n + n a_w^{n+1}}{1 + (c-1)a_w - C a_w^{n+1}} \right] \quad (\text{II.7})$$

onde: n = número de camadas da substância adsorvida.

A equação BET é, provavelmente, mais útil na predição do valor de cobertura da monocamada e do calor de adsorção ΔH_{BET} , que são de maior interesse para processamento e estocagem.

II.2.2.1.2 Modelo de GAB

A equação de GAB (GUGGENHEIM-ANDERSON-de BOER) de três parâmetros é um refinamento das teorias de BET e LANGMUIR e tem sido sugerida por muitos pesquisadores, além de ser recomendada pelo projeto europeu COST 90 (SCHÄR & RÜEG, 1984; LOMAURO *et al.*, 1984; BIZOT, 1985).

Em uma detalhada pesquisa na literatura VAN DEN BERG & BRUIN, 1981 indicaram que a equação mais eficiente para a predição das isotermas de sorção era a equação GAB. É um modelo relativamente simples com um pequeno número de parâmetros com significado físico, e pode ser aplicado a uma grande faixa de atividade de água (WEISSER, 1985; VAN DEN BERG, 1985; MAROULIS *et al.* 1988; TSAMI *et al.*, 1990).

A equação GAB é normalmente escrita como:

$$X_{eq} = \frac{X_m C K a_w}{[(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)]} \quad (\text{II.8})$$

onde: X_{eq} é a quantidade de umidade do material, a_w é a atividade de água, X_m é a quantidade de umidade da monocamada (kg de $\text{H}_2\text{O}/\text{kg m.s}$), C e K estão relacionadas com os efeitos da temperatura (adimensionais). Ou seja,

$$C = C_o \exp (\Delta H_c / RT) \quad (\text{II.9})$$

$$K = K_o \exp (\Delta H_k / RT) \quad (\text{II.10})$$

onde: T é a temperatura absoluta (K), R é a constante dos gases e ΔH_c , ΔH_k são funções do calor de sorção da água: $\Delta H_c = H_m - H_n$, e $\Delta H_k = H_l - H_n$ (expressos em kJ/kg). C_o e K_o são constantes, H_m e H_n são calores de sorção das camadas mono e multimolecular da água, respectivamente, e H_l é o calor de condensação do vapor d'água.

Os parâmetros foram estimados ajustando o modelo matemático para os dados experimentais usando regressão não-linear direta. Esse procedimento apresenta muitas vantagens sobre a regressão não-linear indireta (MAROULIS *et al.*, 1988). Regressão linear por outro lado pode dar resultados muito errados e deve ser evitada (SCHÄER & RUEGG, 1984; MAROULIS *et al.*, 1988).

O método de regressão não-linear direta estima os parâmetros X_m , C_o , ΔH_c , K_o e ΔH_k ajustando os resultados da equação pela substituição da Equação II.9 e II.8 na Equação II.10 para todos os dados experimentais.

Os parâmetros são estimados pela minimização da soma dos quadrados residual SST (Método dos Mínimos Quadrados, BECK & ARNOLD, 1977):

$$SST = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{n_i} (\psi_{ij} - y_i)^2 \quad (\text{II.11})$$

onde: ψ_{ij} é o valor experimental da variável dependente (quantidade de água em equilíbrio) da j-ésima replicata do i-ésimo experimento, y_i é o valor predito do modelo do i-ésimo experimento, e N é o número total de experimentos.

A soma dos quadrados residual, SST, consiste na soma dos quadrados fora do ajuste, SSR, e na soma dos quadrados de erro puro, SSE:

$$SST = SSR + SSE \quad (\text{II.12})$$

onde:

$$SSR = \sum_{i=1}^N n_i (\psi_i - y_i)^2 \quad (\text{II.13})$$

$$SSE = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{n_i} (\psi_{ij} - \psi_i)^2 \quad (\text{II.14})$$

$$\psi_i = \sum_{j=1}^{n_i} \psi_{ij} \quad (\text{II.15})$$

O desvio padrão entre valores experimentais e teóricos, S_R , e o erro experimental padrão, S_E , podem ser calculados pelas seguintes equações:

$$S_R^2 = \frac{SSR}{(N - p)} \quad (\text{II.16})$$

$$S_E^2 = \frac{SSE}{(M - N)} \quad (\text{II.17})$$

$$M = \sum_{i=1}^N n_i \quad (\text{II.18})$$

onde: p é o número de parâmetros.

Um modelo é considerado aceitável se o desvio padrão, S_R , entre valores experimentais e teóricos estiver próximo do erro experimental padrão, S_E .

De acordo com o teste-F o modelo é aceitável quando:

$$\frac{S_R^2}{S_E^2} < F_{1-\alpha}(N - p, M - N) \quad (\text{II.19})$$

onde: $F_{1-\alpha}(N - p, M - N)$ é o valor da distribuição-F para $N - p$ e $M - N$ graus de liberdade no nível de significante $1 - \alpha$.

II.2.2.1.3 Modelo de HENDERSON

A equação de HENDERSON (1952) foi desenvolvida empiricamente e aplicada na secagem de milho, couro, ameixa e semente de algodão.

Para a curva do conteúdo de umidade de equilíbrio para estes materiais foi encontrada a seguinte equação matemática:

$$1 - a_w = \exp(-k' X_{eq}^n) \quad (\text{II.20})$$

onde: a_w = é a atividade de água

X_{eq} = conteúdo de umidade [kg de água/kg m.s.]

k' = fator, variando com o material

n = expoente, variando com o material

O efeito da temperatura é expresso pela relação termodinâmica de GIBBS relacionada com base na adsorção:

$$\frac{\partial \sigma}{\partial v} = - \left(\frac{\partial P}{\partial S} \right)_T \quad (\text{II.21})$$

onde: σ = tensão superficial do líquido absorvido na interface sólido-gás [N/m]

S = superfície do sólido umedecido [m²]

v = volume de líquido [m^3]

P = pressão osmótica absorvida na interface sólido-vapor [N/m^2]

Esta equação presume que a quantidade de água, v , é uma função da superfície S .

A pressão osmótica, P , pode ser definida como:

$$P = \frac{RT}{v_l} \ln \frac{p_0}{p} \quad (\text{II.22})$$

onde: RT = conteúdo de gás na temperatura absoluta [K]

v_l = volume líquido molar [m^3/mol]

p_0 = pressão de saturação de vapor do líquido na temperatura T

p = pressão de vapor do líquido absorvido

A diferenciação parcial da Equação II.22 de P em relação a p e dada por:

$$\partial P = -\frac{RT}{v_l} \ln p \quad (\text{II.23})$$

Sendo C a concentração absorvida de líquido em moles por metro ao quadrado de superfície úmida:

$$\frac{\partial v}{\partial S} = v_l C \quad (\text{II.24})$$

Combinando as Equações (II.21), (II.23) e (II.25) tem-se:

$$\partial \sigma = CRT \partial \ln p \quad (\text{II.25})$$

Integrando teremos:

$$\sigma_s - \sigma = CRT \ln \frac{p_0}{p} \quad (\text{II.26})$$

Esta equação relaciona a concentração adsorvida de vapor C , a temperatura T , o equilíbrio de umidade relativa, p/p_0 , e a energia requerida por metro quadrado onde a superfície é exposta por remoção de umidade. A pressão p_0 é a pressão saturada de água na temperatura T .

A Equação II.26 define as condições para áreas não umedecidas.

Substituindo $p-p_0$ em p na Equação II.25 e integrando entre os limites σ e σ_0 , temos:

$$\sigma - \sigma_0 = CRT \ln \frac{p - p_0}{-p_0} \quad (\text{II.27})$$

A Equação (II.27) pode ser rescrita como:

$$-\ln \frac{p_0 - p}{p_0} = \frac{CRT}{\sigma - \sigma_0} \quad (\text{II.28})$$

Desde que C é a quantidade de umidade absorvida por unidade de área úmida e X a quantidade por área úmida total, pode-se assumir a seguinte relação:

$$C = k_1 X_{eq}^a \quad (\text{II.29})$$

Além disso desde a mudança em energia da superfície, $\partial\sigma$, é diretamente relacionado à mudança em quantidade de umidade adsorvida, ∂v , pela Equação II.21 esses dois fatores estão relacionados, assumindo assim

$$K_2 \frac{1}{\sigma_0 - \sigma} = (f)v = k_2 X_{eq}^b \quad (\text{II.30})$$

Substituindo (II.29) e (II.30) em (II.28) e R, k_1 e k_2 combinando em k, resulta na Equação II.31:

$$-\ln \frac{p_0 - p}{p_0} = kTX_{eq}^n$$

ou

$$1 - \frac{p}{p_0} = \exp(-kTX_{eq}^n) \quad (\text{II.31})$$

A expressão (II.31) é idêntica a Equação II.20, desde que $p/p_0 = a_w$, exceto que um fator da temperatura esteja adicionado a um processo termodinâmico. O valor de p_0 é a pressão saturada de vapor d'água na temperatura T. As constantes k e n dependem do material a ser seco.

O efeito da temperatura das propriedades de umidade relativa de equilíbrio de um material pode ser encontrada convertendo a Equação II.31 para:

$$\frac{\ln(1 - a_w)}{-kT} = X_{eq}^n \quad (\text{II.32})$$

II.2.2.2 Modelos cinéticos de secagem

A maioria dos sólidos orgânicos retêm a umidade como parte integral de sua estrutura, ou então no interior de fibras ou poros delgados internos. Nestes materiais, o movimento de umidade do interior para a superfície é lento e provavelmente ocorre pela difusão do líquido. Geralmente a velocidade do movimento de umidade, através da estrutura do sólido é descrita em termo da segunda lei de Fick, expressa pela Equação II.33.

$$\frac{\partial X}{\partial t} = \nabla(D_{ef} \nabla X) \quad (\text{II.33})$$

onde: X é umidade absoluta [kg de H₂O/kg m.s.]; D_{ef} é a difusividade efetiva [m²/s]; t é o tempo [s].

Quando a D_{ef} é considerado constante, o teor de umidade inicial X_0 é uniforme no interior do produto, a secagem ocorre somente de um lado da amostra em forma de uma lâmina infinita, e ainda a resistência externa à transferência de massa e o encolhimento do material são desprezíveis, a Equação II.33 fica reduzida a forma:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 X}{\partial y^2} \quad (\text{II.34})$$

onde y é a variável espacial.

Com as condições inicial e de contorno:

C.I. $X = X_0$ em $t = 0$, $0 < y < L$

C.C. $\left(\frac{\partial X}{\partial t}\right) = 0$ em $y = 0$, $t > 0$

C.C. $X = X_{eq}$ em $y = L$, $t > 0$

onde: X_{eq} é umidade absoluta [kg de H₂O/kg m.s.]; L é espessura inicial da amostra [m].

A solução analítica da Equação II.34 para o perfil interno de umidade é dada por CRANK (1975) como:

$$\frac{X - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} \exp\left[-(2n-1)^2 \frac{\pi^2 D_{ef} t}{L^2}\right] \quad (\text{II.35})$$

onde X_0 é umidade inicial do produto [kg de H₂O/kg m.s.].

Normalmente o que se mede nos ensaios experimentais de processo em batelada são concentrações médias espaciais ao longo do tempo e como se trata de um problema em coordenadas cartesianas, esta concentração é obtida através da Equação II.36.

$$\bar{X}(t) = \frac{1}{L} \int_0^L X(y, t) dy \quad (\text{II.36})$$

onde: \bar{X} é a umidade média do produto [kg H₂O/kg m.s.]

Integrando a Equação II.36 e denominando $\bar{X}(t)$ de \bar{X} e substituindo na Equação II.35 temos o perfil médio de umidade dado pela Equação II.37.

$$\frac{\bar{X} - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} \exp\left[-(2n-1)^2 \frac{\pi^2 D_{ef} t}{L^2}\right] \quad (\text{II.37})$$

Para tempos de secagem longos, $\left(\frac{D_{ef} t}{L^2} > 0,2\right)$ os termos da somatória que correspondem a $n > 1$ são tão pequenos que a Equação II.37 pode ser re-escrita considerando apenas o primeiro termo da série (Equação II.38), permitindo assim desprezar a contribuição do segundo termo em diante. O erro contido nessas simplificações é menor que 2% no valor adimensional do produto (PINTO, 1996).

$$\frac{\bar{X} - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} = \frac{8}{\pi^2} \exp\left[-\frac{\pi^2 D_{ef} t}{L^2}\right] \quad (\text{II.38})$$

II.2.2.2.1 Modelos empíricos

Uma importante correlação na secagem de materiais biológicos é a lei exponencial. Esta lei estabelece que a taxa de secagem é proporcional ao teor de água livre do material, na forma:

$$\frac{d\bar{X}}{dt} = -K(\bar{X} - X_{eq}) \quad (\text{II.39})$$

onde o fator de proporcionalidade K é denominado de constante de secagem.

$$k_M = k_0 Q^{k_1} P^{k_2} \quad (\text{II.45})$$

onde Q é o nível de potência do microondas e P a pressão de vácuo.

Nesta expressão, os coeficientes empíricos k_i , $i = 0, \dots, 2$ podem ser estimados ajustando o modelo total empregado nas curvas de secagem experimentais. No caso de problemas de uma resposta, o método usado mais freqüentemente para estimar parâmetros de um modelo é pela minimização do desvio padrão médio entre os valores experimentais e calculados:

$$(S_R)^2 = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{n_i} \frac{(e_{i,j})^2}{N} \quad (\text{II.46})$$

onde $e_{i,j}$ é o resíduo criado quando se compara os cálculos do modelo para o ponto experimental i e para a replicata j , n_i é o número de replicatas do ponto experimental i e N é o número de pontos experimentais. Essa comparação se refere a cada ponto experimental, independente da sua posição em um experimento específico (regressão direta).

O erro experimental padrão médio para todos os experimentos é dado pela seguinte equação:

$$(S_E)^2 = \sum_{i=1}^N \frac{n_i S_i^2}{N} \quad (\text{II.47})$$

onde S_i é o desvio padrão dos pontos experimentais com cada experimento. Um modelo é considerado aceitável se o desvio padrão entre valores experimental e calculado, S_R , está perto do erro experimental padrão, S_E .

II.2.2.2.2 Modelo cinético para a secagem por liofilização

O modelo matemático que descreve a taxa de secagem por liofilização foi primeiramente descrito por KING (1971). Este modelo envolve necessariamente a sublimação de água (aproximadamente 2838 kJ/kgmol) que é fornecido através de uma fonte de calor e o vapor d'água gerado é removido por um absorvedor de umidade.

O fluxo de calor de um dado material desidratado é dado pela Equação II.48.

$$q = \frac{1}{\frac{1}{h_e} + \frac{1}{h_i}} (T_e - T_f) \quad (\text{II.48})$$

onde:

q = fluxo de calor [W ou J/s];

T_e = temperatura da fonte de calor [K];

T_f = temperatura da parte sublimada [K];

h_e = coeficiente externo de transferência de calor do material seco [W/m²];

h_i = coeficiente interno de transferência de calor do material seco [W/m²].

O mesmo fluxo de calor também pode ser utilizado para determinar a temperatura da superfície externa do material seco (T_s), a Equação II.49 apresenta essa relação.

$$q = h_i (T_s - T_f) \quad (\text{II.49})$$

onde: h_i = coeficiente interno de transferência de calor do material seco [W/m²].

Da Equação II.48 e II.49 tem-se:

$$\frac{h_i}{h_e} = \frac{T_e - T_s}{T_s - T_f} \quad (\text{II.50})$$

O fluxo de massa do vapor d'água da parte sublimada é dado por:

$$Na = \frac{1}{\frac{1}{k_{ge}} + \frac{1}{k_{gi}}} (p_{fw} - p_{ew}) \quad (\text{II.51})$$

onde: Na = fluxo de massa de vapor d'água [kg.mol/s.m²];

p_{fw} = pressão parcial do vapor d'água em equilíbrio com a parte sublimada [atm];

p_{ew} = pressão parcial do vapor d'água em equilíbrio com o absorvedor de umidade [atm];

k_{ge} = coeficiente de transferência de massa externo do material seco [kg.mol/s.m²atm];

k_{gi} = coeficiente de transferência de massa interno do material seco [kg.mol/s.m²atm].

Os termos h_e , h_i , k_{ge} , e k_{gi} são determinados pela natureza do material e pelo equipamento de secagem, T_e e p_{fw} pelas condições de operação. As Equações II.48 e II.51 fornecem duas equações independentes e quatro incógnitas (q , Na , T_e e p_{fw}), sendo necessário duas outras equações.

Se a temperatura da parte sublimada variar rapidamente, ter-se-á a seguinte relação:

$$q = \Delta H_s Na \quad (\text{II.52})$$

onde: ΔH_s é o calor latente de sublimação do gelo [J/kgmol].

A relação adicional corresponde ao equilíbrio da parte sublimada (pressão de equilíbrio do gelo)

$$p_{fw} = f(T_f) \quad (\text{II.53})$$

Desta forma a taxa de secagem (Na) é determinada.

Combinando as Equações II.49, II.51 e II.52 tem-se:

$$h_i(T_s - T_f) = \Delta H_s \frac{1}{\frac{1}{k_{ge}} + \frac{1}{k_{gi}}}(p_{fw} - p_{ew}) \quad (\text{II.54})$$

Para secagem unidimensional de uma placa h_i dada pelas Equações II.48 e II.40 tem a seguinte forma:

$$h_i = \frac{k}{\Delta L} \quad (\text{II.55})$$

onde: k é a condutividade térmica do sólido seco [W/m.K];

ΔL é a espessura da camada seca em algum tempo durante a secagem [m].

A transferência de massa do vapor d'água ocorre na direção oposta no outro lado da camada seca, sendo dado por:

$$k_{gi} = \frac{D'}{RT\Delta L} \quad (\text{II.56})$$

onde: D' é a difusividade efetiva média na camada seca [m^2/s];

R é constante universal dos gases;

T é a temperatura média da camada seca [K].

Para a geometria plana unidimensional, ΔL pode ser correlacionado com a fração de umidade inicial restante X , que é dado por:

$$\Delta L = (1 - X) \frac{L}{2} \quad (\text{II.57})$$

A taxa de secagem pode ser correlacionado com Na pela equação da taxa de troca de água contida no fluxo de vapor d'água:

$$Na = \frac{L}{2} \frac{1}{M_a V_a} \left(-\frac{dX}{dt} \right) \quad (\text{II.58})$$

onde: M_a = peso molecular da água;

V_a = volume do material sólido ocupado por um quilograma de água;

inicialmente $V_a = \frac{1}{X_0 \rho_0}$, onde X_0 é a umidade inicial [kgH₂O/kg m.s.] e ρ_s é a densidade do sólido seco [kg/m³];

t = tempo [segundos].

Combinando as Equações (II.49), (II.52), (II.55), (II.57), (II.58) tem-se uma equação relacionando a taxa de secagem, o termo de força impulsionante e o conteúdo de umidade restante:

$$(1-X) = \frac{4kM_a V_a}{\Delta H_s L^2} \left[\frac{(T_s - T_f)}{\left(-\frac{dX}{dt} \right)} \right] \quad (\text{II.59})$$

Uma equação similar pode ser escrita em termos de temperatura da força impulsionante total com $(T_e - T_f)$:

$$(1-X) = \frac{4kM_a V_a}{\Delta H_s L^2} \left[\frac{(T_e - T_f)}{\left(-\frac{dX}{dt} \right)} \right] - \frac{2}{L} \frac{k}{h_e} \quad (\text{II.60})$$

Uma derivação similar relatando a taxa de secagem com a transferência de massa total da força impulsionante pode ser escrita como:

$$(1-X) = \frac{4D' M_a V_a}{RT L^2} \left[\frac{(p_{fw} - P_{ew})}{\left(-\frac{dX}{dt} \right)} \right] - \frac{2}{L} \frac{D' RT}{k_{ge}} \quad (\text{II.61})$$

O termo $(T_e - T_f)$ pode ser assumido como uma constante, a Equação II.60 pode ser integrada com $t = t$ e $t = 0$; $X = 1$ e $X = X$, resultado a Equação II.61.

$$(1 - X) = \frac{8kM_a V_a}{\Delta H_s L^2} (T_e - T_f) \left(\frac{t}{1 - X} \right) - \frac{4k}{L h_e} \quad (\text{II.62})$$

A Equação II.62 é conhecida como modelo URIF (Uniformly Reating Ice Front).

Alguns pesquisadores utilizaram o modelo URIF para prever algumas constantes.

GAFFNEY & STEPHENSON (1968), citado por KING (1971), ao liofilizarem uma solução congelada de amido de milho relacionaram $(T_e - T_f)/(1 - X)^2$ contra t , conforme a Equação II.62 e considerando h_e como muito grande e através de regressão linear, verificaram que a condutividade térmica é diretamente proporcional a pressão de operação.

SANDALL *et al.* (1966), também citado por KING (1971), utilizando o modelo URIF, verificaram que ao liofilizarem fatias de peru, em um intervalo de pressão compreendido entre $2 * 10^{-4}$ a 1,01 bar que a baixas pressões a relação gráfica de $(1 - X)$ contra $t/(1 - X)$ obtida através da Equação II.62 ajustou os dados experimentais obtidos. Quando o processo foi conduzido sob altas pressões, a taxa de secagem foi expressa por $(1 - X)$ contra $(p_{fw} - p_{ew})/(-dX/dt)$, obtida através da Equação II.61. Para os dois casos estudados SANDALL *et al.* (1966) verificaram também que a relação foi linear e que a umidade foi reduzida em até 90%.

Segundo KING (1971) a linearidade obtida através da correlação de dados experimentais com o modelo URIF não pode prever o mecanismo de transferência de calor interno e somente condução através do crescimento da camada seca. O mecanismo de transferência de massa é combinado com a difusão de massa, difusão de Knudsen e o fluxo viscosos através do crescimento da camada seca. Estes mecanismos podem ser confirmados por comparação dos parâmetros de transporte deduzidos da taxa de secagem.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão abordados todos os materiais utilizados neste trabalho bem como todos os métodos analíticos.

III.1 Material

III.1.1 Caldo enzimático

Para a realização dos estudos de secagem utilizou-se a enzima α -amilase (AQUAZYM[®] 120 L) adquirida da NOVO NORDISK.

Esta enzima foi produzida por processo fermentativo submerso utilizando-se *Bacillus* como inóculo.

III.2 Métodos analíticos

III.2.1 Planejamento experimental e Metodologia de superfície de resposta

Todos os planejamentos de experiências estão, de uma forma ou de outra, voltados à otimização. A metodologia de superfícies de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais. Introduzida por G. E. P. Box na década de 1950, e que desde então tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO *et al.*, 1995).

Para aplicar a metodologia de superfície de resposta é necessário realizar primeiramente ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste num número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variável de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa normalmente é utilizado um planejamento fatorial de dois níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para n variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é de 2^n .

A aplicação dos planejamentos de experiências supõe que os erros experimentais são independentes e constantes em toda a região experimental; geralmente são feitos três ensaios no ponto central (nível 0) para permitir o cálculo do erro experimental (erro puro). Uma das vantagens de incluir este ponto é que, replicando-o, pode-se obter o desvio padrão dos experimentos e a partir deste dado, pode-se calcular o desvio padrão dos efeitos.

O desvio padrão dos experimentos utilizando o ponto central é calculado pela seguinte equação:

$$S_{\text{exp}}^2 = \sum \frac{(Y_i - \bar{Y})^2}{n-1} \quad (\text{III.1})$$

onde:

S_{exp}^2 = desvio padrão dos experimentos no ponto central

n = número de experimentos executados no ponto central

Y_i = resultado do experimento i

\bar{Y} = média dos resultados dos experimentos

A variância dos efeitos é dada por:

$$S_{efeito}^2 = \frac{4 * S_{exp}^2}{N} \quad (III.2)$$

onde: N = número de coeficientes do modelo.

Se o modelo linear não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais é possível completar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais $2n$ ensaios segundo uma chamada “estrela”, a fim de se obter o modelo de 2ª ordem (quadrático).

O cálculo dos valores codificados dos ensaios do planejamento “estrela” são obtidos pela seguinte expressão:

$$\alpha = (2^n)^{1/4}, \text{ onde } n \text{ é igual ao numero de variáveis independentes estudadas.}$$

Neste caso onde são analisadas duas variáveis têm-se α variando de $-1,41$ a $+1,41$.

Para analisar se os modelos empíricos obtidos através da regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, BOX *et al.* (1978) sugerem a realização de uma análise estatística, utilizando como parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F à partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se existe ou não relação entre as variáveis e a resposta. Segundo BARROS NETO *et al.* (1995), quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (falta de ajuste mais erro puro) MQ_R/MQ_r segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi exclusivamente devido a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada comparando o valor efetivamente calculado para MQ_R/MQ_r com o valor de F tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não

há razão para duvidar da hipótese nula. Então pode-se afirmar que a equação de regressão não é significativa.

Por outro lado, se a razão MQ_R/MQ_r for maior que F tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto. No entanto, pode-se acontecer que uma regressão, embora significativa no ponto de vista do teste F , não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Deste modo BARROS NETO *et al.* (1995), sugerem que para que a regressão seja estatisticamente significativa e preditiva, o valor da razão MQ_R/MQ_r deve ser no mínimo 4 a 5 vezes superior ao valor de F tabelado.

A Tabela III.1 apresenta a Análise da Variância (ANOVA) do planejamento experimental.

Tabela III.1 Tabela ANOVA para o planejamento experimental com pontos centrais

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática SQ</i>	<i>Graus de liberdade gl</i>	<i>Media Quadrática MQ</i>	<i>F calculado</i>	<i>F tabelado*</i>
Regressão (R)	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	$SQ_R/(p-1)$	MQ_R/MQ_r	$F_{p-1, n-p}$
Resíduos (r)	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	n-p	$SQ_r/(n-p)$		
Falta de ajuste (FA)	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$SQ_{FA}/(m-p)$	MQ_{FA}/MQ_{EP}	$F_{m-p, n-1}$
Erro puro (EP)	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n-m	$SQ_{EP}/(n-m)$		
Total (T)	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	n-1			

(*) F_{tabelado} com a % de confiança escolhida (usualmente 95 %).

% variação explicada (R_2) = SQ_R/SQ_T

% máxima variação explicável = $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T$

Coefficiente de correlação = R^2

O $F_{cal.} > F_{tab.}$

onde:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r$$

$$SQ_r = SQ_{FA} + SQ_{EP}$$

p é o número de parâmetros do modelo

n é número total de observações

m é o número de variáveis distintas

\bar{y} é a média global

\hat{y}_i é valor previsto do modelo

y_i é o valor observado

\bar{y}_i é média das respostas observadas no nível i

$(\hat{y}_i - \bar{y})$ representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto questão, \hat{y}_i , em relação a média.

$(y_i - \hat{y}_i)$ é a diferença entre o valor observado e o valor previsto

$(\hat{y}_i - \bar{y}_i)$ depende do modelo e será tanto maior quanto mais estimativas para um dado nível, \hat{y}_i , se afastarem do valor médio das respostas determinadas nesse nível, \bar{y}_i . Este termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo as respostas observadas,

À partir dos resultados obtidos do planejamento experimental é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo de primeira ordem,

correlacionando as variáveis e as respostas. Estes efeitos são calculados segundo a Equação III.3:

$$\text{Efeito} = \frac{\sum \text{respostas para nível (+1)} - \sum \text{respostas para nível (-1)}}{\text{número de respostas no nível (+1)}} \quad (\text{III.3})$$

Quanto maior o valor absoluto do efeito, maior será a influência na resposta. Este tipo de análise pode ser feita porque os efeitos são independentes entre si. Isto é garantido graças a propriedade chamada de ortogonalidade.

Em alguns casos os efeitos são tão grandes que se pode considerar o fator como importante. Em outros casos, os efeitos são tão pequenos que o fator poderá ser descartado. No entanto nem sempre isso é possível e esta decisão deve ser baseada em considerações estatísticas.

Neste trabalho foi utilizado o software *Statística* versão 5.0 como ferramenta computacional.

III.2.2 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de glicose formada à partir de uma solução 7% de amido a pH 6. Neste método utilizou-se um “kit” para dosagem de glicose da Laborlab S.A.

O ensaio da atividade enzimática consistiu na adição da enzima a uma solução 7% de amido em tampão acetato de sódio 0,05 M a pH 6 e uma solução contendo 0,05% (m/v) de cloreto de cálcio e 0,6% (m/v) de cloreto de sódio. Logo após a solução foi incubada a 37⁰C em banho-maria por 5 minutos. Uma alíquota de 20 µL da solução resultante foi adicionada a 2 mL de uma solução contida no “kit” da Laborlab S.A. e logo após incubada a 37⁰C por 10 minutos em banho-maria e posteriormente foi feita a leitura da absorvância da solução a 505 nm em espectrofotômetro UV/VIS, modelo Sintra 10e da GBC.

A curva padrão foi construída com uma solução padrão de glicose, nas concentrações entre 0,2 a 0,13 µmol/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade desta capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de açúcar expresso por glicose/mL a 37°C e a pH 6.

III.2.3 Atividade de água

A atividade de água (a_w) em alimentos fluidos e em produtos naturais estima a disponibilidade para ser utilizada por microorganismos e em reações de degradação. Sua importância está relacionada à melhor conservação, pois quanto maior seu valor, maior a velocidade de deterioração.

A determinação da atividade de água foi medida através de um analisador modelo Aqua-Lab 3TE da DECAGON, que foi mantido à temperatura de 25°C.

O método utilizado fundamenta-se na determinação do ponto de orvalho da camada de ar úmido em equilíbrio com a amostra, o ponto de orvalho está relacionado com a pressão de vapor e por consequência com a a_w (NOREÑA *et al.*, 1996).

Inicialmente o equipamento foi calibrado com soluções de sais saturados (Tabela III.2), em seguida a amostra foi colocada diretamente no aparelho, após alcançar o equilíbrio foram efetuadas três leituras da a_w e a temperatura exata da amostra. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

Tabela III.2 Soluções de sais saturados e suas respectivas atividades de água

Sais	a_w a 20°C	a_w a 25°C
LiCl	0,113 \pm 0,003	0,113 \pm 0,003
CH ₃ KOH	-	0,226 \pm 0,003
MgCl ₂	0,331 \pm 0,002	0,328 \pm 0,002
K ₂ CO ₃	0,432 \pm 0,003	0,432 \pm 0,004
Mg(NO ₃) ₂	0,544 \pm 0,002	0,529 \pm 0,002
NaCl	0,755 \pm 0,001	0,753 \pm 0,001
KCl	0,851 \pm 0,003	0,843 \pm 0,003
BaCl ₂	0,907 \pm 0,003	0,903 \pm 0,003
K ₂ SO ₄	0,976 \pm 0,005	0,973 \pm 0,005
H ₂ O	1,000 \pm 0,003	1,000 \pm 0,003

Fonte: Adaptado de NOREÑA *et al.* (1996); IGARASHI (1999).

III.2.4 Determinação da umidade de equilíbrio (Isoterma de sorção)

As amostras após o processo de desidratação foram condicionadas (aproximadamente 5,0000 g de amostra) em potes fechados contendo soluções supersaturadas de: BaCl₂, KCl, NaCl, MgNO₃.6H₂O, K₂CO₃, MgCl₂.6H₂O, CH₃KOH, LiCl, criando assim no seu interior atmosferas com diferentes umidades relativas correspondentes ao equilíbrio com soluções saturadas de sais. Estes potes foram colocados dentro de uma caixa de isopor à temperatura ambiente. As amostras foram pesadas semanalmente até peso constante (IGARASHI, 1999).

Todas as amostras foram feitas em duplicatas.

III.2.5 Análise do teor de umidade

O teor de água residual contido na amostra após a secagem (X) e após a determinação da umidade de equilíbrio (X_{eq}) foi determinado termogravimetricamente. As análises foram realizadas no equipamento TGA 50 da Shimadzu. As amostras (aproximadamente 5 mg cada) foram colocadas em uma célula de platina a uma atmosfera de nitrogênio. As medidas foram feitas no intervalo de 25 a 70⁰C. Paralelamente afim de verificar se a umidade encontrada nas análises termogravimétricas foram corretas, algumas amostras também foram analisadas por um analisador de umidade a microondas da marca SMART modelo 5.

III.2.6 Análise morfológica

O diâmetro médio da partícula ou o intervalo de diâmetro resultante de cada processo de secagem foi determinado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A análise por MEV possibilita a formação de imagens através do bombardeamento de elétrons na amostra, com um aumento de até 300.000 vezes e com uma profundidade de aproximadamente 10 nm. A imagem é formada pela varredura de um feixe eletrônico

através da amostra em sincronismo com o feixe de varredura dentro do tubo de raios catódicos do monitor de vídeo, por intermédio de um detector de elétrons secundários ou elétrons retroespalhados (GOLDSTEIN *et al.*, 1992).

Para o preparo das amostras de α -amilases desidratadas após o processo de secagem, foram pesadas cerca de 50 mg de cada amostra, logo após foram adicionados 10 mL de n-hexano. As soluções foram levadas ao ultra-som e logo após a um período de 10 minutos de repouso foram retiradas 3 gotas, sendo estas adicionadas gota a gota sobre um *slab* previamente preparado com fita de carbono. Após a secagem do material depositado, estes foram levados para a metalização com ouro a um período de 200 segundos.

Para verificar o diâmetro utilizou-se um MEV modelo 440i da LEO Cambridge.

III.2.7 Medida de pH

O pH do caldo enzimático foi medido através de um potenciômetro da marca FISHER SCIENTIFIC modelo AB 15, utilizando-se eletrodo combinado de plástico com bulbo de vidro e solução interna de cloreto de prata saturado.

O potenciômetro foi calibrado inicialmente através de soluções tampões padrões de pH 4,01 e 6,86.

III.2.8 Eletroforese em condições desnaturantes em gel de tricina – SDS-PAGE

A eletroforese é um método de fracionamento baseado na migração de partículas carregadas, positiva ou negativamente, quando sujeitas à ação de um campo elétrico (VASCONCELLOS *et al.*, 1996).

A eletroforese foi utilizada para caracterização da enzima em estudo a fim de se obter a massa molar para posteriormente ser utilizada na modelagem molecular.

Foram preparados géis de acrilamida e bisacrilamida a 49,5% T, 3% C (spacer gel, gel de corrida e stacking gel) e utilizados os seguintes padrões de marcadores moleculares

(Da): Fosforilase B: 94.000, Albumina Bovina: 67.000, Ovoalbumina: 43.000, Anidrase Carbônica: 30.000, Inibidor Tripsina de soja: 20.100 e α -lactoalbumina: 14.400.

A eletroforese foi desenvolvida a uma voltagem constante de 60 V durante oito horas no equipamento Mini-Protean II Cell da Bio-Rad.

A revelação dos géis foi realizada inicialmente com solução contendo comassie brilliant blue R-250, metanol e ácido acético glacial. Para a fixação do gel utilizou-se uma solução contendo 40% de metanol e 7% de ácido acético.

III.2.9 Calibração da potência do forno de microondas

A potência do secador projetado foi calibrada utilizando-se o método “IMPI 2-litros”, conforme BUFFLER (1991). Inicialmente o forno de microondas foi pré-aquecido com 2 L de água por cinco minutos, logo após foi ajustada a potência do microondas a uma potência máxima com uma carga de água de 2000 ± 5 g, colocada em dois béqueres de 1 L. Foi determinada a temperatura inicial da água, e logo após os béqueres foram colocados no centro do forno, lado a lado. O forno foi ligado por dois minutos e dois segundos, e logo após foram lidas as referidas temperaturas. A potência foi calculada conforme a Equação III.7:

$$P(W) = 70 * \frac{\Delta T_1(^{\circ}C) + \Delta T_2(^{\circ}C)}{2} \quad (III.7)$$

onde ΔT_1 e ΔT_2 são as elevações da temperatura nos dois béqueres, calculadas subtraindo-se as temperaturas iniciais e finais respectivamente.

Neste trabalho não foi computado o efeito da oscilação da corrente elétrica sobre a potência do microondas.

III.2.10 Modelagem matemática

Os ajustes dos dados experimentais foram determinados através da técnica de regressão não-linear, utilizando-se o aplicativo Statística versão 5.0 como ferramenta computacional.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE

IV. 1 Propriedades

Conforme descrito no Capítulo III, a enzima utilizada nos experimentos foi α -amilase bacteriana (EC 3.2.1.1) adquirida da NOVO NORDISK com nome comercial de AQUAZYM[®] 120L.

Segundo os fornecedores, esta enzima é utilizada na hidrólise de amido de gomas têxteis em dextrinas solúveis, sendo a sua temperatura de atuação na faixa de 30-70⁰C. Conforme mostra a Figura IV.1 o seu pH de atuação encontra-se na faixa de 6-7 sendo que abaixo ou acima destes valores há uma queda acentuada na atividade.

De acordo com os mesmos fornecedores a adição de estabilizantes aumenta significativamente a sua susceptibilidade frente à temperatura e pH. A Figura IV.2 mostra que na presença de estabilizantes melhores temperaturas são conseguidas. Estas estão entre 65-70⁰C e que em valores muito elevados (acima de 80⁰C) há uma grande perda de atividade nos primeiros cem minutos de exposição.

Um outro fator relevante é a influência de estabilizantes frente ao pH de atuação. Conforme mostra a Figura IV.3 com a adição de estabilizantes houve um aumento

significativo na faixa ótima de pH (6-9). Cabe ressaltar também, que a adição de cálcio a concentrações acima de 0,5 g/L não altera sua atividade (Figura V.4).

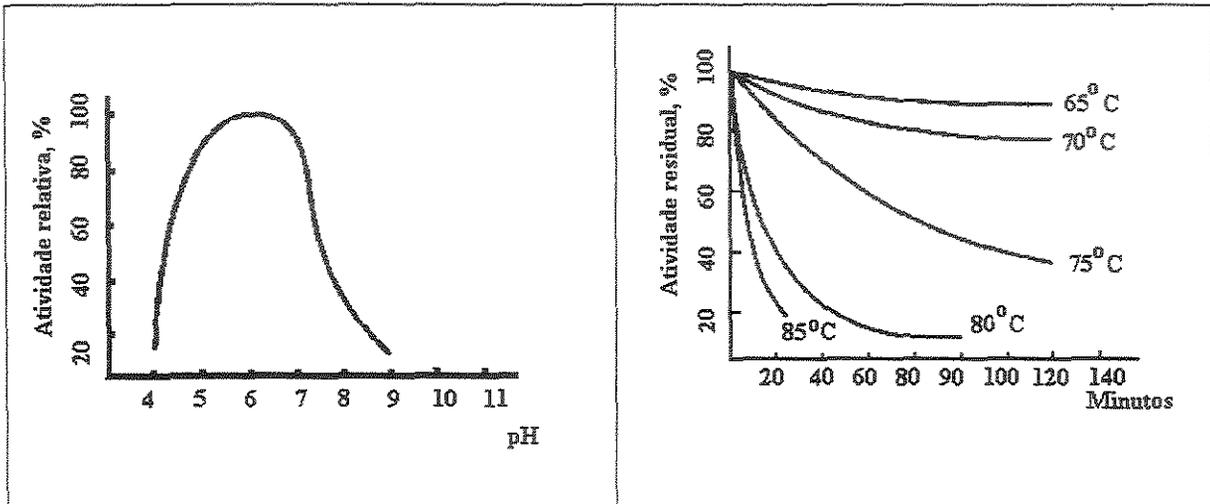


Figura IV.1 Influência do pH sobre a atividade enzimática

Figura IV.2 Influência da temperatura sobre a atividade na presença de estabilizantes.

pH: 7,0

Estabilizantes: 0,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6.0 g NaCl por litro

Fonte: NOVO NORDISK, 2000.

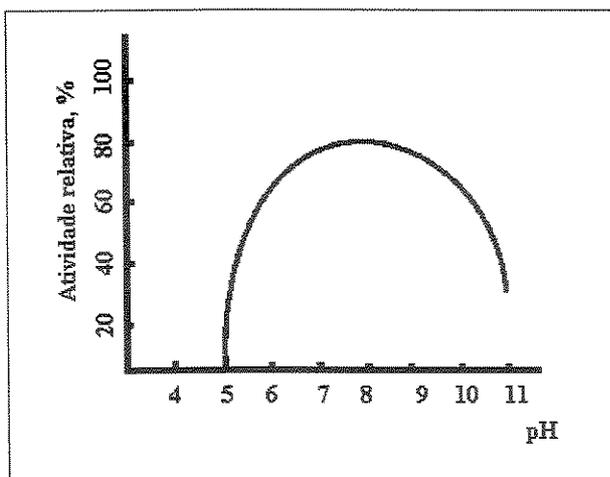


Figura IV.3 Influência do pH sobre a atividade enzimática com adição de estabilizantes

Temperatura: 70^oC

Estabilizantes: 0,5 g CaCl₂.2H₂O + 6.0 g NaCl por litro

Tempo de reação: 60 minutos

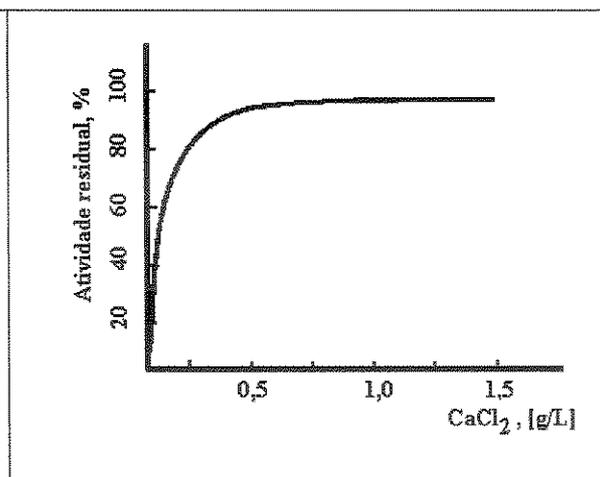


Figura IV.4 Influência da concentração de cálcio na estabilidade

Temperatura: 70^oC

pH: 7,0

Tempo de reação: 60 minutos

Fonte: NOVO NORDISK, 2000.

IV.2 Massa molar

A eletroforese em gel de tricina SDS-PAGE do caldo enzimático revelou que a α -amilase utilizada nos experimentos é constituída de duas sub-unidades, sendo estas heterodímeras com massas molares de 40,74 kDa e 16,59 kDa, totalizando uma massa de 57,33 kDa. Um outro fator relevante foi verificado que o caldo enzimático apresentou outros componentes que provavelmente devem ser proteínas e outros componentes celulares (Figura IV.5).

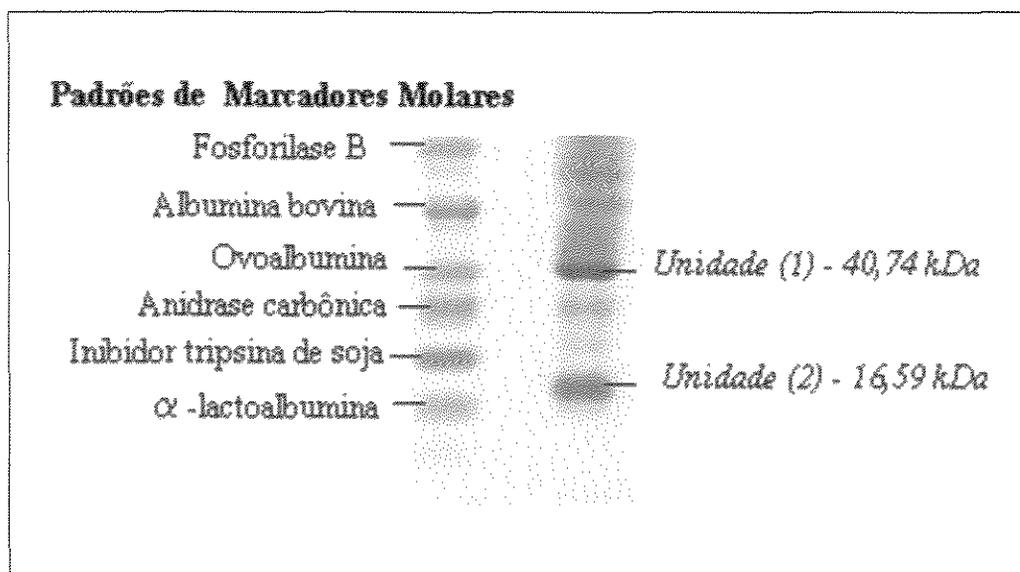


Figura IV.5 Eletroforese em gel tricina SDS-PAGE do caldo enzimático

IV.3 Características gerais do caldo enzimático

O caldo enzimático apresentou as seguintes características:

- pH – 6,56
- Atividade enzimática (U/mL) – 0,9324
- Densidade (g/mL) – 1,0879
- Teor de umidade (kg H₂O/kg m.s) – 4,42
- Atividade de água – 0,935

CAPÍTULO V

SECAGEM DE α -AMILASE POR MICROONDAS À VÁCUO

Neste capítulo serão abordados alguns aspectos teóricos e básicos sobre secagem por microondas sob condições de vácuo.

Procurou-se inicialmente em descrever alguns aspectos fundamentais sobre calor de microondas e suas aplicações.

Serão também descritas neste capítulo as metodologias utilizadas para a secagem de α -amilase assim como alguns dados de construção do secador utilizado neste trabalho.

V.1 Introdução

V.1.1 Calor de microondas

Microondas fazem parte do espectro eletromagnético entre as ondas do rádio e infravermelho e são geradas por meio de tubos de potência especiais chamados Magnetrons, Klystrons e Amplitons (TAPE, 1970). Microondas são ondas eletromagnéticas de comprimento de ondas na faixa de 0,1 milímetro a 1 metro e com frequência entre 300 e 3.000 megaciclos por segundos (DECAREAU, 1985).

Embora a aplicação industrial da energia microondas tenha se iniciado há mais de quarenta anos, a aceitação e a difusão do seu uso tem sido pouco restrita, devido a diversos fatores.

Apesar da utilização da energia de microondas ser considerada uma tecnologia nova, as aplicações em forno doméstico já eram utilizadas logo após a segunda guerra mundial.

A energia de microondas desenvolve calor dentro dos materiais utilizados, reduzindo o tempo de tratamento, melhorando o rendimento dos processos e qualidade final dos materiais, quando comparado com os processos convencionais utilizados nos diferentes seguimentos da industria.

As frequências permitidas no uso industrial, científico e medicinal pela “Federal Communications Commission” de acordo com o “International Radio Regulations” de Genebra em 1959 são as seguintes: 915, 2.450, 5.800 e 22.125 megaciclos por segundo, sendo que a frequência mais utilizada em processamento de alimentos é de 2.450 megaciclos por segundo, correspondendo a 12,2 cm de comprimento de onda no vácuo. Para fins industriais e sob autorização especial pode-se também ser utilizada a frequência de 915 megaciclos por segundo (TAPE, 1970; DROUZAS & SHUBERT, 1996).

Um pré-requisito para a absorção de energia de microondas por um material é a existência de substâncias contendo dipolos ou centros dipolares (DROUZAS & SHUBERT, 1996).

O aquecimento por microondas de uma substância possui vários fatores: permissividade dielétrica (ϵ), perdas por condutividade, temperatura (T), intensidade de campo, capacidade calorífica (C) e densidade (ρ). A condutividade térmica também é importante quando existe um gradiente de temperatura. Portanto, uma secagem por microondas bem sucedida requer conhecimento das propriedades do material e do equipamento de microondas.

Quando uma substância absorve energia de microondas, sua temperatura se eleva. A taxa de mudança de temperatura é dada pela expressão abaixo:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{P}{\rho * C} \quad (V.1)$$

onde, P , é a potência absorvida por volume de unidade de material que depende diretamente da parte imaginária da permissividade dielétrica e do fator de perda (ϵ'').

Como as propriedades dielétricas da maioria dos materiais mudam com a temperatura, mesmo se C e ρ forem constantes, o aquecimento dielétrico não será constante.

Para alguns materiais, as propriedades dielétricas variam não unicamente com a temperatura mas também com conteúdo de umidade. O ϵ'' é diretamente proporcional ao conteúdo de umidade. Num baixo conteúdo de umidade, sendo esta na forma de filmes finos, que podem ou não ser contínuos, o ϵ'' decresce com decréscimo do conteúdo de umidade (AYAPPA, 1997).

Vem sendo observado que a quantidade de potência absorvida é máxima durante os estágios iniciais da secagem. Durante aquecimento e a secagem dielétrica, o campo eletromagnético está altamente acoplado com a transferência de calor e de massa. Mudanças no conteúdo de umidade e na temperatura afetam significativamente as propriedades dielétricas e a distribuição do campo eletromagnético. O valor da carga, relativo a cavitação, também afeta a impedância da cavitação e a quantidade da potência refletida ao magnetron, o que determina a performance do equipamento. A colocação da carga na cavitação do microondas também afeta o aquecimento (ZHANG & DATTA, 1998).

PADUA (1993) investigou o efeito de composição em perfis de temperatura em gels de ágar contendo sacarose. O desenvolvimento de perfis de temperatura dentro de amostras dependia quase exclusivamente da capacidade das amostras em absorver energia de microondas. O nível de sacarose afetou notavelmente os modelos de aquecimento de amostras em gels de ágar cilíndricos também contendo sacarose. Os gels preparados com soluções de sacarose concentrados absorviam energia de microondas mais eficientemente, mostrando um aquecimento na superfície e um centro frio, do que aqueles com nenhuma sacarose na qual absorviam menos energia, mostrando um aquecimento central e uma superfície fria. Assim, PADUA (1993) sugeriu que pode ser possível descrever um modelo de aquecimento por microondas de alimentos através da geometria e da formulação.

AYAPPA *et al.* (1991) apresentaram uma distribuição de calor e um perfil de temperatura transiente para uma amostra de bife cru exposto a microondas de intensidade igual em ambos lados. Até 450 MHz, as propriedades dielétricas são funções da

temperatura. De acordo com estes autores, a profundidade de penetração decresce com o aumento da temperatura. Em altas frequências (e.g. 2.800 MHz) as propriedades dielétricas são fracamente dependentes da temperatura. Assim a distribuição de calor muda pouco com o aquecimento das amostras. Além disso, uma distribuição de temperatura não-uniforme ocorre em amostras aquecidas por microondas em ambas frequências.

A 2.450 MHz, um das duas frequências comuns de microondas, com o aumento da temperatura do produto, mais energia é absorvida perto da superfície do material (MUDGETT, 1986). Por causa do suprimento contínuo de energia de microondas, a temperatura do produto tende a aumentar rapidamente. Este efeito é responsável pela queima da superfície do material (GUNASEKARAN, 1990). Para evitar o super-aquecimento do produto e para usar a energia aplicada mais eficiente, a transferência de calor e de massa devem ser balanceadas cuidadosamente.

Vem sendo sugerido que um suprimento intermitente de energia pode melhorar a utilização da energia térmica assim como a qualidade do produto seco que são sensíveis a temperatura quando as taxas de transferência de massa e de calor interno controlam a velocidade global de secagem (CARABIN, 1990).

GUNASEKARAN (1990) utilizou energia de microondas contínua e pulsada para avaliar as velocidades de secagem de milho. Curvas típicas de secagem exibiam um período inicial de lenta remoção de umidade seguida por um período de secagem rápida. Aparentemente, durante os segundos iniciais a energia de microondas foi usada para aumentar a temperatura do milho e pouca água foi evaporada. Uma vez atingida a temperatura de saturação, ela rapidamente evaporou com a entrada da energia de microondas. O tempo de não funcionamento fornece o tempo de descanso necessário a redistribuição de umidade dentro dos núcleos, nivelando o perfil de umidade por toda a massa de grão. Portanto, durante o tempo de ligação subsequente a secagem foi mais eficiente. As velocidades de secagens por microondas foram as mais altas para uma aplicação de força contínua (70×10^{-3} para 85×10^{-3} kg de H_2O/h). Entretanto, a aplicação pulsada foi a mais rápida (35×10^{-3} para 60×10^{-3} kg de H_2O/h) que a secagem convencional por ar quente. GUNASEKARAN & PAULSEN (1985) relataram que a velocidade desse tipo de secagem foi de 75×10^{-3} para 150×10^{-6} kg de H_2O/h para secar milho de 25% para 15% de umidade.

V.1.2 Efeito das microondas em sistemas biológicos

Algumas formas de radiação são conhecidas por provocar mudanças bioquímicas e físicas no material sujeito ao tratamento pela radiação.

Os efeitos destas radiações em sistemas biológicos podem ser térmicos ou não-térmicos.

Os efeitos térmicos acontecem quando a energia das microondas é transformada em calor. Como a absorção da energia das microondas depende da constante dielétrica e este parâmetro tem valor elevado para a água, os sistemas orgânicos com alto conteúdo aquoso são os mais afetados pelas microondas.

Os efeitos não-térmicos ocorrem quando uniões moleculares são submetidas a tensões. Efeitos não-térmicos podem incluir arranjos em macromoléculas e estruturas subcelulares suficientemente importantes para causar perturbações metabólicas e funcionais a nível celular (LAMBERT, 1980).

FUNG & CUNNINGHAM (1981), estudaram os efeitos de microondas sobre ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) e encontraram que certas frequências tem efeitos específicos e que estes efeitos não eram devidos à mudança de temperatura.

Algumas estruturas de materiais biológicos com extensivas ligações de hidrogênio podem ser afetadas por radiação eletromagnéticas de baixo valor de energia quântica. O delicado balanço de estruturas com extensivas ligações de hidrogênio, as quais determinam as funções de macromoléculas, são possivelmente susceptíveis a distúrbios por microondas (ROSEN, 1972).

DREYFUSS & CHIPLEY (1980) observaram o comportamento da atividade enzimática sob ação das microondas (Tabela V.1). Quando as enzimas de procedência não microbiana foram irradiadas não foi observada nenhuma alteração nas respectivas atividades. Este fato levou a formulação da hipótese da existência de um efeito letal das microondas de caráter não-térmico.

Tabela V.1 Influência do aquecimento convencional e por microondas sobre a atividade de algumas enzimas

ENZIMA	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	
	Forno de microondas	Forno convencional
Malato desidrogenase	Aumento	Aumento menor
(alfa) Cetoglutarato desidrogenase	Aumento	Diminuição
Citocromo desidrogenase	Aumento	-
ATP-ase citoplasma	Aumento	Aumento
ATP-ase membrana	Sem variação	-
Fosfatase alcalina	Sem variação	Sem variação
Lactato desidrogenase	Sem variação	Diminuição
Glucose 6-P desidrogenase	Diminuição	Aumento
Termonuclease	Aumento	-

Fonte: DREYFUSS & CHIPLEY, 1980

DATTA & LIU (1992) verificaram que o aquecimento em forno microondas de alimentos apresenta maior retenção de nutrientes e que os níveis de tiamina não variam significativamente em comparação com o aquecimento convencional.

V.1.3 Secagem por microondas a vácuo

A secagem por microondas sob vácuo pode ser considerada como uma alternativa interessante frente a secagem convencional por oferecer um curto tempo de exposição do material a altas temperaturas.

Neste sistema, o material frequentemente na forma de pasta, é espalhado em uma correia transportadora e passa por um túnel onde recebe a incidência de microondas a uma determinada pressão que varia de 0,0013 a 0,03 bar, causando a formação de uma espuma que quando seca tem propriedades de rehidratação (JAYARAMAN & DAS GUPTA, 1995).

Segundo DERMEIJ *et al.* (1995) o calor requerido para a secagem é gerado pela absorção de radiação eletromagnética por moléculas ou substâncias a serem secas, com isso

a energia é transformada em energia cinética, especialmente a da água. O aumento da energia cinética faz com que a vibração molecular seja intensa principalmente com o aumento da temperatura e da evaporação da água. O vácuo produzido abaixa a pressão de vapor do líquido, assim, a combinação do vácuo e a energia de microondas resulta em uma suave e rápida secagem. O mecanismo físico da difusão da água do produto limita a velocidade de secagem e a intensidade das microondas. Nesse caso, a transferência de calor e massa, aparentemente parece simples, mas diferenças entre a energia de ativação da água ligada e da água livre, por exemplo, dificultam o processo de secagem (PEARCE *et al.*, 1988).

A energia de microondas e a secagem a vácuo cria várias estruturas porosas em gels de amostras, facilitando o transporte de vapor d'água. A evaporação da água dentro da amostra é acelerada pela absorção preferencial da energia de microondas e pelas moléculas de água (DROUZAS *et al.*, 1999).

Atualmente diversos alimentos estão sendo processados com ajuda desta técnica, como na concentração de sucos de frutas, chás e cafés instantâneos e recentemente na secagem de vegetais e grãos (JAYARAMAN & DAS GUPTA, 1995).

Geralmente após o processo de secagem há uma perda de substâncias voláteis o que compromete a qualidade aromática do alimento. HUELDT (1974) verificou que ao secar sucos de frutas em secadores tipo *spray dryer*, 11% dos compostos voláteis se mantinham no alimento; quando a secagem foi realizada em liofilizador houve um aumento significativo para 33% e quando o mesmo suco foi seco em secador por microondas sob condições de vácuo a retenção de tais substâncias aumentou para 82%.

MEISSEL (1979) verificou que ao secar sucos de laranja e de morango em um secador à microondas sob vácuo, operando continuamente a uma pressão de 0,013 bar, as principais características desses alimentos permaneceram inalteradas e a concentração de vitamina C e compostos voláteis não tiveram perdas muito significativas. Estudos comparativos na secagem de suco de laranja em secadores tipo *spray dryer*, liofilizador e microondas sob vácuo conduziram os mesmos resultados descritos por HUELDT (1974).

Experimentos realizados por DROUZAS & SHUBERT (1996) ao secarem bananas em fatias, em um secador de microondas a vácuo, verificaram que a qualidade do produto varia significativamente com a temperatura e a potência de operação. Segundo estes autores

a variação de pressão não influencia muito na secagem e que piores resultados foram obtidos quando o processo foi conduzido a altas pressões.

Estudos feitos por FORWALTER (1978) em uma unidade piloto operando em batelada, verificou que ao secar cereais a uma pressão de 0,03 bar a temperatura de secagem diminuiu significativamente de 93,3⁰C para 51,7⁰C.

DROUZAS *et al.* (1999) verificaram que ao secarem gels de frutas, em um forno de microondas doméstico dotado de um dessecador de vidro, a potência de operação está diretamente relacionada a qualidade do produto, a potências mais altas a secagem é mais completa assim como o seu aspecto colorimétrico melhorou.

A secagem de materiais biológicos como proteínas, enzimas e hormônios utilizando essa técnica tem sido pouco explorada. Encontram-se na literatura poucas referências, sendo os métodos convencionais os mais estudados, nos quais podemos citar a secagem por liofilização e por atomização.

Cabe ressaltar que DERMELJ *et al.* (1995) estudaram o efeito da secagem de proteínas contida em *Urtica urens* por microondas sob vácuo. Segundo estes autores a concentração de proteína está diretamente relacionada com o tempo e o modo de operação (Tabela V.2)

Tabela V.2 Valores médios baseados em três determinações na secagem por microondas sob vácuo de proteínas contida em *Urtica urens*.

Amostra	Modo de Operação	Tempo de Operação (min)	Potência (W)	Proteína (%)
1 ⁺	-	-	-	18,1
2	n	1	300	17,7
3	n	-	300	18,7
4	n	5	300	17,9
5	n	7	300	18,3
6	n	10	300	20,3
7	n	15	300	20,8
8	n	1	600	18,1
9	n	3	600	18,5
10	n	5	600	18,4
11	n	7	600	18,1
12	n	10	600	18,9
13	n	15	600	19,0
14	i	1	300	17,4
15	i	3	300	18,4
16	i	5	300	17,6
17	i	7	300	18,4
18	i	10	300	19,4
19	i	15	300	18,3
20	i	1	600	18,2
21	i	3	600	19,0
22	i	5	600	18,6
23	i	7	600	17,8
24	i	10	600	17,4
25	i	15	600	17,9

+ Amostra original

n Normal

i Impulso (metodologia não escrita)

Fonte: DERMELJ *et al.*, 1995

Segundo GUNASEKARAN (1999) a secagem por microondas sob vácuo pulsada é conveniente para produtos sensíveis ao calor, tais como enzimas e proteínas. Este método tem um menor gasto de energia e resulta num produto de melhor qualidade. No geral, quanto menor o ciclo de operação e maior a taxa de pulsos, melhor a utilização da energia e menor o custo energético.

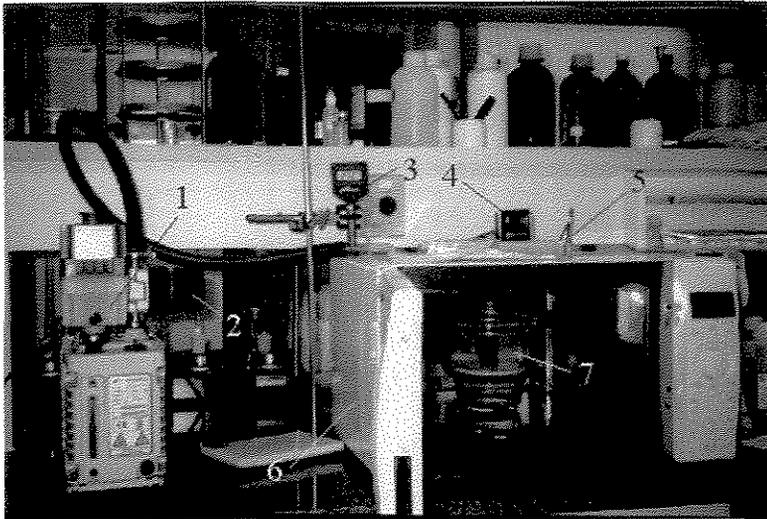
DROUZAS & SHUBERT (1996) obtiveram melhores resultados na secagem de fatias de bananas quando a potência foi operada de forma pulsada. De acordo com estes autores foram obtidos menores teores de umidade e de atividade de água. Em estudos comparativos realizados por estes autores revelaram que algumas características como: cor, sabor, aroma e forma foram as mesmas quando algumas amostras foram liofilizadas.

V.2 Parte Experimental

V.2.1 Secador de microondas à vácuo

O secador utilizado nos experimentos foi construído através de um forno de microondas convencional da marca BRASTEMP modelo 38 MWO. Neste forno o seu interior é constituído de aço inoxidável o que faz com que as microondas reflitam por todas as direções, ocasionando uma secagem mais homogênea.

Na parte superior do forno foram feitos dois orifícios na qual um deles foi adicionado um termopar do tipo J, que foi previamente calibrado com o intuito de verificar a variação da temperatura interna, sendo esta registrada através de um controlador de temperatura da marca OMRON modelo E5CN. A medida da temperatura interna no microondas foi apenas qualitativa. Em um outro orifício de 80 mm de diâmetro teve como finalidade permitir a saída da torneira de vácuo da tampa de um dessecador que foi colocado no seu interior, de forma que a entrada de vácuo ficou posicionada para fora. Nesta entrada foi adicionada uma mangueira ligada diretamente a uma conexão de latão em forma de T unindo o dessecador a um bomba de vácuo de modelo RV5 da EDWARDS na qual foi adaptada uma válvula reguladora de pressão, que operou na faixa de 0,63 a 0,06 bar. Na saída rosqueada da conexão foi adicionado um manômetro digital da COLE-PALMER com o intuito de registrar a pressão interna do dessecador (Figura V.1).



1. Bomba de vácuo;
2. Válvula reguladora de pressão;
3. Manômetro;
4. Controlador de temperatura;
5. Termopar J;
6. Forno de Microondas;
7. Dessecador com amostra.

Figura V.1 Secador de microondas à vácuo

V.2.2 Metodologia

V.2.2.1 Planejamento experimental

Para otimizar os experimentos e as condições de secagem foi utilizado a técnica do planejamento experimental que consistiu no planejamento em estrela com investigação de dois fatores em cinco níveis.

Os níveis escolhidos para as variáveis independentes estão citados nas Tabelas V.3 e V.4.

Tabela V.3 Níveis das variáveis estudadas

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Pressão P (bar)	0,63	0,55	0,34	0,14	0,06
Potência Q (W)	200	300	550	800	900

Tabela V.4 Matriz do planejamento fatorial.

Ensaio	Pressão (P)	Potência (Q)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	$-\sqrt{2}$	0
9	$+\sqrt{2}$	0
10	0	$-\sqrt{2}$
11	0	$+\sqrt{2}$

V.2.2.2 Metodologia da secagem

Para cada experimento de secagem foi utilizado aproximadamente 5,0 mL de caldo enzimático que foi colocado no interior de um dessecador e desidratado conforme as variáveis do planejamento experimental.

V.3 Resultados e Discussão

V.3.1 Estudo cinético da secagem e modelagem matemática

Com o intuito de avaliar o melhor tempo para ser utilizado no planejamento experimental, inicialmente foram realizados estudos cinéticos da secagem a uma pressão e potência estipulados conforme descrito na Tabela V.3 e V.4.

Os resultados obtidos foram ajustados pelo modelo empírico modificado para secagem por microondas à vácuo.

A Figura V.2 mostra a influência do tempo de secagem em função da umidade residual.

Os valores dos parâmetros de ajuste e o coeficiente de correlação estão na Tabela V.5.

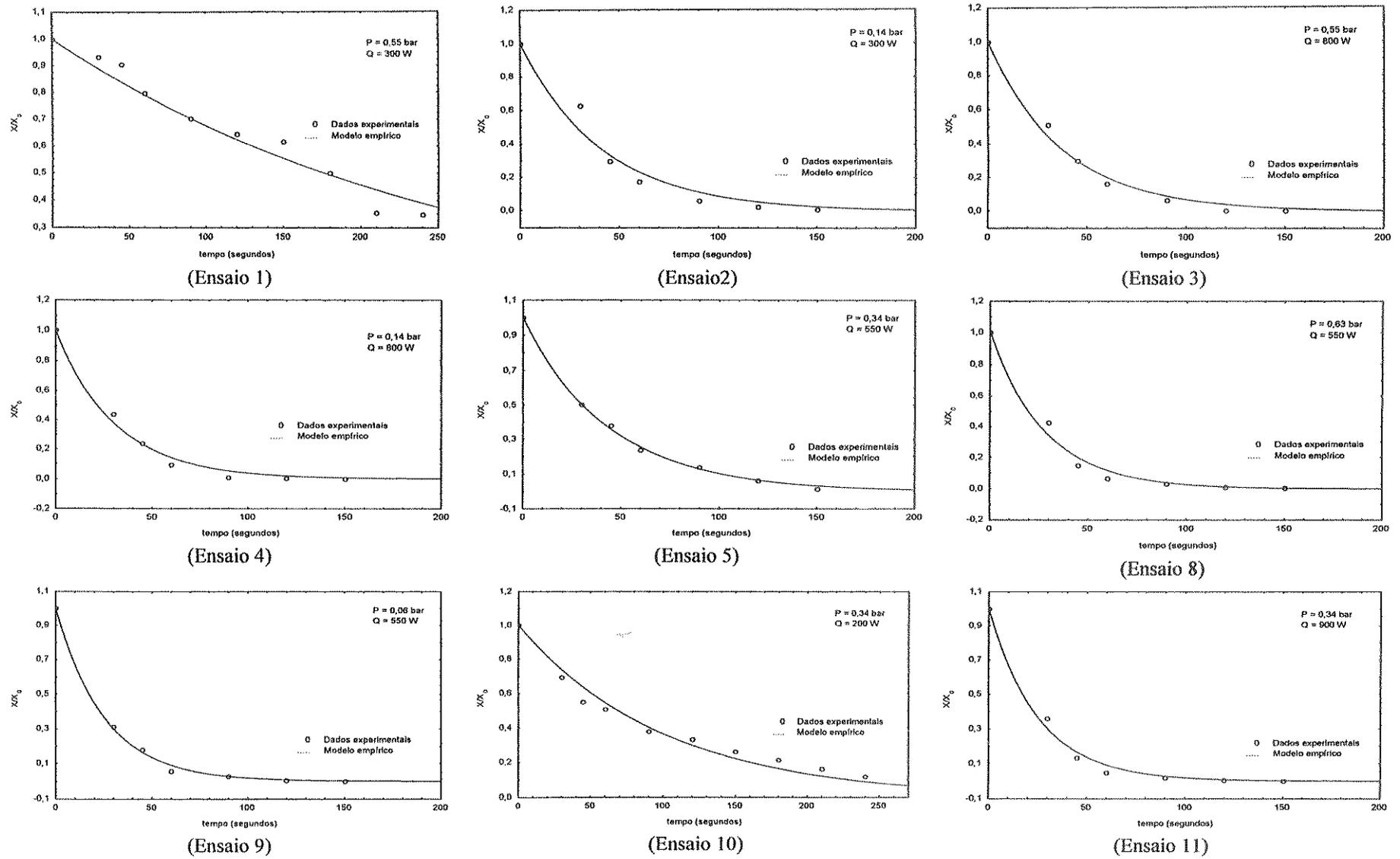


Figura V.2 Perda de massa em função do tempo referente aos ensaios da Tabela V.4.

Tabela V.5 Parâmetros de ajuste do modelo empírico.

<i>Variáveis</i>	k_0 (W.bar/s)	k_1	k_2	R^2
P = 0,55 bar Q = 300 W	0,0111	-0,1691	0,1277	0,9799
P = 0,14 bar Q = 300 W	0,02096	0,0652	0,1109	0,9821
P = 0,55 bar Q = 800 W	0,0343	-0,0269	0,1110	0,9949
P = 0,14 bar Q = 800 W	0,0270	0,0599	0,1111	0,9941
P = 0,34 bar Q = 550 W	0,0487	-0,0974	0,1331	0,9991
P = 0,63 bar Q = 550 W	0,0575	-0,0671	0,11205	0,9926
P = 0,06 bar Q = 550 W	0,0674	-0,0167	0,1480	0,9990
P = 0,34 bar Q = 200 W	0,0096	0,0316	0,1131	0,9853
P = 0,34 bar Q = 900 W	0,0303	0,0571	0,1064	0,9958

Através da Figura V.2 foi verificado que num intervalo de 150 segundos praticamente o caldo enzimático foi desidratado, salvo apenas quando as amostras foram processadas a baixa potência e vácuo. Foi verificado também que a secagem foi praticamente completa em 120 segundos quando o equipamento foi operado com altos valores de potência e a baixas pressões, concluindo que o tempo de secagem é influenciado principalmente por altos valores de potência e a alto vácuo. Estas observações foram semelhantes as descritas por DROUZAS & SCHUBERT (1996) que utilizaram banana como material de pesquisa.

Foi verificado através do ajuste do modelo empírico estudado que as constantes k_0 , k_1 e k_2 foram muito baixos. Esta observação também foi relatada por DROUZAS *et al.* (1999) ao utilizarem géis de frutas, obtendo resultados semelhantes ao deste trabalho.

V.3.2 Estudo da influência da pressão e da potência na atividade enzimática e na atividade de água do material desidratado

Nesta etapa do trabalho foi verificado a influência da pressão e da potência sobre a atividade enzimática (AE) e sobre a atividade de água (a_w), conforme o planejamento descrito anteriormente a um tempo de secagem de 150 segundos.

V.3.2.1 Influência sobre a atividade enzimática

Conforme mostra a Tabela V.6 através do planejamento experimental foi verificado a influência das variáveis pressão e potência sobre a atividade enzimática do material desidratado.

Tabela V.6 Influência do planejamento experimental sobre a atividade enzimática.

<i>Ensaio</i>	<i>P (bar)</i>	<i>Q (W)</i>	<i>AE (U/mL)</i>
1	-1	-1	0,8332
2	+1	-1	0,8877
3	-1	+1	0,4583
4	+1	+1	0,2611
5	0	0	0,5101
6	0	0	0,5074
7	0	0	0,5313
8	$-\sqrt{2}$	0	0,8675
9	$+\sqrt{2}$	0	0,1417
10	0	$-\sqrt{2}$	0,7776
11	0	$+\sqrt{2}$	0,6349

V.3.2.1.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade enzimática

A Tabela V.7 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de segunda ordem analisando a atividade enzimática (AE) em função das variáveis independentes pressão (P) e potência (Q).

Tabela V.7 Coeficientes de regressão estimados

Fatores		Coefficiente de Regressão
Média		0,516250
P (bar)	(L)	-0,146195
P (bar)	(q)	-0,004825
Q (W)	(L)	-0,150787
Q (W)	(q)	0,096604
P x Q (bar x W)		-0,062925

onde: (L) coeficiente linear

(q) coeficiente quadrático

Através dos resultados obtidos pela Tabela V.7 foi possível obter um modelo empírico codificado que ficaria da seguinte forma:

$$AE = 0,516250 - 0,146195P - 0,150787Q - 0,062925PQ - 0,004825P^2 - 0,096604Q^2 \quad (V.2)$$

A validade do modelo foi verificada pela Tabela V.8, através da Análise da Variância (ANOVA), calculada para todos os parâmetros e o $F_{\text{calculado}}$ que foi comparado com o F_{tabelado} a 95% de confiança.

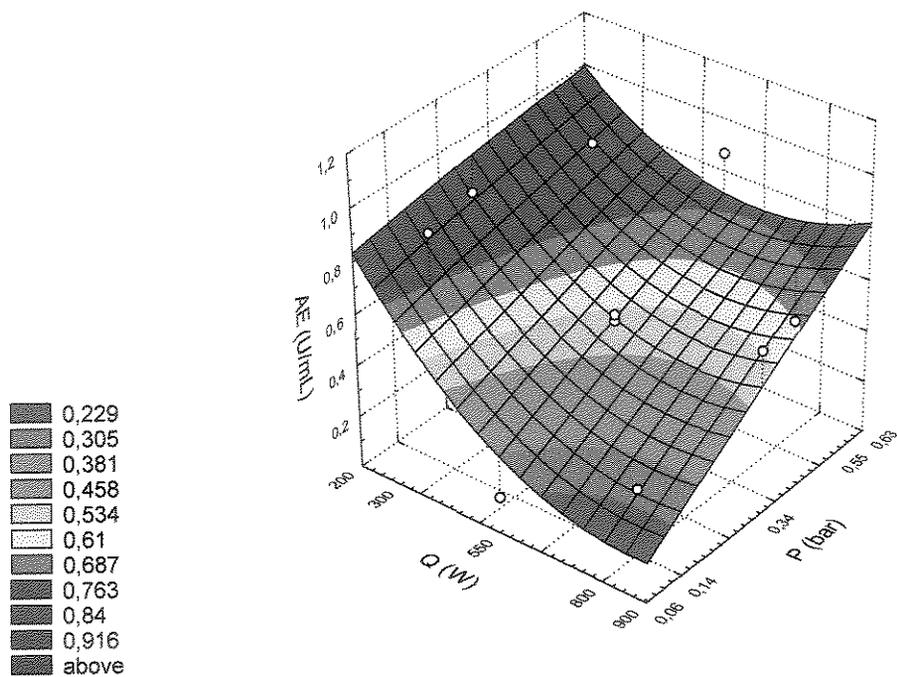
Tabela V.8 Tabela ANOVA para o planejamento experimental em estrela

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	0,426597	5	0,0853194
Resíduos	0,177966	5	0,0355932
Falta de ajuste	0,177623	3	0,0587433
Erro puro	0,000343	2	0,0001715
Total	0,604563	10	

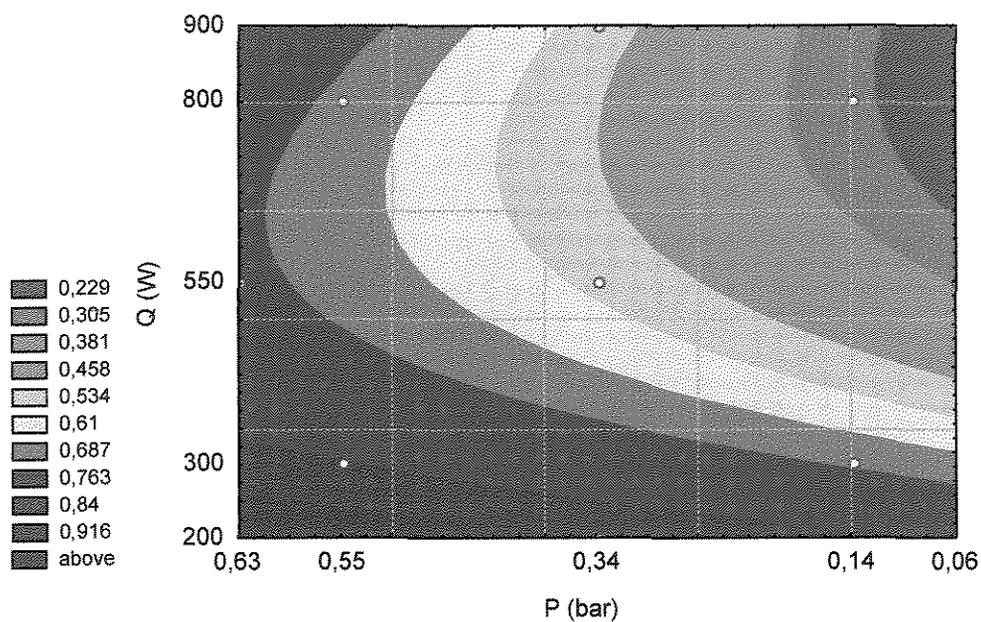
Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,70563$

Através do modelo que considera todos os efeitos estimados foi obtida a superfície de resposta [Figura V.3 (a) e (b)], permitindo a análise da influência da pressão e da potência de operação sobre a atividade enzimática do material desidratado.

A análise da ANOVA revelou que $F_{cal.}$ foi menor que $F_{tab.}$ no nível de confiança de 95%, sendo o modelo representado pela Equação V.2 não-preditivo, o que não pode ser utilizado como modelo empírico estatístico do processo.



(a)



(b)

Figura V.3 Superfície do planejamento em estrela para a atividade enzimática (a) Superfície de resposta; (b) Curva de nível da superfície quadrática.

O planejamento experimental revelou que a pressão não influencia muito na atividade enzimática do material desidratado. Todavia a variação da potência no processo de secagem está diretamente relacionada com a desidratação do material e com a atividade enzimática. A Figura V.3 mostra que melhores resultados foram obtidos quando o processo foi conduzido a baixos valores de potência, situado na região de 200 e 300 W. Com o aumento da potência piores foram os resultados e, quando o processo foi realizado em baixas pressões e a altos valores de potência houve uma perda significativa da atividade enzimática. Estas mesmas observações também foram relatadas por DROUZAS & SCHUBERT (1996) e DROUZAS *et al.* (1999) ao secarem bananas e géis de frutas. Segundo estes autores a pressão não influencia muito no processo de secagem, porém quando os experimentos foram conduzidos a baixas pressões o material apresentou pior qualidade. A influência de cada variável no processo está ilustrado na Figura V.4, na qual a potência apresenta maior efeito.

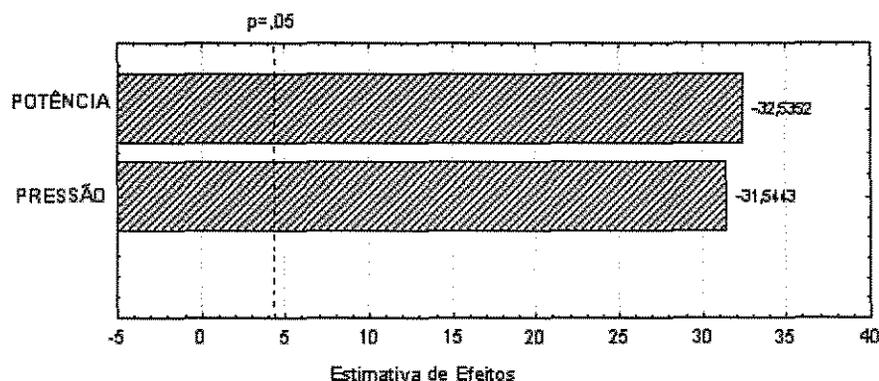


Figura V.4 Histograma de Pareto em função de AE

V.3.2.2 Influência sobre a atividade de água

Nesta segunda etapa foi verificada a influência das variáveis pressão e potência sobre a atividade de água do material desidratado, conforme mostra a Tabela V.9.

Tabela V.9 Resultados da atividade de água sobre o planejamento fatorial.

<i>Ensaio</i>	<i>P (bar)</i>	<i>Q (W)</i>	<i>a_w</i>
1	-1	-1	0,936
2	+1	-1	0,682
3	-1	+1	0,533
4	+1	+1	0,371
5	0	0	0,722
6	0	0	0,597
7	0	0	0,538
8	$-\sqrt{2}$	0	0,394
9	$+\sqrt{2}$	0	0,335
10	0	$-\sqrt{2}$	0,436
11	0	$+\sqrt{2}$	0,903

V.3.2.2.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade de água

A Tabela V.10 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de segunda ordem analisando a atividade de água (a_w) em função das variáveis independentes pressão (P) e potência (Q).

Tabela V.10 Coeficientes de regressão estimados.

Fatores	Coefficiente de Regressão
Média	0,634590
P(bar) (L)	-0,068097
P (bar) (q)	-0,127283
Q (W) (L)	0,088291
Q (W) (q)	0,014265
P x Q (bar x W)	0,293939

onde: (L) coeficiente linear

(q) coeficiente quadrático

Através dos resultados obtidos pela Tabela V.10 foi possível obter um modelo empírico codificado que ficaria da seguinte forma:

$$a_w = 0,634590 - 0,068097P + 0,088291Q + 0,293939PQ - 0,127283P^2 + 0,014265Q^2 \quad (V.3)$$

A validade do modelo foi verificada pela Tabela V.11, através da Análise da Variância (ANOVA), calculada para todos os parâmetros e o $F_{\text{calculado}}$ que foi comparado com o F_{tabelado} a 95% de confiança.

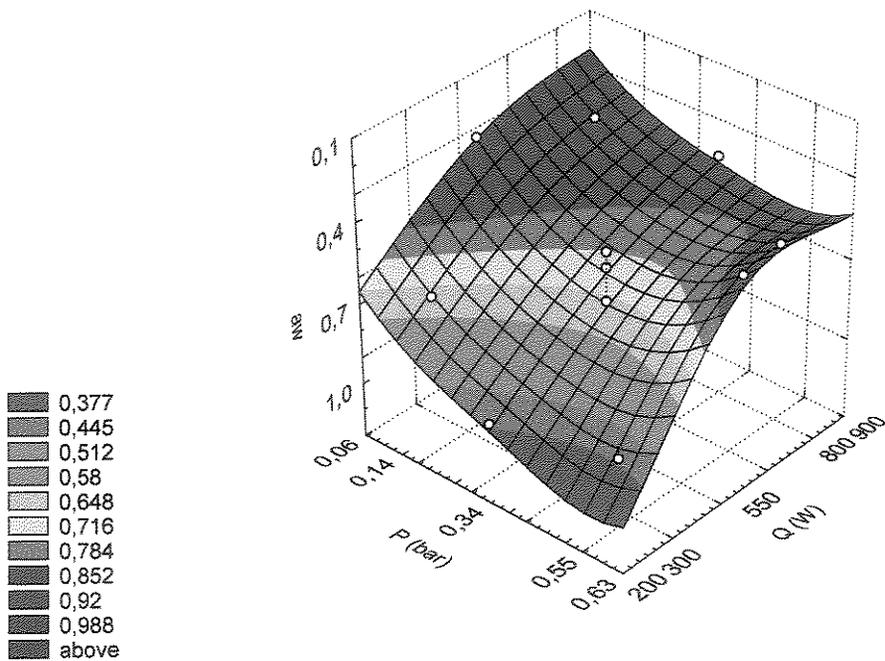
Tabela V.11 Tabela ANOVA para o planejamento experimental em estrela.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	0,320477	5	0,0640954
Resíduos	0,104048	5	0,0208096
Falta de ajuste	0,086394	3	0,028798
Erro puro	0,017654	2	0,008827
Total	0,424525	10	

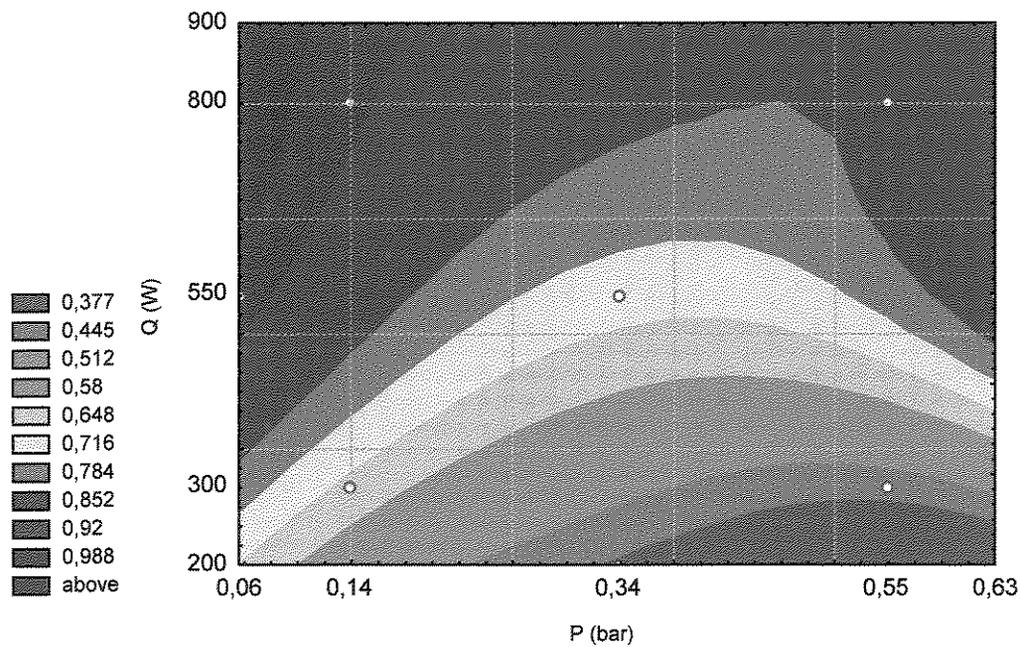
Coefficiente de correlação: $R^2 = 0,75491$

Através do modelo que considera todos os efeitos estimados foi obtida a superfície de resposta [Figura V.5 (a) e (b)], permitindo a análise da influência da pressão e da potência na atividade de água.

Através da análise da ANOVA foi verificado que $F_{\text{cal.}}$ foi menor que $F_{\text{tab.}}$ no nível de confiança de 95 %, sendo o modelo representado pela Equação V.3 não-preditivo, o que não pode ser utilizado como modelo empírico estatístico do processo.



(a)



(b)

Figura V.5 Superfície do planejamento em estrela para a atividade de água (a) Superfície de resposta; (b) Curva de nível da superfície quadrática.

Através da análise de superfície de resposta do planejamento experimental foi verificado que a atividade de água é influenciada principalmente pela potência de operação. Melhores resultados foram obtidos quando o processo foi conduzido a altos valores de potência e pressão.

A combinação linear da pressão e da potência juntos apresentaram o maior efeito na atividade de água, sendo que a potência teve uma maior representatividade no modelo (Figura V.6).

Cabe ressaltar também que melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos quando o processo foi conduzido com baixos valores de potência, todavia menores valores de atividade de água foram obtidos com altos valores de potência. Melhores resultados podem ser obtidos quando o processo for realizado próximo ao ponto central. Neste caso o produto desidratado terá uma boa atividade enzimática e uma baixa atividade de água. No caso o melhor resultado foi obtido no ensaio de número 8.

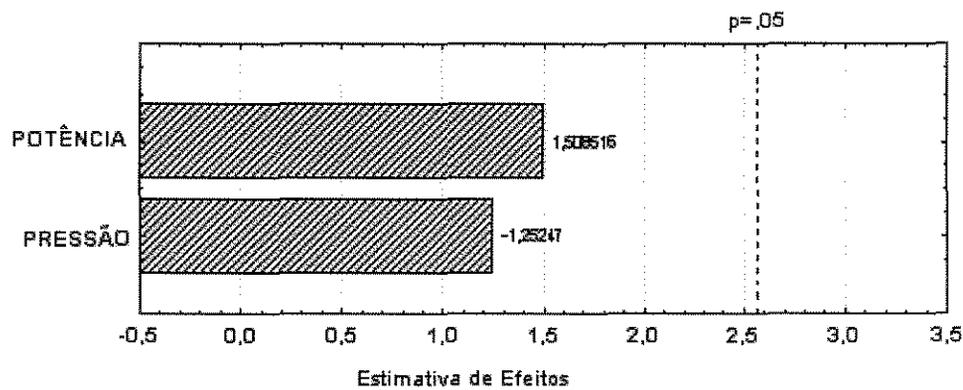


Figura V.6 Histograma de Pareto em função de a_w

V.3.3 Análise morfológica

A análise morfológica do material desidratado foi realizado em duas magnitude distintas (300x e 1000x), com o intuito de verificar a estrutura sólida formada e alguns detalhes mais relevantes.

Foram realizadas análises de MEV para as amostras referentes aos ensaios 4, 6, 8, 9 e 11 (Figura V.7).

A escolha destas amostras foram devidas a elas apresentarem baixa umidade (condição operacional do equipamento) e algumas delas apresentaram alta ou baixa atividade enzimática.

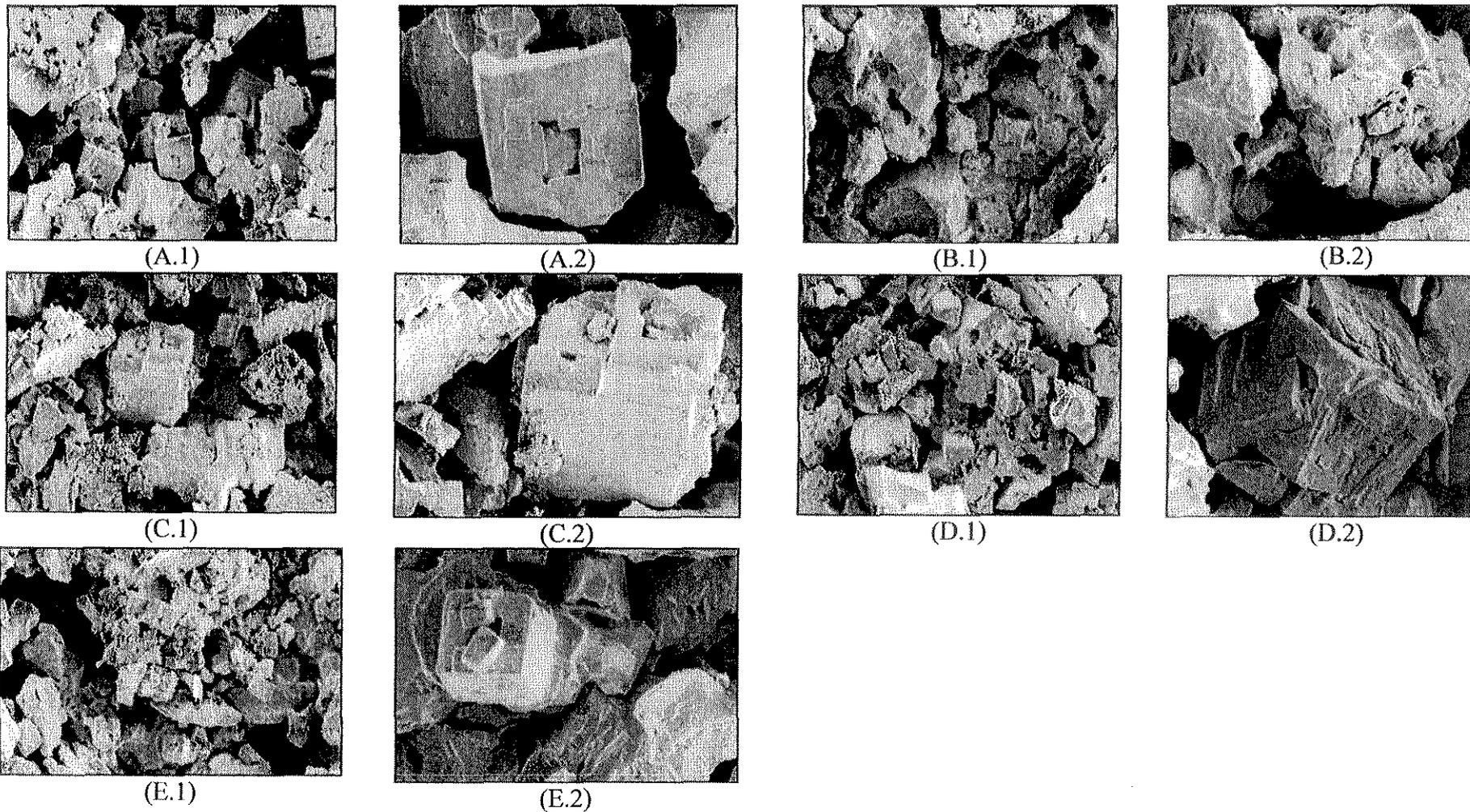


Figura V.7 Fotomicrografia eletrônica de varredura de α -amilase desidratada; onde: (A.1) corresponde ao ensaio de número 4 a uma magnitude de 300 x; (A.2) corresponde ao ensaio de número 4 a uma magnitude de 1000 x; (B.1) corresponde ao ensaio de número 6 a uma magnitude de 300 x; (B.2) corresponde ao ensaio de número 6 a uma magnitude de 1000 x; (C.1) corresponde ao ensaio de número 8 a uma magnitude de 300 x; (C.2) corresponde ao ensaio de número 8 a uma magnitude de 1000 x; (D.1) corresponde ao ensaio de número 9 a uma magnitude de 300 x; (D.2) corresponde ao ensaio de número 9 a uma magnitude de 1000 x; (E.1) corresponde ao ensaio de número 11 a uma magnitude de 300 x; (E.2) corresponde ao ensaio de número 11 a uma magnitude de 1000 x.

As análises de MEV revelaram que a maioria das amostras desidratadas apresentaram geometria cúbica e relativamente grande, o que possivelmente ocasionou a sua pouca solubilidade em água.

V.3.4 Isoterma de sorção

A isoterma de secagem foi realizada apenas para o oitavo ensaio do planejamento experimental, por apresentar baixa atividade de água e a uma dos maiores valores de atividade enzimática.

A Figura V.8 apresenta o ajuste dos dados experimentais obtidos com os modelos de BET e GAB.

O modelo de BET também foi ajustado para valores de a_w até 0,450, conforme a Figura V.9.

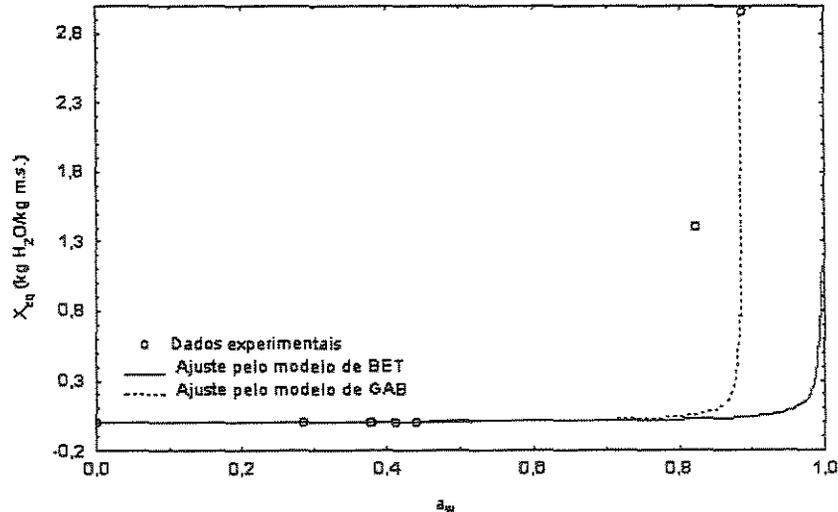


Figura V.8 Isoterma de sorção de α -amilase desidratada ajustado pelos modelos de BET e GAB.

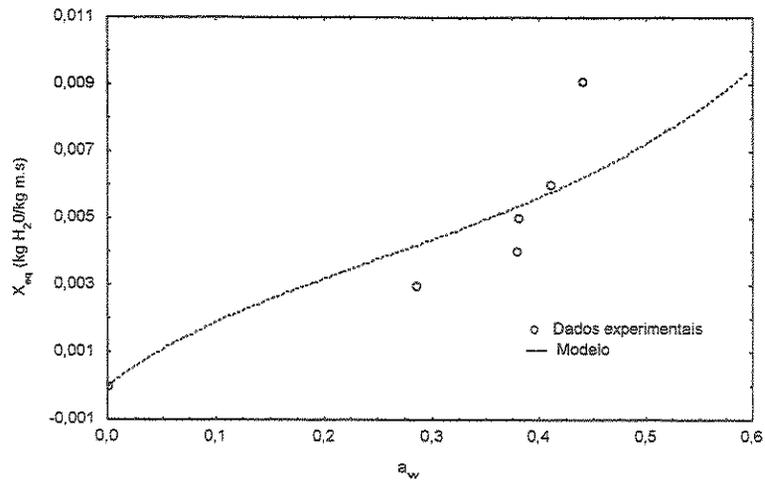


Figura V.9 Isotherma de sorção de α -amilase ajustada pelo modelo de BET com a_w até 0,450.

A Figura V.10 mostra o ajuste da isoterma de secagem referente ao modelo empírico de HENDERSON.

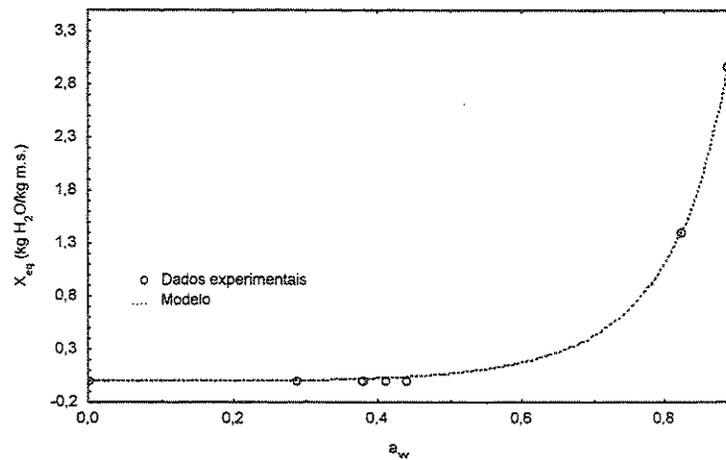


Figura V.10 Isotherma de sorção de α -amilase ajustada pelo modelo de HENDERSON.

Tabela V.10 Parâmetro de ajuste dos modelos de BET, GAB e HENDERSON.

<i>Modelo</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Coefficiente de correlação (R^2)</i>
BET	$X_m = 0,0042$ $C = 87592,1$	0,9032
BET (com a_w até 0,450)	$X_m = 0,0041$ $C = 6,19226$	0,8666
GAB	$X_m = 0,0043$ $C = 91464,43$ $K = 1,1245$	0,9846
HENDERSON	$K = 0,06243$ $C = 0,31061$	0,9985

Através dos resultados obtidos foi verificado que o modelo de HENDERSON ajustou melhor os dados experimentais, entre os dois modelos teóricos o modelo de GAB foi considerado o melhor.

V.4 Conclusões

Neste capítulo foi verificado que:

- A secagem é influenciada principalmente pela potência de operação; melhores resultados foram obtidos quando o processo foi conduzido próximo ao ponto central, neste caso o melhor resultado foi obtido no ensaio de número 8;
- A secagem por microondas sob condições de vácuo apresenta-se como um método potencial pois houve uma boa preservação da atividade enzimática, além do reduzido tempo de operação, porém cabe ressaltar que o material apresentou pouca solubilidade em água;
- A potência e a pressão de operação influencia no tempo de secagem. Foi verificado que quanto maior o valor da potência e maior o vácuo formado (valores menores de pressão), a secagem foi completa em um tempo menor.

CAPÍTULO VI

SECAGEM DE α -AMILASE POR LIOFILIZAÇÃO

Neste capítulo serão abordados os aspectos teóricos e os mais relevantes na secagem por liofilização.

Serão descritas as técnicas e as metodologias experimentais utilizadas na secagem de α -amilase, bem como os resultados obtidos.

VI.1 Introdução

A secagem por sublimação também conhecida como liofilização consiste em um processo de desidratação do material através da sublimação da parte congelada a baixas temperaturas e sob vácuo.

A fim de congelar toda a água não ligada, o produto é levado geralmente a temperaturas compreendidas entre -40 e -60°C ; a sublimação propriamente dita é realizada em torno de -30 à -40°C (SANTIN, 1996). No caso de materiais biológicos a temperatura de secagem varia de -5 à -40°C (ADAMIEC *et al.*, 1995).

Os produtos processados por esta técnica sofrem mínima degradação química, física e microbiológica. Portanto, a desnaturação de proteínas, reações de caramelização de açúcares, de oxidação de lipídeos e enzimáticas quase não ocorrem (ALCAIDE & LOBRAÑA, 1983).

Por outro lado, a secagem por liofilização pode apresentar algumas desvantagens, como: contração do produto, perda e má retenção de água, de aromas e materiais voláteis (ALCAIDE & LOBRAÑA, 1983).

O custo operacional pode ser considerado um fator limitante na escolha deste processo. Para que a secagem seja completa são necessárias pressões abaixo de 5,33 mbar (evaporação do estágio de congelamento), além do alto gasto de energia para a refrigeração e para a obtenção do vácuo desejado, ocasionando um longo tempo de secagem, o que encarece muito o processo (DROUZAS *et al.*, 1999; LOBRAÑA & VILLARÁN, 1997).

Devido aos problemas expostos anteriormente a liofilização é utilizada apenas para produtos com alto valor agregado (GALUCCI & FREIRE, 1997).

Um sistema de liofilização é constituído basicamente de uma câmara de secagem ou de vácuo, condensador de vapor d'água, sistema de vácuo e alguns sistemas complementares tais como: válvulas de vácuo (manifold) e sistema de refrigeração (ALCAIDE *et al.*, 1978).

A etapa de congelamento do material corresponde à fase inicial da liofilização e tem grande importância para que se obtenha um produto de boa qualidade. Como é o congelamento que define o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo formados no produto, as outras etapas (sublimação e desorção) são diretamente dependentes da primeira (LUCAS *et al.*, 1997).

De acordo com ALCAIDE *et al.* (1978) quanto maior a temperatura de congelamento do material maior será a pressão de vapor da água e conseqüentemente menor será o tempo de secagem, diminuindo significativamente o consumo de energia.

Segundo ADAMIEC *et al.* (1995) o congelamento de materiais biológicos como microorganismos é favorecido por altas taxas de congelamento, pois há formação de pequenos cristais de gelo que são distribuídos uniformemente, o que não causa danos mecânicos às células. De acordo com estes autores, a velocidade inicial de congelamento é

diferente para cada microorganismo e biopolímeros e que a uma baixa taxa de congelamento há formação de grandes cristais de gelo podendo danificar mecanicamente algumas estruturas celulares tais como a membrana citoplasmática, além da alta desidratação celular devido ao aumento da concentração eletrolítica de sais.

Estudos realizados por ALCAIDE *et al.* (1978) verificaram também que quanto menor o tempo de congelamento menor o tempo de liofilização, porém maior o teor de umidade residual. Segundo estes autores a formação de cristais de gelo maiores e de poros facilita a saída de vapor restante da sublimação, e ao mesmo tempo a água retida por adsorção é menor por ser pequena a superfície específica do produto seco.

LUCAS *et al.* (1997) verificaram a influência do congelamento na secagem do sangue bovino por nitrogênio líquido, vapor de nitrogênio e em *freezer*. Estes autores observaram que o congelamento não causou influência significativa em relação aos teores de proteínas e de ferro, porém a influência foi razoável para os teores de gordura, umidade e solubilidade. Segundo estes autores o congelamento em *freezer* ocasionou menor tempo de processo quando o produto é destinado ao enriquecimento nutritivo de alimentos. Todavia, para utilização em fins mais nobres, a técnica com nitrogênio líquido mostrou-se mais adequada, pois houve uma total preservação das células.

Os processos de congelamento e secagem podem causar danos irreversíveis a proteínas lábeis, ocasionando desnaturação estrutural, agregação sobre a rehidratação após a secagem, além da perda de sua função biológica. O congelamento está associado ao aumento da concentração de todas as substâncias solúveis em água, podendo atingir concentrações de 20 a 50 vezes maior que suas concentrações iniciais. A desnaturação por congelamento é irreversível e devida a rápida agregação, seguida de um desdobramento e/ou uma dissociação sub-unitária (FRANKS & HATLEY, 1991; HELLER *et al.*, 1997; HELLER *et al.*, 1999).

Para reduzir os problemas da liofilização, geralmente são adicionadas formulações estabilizadoras de proteínas, como: açúcares, polióis, amino-ácidos ou polímeros, sendo necessários, às vezes, o uso de estabilizadores múltiplos. Em alguns casos também são adicionados agentes inertes para garantir uma boa estética do produto. A formulação final pode resultar em uma mistura complexa de substâncias macromoleculares e sais tamponantes (HELLER *et al.*, 1997).

O sucesso de uma formulação requer não apenas um entendimento das interações entre os componentes da formulação mais também uma estimativa para comportamentos físicos de formulações sob condições do processo de secagem e congelamento. As condições que podem ser fortemente variadas durante a porção congelada de um ciclo de liofilização incluem velocidades de congelamento, grau de congelamento e o tempo de tratamento térmico de enrijecimento. Estes parâmetros afetam a formação de gelo e a morfologia, o grau de supercongelamento, a concentração e a formação de cristais. Em geral o congelamento lento leva à formação de grandes cristais de gelo, e tendência a um máximo de soluto concentrado por congelamento numa fase sem gelo, e pode permitir incompatibilidades entre solutos, ocasionando a separação de fases. Velocidades de congelamento maiores tendem a aumentar a velocidade de nucleação e o crescimento de cristais de gelo, além do aumento da área superficial do gelo. Velocidades de congelamento mais rápidas também tendem a criar estados de não-equilíbrio ou metaestável, resultando em uma quantidade maior de água descongelada e promovendo formações de cristais. Os efeitos da velocidade de congelamento na estabilidade de proteínas não são nítidos, a maioria por causa da natureza complexa de soluções aquosas congeladas (HELLER *et al.*, 1997).

HELLER *et al.* (1997) ao liofilizarem hemoglobina recombinante (rHb 1.1) em uma solução tamponante contendo NaCl, verificaram que o uso de polietilenoglicol (PEG) e dextrana como estabilizadores, que o efeito do aumento da concentração pelo congelamento pode levar a separação de fase líquido-líquido. Segundo estes autores a separação ocorre a temperatura de -7°C e com a substituição de NaCl por KCl não ocorre separação. Esta substituição previne danos estruturais resultantes da separação de fases. Estes autores verificaram também que as mudanças estruturais não são decorrentes da mudança do pH.

Em um novo estudo HELLER *et al.* (1999) verificaram que o uso de manitol previne também danos estruturais a rHb 1.1. Segundo estes autores o grau de separação de fases pode ser diminuído pelo aumento da velocidade de congelamento da amostra. A separação de fase, embora termodinamicamente favorecida, é minimizada pela redução de tempo gasto no congelamento das amostras. De acordo com estes autores o uso de nitrogênio líquido resulta numa retenção estrutural da rHb 1.1 no sistema PEG/dextrana.

Estudos semelhantes também foram conduzidos por CORNELEY & REMON (1996) ao utilizarem a enzima lactato desidrogenase (LDH). Segundo estes autores ao secarem essa enzima na ausência de estabilizantes, 80% de sua atividade foi perdida. Ao

adicionarem açúcares como sacarose e maltose houve um aumento significativo na sua atividade. Estes autores verificaram também que melhores resultados foram obtidos utilizando-se maltodextrinas e PEG 8000 como estabilizadores.

Em outros estudos realizados por WARD *et al.* (1999) ao secarem a enzima L-asparaginase, observaram que na ausência de aditivos estabilizantes, o tetrâmero biologicamente ativo de massa molar igual a 134 kDa é quebrado originando um monômero inativo de 34 kDa. Ainda WARD *et al.* (1999) verificaram que a utilização de açúcares como lactose, sacarose, glicose e maltose e também o uso de manitol podem preservar a estrutura proteica e que quanto maior a concentração dos mesmos menos afetada será a estrutura tetramérica.

JIANG & NAIL (1998), utilizando três enzimas como modelo, verificaram que na ausência de sais tampões na secagem houve uma diminuição da atividade dessas três enzimas e, através de estudos comparativos, verificaram que quanto maior a concentração das mesmas, menores são as perdas de atividade. No mesmo estudo, estes autores verificaram também que o método de congelamento e o tipo de tampão afetam significativamente a atividade enzimática.

Um outro fator relevante na secagem por liofilização está diretamente relacionada com a pressão. Em princípio, seria desejável que a pressão total da câmara fosse a maior possível de tal modo que a pressão parcial de vapor d'água na câmara seja inferior a pressão de vapor na fase de sublimação. Por outro lado, a pressão total tem um limite, ao aumentar a pressão total da câmara chegar-se-á um momento em que a fase de sublimação receberá mais calor que necessário para a sublimação do gelo, e portanto haverá a fusão do produto. Neste momento a secagem será ocasionada por evaporação e não por liofilização, o que confere ao produto após seco uma apreciável perda de qualidade (ALCAIDE *et al.* 1978; ALCAIDE & LOBRAÑA, 1983)

ALCAIDE & LOBRAÑA (1983) verificaram que a pressão da câmara de vácuo não influencia a velocidade de secagem de alguns alimentos como suco de cenoura, gelatinas e champignon. Estes autores verificaram também que ao secarem sucos cítricos, a pressão era inversamente proporcional ao tempo de secagem.

Um outro fenômeno relevante que pode ocorrer durante o processo de liofilização está relacionada com a temperatura de colapso, sendo esta relacionada com a temperatura

de transição vítrea do soluto congelado, que representa a temperatura sobre a qual a matriz do soluto perde sua forma e conseqüentemente há uma diminuição de sua qualidade (KROKIDA *et al.*, 1998).

A presença de colapso significa que a temperatura do produto excedeu a temperatura de colapso e o material resultante não foi liofilizado.

Com a ocorrência de colapso o material desidratado perde significativamente a sua capacidade de reidratação e retenção de compostos voláteis. Uma outra característica do produto após a liofilização é seu aumento no volume com uma estrutura porosa muito grande, sendo susceptível a reações de oxidação. (KARATHANOS *et al.*, 1996).

Atualmente estão sendo propostos novos métodos de liofilização de modo a se tornar economicamente mais viável. Entre eles merece destaque a liofilização por imersão em um adsorvente (LIAM). Este processo tem como característica principal o uso opcional de vácuo e por ser facilmente adaptado para operações contínuas, ocasionando uma redução de tempo, pois elimina-se o tempo de parada do equipamento. Entre suas vantagens podemos citar sua considerável redução de energia, devido ao uso da fluidização. Custos com instalação e mão-de-obra são também possíveis de serem reduzidos, sendo que uma das suas principais desvantagens está no seu uso limitado, sendo utilizado apenas em produtos particulados, não fluidos (LOBRAÑA & VILLARÁN, 1997).

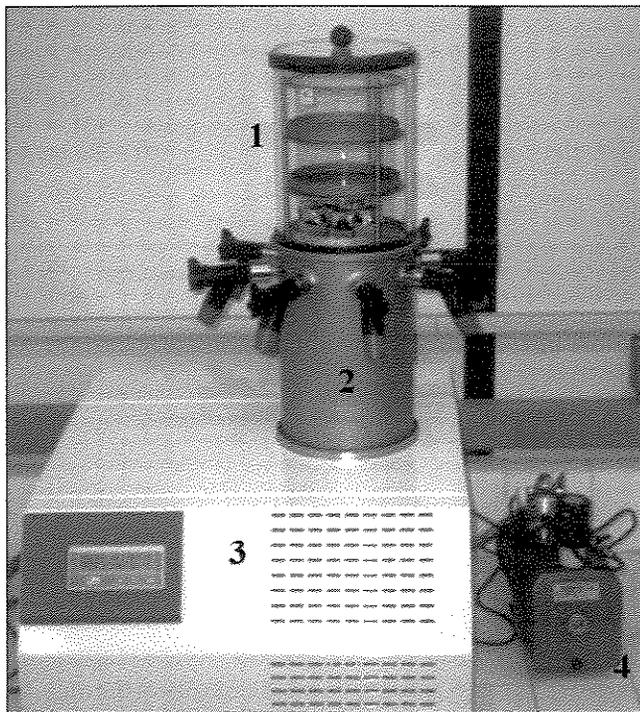
Segundo MERYMANN (1959) citado por LOBRAÑA & VILLARÁN (1997) a liofilização de produtos biológicos a pressões moderadas e mesmo sob certas condições a pressão atmosférica é possível. De acordo com MERYMANN (1959) mantendo-se a pressão parcial do vapor d'água ao redor do produto num nível bem abaixo do ponto triplo da água e na presença de um gás seco inerte, a pressão pode ser mantida a pressão atmosférica. Na prática, o processo é muito longo por causa das baixas taxas de transferência de calor e massa.

VI.2 Parte Experimental

VI.2.1 Liofilizador

A secagem por congelamento foi realizada em um liofilizador da marca TELSTAR Industrial S.L., modelo Cryodos –80.

O liofilizador utilizado nos experimentos é composto de uma câmara de aço inoxidável com oito saídas múltiplas de silicone (manifold) de 3/4” (18,7 mm) para conexão de frascos. Na parte superior da câmara há uma tampa construída em material acrílico transparente para a inspeção do condensador durante o processo. Na parte superior também pode ser adicionado um sistema composto de um cilindro de vidro que acopla um suporte com três bandejas. Na parte exterior há uma bomba de vácuo que está ligada diretamente ao liofilizador. A temperatura do processo atinge até -100°C e a pressão até 0,02 mbar (Figura VI.1).



1. Câmara de vidro com bandejas de aço inoxidável;
2. Manifold com saídas de silicone e serpentina interna;
3. Sistema de controle de refrigeração e pressão;
4. Bomba de vácuo

Figura VI.1 Liofilizador utilizado nos experimentos

VI.2.2 Metodologia

VI.2.2.1 Congelamento

As técnicas de congelamento utilizadas foram as seguintes: contato com nitrogênio líquido, contato com gelo seco e acetona e em *freezer* convencional.

As taxas de congelamento foram obtidas através da seguinte expressão:

$$W = \frac{0 - T}{\Delta t} \quad (\text{VI.1})$$

onde: W representa a taxa de congelamento [$^{\circ}\text{C}/\text{min}$];

T é a temperatura final de congelamento [$^{\circ}\text{C}$];

Δt o tempo de congelamento [min].

VI.2.2.2 Metodologia da secagem

Para cada experimento de secagem foram utilizados 5,0 mL do caldo enzimático que foi previamente congelado conforme as técnicas de congelamento citadas anteriormente. Logo em seguida as amostras foram liofilizadas em tempos diferentes (de quatro a vinte e quatro horas).

A temperatura de congelamento foi medida através de um controlador de temperatura da marca OMRON modelo E5CN acoplado com um termopar de entrada K, que foi previamente calibrado.

Para o congelamento em *freezer* utilizou-se um *freezer* vertical da marca Continental, modelo Elegance FC 23, que foi ajustado para o módulo *fast freezing* e graduação máxima de congelamento.

Durante o processo de liofilização a temperatura da câmara foi mantida em aproximadamente -90°C e a uma pressão de 0,048 mbar.

VI.3 Resultados e Discussão

VI.3.1 Taxas de congelamento

A Tabela VI.1 mostra as taxas de congelamento obtidas para nitrogênio líquido, gelo seco e acetona e em *freezer*, respectivamente.

Tabela VI.1 Taxas de congelamento

Método de congelamento	Temperatura (°C)	Tempo médio de exposição (min)	Taxa de congelamento (°C/min)
nitrogênio líquido	-195,8	1,89	103,60
gelo seco e acetona	-82,0	7,22	11,36
<i>freezer</i>	-35,0	243,00	0,14

VI.3.2 Influência da atividade enzimática e da atividade de água no tempo de liofilização

A Figura VI.2 mostra a influência da AE e da a_w sobre o tempo de liofilização para as três técnicas de congelamento em estudo.

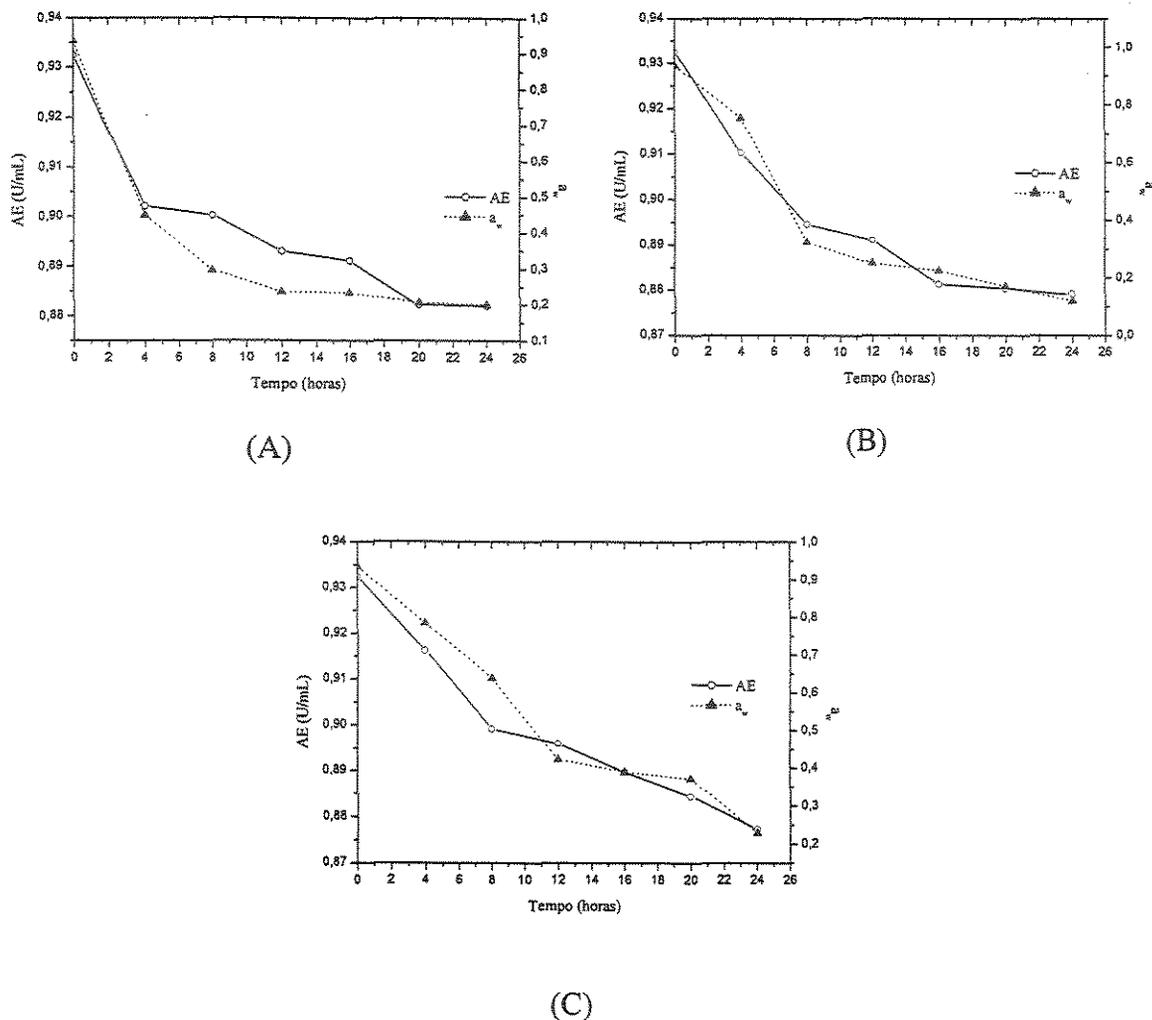


Figura VI.2 Influência do tempo de secagem sobre a AE e a_w ; onde (A) congelamento por nitrogênio líquido; (B) congelamento por gelo seco e acetona; (C) congelamento por *freezer* convencional.

A cinética de liofilização revelou que a atividade enzimática e a atividade de água decrescem com o tempo de secagem.

Os valores da atividade enzimática encontrado pelos três processos de congelamento foram praticamente semelhantes. Esse fato é devido α -amilase ser uma enzima termorresistente e estes resultados já eram esperados teoricamente. Porém, cabe ressaltar que quando o congelamento foi realizado com nitrogênio líquido a um período de quatro horas houve uma perda acentuada em sua atividade enzimática, porém a sua atividade de água caiu praticamente pela metade e a secagem foi quase completa.

Foi verificado também que quando o congelamento foi realizado com nitrogênio líquido e gelo e acetona, em um período de doze horas de processo, houve uma diminuição de 80% de sua atividade de água e o material foi praticamente desidratado e a secagem permaneceu praticamente constante ao longo do tempo. Resultados similares foram obtidos quando o congelamento foi realizado em *freezer*, a um período de vinte e quatro horas de processo.

Cabe ressaltar também que a solubilização do material desidratado decresceu com o tempo de processo, sendo que piores resultados foram obtidos quando o congelamento foi realizado em *freezer*.

VI.3.3 Análise Morfológica

As análises morfológicas foram realizadas através de MEV a uma magnitude de 300 vezes, foram feitas análises das amostras referentes aos ensaios de secagem de vinte e quatro horas de liofilização. A Figura VI.3 mostra a estrutura morfológica para cada tipo amostra liofilizada

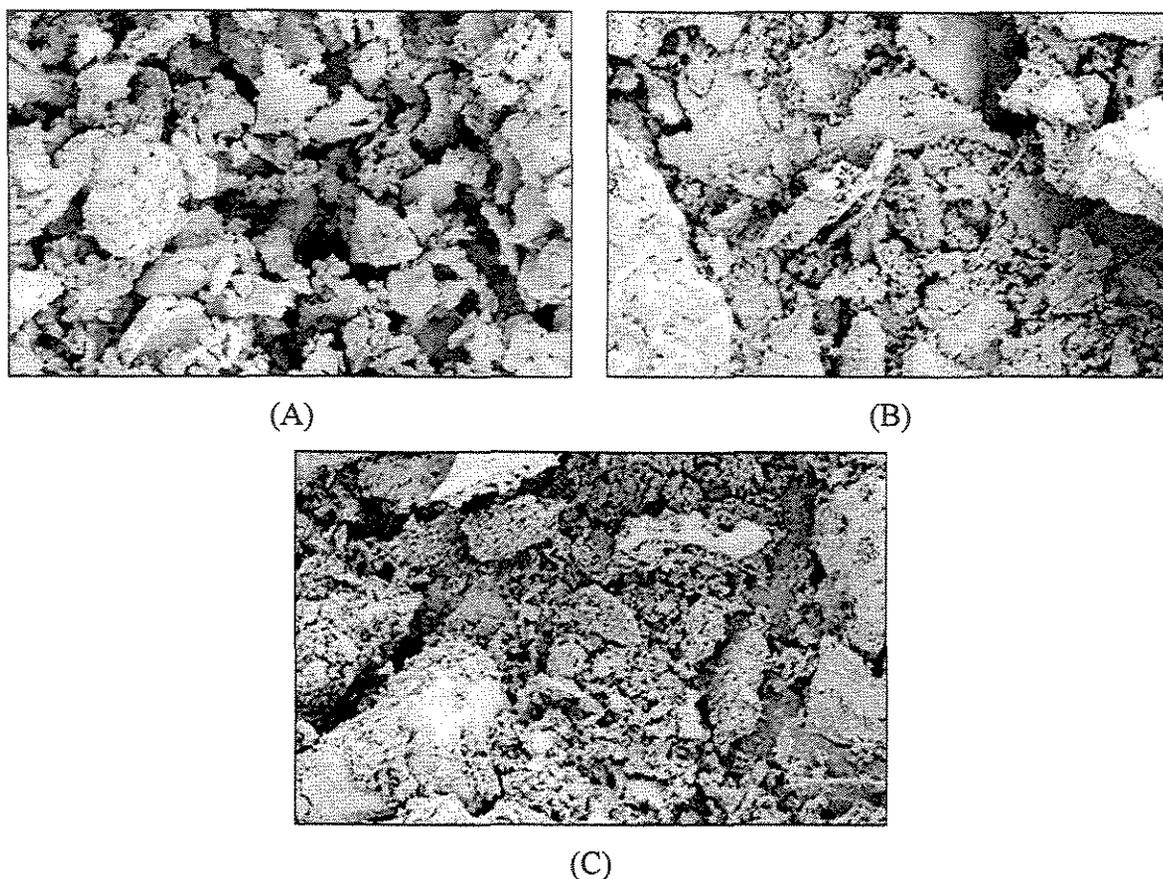


Figura VI.3 Fotomicrografia de α -amilase desidratada pelo processo de liofilização, onde (A) congelamento por nitrogênio líquido; (B) congelamento por gelo seco e acetona; (C) congelamento por *freezer* convencional.

O material desidratado pelas três técnicas apresentaram-se de forma laminar e sem estrutura morfológica definida, não podendo ser calculado seu diâmetro médio.

Pelas fotomicrografias foi verificado que houve a formação grandes aglomerados, sendo esta uma das prováveis razões de sua pouca solubilidade em água, o que comprova as observações feitas por FRANKS & HATLEY (1991).

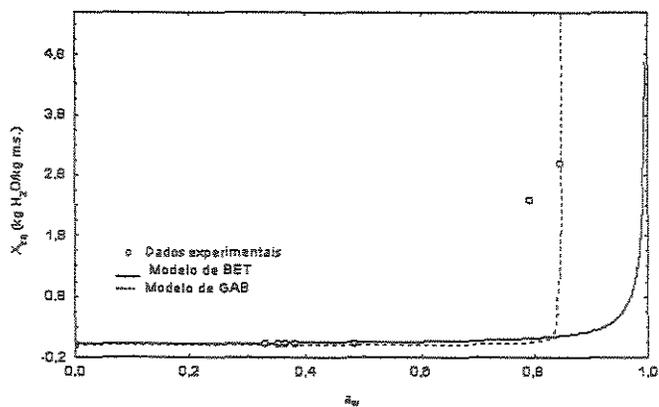
VI.3.4 Isotermas de sorção

As isotermas de secagem foram obtidas conforme descrito no Capítulo III. Para o seu levantamento foram utilizadas amostras desidratadas em um período de vinte quatro horas.

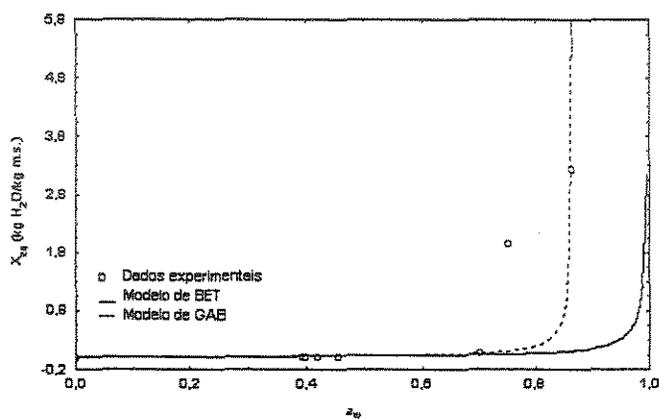
Com os resultados obtidos foram testados os modelos de BET, GAB e HENDERSON afim de se verificar qual destes modelos melhor representasse o fenômeno de sorção de umidade. O modelo de BET também foi ajustado para valores de a_w até 0,450.

A Figuras VI.4, VI.5 e VI.6 mostra as curvas e os ajustes obtidos através dos modelos testados.

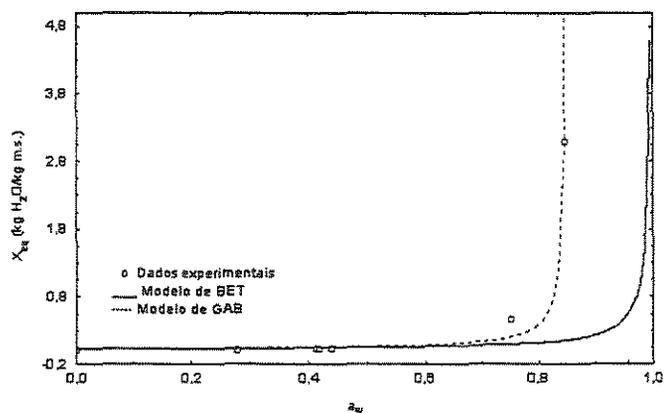
Com o intuito de avaliar qual a umidade na monocamada (X_m), foi verificado qual o melhor coeficiente de correlação para os dois primeiros modelos testados, pois o modelo empírico de HENDERSON (1952) não fornece essa constante.



(A)

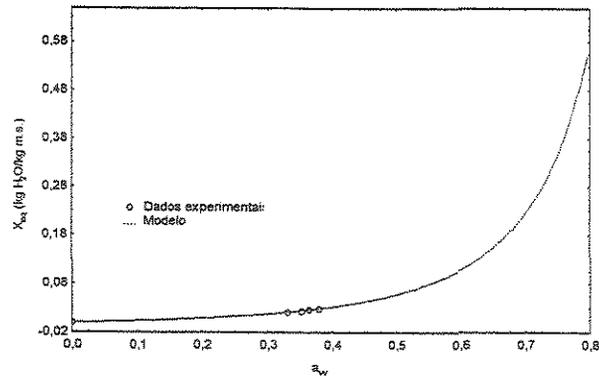


(B)

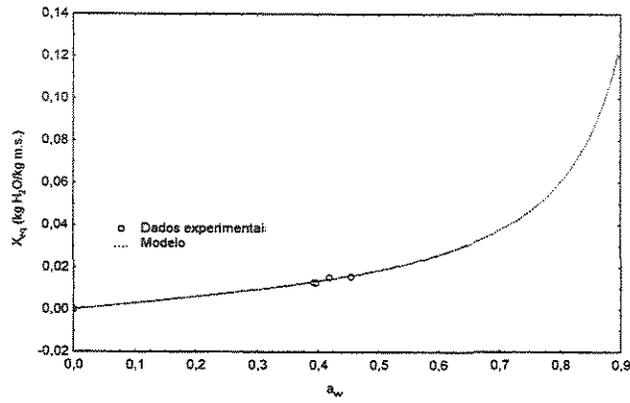


(C)

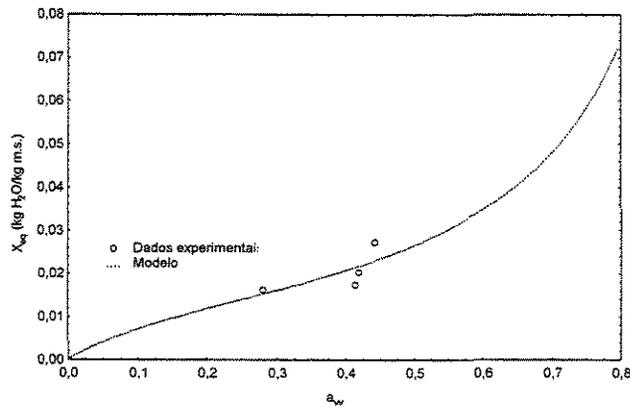
Figura VI.4 Isotherma de sorção da α -amilase desidratada pelo processo de liofilização, onde (A) congelamento por nitrogênio líquido; (B) congelamento por gelo seco e acetona; (C) congelamento por *freezer* convencional.



(A)

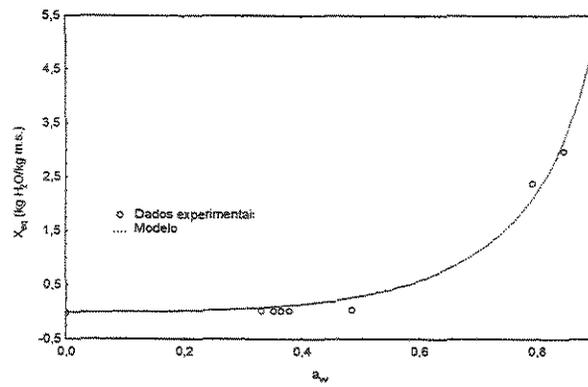


(B)

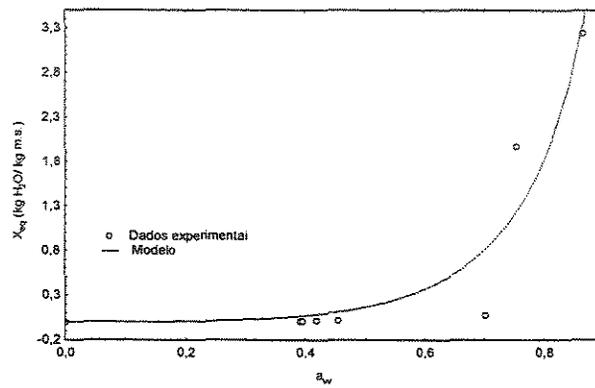


(C)

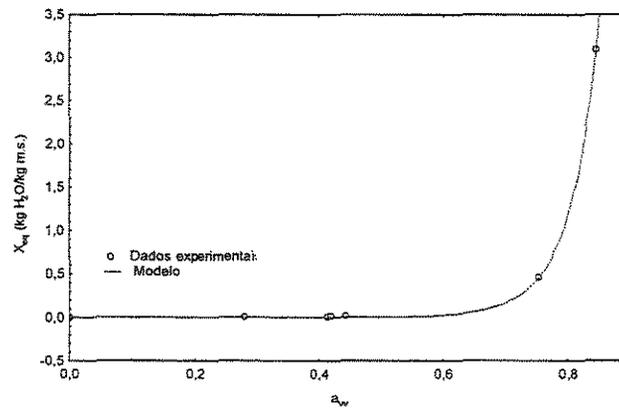
Figura VI.5 Isotherma de sorção da α -amilase ajustada pelo modelo de BET com a_w até 0,450. pelo processo de liofilização, onde (A) congelamento por nitrogênio líquido; (B) congelamento por gelo seco e acetona; (C) congelamento por *freezer* convencional.



(A)



(B)



(C)

Figura VI.6 Isotherma de sorção da α -amilase ajustada pelo modelo de HENDERSON pelo processo de liofilização, onde (A) congelamento por nitrogênio líquido; (B) congelamento por gelo seco e acetona; (C) congelamento por *freezer* convencional.

A Tabela VI.2 apresenta os valores das constantes de cada modelo e o coeficiente de correlação.

Tabela VI.2 Parâmetro de ajuste dos modelos de BET, GAB e HENDERSON.

<i>Processo de congelamento</i>	<i>Modelos</i>			
	<i>BET</i>	<i>BET ($a_w < 0,450$)</i>	<i>GAB</i>	<i>HENDERSON</i>
Nitrogênio líquido	$X_m = 0,0235$ $C = 100993$	$X_m = 0,0253$ $C = 0,0019$	$X_m = 0,0268$ $C = 172892,5$ $K = 1,1715$	$K = 0,0063$ $C = 0,4205$
R^2	0,8209	0,9967	0,9851	0,9908
Gelo seco e acetona	$X_m = 0,0158$ $C = 90269,14$	$X_m = 0,0132$ $C = 2,3676$	$X_m = 0,0152$ $C = 161489,3$ $K = 1,1535$	$K = 0,0071$ $C = 0,3511$
R^2	0,8187	0,9967	0,9461	0,9463
<i>Freezer</i>	$X_m = 0,0223$ $C = 223172$	$X_m = 0,0153$ $C = 6,5334$	$X_m = 0,023$ $C = 257469$ $K = 1,1746$	$K = 0,0086$ $C = 0,1499$
R^2	0,8271	0,9707	0,9854	0,9999

Através do ajuste das isotermas de equilíbrio foi possível determinar o conteúdo de umidade na monocamada. Foi verificado que os valores obtidos foram muito baixos devido a pouca solubilidade do material a temperatura ambiente, porém cabe ressaltar que os valores encontrados para cada técnica de congelamento foram muito próximos.

O modelo de GAB ajustou melhor os valores experimentais para as três técnicas de congelamento estudadas, com relação ao modelo de BET. Melhores resultados foram obtidos quando foi utilizado o modelo de BET com valores de a_w até 0,450, porém quando foi utilizada a técnica de congelamento com *freezer* ainda o modelo de GAB correlacionou melhor os dados experimentais.

O modelo empírico de HENDERSON apresentou bom ajuste, quando o material foi congelado inicialmente com nitrogênio líquido e *freezer*.

VI.3.5 Cinética da secagem em função do método de congelamento e modelagem matemática

A cinética de secagem foi realizada num período de até 24 horas. Foi verificada a influência da umidade do produto em função do tempo de secagem. A Tabela VI.3 mostra os resultados obtidos para os três processos de congelamento e posterior liofilização.

Tabela VI.3 Perda de massa e queda da atividade de água em função do tempo de secagem

<i>Processo de Congelamento</i>	<i>Tempo de secagem (horas)</i>	<i>X (kgH₂O/kg m.s)</i>	<i>a_w</i>
Nitrogênio	0	4,420	0,935
	4	0,531	0,450
	8	0,048	0,298
	12	0,042	0,236
	16	0,037	0,233
	20	0,031	0,206
	24	0,030	0,200
Gelo seco e Acetona	0	4,420	0,935
	4	2,157	0,753
	8	0,041	0,324
	12	0,036	0,251
	16	0,035	0,225
	20	0,033	0,171
	24	0,030	0,119
Freezer	0	4,420	0,935
	4	2,191	0,748
	8	0,165	0,639
	12	0,111	0,423
	16	0,041	0,390
	20	0,0365	0,371
	24	0,0335	0,228

A Figura VI.7 mostra a influência do tempo de liofilização em função da umidade residual.

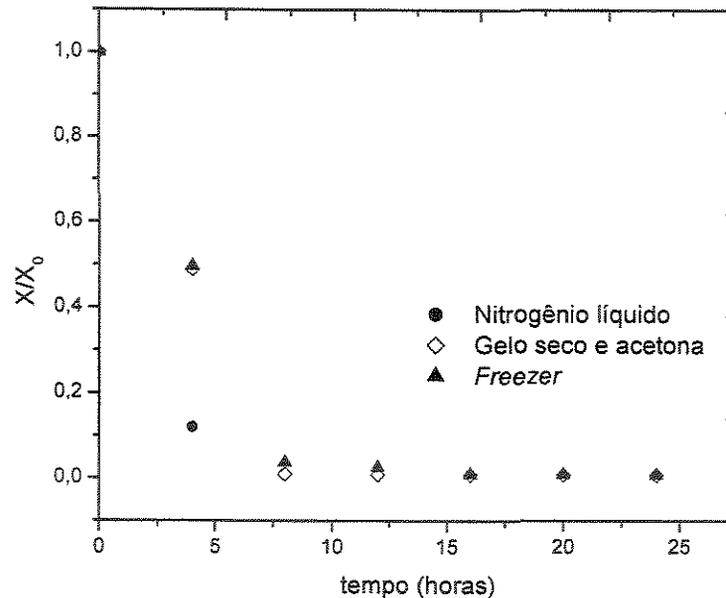


Figura VI.7 Evolução da perda de massa em função do tempo de secagem

Para a modelagem matemática foram feitas as seguintes considerações:

- A espessura inicial do volume de amostra no frasco foi de 0,8 cm;
- A espessura do material após a secagem foi igual a da amostra inicial na qual foi considerada como uma placa plana;
- Densidade da amostra durante a secagem não depende da direção;
- Distribuição inicial de umidade uniforme;

Os dados obtidos experimentalmente foram ajustados pelo modelo URIF (KING, 1971), na qual foi linearizado e através da construção da curva de umidade residual $(1-X)^2$ contra o tempo (t), foi determinado as constantes $(T_e - T_f)$ e k.

Para o ajuste foram considerados os seguintes parâmetros:

$$\Delta H_s = 51.084 \text{ kJ/kg.mol}$$

$$X_0 = 4,42 \text{ kg H}_2\text{O/kg.m.s.}$$

$$M_a = 18 \text{ kg/kg.mol}$$

$$L = 8 \times 10^{-3} \text{ m}$$

$$\rho_s = 1,624 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$$

$$V_a = 1,39 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3/\text{kg}$$

O ajuste do modelo está representado na Figura VI.8, a Tabela VI.4 mostra os parâmetros obtidos através do modelo URIF.

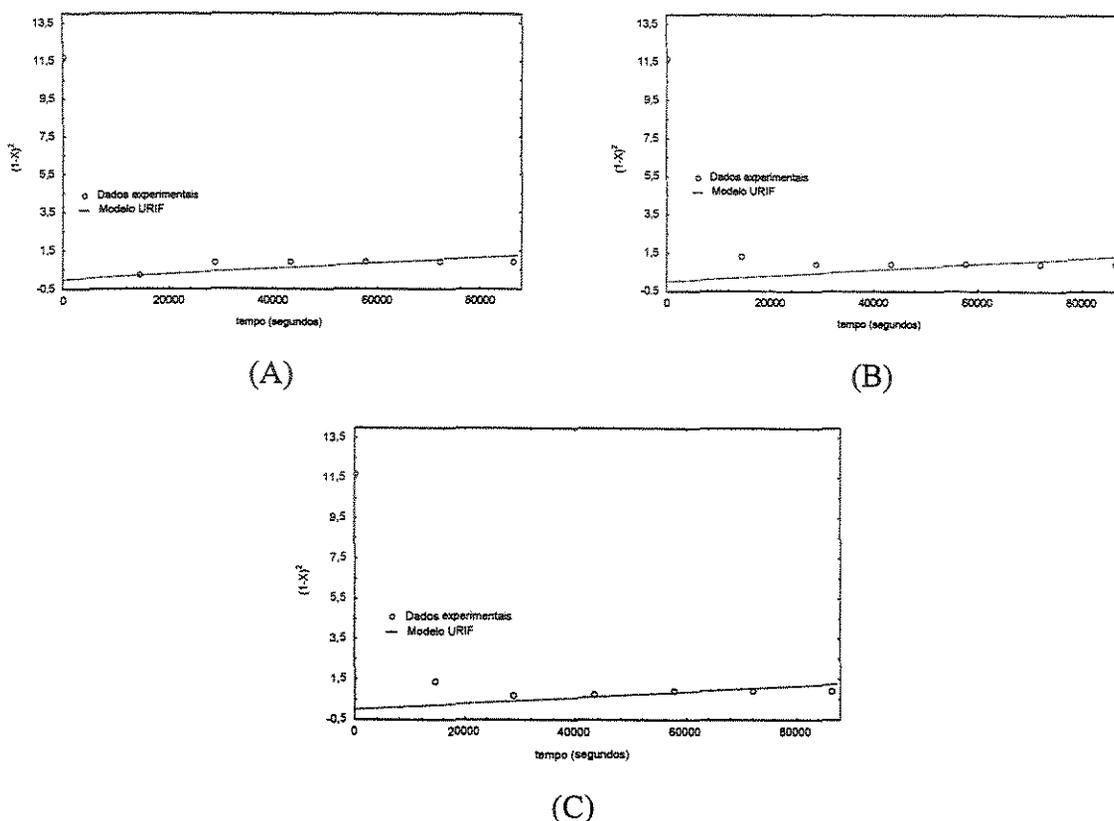


Figura VI.8 Ajuste cinético pelo modelo URIF linearizado, onde: (A) congelamento por nitrogênio líquido; (B) congelamento por gelo seco e acetona; (C) congelamento por *freezer* convencional.

Tabela VI.4 Parâmetro de ajuste do modelo URIF.

<i>Processo de congelamento</i>	<i>Parâmetros</i>		
	<i>k (W/m.K)</i>	<i>T_e-T_f (K)</i>	<i>R²</i>
Nitrogênio líquido	0,13996	0,242	0,9849
Gelo seco e acetona	0,14003	0,228	0,9822
<i>Freezer</i>	0,13998	0,156	0,9824

Foi verificado através do levantamento cinético da curva de secagem que quanto maior a taxa de congelamento menor foi o tempo de secagem, segundo ALCAIDE *et al.* (1978) quanto maior os cristais de gelo formado mais rápida é a saída de vapor d'água. Foi observado que à partir de 16 horas de secagem a umidade residual foi praticamente

constante. Quando o congelamento foi realizado com nitrogênio líquido, foi verificado que a um período de apenas 4 horas de secagem o produto apresentou baixo teor de umidade.

Quando o congelamento foi realizado em *freezer*, foi necessário um maior tempo de processo, para que sua umidade fosse reduzida significativamente.

A modelagem do processo revelou que a condutividade térmica do produto após a sua desidratação foi praticamente igual para os três tipos de congelamento e que as temperaturas da fonte de calor e da parte sublimada foi praticamente a mesma, independente do congelamento utilizado.

VI.4 Conclusões

Neste capítulo foi verificado que:

- O tipo de congelamento não influencia muito na atividade enzimática após a liofilização;
- O processo de liofilização praticamente preservou a atividade enzimática. Foi verificado também que há uma diminuição da atividade enzimática com o tempo de processo;
- Menores valores de a_w foram obtidos quando o congelamento foi realizado com nitrogênio líquido seguido por gelo seco e acetona, o que comprova que o processo é influenciado por altas taxas de congelamento;
- O ajuste dos dados experimentais da isoterma de sorção seguiu o modelo de GAB;
- Estudos da cinéticos de secagem revelaram que quanto maior a taxa de congelamento menor o tempo de secagem;
- Todas as técnicas estudadas seguiram o modelo URIF.

CAPÍTULO VII

SECAGEM DE α -AMILASE POR ATOMIZAÇÃO

Neste capítulo serão abordados alguns aspectos teóricos e os mais relevantes na secagem por atomização.

Serão descritas as metodologias experimentais utilizadas na secagem de α -amilase, bem como os resultados obtidos.

VII.1 Introdução

A secagem por atomização, também conhecida como secagem por aspersão ou *spray drying*, consiste na transformação do material do estado líquido para o sólido, sob forma de pó, através da dispersão de gotículas que contatam ar quente dentro de uma câmara. O material a ser seco pode estar sob forma de solução, suspensão, emulsão ou pasta resultando gotículas isoladas, grânulos ou aglomerados; estas formas dependem das propriedades físicas e químicas do material, do projeto e operação do secador (MASTERS, 1985).

Segundo TEYMANS & LENGES (1983) as condições de funcionamento de uma torre de atomização são definidas pelas seguintes variáveis:

- a temperatura do fluido de secagem na entrada;
- a viscosidade deste fluido;
- as vazões do gás e da suspensão ou da solução a secar;
- grau de pulverização que está ligado à granulometria do produto seco;
- teor em matéria seca da suspensão ou da solução a secar.

A secagem por atomização consiste em três etapas: atomização, secagem e coleta do material particulado. A recuperação do produto é determinada pela eficiência da coleta do material que é feita por um ciclone separador. Mesmo sendo o meio mais econômico de coleta, o uso de ciclones coletores possuem limitações na sua aplicação que são o uso de unidades pequenas e sua baixa eficiência para a coleta de partículas menores de 5 μm . Um baixo rendimento de produto resulta num alto custo de produção, ocasionando um aumento no seu preço. A grande perda de produto é devida principalmente à impregnação do pó na parede do aparato e a baixa eficiência do ciclone em coletar finas partículas. A adesão das partículas na parede pode ocorrer na câmara de secagem e no ciclone e é afetada pela natureza de materiais a serem secos e as condições de secagem (MAA *et al.*, 1998).

STRAATSMA *et al.* (1999a) verificaram que, aumentando a temperatura de entrada de ar e o total de sólidos na alimentação, há um aumento significativo na coleta de material, entretanto há formação de material insolúvel.

Para estudar a formação de material insolúvel, KUDO *et al.* (1990) testaram pó de leite desnatado com uma quantidade de água na faixa de 3-7%. Os testes mostraram que o índice de insolubilidade começou a crescer somente após um longo tempo de secagem com respeito ao tempo de residência em atomizadores, que foi de 20-40 segundos. De acordo com WALSTRA & JENNESS (1984), a sensibilidade à temperatura é maior quando a quantidade de água está entre 10 e 30%.

STRAATSMA *et al.* (1999b) verificaram também que índice de insolubilidade cresce claramente com o diâmetro da partícula, pois as maiores partículas secam mais devagar devido as limitações da difusão e precisam de mais tempo para passar pela faixa de maior sensibilidade a temperatura. Segundo estes autores a exposição do material ao calor pode resultar na formação de material insolúvel, que é indesejável principalmente para pós instantâneos. OHBA *et al.* (1989) ao secarem alimentos verificaram que atomizações a altas

pressões causam grandes quantidades de material insolúvel com um conteúdo relativamente grande de gordura.

Uma das maiores aplicações do uso de atomizadores está na secagem de materiais biológicos, na qual podemos citar proteínas, enzimas, fármacos e microorganismos.

Segundo ADAMIEC *et al.* (1995) a secagem em spray de materiais biológicos pode degradar ou comprometer a qualidade do produto. Para uma melhor preservação aconselha-se a aplicação de secadores com multi-estágios.

PERI & LABUZA citado em TEYMANS & LENGERS (1983) ao secarem leveduras observaram uma variação na cinética de destruição no decorrer da secagem. Os ensaios mostram que a mortalidade microbiana é mais rápida quando a umidade residual é abaixo de 10%, conseguido com ar de saída na torre de secagem à temperatura de 70 a 80°C. A redução da umidade abaixo de 10% parece crítico para a sobrevivência desses microorganismos.

PERI & LABUZA observaram também que quanto mais baixa for a temperatura ou quanto maior a umidade residual, maior é o número de células viáveis. Esse efeito é relativamente independente da temperatura de entrada do fluido de secagem, tanto que a atividade de água do duto fica igual à unidade, a temperatura do produto equivale temperatura do bulbo úmido.

FOSTER & LEATHERMAN (1995) fizeram estudos comparativos em três diferentes atomizadores, utilizando caseína e somatotrofina bovina como proteínas modelo. Estes autores verificaram que com o aumento da câmara de secagem do atomizador, há um aumento das partículas de ambas as proteínas, em atomizadores em escala de laboratório e piloto obtendo-se o mesmo diâmetro de partículas, mas em escala industrial houve um aumento de 100 a 300% no diâmetro das partículas.

MAA *et al.* (1998) verificaram que ao secarem proteínas em um mini *spray dryer*, 10-20% do material foi perdido no exaustor. Foi verificado que estes particulados eram constituídos de partículas menores que 2 µm. Estes autores verificaram também que 20-30% foram perdidos no ciclone.

Segundo NATH & SATPATHY (1998) a secagem de enzimas pode ser dividida em duas categorias, a primeira inclui enzimas de uso industrial, na qual pode-se citar proteases

e amilases. A segunda inclui produtos para usos analíticos, sendo estas secas em pequenas quantidades a uma baixa temperatura. Neste grupo podemos citar a pancreatina.

De acordo com estes autores a dificuldade na secagem de enzimas está sobretudo na sensibilidade a altas temperaturas podendo ocasionar na perda parcial ou total de sua atividade. Para reduzir danos a enzima aconselha-se o uso de aditivos como sais inorgânicos.

LABRUDE *et al.* (1989) observaram que ao secarem uma solução de hemoglobina, 50% foi oxidada, entretanto com a adição de uma solução de sacarose a 0,25 M, 97% da hemoglobina permaneceu na forma reduzida. Estes autores verificaram também que a temperatura de secagem podia ser aumentada em 50%, diminuindo significativamente o teor de umidade residual.

ÇAKALOZ *et al.* (1997) ao secarem α -amilase em atomizador horizontal verificaram que a perda da atividade depende principalmente da temperatura do duto de gás e da distribuição de temperatura do secador. Em uma temperatura de entrada de ar a 155⁰C a perda foi de 9% porém a secagem não foi completa. Quando a temperatura de 165⁰C foi utilizada, a perda de atividade subiu para 46%. Estes autores verificaram que com o aumento do diâmetro das partículas na entrada do atomizador, o tempo de retenção da enzima e a taxa de secagem diminuem. Quando os experimentos foram conduzidos com gotas de entrada de 80 μ m de diâmetro, estas alcançaram sua concentração de equilíbrio de 0-12 kg de água/kg de sólido seco em 2 segundos, continuando com o ar quente mais 12 segundos, sua desnaturação foi vulnerável. Por outro lado, quando foi utilizado suspensão com partículas de tamanho inicial de 250 μ m, estas demoram para atingir o atomizador com um conteúdo úmido de 0-25 kg de água/kg de sólido seco que é acima do limite prático.

VII.2 Parte experimental

VII.2.1 Spray dryer

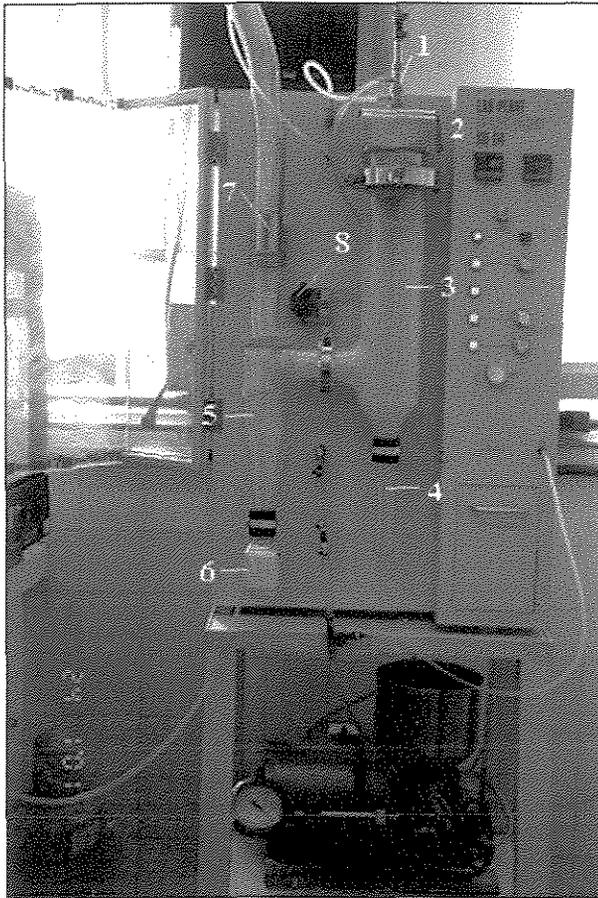
A secagem por atomização foi realizada em um mini *spray dryer* da marca Lab-Plant modelo SD-04.

Este aparelho tem capacidade nominal de secagem de 1,25 mL/h para água, atinge no máximo a temperatura de 250⁰C e a compressão de ar varia entre 1-4 bar.

O mini *spray dryer* é composto basicamente por um bocal de pressão (bico atomizador), uma câmara de secagem e um ciclone para a coleta do produto. A vantagem de se utilizar este aparelho é que a câmara de secagem e o coletor são totalmente de vidro, o que facilita a visualização e a operação do processo.

O ar de secagem é succionado do ambiente para o *spray dryer*, passando pela câmara de secagem e pelo ciclone até ser expelido novamente para o ambiente. A matéria prima é succionada através de uma bomba peristáltica que é deslocada positivamente até o bico atomizador, onde é atomizada, como mostra a Figura VII.1.

Neste aparelho a alimentação do ar de secagem é concorrente à alimentação da amostra. As medidas de temperatura são realizadas através de dois sensores, um na entrada e outro na saída da câmara de secagem.



1. Bico atomizador
2. Câmara de topo
3. Câmara principal
4. Tubo coletor
5. Ciclone
6. Coletor de amostra
7. Exaustor
8. Bomba peristáltica

Figura VII.1 Mini *spray dryer* utilizado nos experimentos

VII.2.2. Metodologia

VII.2.2.1 Planejamento experimental

Para otimizar os experimentos e as condições de secagem foi utilizada a técnica do planejamento experimental que consistiu no planejamento em estrela com investigação de dois fatores em cinco níveis.

Os níveis escolhidos para as variáveis independentes estão citados na Tabela VII.1

Tabela VII.1 Níveis das variáveis estudadas

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Temperatura de operação T (°C)	130	145	180	215	230
Vazão de alimentação de enzima Q (mL/s)	0,20	0,23	0,31	0,38	0,41

A Tabela VII.2 mostra a matriz do planejamento experimental realizado.

Tabela VII.2 Matriz do planejamento fatorial.

Ensaio	Temperatura (T)	Vazão (Q)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	$-\sqrt{2}$	0
9	$+\sqrt{2}$	0
10	0	$-\sqrt{2}$
11	0	$+\sqrt{2}$

VII.2.2.2 Metodologia da secagem

Para cada experimento de secagem foram utilizados aproximadamente 500 gramas de caldo enzimático que foi atomizado em um bico atomizador de 0,5 mm de diâmetro. A compressão de ar foi mantida constante a 0,41 bar. O caldo foi bombeado para o bico atomizador por uma bomba peristáltica operando de 1 a 100 rpm, através de um tubo de silicone de 4 mm de diâmetro.

VII.3 Resultados e Discussão

VII.3.1 Estudo da influência da vazão de alimentação e da temperatura na atividade enzimática e na atividade de água do produto desidratado

Nesta etapa do trabalho foi verificada a influência da vazão de alimentação de enzima e da temperatura do ar de secagem sobre a atividade enzimática (AE) e sobre a atividade de água (a_w) do produto desidratado, conforme o planejamento descrito anteriormente.

VII.3.1.1 Influência sobre a atividade enzimática

Conforme mostra a Tabela VII.3 através do planejamento experimental foi estudada a influência das variáveis temperatura e vazão sobre a atividade enzimática do produto desidratado.

Tabela VII.3 Influência do planejamento experimental sobre a atividade enzimática.

<i>Ensaio</i>	<i>Q (mL/s)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>AE (U/mL)</i>
1	-1	-1	0,8874
2	+1	-1	0,7766
3	-1	+1	0,6560
4	+1	+1	0,6984
5	0	0	0,7152
6	0	0	0,7440
7	0	0	0,7092
8	$-\sqrt{2}$	0	0,7712
9	$+\sqrt{2}$	0	0,7738
10	0	$-\sqrt{2}$	0,7168
11	0	$+\sqrt{2}$	0,5180

VII.3.1.1.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade enzimática

A Tabela VII.4 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de segunda ordem analisando a atividade enzimática (AE) em função das variáveis independentes vazão (Q) e a temperatura (T).

Tabela VII.4 Coeficientes de regressão estimados

Fatores		Coeficiente de Regressão
Média		0,722563
Q (mL/s)	(L)	-0,008116
Q (mL/s)	(q)	0,040161
T (°C)	(L)	-0,073959
T (°C)	(q)	-0,037853
Q x T (mL x °C/s)		0,038300

onde: (L) coeficiente linear

(q) coeficiente quadrático

Através dos resultados obtidos pela Tabela VII.4 foi possível obter um modelo empírico codificado que ficaria da seguinte forma:

$$AE = 0,722563 - 0,008116Q - 0,073959T + 0,0383QT + 0,040161Q^2 - 0,037853T^2 \quad (\text{VII.1})$$

A validade do modelo foi verificada pela Tabela VII.5, através da Análise da Variância (ANOVA), calculada para todos os parâmetros e o $F_{\text{calculado}}$ que foi comparado com o F_{tabelado} a 95% de confiança.

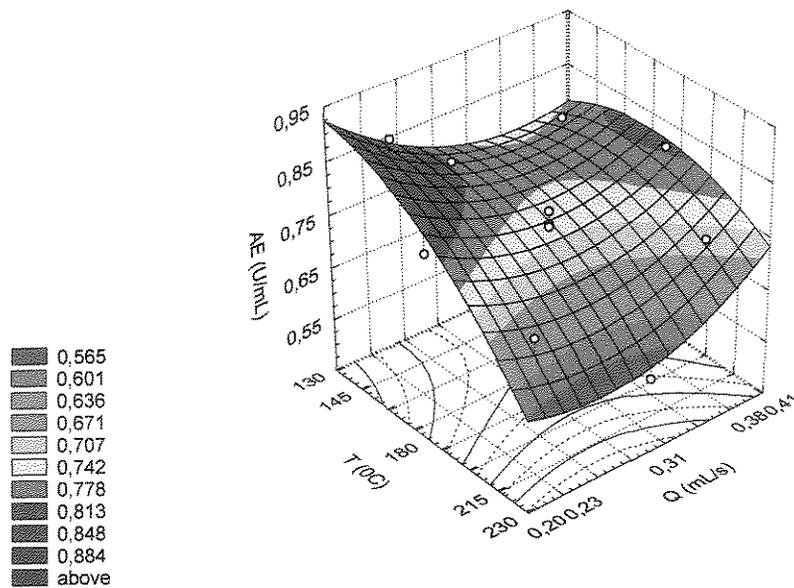
Tabela VII.5 Tabela ANOVA para o planejamento experimental em estrela

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	0,074084	5	0,0148168
Resíduos	0,008548	5	0,0017096
Falta de ajuste	0,007856	3	0,0026187
Erro puro	0,000692	2	0,0003460
Total	0,082637	10	

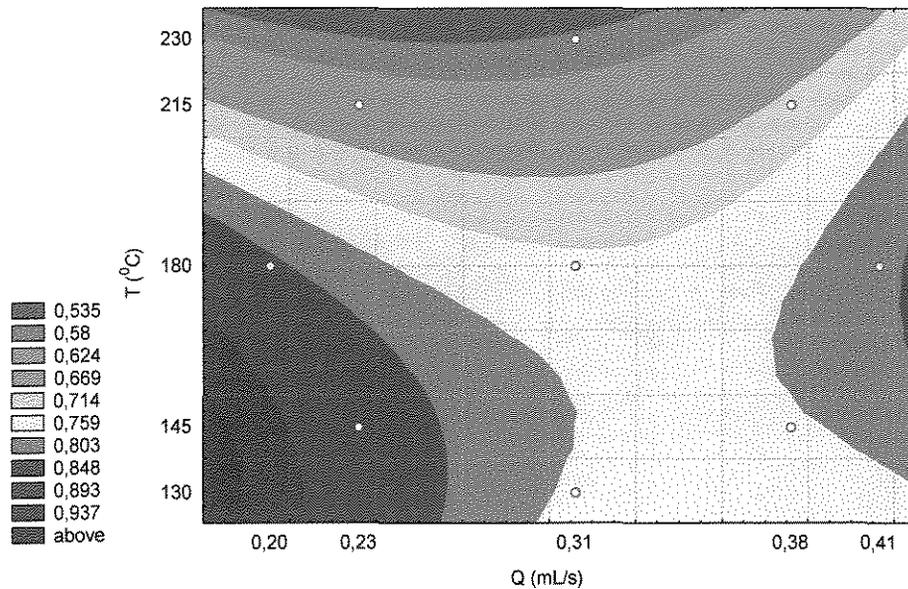
Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,89565$

A análise da ANOVA revelou que $F_{\text{cal.}}$ foi menor que $F_{\text{tab.}}$ no nível de confiança de 95%, sendo o modelo representado pela Equação VII.1 não-preditivo, o que não pode ser utilizado como modelo empírico estatístico do processo.

Através do modelo que considera todos os efeitos estimados foi obtida a superfície de resposta [Figura VII.2 (a) e (b)], permitindo a análise da influência da temperatura e da vazão de alimentação na atividade enzimática do material desidratado.



(a)



(b)

Figura VII.2 Superfície do planejamento em estrela para a atividade enzimática (a) Superfície de resposta; (b) Curva de nível da superfície quadrática.

O produto desidratado obtido apresentou uma boa atividade enzimática devido a α -amilase ser uma enzima termoresistente.

O planejamento experimental revelou que a temperatura e a vazão de alimentação influencia na atividade enzimática. Melhores resultados foram obtidos quando o processo foi conduzido a baixas vazões e temperaturas. Quando o processo foi realizado em altas vazões e a temperatura de 180⁰C, correspondente ao ponto central, foi verificado que houve uma boa preservação da atividade enzimática, porém cabe ressaltar que o teor de umidade e a atividade de água foram superiores do que as obtidas com baixas vazões e temperaturas. A temperaturas muito elevadas e a baixas vazões houve uma redução drástica na atividade enzimática.

A influência de cada variável do processo está ilustrado na Figura VII.3, na qual foi verificado que a temperatura apresenta maior efeito. Este fato é devido principalmente a temperatura do ar de secagem e da distribuição de temperatura interna no secador, o que compromete a atividade enzimática do produto desidratado. Cabe ressaltar que as mesmas observações foram feitas por ÇAKALOZ *et al.* (1997), ao secar α -amilase em spray dryer horizontal.

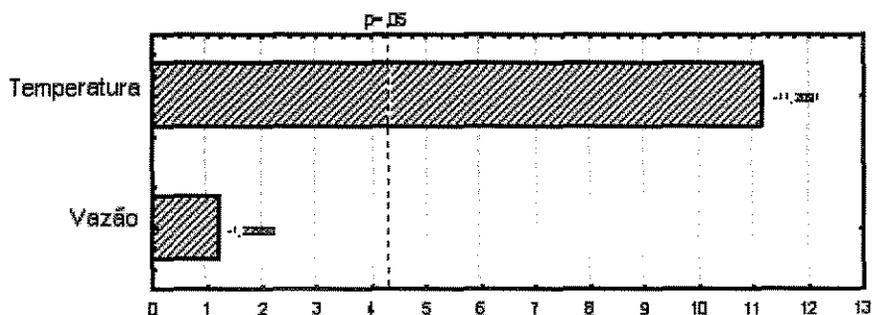


Figura VII.3 Histograma de Pareto em função de AE.

VII.3.1.2 Influência sobre a atividade de água

Conforme mostra a Tabela VII.6, através do planejamento experimental, foi verificado a influência das variáveis temperatura e vazão sobre a atividade de água do material desidratado.

Tabela VII.6 Resultados da atividade de água sobre o planejamento fatorial

<i>Ensaio</i>	<i>Q (mL/s)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>a_w</i>
1	-1	-1	0,360
2	+1	-1	0,614
3	-1	+1	0,298
4	+1	+1	0,418
5	0	0	0,408
6	0	0	0,382
7	0	0	0,393
8	$-\sqrt{2}$	0	0,336
9	$+\sqrt{2}$	0	0,466
10	0	$-\sqrt{2}$	0,573
11	0	$+\sqrt{2}$	0,325

VII.3.1.2.1 Análise da superfície de resposta sobre a atividade de água

A Tabela VII.7 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de segunda ordem analisando a atividade de água (a_w) do produto desidratado em função das variáveis independentes vazão (Q) e a temperatura (T).

Tabela VII.7 Coeficientes de regressão estimados

Fatores		Coeficiente de Regressão
Média		0,394344
Q (mL/s)	(L)	0,069870
Q (mL/s)	(q)	0,002673
T (°C)	(L)	-0,076187
T (°C)	(q)	0,026817
Q x T (mL x °C/s)		-0,033500

onde: (L) coeficiente linear

(q) coeficiente quadrático

Através dos resultados obtidos pela Tabela VII.7 foi possível obter um modelo empírico codificado que ficaria da seguinte forma:

$$a_w = 0,0394344 - 0,069870Q - 0,076187T + 0,0335QT + 0,02673Q^2 - 0,026817T^2 \quad (\text{VII.2})$$

A validade do modelo foi verificada pela Tabela VII.8, através da Análise da Variância (ANOVA), calculada todos os parâmetros e o $F_{\text{calculado}}$ comparado com o F_{tabelado} a 95% de confiança.

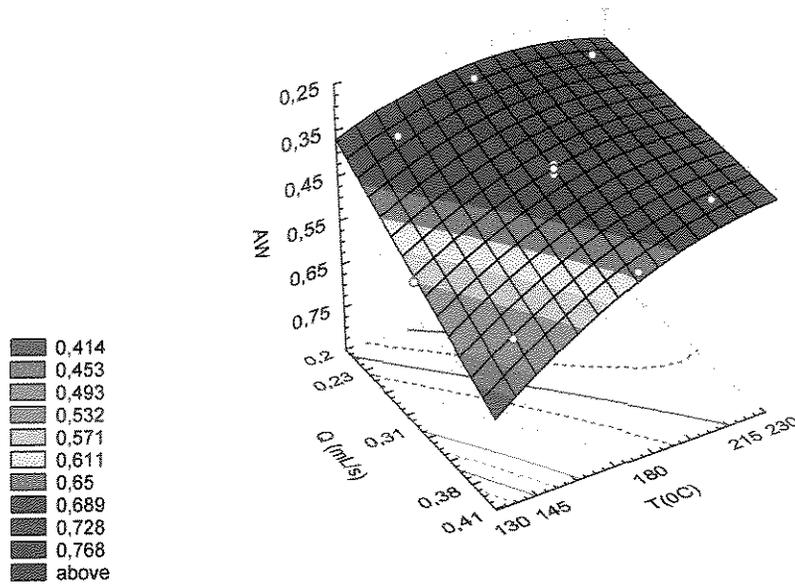
Tabela VII.8 Tabela ANOVA para o planejamento experimental em estrela

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	0,093900	5	0,018780
Resíduos	0,005931	5	0,001862
Falta de ajuste	0,005590	3	0,001863
Erro puro	0,000341	2	0,000170
Total	0,099846	10	

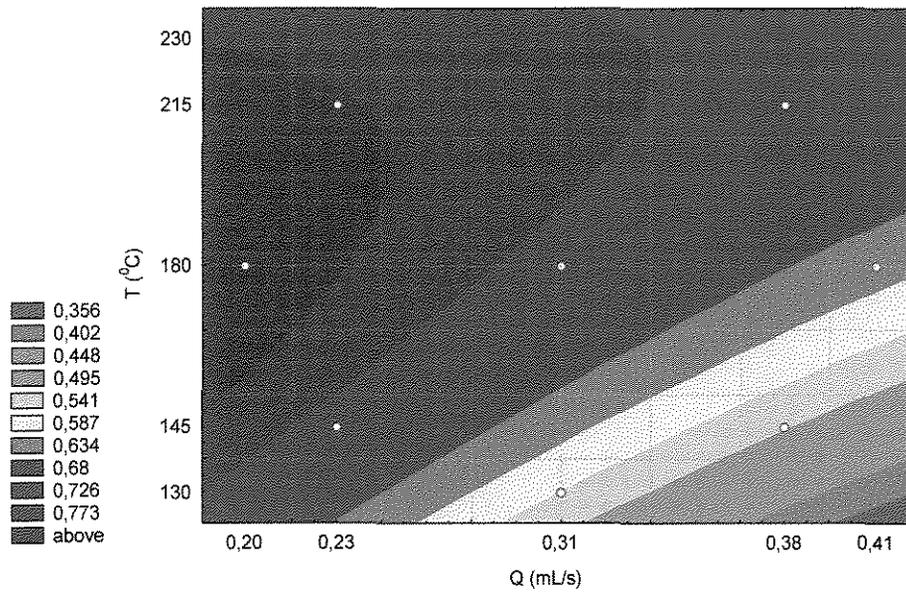
Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,9406$

A análise da ANOVA revelou que $F_{\text{cal.}}$ foi menor que $F_{\text{tab.}}$ no nível de confiança de 95%, sendo o modelo representado pela Equação VII.2 não-preditivo, o que não pode ser utilizado como modelo empírico estatístico do processo.

Através do modelo que considera todos os efeitos estimados foi obtida a superfície de resposta apresentada [Figura VII.4 (a) e (b)], permitindo a análise da influência da temperatura e da vazão de alimentação na atividade de água.



(a)



(b)

Figura VII.4 Superfície do planejamento em estrela para a atividade de água (a) Superfície de resposta; (b) Curva de nível da superfície quadrática.

Através da análise da curva de nível, foi verificado que a atividade de água também é influenciada pela vazão de alimentação e da temperatura do processo. Foi verificado que em operações a baixas vazões e a altas temperaturas, menores foram os valores da atividade de água. Cabe ressaltar que quanto menor o valor da atividade de água, o produto será menos susceptível a reações de degradação e por microorganismos. É interessante salientar também que a temperaturas muito elevadas e a vazões muito baixas, a temperatura de saída do ar de secagem e a distribuição de temperatura interna no secador comprometem atividade enzimática do produto desidratado.

Através da Figura VII.5 foi verificado que o principal parâmetro sobre a atividade de água corresponde a temperatura de operação.

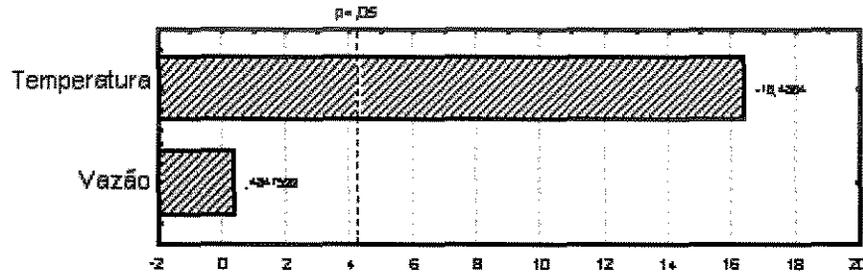


Figura VII.5 Histograma de Pareto em função de a_w .

VII.3.2 Análise morfológica

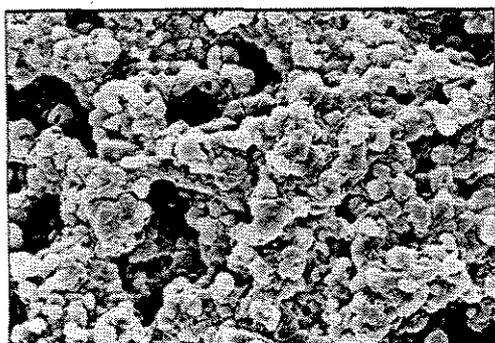
Com o intuito de verificar o diâmetro médio do material desidratado as análises morfológicas foram realizadas através de MEV a uma magnitude de 3.000 vezes.

Foram realizadas análises das amostras referentes aos ensaios de números 3, 8 e 9 (Figura VII.6).

Com o intuito de verificar o diâmetro das amostras que não foram coletadas, também foram realizadas análise de MEV do material retido no topo do ciclone. Essas amostras também foram referentes aos do ensaio número 3, 8 e 9 (Figura VII.6).

A escolha destas amostras foram devido ao fato delas apresentarem baixa umidade (condição operacional do aparelho) e algumas delas apresentaram alta ou baixa atividade de

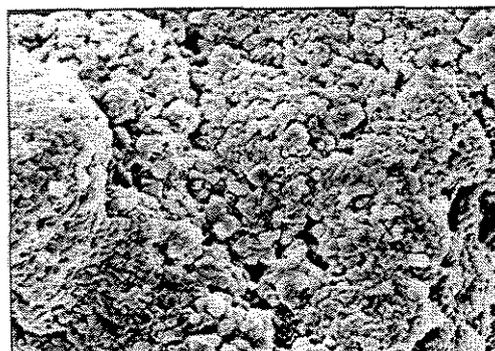
água e no caso as amostras correspondentes aos ensaios de número 3 e 8 serem poucos solúveis em água a temperatura ambiente.



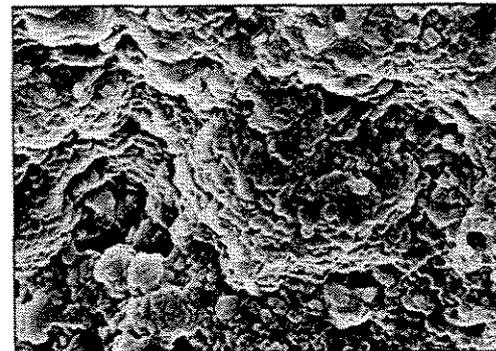
(A.1)



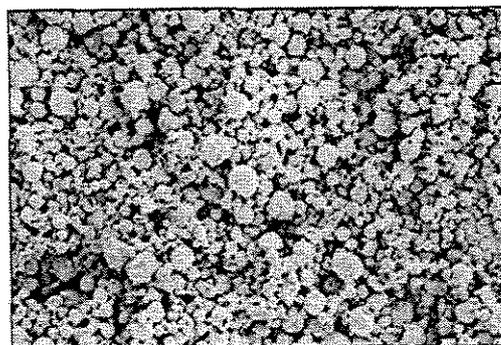
(A.2)



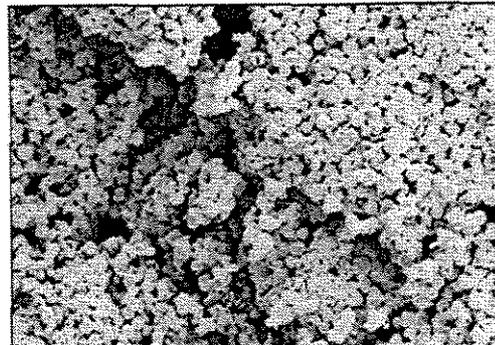
(B.1)



(B.2)



(C.1)



(C.2)

Figura VII.6 Fotomicrografia eletrônica de varredura de α -amilase desidratada; onde: (A.1) corresponde ao ensaio de número 3 coletada pelo ciclone; (A.2) corresponde ao ensaio de número 3 coletada no topo ciclone; (B.1) corresponde ao ensaio de número 8 coletada pelo ciclone; (B.2) corresponde ao ensaio de número 8 coletada no topo ciclone; (C.1) corresponde ao ensaio de número 9 coletada pelo ciclone; (C.2) corresponde ao ensaio de número 9 coletada no topo ciclone;

A Tabela VII.9 apresenta o intervalo de diâmetro referente aos ensaios de número 3, 8 e 9.

Tabela VII.9 Intervalo de diâmetros referente aos ensaios 3, 8 e 9

<i>Ensaio</i>	<i>Amostras coletadas pelo ciclone</i> (μm)	<i>Amostras coletadas no topo do ciclone</i> (μm)
3	4,36 a 9,08	2,37 a 7,50
8	1,61 a 4,85	2,08 a 2,32
9	1,25 a 3,33	1,25 a 2,50

As amostras coletadas pelo ciclone dos ensaios 3 e 8 apresentaram faixas de diâmetros maiores que as referentes ao ensaio de número 9, sendo este um dos fatos de sua pouca solúveis em água a temperatura ambiente. As mesmas observações também foram relatadas por STRAATSMA *et al.* (1999b). Estes autores verificaram em estudos realizados com leite que maiores diâmetros foram obtidos em amostras insolúveis em água.

Um outro fator relevante verificado foi que o ciclone utilizado nos experimentos coletou amostras com diâmetros basicamente superiores a 1,25 μm , porém também foram perdidos materiais com diâmetros superiores a 1,25 μm . Deve-se ressaltar que a maior quantidade de partículas coletadas pelo ciclone tiveram diâmetros superiores a 4 μm . Já materiais perdidos pelo processo apresentaram diâmetros menores, que ficaram em aproximadamente 2,30 μm .

Em estudos similares realizados por MAA *et al.* (1998) ao secarem proteínas, operando também em um mini *spray dryer*, verificaram que basicamente as partículas coletadas no topo do ciclone eram constituídas de diâmetros de 2 μm . Isto permite concluir que este tipo de equipamento não é apropriado para coletar amostras com pequenos diâmetros.

VII.3.3 Isoterma de sorção

A isoterma de secagem foi realizada apenas para o primeiro ensaio do planejamento experimental, por apresentar baixa atividade de água e a maior atividade enzimática de todos os experimentos realizados.

A Figura VII.7 apresenta o ajuste dos dados experimentais obtidos com os modelos de BET e GAB.

O modelo de BET também foi ajustado para valores de a_w até 0,450, conforme mostra a Figura VII.8.

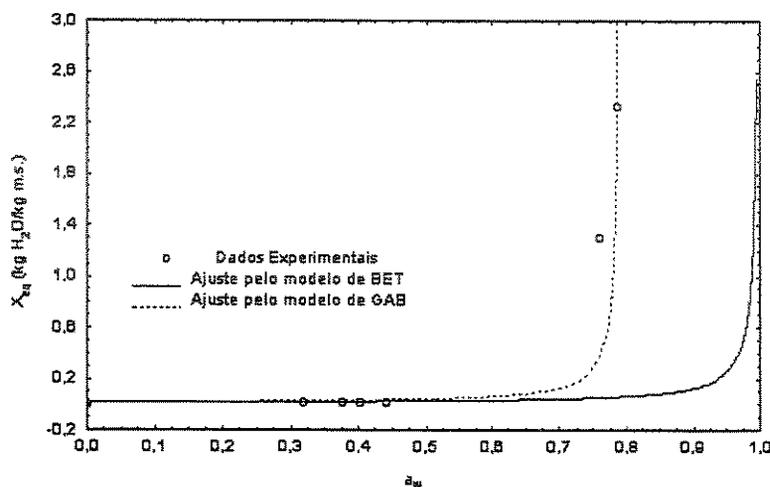


Figura VII.7 Isoterma de sorção de α -amilase desidratada ajustado pelos modelos de BET e GAB.

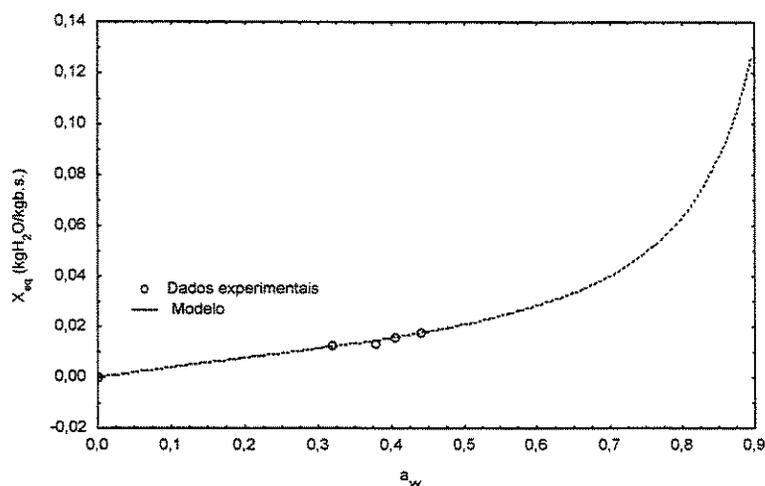


Figura VII.8 Isoterma de sorção de α -amilase ajustada pelo modelo de BET com a_w até 0,450.

A Figura VII.9 mostra o ajuste da isoterma de secagem referente ao modelo empírico de HENDERSON.

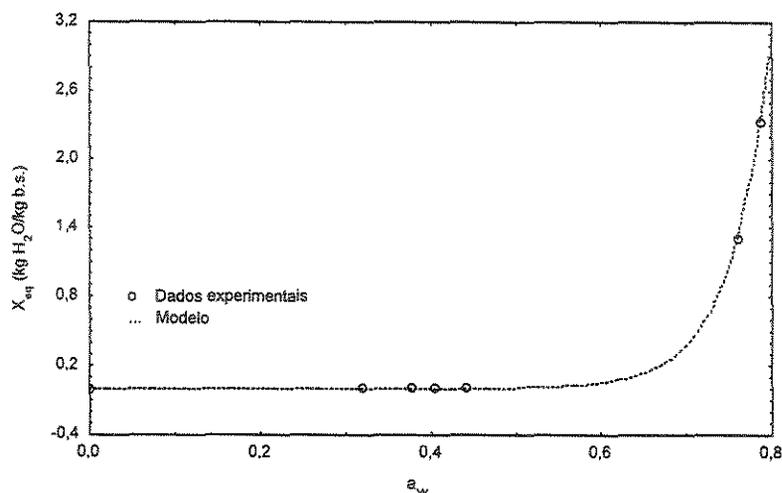


Figura VII.9 Isoterma de sorção de α -amilase ajustada pelo modelo de HENDERSON.

A Tabela VII.10 apresenta os parâmetros de ajuste dos três modelos estudados.

Tabela VII.10 Parâmetro de ajuste dos modelos de BET, GAB e HENDERSON.

<i>Modelo</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Coefficiente de correlação (R^2)</i>
BET	$X_m = 0,01279$ $C = 90792,9$	0,7126
BET (com a_w até 0,450)	$X_m = 0,01368$ $C = 3,395124$	0,9966
GAB	$X_m = 0,0153$ $C = 98167,3$ $K = 1,264$	0,9986
HENDERSON	$K = 0,009473$ $C = 0,136288$	0,9999

O modelo de BET não ajustou bem aos dados experimentais, mas quando foram utilizados apenas os primeiros pontos cuja a atividade de água foi menor que 0,450 o modelo apresentou bom ajuste. O modelo triparmétrico de GAB e o de HENDERSON forneceram um excelente ajuste, porém este último modelo não apresenta significado físico.

Cabe ressaltar também que os baixos valores de umidade da isoterma de sorção foram devidos a amostra após o processo de desidratação apresentar baixa solubilidade em água a temperatura ambiente.

VII.4 Conclusões

Neste capítulo foi verificado que:

- A secagem é influenciada pela temperatura de operação e pela vazão de alimentação de enzima. A baixas vazões e a altas temperaturas há formação de material insolúvel;
- A atividade enzimática foi influenciada principalmente pela ação da temperatura. Quando o processo foi conduzido com valores muito baixos de temperatura foram obtidos melhores valores, porém a atividade de água aumentou significativamente;
- A perda de atividade enzimática após o processo de desidratação depende principalmente da temperatura do ar de secagem e da distribuição de temperatura interna no secador;
- Menores valores de atividade de água foram obtidos quando o processo foi conduzido a altas temperaturas e a baixas vazões. Por outro lado, houve perdas significativas na atividade enzimática;
- As condições de operação referentes ao primeiro ensaio do planejamento experimental foi considerada melhor, pois o material desidratado apresentou uma alta atividade enzimática e uma baixa atividade de água;
- A isoterma de secagem do melhor ponto experimental seguiu o modelo de GAB e o modelo empírico de HENDERSON.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES & SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

VIII.1 Conclusões finais

Este trabalho foi realizado com a finalidade de verificar o desempenho de três métodos de secagem aplicados à enzima α -amilase. Através dos resultados obtidos foi verificado que a secagem por atomização apresentou alguns inconvenientes como a queda acentuada da atividade enzimática, mesmo utilizando-se uma enzima termorresistente, além da dificuldade de se estabelecer quais as melhores condições operacionais.

A liofilização preservou melhor a atividade enzimática, porém cabe ressaltar que o tempo de processo e o alto consumo de energia necessário para a condução deste processo pode ser considerado como um fator limitante na escolha desta técnica, além da pouca solubilidade do material, sendo necessário a adição de um coadjuvante para melhorar a solubilidade do produto. Este processo é recomendado apenas para a secagem de produtos com alto valor agregado.

Quando o experimento de secagem foi realizado em microondas sob condições de vácuo, o produto desidratado apresentou uma boa atividade enzimática. Situações similares a da secagem por liofilização foram obtidas quando o experimento foi conduzido a uma pressão de 0,63 bar e a 550 W, todavia o material desidratado também apresentou pouca solubilidade em água. Cabe ressaltar ainda que o tempo de processo com o mesmo volume de amostra, utilizado nos experimentos de liofilização foi de apenas 150 segundos.

Através da análise final dos três processos de secagem estudados pode-se concluir que, além da redução do tempo de processo, e conseqüentemente um menor gasto de consumo de energia, a secagem por microondas sob condições de vácuo pode ser considerado como um método promissor.

VIII.2 Sugestões para trabalhos futuros

Com base nos resultados e conclusões obtidas neste trabalho sugere-se como trabalhos futuros:

- Realizar os mesmos estudos deste trabalho com materiais biológicos diferentes, a fim de verificar se os fenômenos observados e se as técnicas utilizadas são válidas de um modo geral;
- Incluir a pressão como uma nova variável no planejamento estatístico do processo de secagem por atomização com a finalidade de melhorar a otimização do processo e refazer os experimentos com outros valores de temperatura e vazão com a finalidade de deslocar o planejamento utilizado. Pretende-se assim verificar o ponto ótimo do processo, em que a atividade enzimática seja a máxima possível e a atividade de água a menor possível e com isso obter um modelo estatístico do processo que possa ser utilizado para fins preditivos;
- Realizar um estudo sobre a influência da adição de coadjuvantes (tampões, sais açúcares e polímeros) na atividade enzimática com a finalidade de melhorar a solubilidade da enzima após o processo de desidratação pelas três técnicas de secagem estudadas nesta dissertação;
- Estudar um novo projeto de construção de um microondas a vácuo para que além de se verificar a eficiência do processo possa incluir também uma outra variável, que no caso seria a temperatura e refazer o mesmo trabalho utilizando condições de pulso;

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFIA

ADAMIEC, J.; KAMINSKI, W.; MARKOWSKI, A.S.; STRUMILLO, C. Drying of Biotechnological Products, In: Handbook of Industrial Drying, ed. MUJUNDAR, A.S., Library of Congress Cataloging - in - Publication Data. Second Edition. New York, v.2, p.775-779, 1995.

ADAMSON, A. W. "Physical Chemistry of Surface", **Interscience Publ. Co. Inc.**, New York, 1963.

ALCAIDE, L.J.; FARRADAS, E.G.; GONZALEZ, A.R. Estudio cinetico de la liofilizacion de crema de leche, **Anales de Quimica de la Real Sociedad Española de Física y Química**. v. 74, p.134-140, 1978.

ALCAIDE, L.J.; LOBRAÑA, J.I. Influencia de las variables del proceso sobre el tiempo de secado por liofilizacion del zumo de zanahoria, **Anales de Quimica de la Real Sociedad Española de Física y Química**. v. 79, n.1, p.101-107, 1983.

ALLEN, W.G.; SPRADLIN, J.E. Amylases and their properties, **BrewersDigest**, v.49, n.7, p.48-65, 1974.

AYAPPA, DAVIS, K.G.,H.T.; GORDON, J. Analysis of microwave heating of materials with temperature-dependent properties. **AIChE Journal**,v.37, n.3, p.313-322, 1991.

AYAPPA, K.G. Modeling transport process during microwave heating: **A review. Reviews in Chemical Eng.**, n.13, v.2, p.1-69,1997.

BARROS NETO, B., BRUNS, R.E. & SCARMINIO, I.S. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 1995.

BECK, J.V.; ARNOLD, K.J. Parameter Estimation in Engineering and Science, John Wiley, New York, 1977.

BEKE, J.; MUJUMDAR, A. S.; GIROUX, M. Some Features of Microwave Drying of Corn and Potato Samples, **Drying '96**, Marcel-Dekker, NY, p. 888-895, 1996.

BERLIN, E.; KLIMAN, P. G.; PALLANSCH, M. J. Surface Areas and Densities of Freeze-Dried Foods, **Agr. & Food Chem.**, v. 14, p.15, 1966.

BIZOT, H. Using the G.A.B. model to construct sorption isotherms. **Physical Properties of Foods**. p.43-54, 1985.

BOX, G.E.P; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistic for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. New York, Wiley, 1978.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 60, p.309, 1938.

BUFFLER, C. A guideline for power output measurement of consumer microwave. **Microwave World**, v.10, n.5, p.15, 1991.

CARABIN, P. Simulation of periodic convective and volumetric heating of finite and semi-infinite slabs. In: A. S. Mujundar (ed.), **Drying of Solids**, Sarita Publication, New Delhi, India, 1990.

ÇAKALOZ, T., AKBABA, H., YESÜGEY, E.T., PERIZ, A. Drying model for α -amilase in a horizontal spray dryer, **Journal of Food Engineering**, v.31, p.499-510, 1997.

CORNEJO, F.E.P. Estudos dos parâmetros de secagem e construção de um secador de baixo custo para filés salgados de pescado, Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1987. 89 p. Dissertação (Mestrado).

COVERLEYN, S. & REMON J.P. Maltodextrins as lyoprotectants in the lyophilization of a model protein, LDH, **Pharmaceutical Research**, v.13, n.1, p.146-150, 1996.

CRANK, J. The mathematics of diffusion, 2nd. Claredon Press Oxford, 1975.

DATTA, A.K.; LIU, J. Thermal time distributions for microwave and conventional heating of food, **Food & Bioprod. Proces.**, v.70, n.C2, p.83-90, 1992.

DECAREAU, R.V.; Microwave in the Food Processing Industry. Academic Press, New York, NY, 1985.

DERMELJ, M.; BOGENRIEDER, C.; HIDVÉGI, M.; LÁSZTITY, R. Effect of microwave vacuum drying on protein and chlorophyll contents of blind nettle (*Urtica urens* L.), **Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.**, v.39, n.1, p.77-84, 1995.

DREYFUSS, M.S.; CHIPLEY, J.R. Comparison of effects sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*, **Appl. & Environ. Microbiol.**, v.39, n.1, p.13-16, 1980.

DIXON, M. Enzymes, Academic press, inc. Publishers, 2nd. Ed., 950p., 1964.

DOUGLAS, S.E.; MANDLA, S.; GALLANT, J.W. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture**. v.190, p.247-260, 2000.

DROUZAS, A.E; SCHUBERT, H. Microwave application in vacuum drying of fruits, **Journal of Food Engineering**, v.28, p.203-209, 1996.

DROUZAS, A.E.; TSAMI, E.; SARAVACOS, G.D. Microwave/vacuum drying of model fruit gels, **Journal of Food Engineering**, v.39, p.117-122, 1999.

EGAS, M.C.V. Purificação e caracterização de uma α -amilase produzida por *Thermus filiformis* Ork A2, Coimbra: Universidade de Coimbra, 1997. 177p. Tese (Doutorado).

FALCH, E.A. Industrial Enzymes – Development in production and application **Biotechnology Advances**, v.9, n.4, p.643-658, 1991.

FORWATER, J. Microwave vacuum dryer cuts drying time by 1/3 @ 100⁰F, **Food Processing**, p.176-177, 1978.

FOSTER, T.P. & LEATHERMAN, M.W. Powder characteristics of proteins spray-dried from different spray-dryers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.21, n.15, p.1075-1723, 1995.

FOX K. K.; HOLSIMGER, V. W.; HARPER, M. K.; HOWARD N.; PRYOR, L. S.; PALLANSCH, M. J. Measurement of the Surface Areas of Milk Powders by a Permeability Procedure, **Food Technol.**, v. 17, p. 127, 1963.

FRANKS, F.; HATLEY R.H.M. Stability of proteins at subzero temperatures: thermodynamics and some ecological consequences, **Pure & Appl. Chem.**, v.63, n.10, p.1367-1380, 1991.

FREUDLICH, H. Colloid and Capillary Chemistry, **Methuen & Co. Ltd.**, London, 1926.

FUNG, D.Y.C.; CUNNINGHAM, F.E. Effect of microwaves on microorganisms in foods. **J. of Food Protection.**, v.43, n.8, p.641-650, 1980.

GALUCCI, C.A.; FREIRE, J.T. Estudo do comportamento da secagem de ovo integral, albume e gema em *spray dryer*. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados. São Carlos, v.2, p.578-585, 1997.

GOLDSTEIN, J.I.; NEWBURY, D.E.; ECHLN, P.; JOY, D.C.; ROMIG Jr, A.D.; LYMAN, C.E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. A text for biologists, materials scientists and geologists, New York, Plenum, p. 149-63, 1992.

GUNASEKARAN, S.; PAULSEN, M.R., Breakage resistance of corn as a function of drying rates , **Transactions of the ASAE**, v.28, n.6, p.2071-2076, 1985.

GUNASEKARAN, S.; Grain drying using continuous and pulsed microwave energy. **Drying Technology**, n.8, v.5, p.1039-1047, 1990.

GUNASEKARAN, S. Pulsed Microwave-Vaccum of Food Materials. **Drying Technology**. v.17, n.3, p.395-412, 1999.

GUSTAFSON, R.J.; HALL, G.E. Equilibrium moisture content of shelled corn from 50 to 155^oF, **Trans. ASAE**, v.17, n.1, p.120-124, 1974.

HAYASHI, T.; ABIBA, T.; HORIKOSHI, K. Properties of new alkaline maltohexaose forming amylases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.3, p. 281-285, 1988.

HELLER, M.C.; CARPENTER, J.F.; RANDOLPH, T.W. Manipulation of lyophilization-induced phase separation: Implications for pharmaceutical proteins, **Biotechnol. Progress**, v.13, n.5, p.590-596, 1997.

HELLER, M.C.; CARPENTER, J.F.; RANDOLPH, T.W. Protein formulation and lyophilization cycle design: prevention of damage due to freeze-concentration induced phase separation, **Biotechnol. Bioeng.**, v.63, n.2, p.166-174, 1999.

HENDERSON, S.M. A basic concept of equilibrium moisture . **Agricultural Engineering**, v.33, n.1, p.29-32, 1952.

HUULT, R. Retention des arômes dans les poudres de fruits tropicaux obtenues dans un four à micro-ondes sous vide, **Fruits**, v.5, p.399, 1974.

IGARASHI, L. Estudo do pré tratamento osmótico de tomate usados na secagem, Campinas: Faculdade de Engenharia de Química, 1999. 108 p. Dissertação (Mestrado).

JAYARAMAN, K.S.; DAS GUPTA, D.K., Drying of Fruits and Vegetables, In: Handbook of Industrial Drying, ed. MUJUNDAR, A.S., Library of Congress Cataloging - in - Publication Data. Second Edition. New York, v.1, p.661, 1995.

JIANG, S.; NAIL, S.L. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.45, n.3, p.249-257, 1998.

KARATHANOS, V.T., KANELLOPOULOS, N.K., BELESSIOTIS, V.G. Development of porous structure air drying of agricultural plant products, **Journal of Food Engineering**, n.29, p.167-183, 1996.

KHRAISHEH, M.A.M.; COOPER, T.J.R.; MAGGE, T.R.A. Investigation and Modeling of Combined Microwave and Air Drying, **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, n.73, p.121-126, 1995.

KING, C.J. Freeze-drying of foods, Editora Butterworths, London, 1971.

KIRANOUDIS C. T.; TSAMI E.; MAROULIS Z. B. Microwave vacuum drying kinetics of some fruits, **Drying Technology**, v.15, n.10, p.2421-2440, 1997.

KROKIDA, M.K., KARATHANOS, V.T., MAROULIS, Z.B. Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products, **Journal of Food Engineering**, n.35, p.369-380, 1998.

KUDO, N.; HOLS, G.; VAN MIL, P.J.J.M. The insolubility index of moist skim milk powder: Influence of the temperature of the secondary drying air. **Netherlands Milk and dairy Journal**, v.44, p.89-98, 1999.

LABRUDE, P.; RASOLOMANNA, M.; VIGNERON, C., THIRION, C. CHAILLOT, B. Protective effect of sucrose on spray drying of oxyhemoglobin, **Journal Pharm. Sci.**, v.78, p.223-229, 1989.

LABUZA, T.P. Sorption phenomena in foods. **Food technology**, v.22, p.15-24, 1968.

LAMBERT, J.P. Biological hazards of microwave radiation, **J. of Food Protection**, v.43, n.8, p.625-628, 1980.

LANGMUIR, I. The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica, and Platinum, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 40, p. 1361, 1918.

LEFEUVRE, S.; PANESI, A.; AHMADPANAHI, M.; MANGIN, B. & REZUAN, Y. Industrial Material Drying by Microwave and Hot Air, **Proceedings of the IMPI Conference**, Ottawa, p.65-67, 1978.

LEFEUVRE, S. Microwave Drying of Porous Materials, **Physical Technology**, n.12, p.155-161, 1981.

LÉVÊQUE, E.; JANEČEK, Š.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes, **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.3-14, 2000.

LIMA, O.C.M.; MACHADO, M.A.L.S.; OLIVEIRA, V.M. Estudo sobre a secagem de papel V: secagem condutiva/convectiva com ar ambiente. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados. São Carlos, v.2, p.647-653, 1997.

LOBRAÑA, J.I.; VILLARÁN, M.C. The influence of pressure and temperature on freeze-drying in an adsorbent medium and establishment of drying strategies, **Food Research International**, v.30, n.3/4, p.213-222, 1997.

LOMAURO, C.J.; BAKSHI, A.S.; LABUZA, T.P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I and II. **Lebensm.-Wiss. und Technol.**, v.18, n.2, p.111-117, 1984.

LUCAS, P.; FREIRE, J.T.; SILVEIRA, A.M. Influência do Congelamento na Qualidade do Sangue Liofilizado. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados. São Carlos, v.2, p.586-593, 1997.

LUYBEN, K. C. A. M.; LIOU, J. K.; BRUIN, S. Enzyme Degradation during Drying, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 534-536, 1982.

MAA, Y-F.; NGUYEN, P-A; SIT, K.; HSU, C.C. Spray-Drying performance of a Bench-top spray dryer for protein aerosol power preparation, **Biotechnology and Bioengineering**, v.60, n.3, p.301-309, 1998.

MANCINI, M.C.; ALPANDE, T.R.; SANTOS, D.Q.; TEIXEIRA, F.F. Estudo da cinética de secagem de bananas em um secador de bandejas, Anais do 2° Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, p.203-210, 1997.

MARINOS-KOURIS, D.; MAROULIS, Z. B., Transport Properties in Drying of Solids, In: Handbook of Industrial Drying, ed. MUJUNDAR, A.S., Library of Congress Cataloging - in - Publication Data. Second Edition. New York, v.2, p.113-159, 1995.

MAROULIS, Z. B.; TSAMI, E.; MARINOS-KOURIS, D. Application of the GAB Model to the Moisture Sorption Isotherms for Dried Fruits, **Journal of Food Engineering**, n. 7, p. 63-67, 1988.

MASTERS, K. Spray drying, **Hill Books**, London, 668p., 1985.

MC CORMICK, P.Y. Solids drying fundamentals. In.: Chemical Engineer's handbook. Mc Graw-Hill Co. 5ed. Sec. 20-4, 1983.

McLAREN, A. D.; ROWEN, J. W. Sorption of Water Vapor by Proteins and Polymers: A Review, *J. Polymer Sci.*, v. 7, p. 289, 1952.

MEDDA, S., CHANDRA, K. New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. **Journal of Applied Bacteriology**, v.48, p.47-58, 1980.

MEISSEL, N. Microwave-vacuum drying by the Gigavac-process for continuous manufacture of instantly soluble fruit powders, **Microwave Energy Appl. Newsletter**, v.12, n.6, p.3-6, 1979.

MENON, A.S.; MUJUNDAR, A.S. Drying of solids: Principles, classification and selection of dryers, In: Handbook of Industrial Drying, ed. MUJUNDAR, A.S., Library of Congress Cataloging - in -Publication Data. Second Edition. New York, v.1, p.140, 1995.

MUDGETT, R.E. Microwave properties and heating characteristics of foods, **Food Technology**, n.40, v.60, p.84-93,98.

NATH, S.; SATPATHY, G.R. A systematic approach for investigation of spray drying processes, **Drying Technology**, v.16, n.6, p.1173-1193, 1998.

NOGUEIRA, R.I. Processo de secagem de banana (*Musa acuminiata* subgrupo *cavendish* cultivar *nanica*): parâmetros de obtenção de banana passa, Campinas: Faculdade de Engenharia de Agrícola, 1991. 158 p. Dissertação (Mestrado).

NOREÑA, C.Z.; HUBINGER, M.D.; MENEGALLI, F.C. Técnicas básicas de Determinação de Atividade de Água: uma Revisão, **Bol. SBCTA**, v.30, n.1, p.91-96, 1996.

NOVO NORDISK, **Folhetos técnicos**, 2000.

OFOLI, R. Y.; KOMOLPRASERT, V. On the Thermal Modeling of Foods in Electromagnetic Fields, **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 12, p. 219-241, 1988.

OGASAHARA, K.; IMANISHI, A.; ISEMURA, T. Studies on thermophilic α -amylase from *Bacillus stearothermophilis*. II. Thermal stability of thermophilic α -amylase. **The Journal of Biochemistry**, v.67, n.1, p.77-82, 1970.

OHBA, T.; TAKAHASHI, K.; IGARASHI, S. Mechanism of insoluble material formation in spray dried whole milk powder. **Reports of Research Laboratory**, v.88, p.91-108, 1989.

OKADA, S.; KITAHATA, S.; HIGASHIHARA, M.; FUKUMATO, J. Classification of α -amylases by the action patterns on maltodioligosaccharides, **Agricultural and Biological Chemistry**, v.33, n.6, p.900-906, 1969.

PADUA, G.W.; Microwave-heating of agar gels containing sucrose. **J. Food Sci.** n.58, v.6, p.1426-1428, 1993

PAGE (1949). Citado em MOTTA LIMA, O.C. & MASSARANI, G. Estudo sobre secagem de papel III: uma análise das equações de secagem, **Anais do XXIII COBRASP**, v.1, Ed. DEQ/CTC-UEM, Maringá, 1996.

PATHAK, P.K.; AGRAWAL, Y.; SINGH, B.F. Thin-layer drying model for reseed, **Transactions ASAE**, v.34, n.6, p.2050-2508, 1991.

PEARCE, J.A.; YANG, S.I.; SCHIMIDT, P.S. A research program for dielectric heating and drying of industrial materials. In: SUTTON, W.H.; BROOKS, M.H.; CHABINSKY, I.J. Microwave processing of materials, **Mat. Res. Soc. Symp. Proceeding**, Pittsburg, v.124, p.329-334, 1988.

PERRY & CHILTON; **Manual de Engenharia Química**, 5ª edição, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1980.

PINTO L.A.A. Secagem de materiais fibrosos: músculo de peixe, São Carlos: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 1992. 104 p. Dissertação (Mestrado).

PINTO L.A.A. Cinética da Secagem de Filés de Peixes: Uso de um Modelo Difusivo com Variação de Volume, São Carlos: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 1996. 154 p. Tese (Doutorado).

PRABHANJAN, D.G.; RAMASWAMY, H.S.; RAGHAVAN, G.S.V. Microwave-Assisted Convective Drying of Thin Layer Carrots, **Journal of Food Engineering**, n.25, p.283-293, 1995.

RAO, M.A.; RIZVI, S.S.H. **Engineering Properties of Foods**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1986.

RICHARDSON, G. M.; MALTHUS, R. S. Salts for Statistic Control of Humidity at Relative Low Levels, **J. Appl. Chem**, v. 5, p. 557, 1955.

ROCKLAND, L. B. Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40°C, **Anal. Chem.**, v. 32, p. 1375, 1960.

ROSEN, C.G. Effects of microwaves on food related materials. **Food Technol.**, v.26, n.7, p.36-40, 1972.

SALVA, T.J.G. α -amilase de *Bacillus subtilis* ATCC 601B: Produção e propriedades da enzima não purificada. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1990. 128 p. Tese (Doutorado).

SANTIN, A.P. Estudo da Secagem e da Inativação de Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. 135p. Dissertação (Mestrado).

SCHÄR, W.; RÜEGG, M. The evaluation of G.A.B. constants from water vapour sorption data. **Lebensm.-Wiss. und. Technol.**, v.18, p.225-229, 1984.

STITT, F. Moisture Equilibrium and the Determination of Water Content of Dehydrated Foods, **Ch. In "Fundamental Aspects of the Dehydration of Foodstuffs"**, Soc. Chem. Industry, London, 1958.

STRAATSMA, J.; VAN HOUWELINGEN, G.; STREENBERGEN, A.E.; DE JONG, P. Spray drying of food products: 1. Simulation model, **Journal of Food Engineering**, v.42, p.67-72, 1999a.

STRAATSMA, J.; VAN HOUWELINGEN, G.; STREENBERGEN, A.E.; DE JONG, P. Spray drying of food products: 2. Prediction of insobility index, **Journal of Food Engineering**, v.42, p.73-77, 1999b.

STRUMILLO, C.; KUDRA, T. Drying: Principles, applications and design. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1986.

TAPE, N.W. Application of microwave energy in food manufacture. **Can. Inst. Food Technol. J.**, v.3, n.2, p.39-43, 1970.

TAYLOR, A. A. Determination of Moisture Equilibrium in Dehydrated Foods, **Food Technol.**, v. 15, p. 536, 1961.

TEIXEIRA NETO, R.O. Levantamento e aplicação de isotermas. In: Seminário sobre atividade de água em alimentos, **Resumos**, Campinas, ITAL, 1987.

TEYMANS, D.; LENGERS, J. Sechage de la Biomasse. **Rev. Ferm. Ind. Alim.**, v.39, n.2, p.31-44, 1983.

TOBINAGA, S. & PINTO, L.A.A. Secagem de materiais fibrosos: músculos de peixes, em Tópicos Especiais em Secagem, v.1, ed. J. T. Freire & D.J.M. Sartori, UFSCar, São Carlos, 1992.

TSAMI, E.; MARINOS-KOURIS, D.; MAROULIS, Z. B. Water sorption isotherms of raisins, currants, figs, prunes and apricots, **Journal of Food Science**, v. 55, n. 6, p. 1594-1595, 1990.

TSAMI, E.; MAROULIS, Z. B.; KIRANOUDIS C. T. Microwave vacuum drying kinetics of some fruits, **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2423-2425, 1997.

TURNER, I. W. A Study of the Power Density Distribution generated during the Combined Microwave and Convective Drying of Softwood, **Drying '94** (ed. A. S. Mujumdar), Marcel-Dekker, NY, p. 89-111, 1994.

VALLE, B.; SUMERWELL, W.N.; FISHER, E. Metal content of α -amylase of various origins. **Journal of Biological Chemistry**, v.234, n.11, p.2901-2905, 1959.

VAN BRAKEL, J. Mass Transfer in Convective Drying, ed. MUJUNDAR, A.S., **Advances in Drying**, Hemisphere Publishers, New York, v.1, p. 236-241, 1980.

VAN DEN BERG, C. Development of B.E.T. like models for sorption of water on foods, theory and relevance, *Properties of Water in Foods*, D. Simatos and J. L. Multon (Ed.), Martinus Nijhoff Publs. Dordrecht, 1985.

VAN DEN BERG, C.; BRUIN, S. Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects, **Water Activity: Influence on Food Quality**, L. B. Rockland and G. E. Stewart (Ed.) Academic Press, NY, 1981.

VAN STADEN, J.F.; MULAUDZI, L.V. Flow injection spectrophotometric assay of α -amylase activity, **Analytica Chimica Acta**, v.421, p.19-25, 2000.

VASCONCELLOS, A. M. H, NETO, A.L.C, VALLE A.B.F, PANEK A. D., QUINTO, G.F., OLIVEIRA, M. L. C.; OPERTI, M. S.; CHALOUB, R.M.; LEÃO, M.H.M.R.; *Cursos práticos em Bioquímica*, 6ª Edição, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da UFRJ 342 p., 1996.

VISSERS, R.J., ABU-LABAN, R.B., McHUGH, D.F., Amylase and Lipase in the emergency Department Evaluation of Acute Pancreatitis, **The Journal of Emergency Medicine**, v.17, n.6, p.1027-1037, 1999.

WAANANEN , K.M., LITCHFIEL, J.B.; OKOS, M.R.; Classification of drying models for porous solids, **Drying Technology**, v.11, n.1, p.1-40, 1993.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. In *Dairy Chemistry and Physics*. New York: Wiley, 1984.

WARD, K.R., ADAMS, G.D.J., ALPAR. H.O. IRWIN, W.J. Protection of the enzyme L-asparaginase during lyophilization – a molecular modelling approach to predict required level of lyoprotectant, **International journal of pharmaceutics**, v.187, p.153-162, 1999.

WEISSER, H. Influence of temperature on sorption equilibria, **Properties of Water in Foods**, D. Simatos and J. L. Multon (Ed.), Martinus Nijhoff Publs., Dordrecht, 1985.

WINK, W. A.; SEARS, G. R. Equilibrium Relative Humidities Above Saturated Salt Solutions at Various Temperatures, **Tappi**, v. 33, p. 96A, 1950.

ZHANG, H.; DATTA A.K., Microwave heating patterns as affected by food placements inside an oven. Abstract no. 70-4. IFT Book of Abstracts, IFT Annual Meeting, Atlanta, 1998.

APÊNDICE

Modelagem e dinâmica conformacional

Foi realizado em paralelo ao trabalho experimental um estudo inicial de modelagem e dinâmica conformacional da enzima α -amilase de *Bacillus licheniformis* com o intuito de se verificar alguns aspectos relevantes na sua perda de atividade biológica quando exposta a altas ou baixas temperaturas, tentando assim correlacionar com os dados experimentais obtidos nesta dissertação.

A.1 INTRODUÇÃO

Recentes avanços na engenharia genética têm aumentado o interesse em pesquisas relacionadas com a conformação proteica. A habilidade em predizer estas estruturas é de grande interesse teórico, especialmente nos ramos da bioquímica e da biofísica. Além disso, as aplicações destes conhecimentos prometem ser de grande interesse como por exemplo, a habilidade em predizer estas estruturas aumentaria muito o entendimento de hereditariedade e de doenças infecciosas nas informações do genoma. Além dessas vantagens, a habilidade para o entendimento da conformação proteica revolucionaria o processo de desenvolvimento de novas drogas (KLEPEIS *et al.*, 1998).

O uso de técnicas computacionais e simulação destinados aos problemas de conformação proteica tornou-se possível através da introdução de métodos qualitativo e quantitativos para modelar estes sistemas. O desenvolvimento de modelos realistas de energia estabelecem uma ligação ao campo de otimização global, na qual a quantidade a ser otimizada é a energia livre do sistema. Entretanto, devido à complexidade computacional associada com estes problemas, apenas as estratégias de otimização global mais eficientes serão bem sucedidas.

Os conhecimentos teóricos da mecânica quântica aplicados através de algoritmos computacionais, são os elementos essenciais da simulação. A implementação adequada destes algoritmos através de uma linguagem de programação permite obter o grau de simulação desejado de um sistema em questão.

Dentro da química, a modelagem molecular auxilia em grande medida ao discernimento, compreensão e predição de processos químicos, assim como o estudo de espécies de difícil manipulação por ter pouca estabilidade e apresentar-se em quantidades difíceis de se quantificar (por exemplo, estados de transição e intermediários).

Atualmente a simulação molecular tem como principal objetivo prever certos fenômenos e principalmente diminuir o tempo de processo de simulação. Em muitos casos, a qualidade dos resultados de um processo de simulação dependerá do tempo computacional investido.

A interpretação dos resultados numéricos da simulação proporciona informações úteis de vários parâmetros físico-químicos de um sistema molecular, como sua geometria e sua energia, revelando interações e dependências de outros parâmetros do sistema.

Moléculas muito grandes, tais como proteínas que possuem substituintes com cargas e espécies com interações de diferentes tipos, apresentam suficientes graus de liberdade para fazer de sua simulação uma tarefa extremamente complexa. A necessidade de partir de sistemas relativamente simples para provar a eficiência de algum método de cálculo de simulação deve ser utilizada como primeiro passo para sua posterior aplicação em sistemas mais complexos (ORCERO & VALÉN, 1999).

Atualmente um grande número de programas computacionais estão disponíveis, sendo que apenas alguns utilizam a representação de todos os átomos da conformação

proteica. Entre estes programas podemos citar o MOIL, ECEPP, AMBER, CHARMM, GROMOS, FANTOM e KONF90 (EISENMENGER *et al.*, 2001).

A.1.1 O programa ECEPP

A tarefa básica de todo programa de simulação de proteína é descrever sua conformação e calcular a sua energia conformacional.

No programa Empirical Conformational Energy Program for Peptides (ECEPP), as conformações são descritas por meio de um modelo padrão de geometria. Neste modelo, a proteína é descrita pelo conjunto de coordenadas internas definidas (Figura A.1). Os ângulos e as ligações de valência são descritos por rigorosos graus de liberdade fazendo com que as barreiras de energia para sua deformação sejam de diversas ordens maiores do que a energia resultante das flutuações térmicas em temperaturas biologicamente relevantes. Por outro lado, os ângulos de diedro (Figura A.2) ϕ_i , ψ_i , ω_i , que descrevem as rotações em torno da ligação química (torsão) ao longo da cadeia dos aminoácidos, e os ângulos de diedro das cadeias laterais, são muito mais flexíveis. A escala da energia para estas rotações é aproximadamente 1 kcal/mol que é da ordem da constante de Boltzmann com a temperatura ($k_B T$). Assim, estas variáveis estão sujeitas a flutuações em temperaturas ambiente. Note que a ligação CO-N da Figura A.1 tem um hibridização eletrônica específica que conduz à estrutura estritamente planar do grupo de átomos C_α -CO-N-H em temperaturas biológicas relevantes. Isto é porque o ângulo de diedro ω , associado com as rotações em torno desta ligação, é muito menos flexível do que os outros ângulos diedrais.

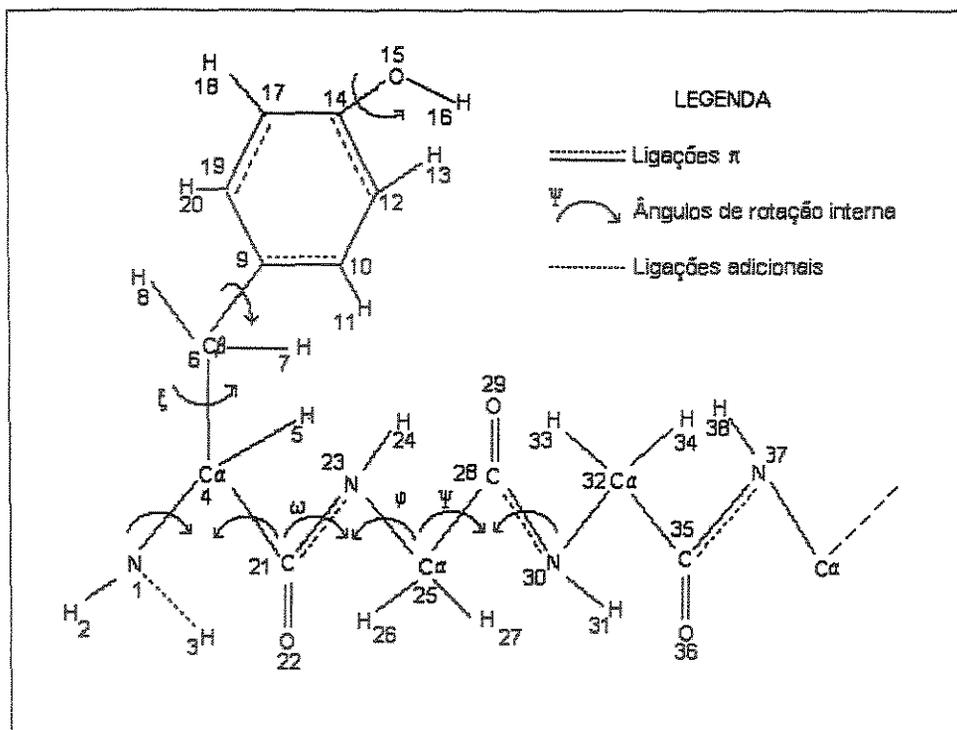


Figura A.1 Definição de coordenadas internas

Fonte: EISENMENGER *et al.*, 2001.

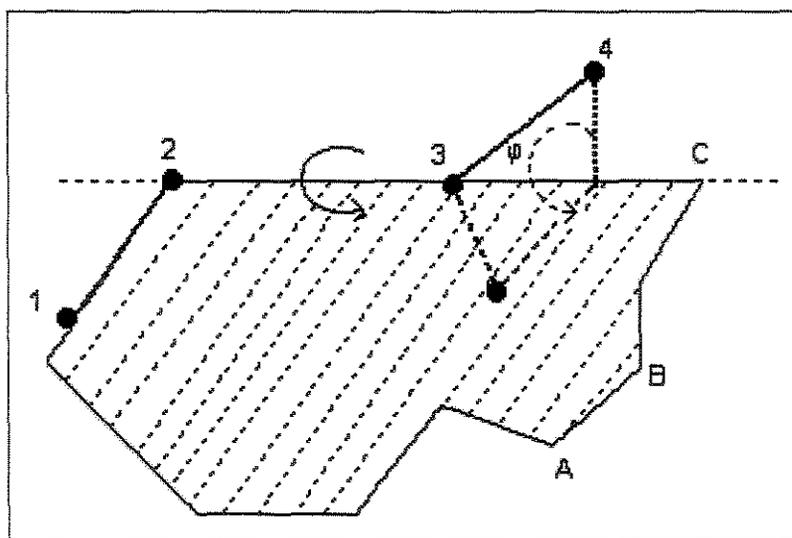


Figura A.2 Definição de ângulos de diedro, onde: ligação 3-4 rotação em torno do eixo 2-3 do ângulo ϕ até o chegar ao plano hachurado.

Fonte: EISENMENGER *et al.*, 2001.

A.1.1.1 Modelo Matemático

Através da aplicação da mecânica molecular pode-se calcular a geometria e a energia de uma molécula. O método empírico é baseado no modelo da mecânica clássica que utiliza funções analíticas que incluem parâmetros ajustáveis que permitem uma melhor representação de determinadas propriedades moleculares, como a geometria, energia conformacional, calor de formação, entre outros.

A diferença dos métodos quânticos não se trata explicitamente dos elétrons e núcleos dos átomos, basicamente se fundamenta em que as ligações têm um comprimento e ângulo “naturais” e as moléculas se ajustam a eles. Adicionalmente incluem também interações estéricas (potenciais de Van der Waals) e eletrônicas. As moléculas são consideradas como um conjunto de esferas de diferentes tamanhos ligadas entre si por molas de diferentes comprimentos comportando-se ao sistema de uma maneira elástica (lei de Hooke), desta forma interagem entre si uma série de massas mediante forças harmônicas.

O conjunto de valores ótimos de comprimento e ângulos de ligação, torsão e interações entre átomos não ligados, junto com suas funções de potencial e parâmetros correspondentes se denomina campos de força (ORCERO & VALÉN, 1999).

No programa ECEPP/3 a energia potencial total (E_T) ou energia estérica de uma proteína é dada pelo somatório de dois campos de forças: energia espacial e energia torsional. A parte espacial é expressa pelo somatório das interações energéticas entre átomos. Nesta parte incluem-se o termo eletrostático, termo repulsivo e atrativo Lennard-Jones e o potencial das ligações de hidrogênio, sendo que nesta parte a energia espacial depende basicamente das distâncias entre átomos. Na segunda parte temos a energia torsional de uma molécula, sendo esta reduzida a um somatório de energias torsionais para cada ligação. Cada energia de ligação torsional é somente uma função do ângulo de diedro correspondente, sendo descrito por um potencial periódico com uma barreira de energia para cada ligação química (EISENMENGER & HANSMANN, 1997; EISENMENGER *et al.*, 2001).

A equação resultante destes dois termos tem a seguinte forma:

$$E_T = E_{LJ} + E_{EL} + E_{HB} + E_{TORS} \quad (A.1)$$

onde: E_{LJ} representa o termo potencial repulsão e atração Lennard-Jones, conforme a Equação A.1.1.

$$E_{LJ} = \sum_{i>j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (A.1.1)$$

r_{ij} é a distância em Angstrom (\AA) entre átomos i e j ;

A_{ij} e B_{ij} , são parâmetros dos potenciais empíricos.

No termo de Lennard-Jones aqui utilizado assume-se que as moléculas que se deseja simular não se combinam; assume-se também que as forças entre as moléculas dependem apenas da distância entre elas. Verifica-se experimentalmente para líquidos simples uma forte repulsão para distâncias pequenas entre as moléculas, e uma pequena atração para grandes distâncias.

Essa pequena atração para r grande deve-se à força de Van der Waals. Esta força deve-se à uma atração de dipolos elétricos; as moléculas têm dipolos elétricos flutuantes, devido ao comportamento flutuante dos elétrons; estes dipolos elétricos instantâneos geram campos elétricos que induzem um momento de dipolo na distribuição de carga da molécula vizinha; como a força entre dipolo elétrico indutor e induzido é sempre atrativa, as moléculas sofrem atração fraca.

Quando a distância entre as moléculas é pequena, as nuvens eletrônicas começam a superpor-se, e surge uma força de repulsão para impedir que os elétrons ocupem o mesmo estado quântico. Tem-se assim uma força de repulsão forte para r pequeno e uma força de atração fraca dominante para grande distâncias. A maiores distâncias, ambas tendem a zero.

O termo r_{ij}^6 descreve as atrações dispersivas de London entre os átomos e o termo r_{ij}^{12} descreve as interações repulsivas causadas por o princípio de exclusão de Pauli.

No segundo termo da Equação A.1, E_{EL} representa a contribuição de energia da interação eletrostática.

Neste termo leva-se em conta os efeitos de repulsão e atração entre cargas de moléculas com grupos polares. Utiliza-se o potencial de Coulomb, já que a carga parcial de um determinado tipo de grupo químico permanece relativamente constante.

Os momentos dipolares associados a cargas parciais também podem ter efeitos na energia total da molécula. O momento dipolar total pode ser representado como um vetor soma dos dipolos associados a cada ligação (geralmente, a conformação na que o momento dipolar total é menor é a mais estável).

O potencial eletrostático pode ser representado pela equação abaixo:

$$E_{EL} = 332 \sum_{i>j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right) \quad (\text{A.1.2})$$

q_i e q_j são cargas parciais dos átomos i e j respectivamente;

ϵ é a constante dielétrica do ambiente. Na presença de água assume-se que a distância depende da permissividade eletrostática de acordo com a seguinte equação:

$$\epsilon(r) = D - \frac{D-2}{2} [(sr)^2 + 2sr + 2] \exp(-sr) \quad (\text{A.1.2.1})$$

onde o valor empírico dos parâmetros D e s são escolhidos por um caminho semelhante para permissividades em larga distâncias, para curtas distâncias as interações da molécula com moléculas do solvente pode ser negligenciada e a constante dielétrica pode ser assumida como $\epsilon = 2$, correspondendo ao espaço interior da proteína.

O valor 332 da Equação A.1.2.1 é utilizado para expressar a energia em kcal/mol.

O termo E_{HB} representa a função energia das pontes de hidrogênio, que é representado pela seguinte expressão:

$$E_{HB} = \sum_{i>j} \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \quad (\text{A.1.3})$$

C_{ij} e D_{ij} são parâmetros dos potenciais empíricos.

Estes potenciais aparecem já que os potenciais de Van der Waals não são capazes de refletir corretamente as interações por pontes de hidrogênio. Neste caso se utiliza a equação (A.1.2) corrigida com um termo repulsivo mais forte.

E_{TOR} é a energia torsional da molécula. Este potencial tornou-se importante ao notar-se que os potenciais anteriores eram incapazes de obter resultados corretos enquanto as diferenças nas conformações eclipsadas do etano. Para corrigi-lo foi introduzido uma função cosseno que reproduz uma energia mínima na conformação alternada e máxima na eclipsada. Assim mediante estas funções se tem em conta a barreira rotacional podendo ser escrito pela expressão abaixo:

$$E_{TOR} = \sum_n U_n [1 \pm \cos(K_n \varphi_n)] \quad (A.1.4)$$

Neste termo a energia torsional de uma molécula é reduzida a um somatório de energias torsionais para cada ligação. Cada energia torsional de ligação é somente uma função do ângulo diédrico correspondente descrito por um potencial periódico com uma barreira de energia para cada tipo de ligação química.

O termo U_n representa a barreira de energia torsional da rotação aproximada da ligação n ; K_n é a multiplicidade do ângulo de torção φ_n .

O valor \pm deve-se ao fato que se for +1 teremos a conformação alternada e -1 eclipsada. Fisicamente, se $n = 1$ corresponderá a uma interação dipolo-dipolo, se $n = 2$ há uma hiperconjugação em alcanos (ou conjugação em sistemas insaturados) e para $n = 3$ há um impedimento estérico.

E_{TORS} depende de φ_n explicitado, os outros termos dependem apenas dos ângulos implícitos das distâncias r_{ij} .

A.1.1.1.1 Cálculo do desvio médio quadrado

O cálculo do desvio médio quadrado, mais conhecido como root mean squared deviation (RMSD) é utilizado para ajuste entre duas moléculas (duas camadas). Neste cálculo não são utilizados os átomos de hidrogênio.

O RMSD é calculado de acordo com a Equação A.2:

$$RMSE = \sqrt{\frac{E_{(DIST)}^2}{nb_{\text{atomos}}}} \quad (A.2)$$

onde $E_{(DIST)}$ é a distância (em ângstroms) entre um par de átomos relacionados e nb_{atomos} são átomos não ligados entre si.

A.2 METODOLOGIA

A.2.1 Material

Através dos estudos realizados por eletroforese da enzima em estudo e pela consulta no banco de dados de sequenciamento molecular "SWISS-PROT" foi verificada maior similaridade da enzima α -amilase de *Bacillus licheniformis* com a α -amilase utilizada nos experimentos, pois a enzima utilizada nos experimentos é de origem bacteriana (gênero *Bacillus*) obtida industrialmente, não sendo possível neste trabalho obter o seu sequenciamento.

A α -amilase de *B. licheniformis* é constituída de 512 aminoácidos e tem massa molar de 58.549 Da (Figura A.3).

Os estudos conformacionais foram realizados através de métodos computacionais com o auxílio do programa ECEPP/3 versão IBM-AIX. Para a visualização tridimensional foi utilizado os softwares SpdbViewer e RasMol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	Met	Lys	Gln	Gln	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ala	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	15
16	Phe	Ala	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Pro	His	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	30
31	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Met	Pro	45
46	Asn	Asp	Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ser	Ala	Tyr	60
61	Leu	Ala	Glu	His	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	75
76	Lys	Gly	Thr	Ser	Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	90
91	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	His	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	105
106	Tyr	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu	Leu	Gln	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	His	120
121	Ser	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Lys	135
136	Gly	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	150
151	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val	Ile	Ser	Gly	Glu	His	Arg	Ile	Lys	165
166	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	180
181	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asp	Trp	Asp	195
196	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	210
211	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	225
226	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	Ala	Ala	Glu	240
241	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln	Leu	Asp	255
256	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	Leu	270
271	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	285
286	Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	300
301	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	315
316	Pro	Leu	His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	330
331	Tyr	Asp	Met	Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	345
346	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	360
361	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	375
376	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	390
391	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly	Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	405
406	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile	Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	420
421	Lys	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gln	His	Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	435
436	Asp	Ile	Val	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp	Ser	Ser	Val	Ala	Asn	450
451	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Ala	Lys	465
466	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Glu	Thr	Trp	His	Asp	480
481	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	Ser	Glu	Gly	495
496	Trp	Gly	Glu	Phe	His	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Tyr	Val	510
511	Gln	Arg														

Figura A.3 Sequenciamento de aminoácidos da enzima α -amilase de *B. licheniformis*.

Fonte: SWISS-PROT

A.2.2 Método Computacional

Os valores das coordenadas internas de cada átomo que compõe a cadeia protéica foi obtida através do Protein Data Bank (PDB) do Laboratório Nacional de Brookhaven (BNL). O modelo estrutural tridimensional da proteína foi gerado a partir da interpretação do padrão de difração de raios-X produzido por um cristal da macromolécula. Este arquivo

A.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em termos gerais, a geometria molecular é considerada otimizada se não for possível baixar a E_T através de qualquer distorção da geometria, a Tabela A.1 apresenta os valores de E_T encontrados para as simulações moleculares.

Para cada simulação o programa calcula todos os parâmetros da Equação A.1 e logo após realiza o somatório geral (E_T). Parte do arquivo de uma das simulações está ilustrado na Figura A.5.

```

C:\spdbv\temp\1BPL.E1
/ Computations were done in vacuo with the GROMOS96 43B1 parameters set, without reaction field.
/ For more information about GROMOS96, refer to: W.F. van Gunsteren et al. (1996) in Biomolecular
/ simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Vdf Hochschulverlag ETHZ (http://loc.ethz.ch/gromos).
/ When using those results, please mention that energy computations were done with the GROMOS96
/ implementation of Swiss-PdbViewer.
-----
/ residue      bonds      angles      torsion      improper      nonBonded      electrostatic constraint // TOTAL
-----
HET  A  3      0.000      6.183      7.540      0.000      0.00      -38.38      0.0000 // E= -2
LEU  A  3      3.029      3.714      10.515     0.438      -15.84      151.56      0.0000 // E= 15
ASN  A  4      2.035      0.795      2.525      0.389      -28.10      -132.97      0.0000 // E= -15
GLY  A  5      2.003      1.037      2.488      2.181      -12.00      35.66      0.0000 // E= 3
THR  A  6      1.005      1.036      3.322      1.055      -31.34      -26.92      0.0000 // E= -5
LEU  A  7      2.491      19.934     1.112      0.149      -56.31      -18.55      0.0000 // E= -5
MET  A  8      13.626     1.906      3.534      1.345      -53.67      -9.32      0.0000 // E= -4
GLN  A  9      2.896      6.811      5.605      0.916      -44.17      -168.53      0.0000 // E= -19
TYR  A  10     2.910      4.831      9.685      2.064      -57.12      -63.29      0.0000 // E= -10
PEP  A  11     2.740      2.422      3.225      1.477      -67.49      -4.89      0.0000 // E= -6
GLU  A  12     8.719      9.490     12.959     0.134      -50.72      1.52      0.0000 // E= -1
TRP  A  13     21.175     6.461      3.292      4.481      -69.08      -10.15      0.0000 // E= -4
TYR  A  14     1.533     12.057     2.699      1.376      -47.06      -27.06      0.0000 // E= -5
MET  A  15     9.339      2.242      2.253      1.446      -24.67      23.67      0.0000 // E= 1
PRO  A  16     3.039     22.330     16.648     0.907      -25.90      -29.68      0.0000 // E= -1
ASN  A  17     1.591      3.261      3.888      0.188      -21.12      -159.33      0.0000 // E= -17
ASP  A  18     1.473      3.062      2.111      1.203      -16.12      32.99      0.0000 // E= 2
GLY  A  19     0.812      4.322     0.503      0.451      -20.13      34.23      0.0000 // E= 2
GLN  A  20     0.919      6.702     4.043      0.021      -28.86      -164.86      0.0000 // E= -18
HISB A  21     12.329     6.685     4.014      2.016      -49.10      -15.26      0.0000 // E= -3
TRP  A  22     25.455     5.422     0.765      4.693      -84.15      -22.86      0.0000 // E= -7
LYSH A  23     3.767      4.921     2.130      0.006      -30.69      -6.76      0.0000 // E= -2
ADC  A  24     2.555      2.118     4.827     0.881      -35.57      -266.92      0.0000 // E= -29
LEU  A  25     1.361      5.437     1.682     0.332      -46.28      -6.39      0.0000 // E= -4
GLN  A  26     1.159      1.193     2.450     1.126      -27.06      -166.69      0.0000 // E= -18
ASN  A  27     2.360      1.331     2.821     0.721      -18.03      -153.26      0.0000 // E= -16
ASP  A  28     1.373      7.604     16.383     0.129      -27.66      -28.10      0.0000 // E= -3
SER  A  29     1.117      6.170     4.019     2.429      -25.72      -27.99      0.0000 // E= -3
ALA  A  30     1.202      0.794     1.327     1.247      -19.75      -7.24      0.0000 // E= -2
TYR  A  31     2.146      3.542     2.482     0.850      -47.83      -53.05      0.0000 // E= -9
LEU  A  32     0.843      3.183     1.408     0.157      -49.04      -14.34      0.0000 // E= -5
ALA  A  33     0.605      3.798     0.980     0.164      -23.98      -7.66      0.0000 // E= -2
GLU  A  34     1.204      5.629     3.740     2.830      -25.10      -4.41      0.0000 // E= -1
HISA A  35     13.465     5.915     4.396     1.891      -40.66      30.14      0.0000 // E= 1
GLY  A  36     0.483      9.833     3.402     0.664      -17.68      33.65      0.0000 // E= 3
ILE  A  37     6.148      7.191     6.681     3.798      -33.77      4.62      0.0000 // E= -
THR  A  38     1.634      4.862     4.862     0.063      -18.94      -7.04      0.0000 // E= -1
ALA  A  39     0.561      2.260     2.085     0.126      -32.64      -5.75      0.0000 // E= -3
  
```

Figura A.5 Valores dos parâmetros simulados para cada aminoácido da cadeia enzimática.

Tabela A.1 Valores de temperaturas utilizadas e suas respectivas E_T .

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura (K)	Energia potencial total (KJ)
-90	183	-130.243,20
25	298	-134.494,40
70	343	-123.393,40
130	403	-86.252,36
145	418	-84.221,55
180	453	-60.442,33
215	488	-55.234,83
230	503	-40.421,23

A figura A.6 apresenta a dependência da E_T com a temperatura.

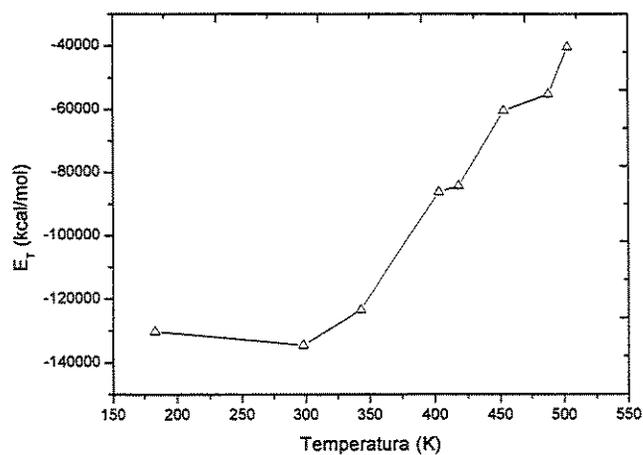


Figura A.6 Energia potencial total (E_T) em função da temperatura.

A figura A.6 mostra que a temperatura deve influenciar muito na conformação pois quanto maior a temperatura maior o valor E_T , o que compromete sua geometria e consequentemente a atividade enzimática. A especificidade de ligação depende do arranjo, definido com precisão dos átomos no centro ativo.

Experimentalmente foi comprovado que a temperaturas de até 70°C a enzima ainda mantém sua atividade enzimática, porém com menos eficiência.

Quando o experimento foi realizada a temperatura de -90°C houve um maior tempo de simulação, cabe ressaltar que a energia total é calculada através de um gradiente de temperatura, que neste caso foi realizado a uma temperatura inicial de -98°C até a temperatura desejada. Alguns pesquisadores relataram que simulações a baixas temperaturas pode ocasionar grandes erros e que em muitos casos não podem predizer dados experimentais;

Com relação aos dados experimentais foi verificado que embora a simulação realizada com a temperatura de -90°C ter sido muito lenta em relação a temperaturas muito altas, o valor de E_T é muito baixo ou seja a conformação e o centro ativo da enzima não deve ter sido muito afetada, o que foi comprovado experimentalmente com os estudos de liofilização, outro fato foi que maiores valores de E_T foram obtidos para valores de temperaturas mais altas, este fato também foi reportado nos experimentos de atomização, pois os valores das atividades enzimáticas foram menores que nos experimentos de liofilização.

Cabe ressaltar também que resultados mais precisos e que compreendessem melhor o comportamento da enzima nestas temperaturas seria sua simulação com variação de pressão e tempo.

As mudanças conformacionais da enzima a nível macroscópico não são visualizadas, pois o que foi verificado através do programa ECEPP/3 é que há apenas deslocamento de átomos da cadeia protéica, fazendo com que algumas moléculas de aminoácidos obtenham uma conformação desfavorável comprometendo assim o centro ativo e o que experimentalmente leva a precipitação da enzima.

As Figuras A.7 e A.8 mostram a estrutura tridimensional otimizada à 25°C da enzima α -amilase, com visualização de dois softwares diferentes.

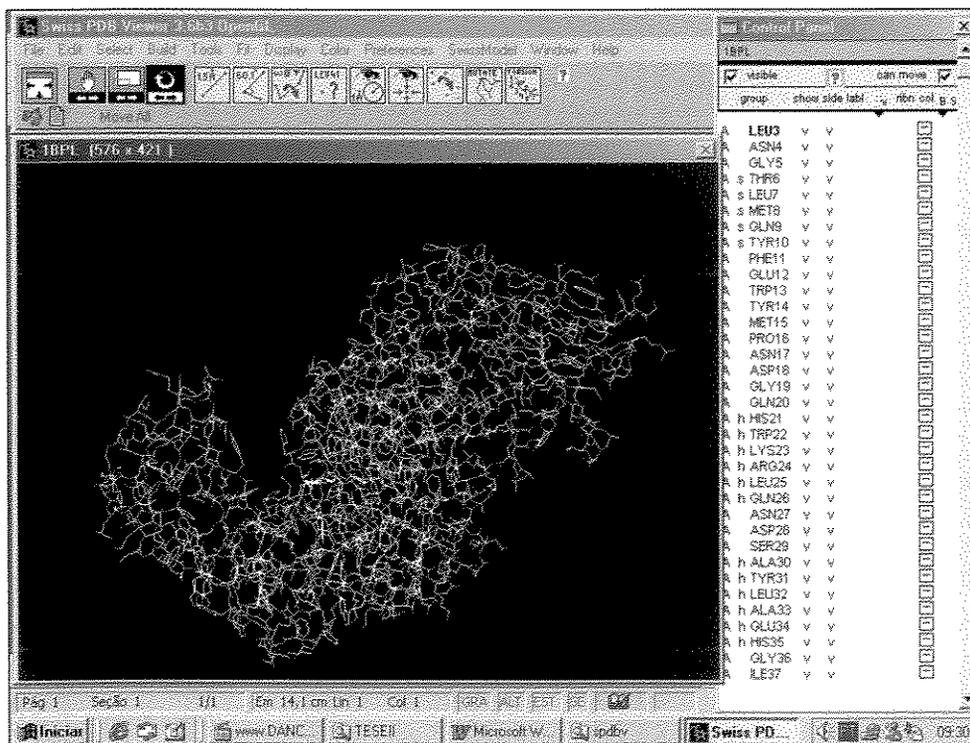


Figura A.7 Estrutura tridimensional da enzima α -amilase a 25⁰C utilizando o software SpdbViewer.



Figura A.8 Estrutura tridimensional da enzima α -amilase a 25⁰C utilizando o software RasMol.

A.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi verificado que:

- A E_T é dependente da temperatura, sendo que quanto maior a temperatura maior o seu valor, microscopicamente há um maior movimento atômico na molécula, causando a desnaturação da proteína. Este deslocamento atômico não é observado por programas de visualização gráfica como o SpdbViewer e RasMol.
- A modelagem molecular pode ser utilizada como ferramenta para prever certos fenômenos e prever qual o melhor método de secagem, não sendo necessário a realização de alguns experimentos, para que isso seja possível é necessária a investigação de outros fatores relevantes no processo, como a pressão e o tempo de secagem.

Com base nos resultados e conclusões obtidas neste trabalho sugere-se como trabalhos futuros:

- Incluir nas simulações moleculares outros parâmetros como a pressão e tempo, para que o estudo se aproxime mais dos dados experimentais, para que isso seja possível deverá ser utilizado pacotes computacionais mais robustos;
- Estudar simulações moleculares levando em conta a solvatação, neste caso o programa MOIL poderá ser utilizado para esta finalidade.

A.5 BIBLIOGRAFIA

EISENMENGER, F.; HANSMANN, U.H.E. Global minimum configuration of small peptide for the ECEPP/2 and ECEPP/3 force fields, **Chemical Physics Letters**, v.268, p.86-92, 1997.

EISENMENGER, F.; HANSMANN, U.H.E.; HAYRYAN, S.; HU, CHIN-KUN. [SMNP] A modern package for simulation of proteins, **Computer Physics Communications**, v.138, p.192-212, 2001.

KLEPEIS, J.L, IERAPETRITOU, M.G., FLOUDAS, C.A. Protein folding and peptide docking: a molecular modeling and global optimization approach, **Computers Chem. Eng.**, v.22, p.S3-S10, 1998.

OCERO, D.S.; VALÉN, L.G. Notas de aula, Departamento de Química Orgânica e Farmacêutica, Universidad de Navarra, Espanha, 1999.