

"ESTUDO CINÉTICO DA INVERTASE LIVRE E
IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO"

01/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"ESTUDO CINÉTICO DA INVERTASE LIVRE E
IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO"

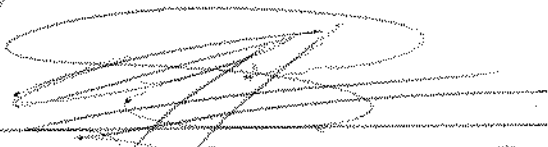
FERNANDO ANTONIO CABRAL

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Fernando Antonio Cabral e aprovada pela Comissão Julgadora em 16.01.89, Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Por 16 de janeiro de 1989,



Presidente da Banca

A meus pais,
Esposa e filhos.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof.Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO, por sua orientação, ensinamentos e amizade.
- À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS, especialmente ao Departamento de ENGENHARIA que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq pela bolsa concedida.
- À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos - ABIA, pelo fornecimento das cópias xerox desta tese.
- Aos colegas da pós graduação e particularmente MARIA ISABEL, FATIMA, JONAS e ELOÍSIO pelo companheirismo e colaboração.
- Aos funcionários pelos trabalhos prestados e aos professores pelos ensinamentos.
- A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

INDICE DE TABELAS	1
INDICE DE FIGURAS	iii
NOMENCLATURA	vi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
II.1. Generalidades	3
II.2. Atividade enzimática	4
II.2.1. Medida da atividade	4
II.2.2. Influência da temperatura	5
II.2.3. Influência do pH	7
II.3. Estabilidade térmica	8
II.4. Cinética da invertase na forma livre	14
II.5. Características do suporte de imobilização	21
II.6. Cinética da enzima imobilizada	25
II.7. Transferência de massa na camada limite	36
II.8. Coeficientes de difusão	40
II.8.1. Difusividade de massa em solução D(S).....	40
II.8.2. Difusividade efetiva de massa De.....	42

III. MATERIAL E MÉTODOS	49
III.1. Reagentes	49
III.2. Metodologia	49
III.2.1. Determinação de açúcares pelo método DNS	49
III.2.2. Medida da atividade enzimática da enzima na forma livre	51
III.2.3. Influência da temperatura na atividade enzimática	52
III.2.4. Influência do pH na atividade enzimática	53
III.2.5. Estabilidade térmica da enzima na forma livre...	54
III.2.6. Cinética da enzima na forma livre	55
III.2.7. Preparação da enzima imobilizada em alginato de cálcio 3,5%	57
III.2.8. Medida da atividade para enzima imobilizada	58
III.2.9. Influência da temperatura na atividade da enzima imobilizada	60
III.2.10. Influência do pH na atividade da enzima imobilizada	60
III.2.11. Estabilidade térmica da enzima imobilizada	61
III.2.12. Obtenção de dados do Reator de Mistura	62
III.2.13. Determinação dos parâmetros intrínsecos da invertase imobilizada.....	63
III.2.14. Determinação da difusividade efetiva da sacarose em soluções diluídas	65
III.3. Equipamentos	69
III.3.1. Geometria e dimensão do reator utilizado nos experimentos	69
III.3.2. Sistema de Operação do Reator de mistura	70

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
IV.1. Caracterização da enzima	73
IV.2. Influência da temperatura na atividade enzimática ...	
.....	73
IV.3. Influência do pH na atividade enzimática	77
IV.4. Estabilidade térmica	81
IV.5. Cinética da invertase na forma livre	90
IV.6. Cinética da invertase na forma imobilizada	102
IV.7. Difusividade efetiva da sacarose em soluções diluídas	
.....	112
V. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	118
VI. BIBLIOGRAFIA	120
VII. ANEXOS	131
I. Modelagem matemática da atividade enzimática quanto à	
temperatura	131
II. Modelagem matemática da atividade enzimática quanto ao	
pH	133
III. Fatores de correção para taxas iniciais de reação, sobre	
a cinética de inibição pelo substrato	135
IV. Método das diferenças finitas	140
V. Determinação do parâmetro β	144

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 : Coeficientes de difusão de substratos em água e em alginato de cálcio.....	24
Tabela 2 : Coeficientes de difusão de sacarose, glucose e frutose em soluções aquosas diluídas	42
Tabela 3 : Atividade enzimática relativa, em função da temperatura, para a enzima na forma livre e nas condições padrão.....	73
Tabela 4 : Atividade enzimática relativa, em função da temperatura, para a enzima imobilizada em alginato de cálcio 3,5%	74
Tabela 5 : Atividade enzimática em função do pH, obtidas experimentalmente para a enzima livre	78
Tabela 6 : Atividade enzimática relativa em função do pH, para a enzima imobilizada.....	78
Tabela 7 : Coeficientes de correlação (r) obtidos, quando se estimou o pH_m sobre a equação II.9 ajustada aos dados experimentais	79
Tabela 8 : Atividades enzimáticas relativas observadas em função do tempo de incubação, para a enzima livre, à diferentes temperaturas	82
Tabela 9 : Atividades enzimáticas relativas observadas em função do tempo de incubação, para a enzima imobilizada à diferentes temperaturas	83
Tabela 10: Valores obtidos das constantes de desativação k_d em relação à temperatura, para a enzima na forma livre	84

Tabela 11: Valores obtidos das constantes de desativação k_d , em relação à temperatura para a enzima na forma imobilizada	84
Tabela 12: Tempos de meia vida ($t_{1/2}$) estimados para a faixa de 40 a 60°C, para a enzima livre e imobilizada	88
Tabela 13: Taxas iniciais de reação (v) em função da concentração de substrato (S), para a invertase na forma livre a 40 e 50°C	90
Tabela 14: Taxas iniciais de reação a 40°C e 50°C, na forma modificada (v^*), utilizando-se do fator $f(S) = \frac{K(S)}{D_0}$	96
Tabela 15: Constantes cinéticas para a invertase livre e imobilizada a 40°C e 50°C	99
Tabela 16: Estimativa de números de hidratação necessários ao ajuste do modelo cinético, baseados em concentração de água livre	101
Tabela 17: Dados do reator de mistura a 40°C	102
Tabela 18: Dados de taxas de reação e concentração de substrato na superfície do gel de alginato de cálcio	103
Tabela 19: Obtenção da constante de Michaelis-Menten intrínseca, pelo método numérico	108
Tabela 20: Parâmetros cinéticos da invertase a 40°C.	109
Tabela 21: Previsão de km^{ap} para diferentes raios	111
Tabela 22: Dados de penetração de sacarose em esferas de alginato de cálcio a 40°C em função do tempo (t) ..	113
Tabela III.1: Fatores $f(S)$ em função de S , baseados na difusividade de massa	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Variação da atividade com a temperatura	7
Figura 2 : Forma de Arrhenius para a atividade	7
Figura 3 : Comportamento da atividade enzimática em relação à variação de pH	7
Figura 4 : Esquema do perfil de concentração de substrato em suporte esférico, contendo enzima imobilizada	27
Figura 5 : Esquema de um elemento de volume no interior de uma matriz esférica	27
Figura 6 : Influência do raio do suporte na taxa de reação global	30
Figura 7 : Representação esquemática do perfil de concentração no interior de sólidos, no estado estacionário	43
Figura 8 : Esquema do processo de imobilização de invertase em alginato de cálcio, contendo enzima oclusa no seu interior	58
Figura 9 : Reator utilizado nos experimentos	70
Figura 10: Esquema do processo de reação, utilizando-se do reator de mistura em estado estacionário	71
Figura 11: Comparação entre os resultados práticos obtidos e modelo matemático, para valores de atividade da enzima livre em função da temperatura.....	76
Figura 12: Comparação entre os resultados práticos obtidos e modelo matemático, para valores de atividade da enzima imobilizada em função da temperatura	77
Figura 13: Resultados práticos obtidos e preditos pelo modelo, de atividade enzimática em função do pH para a enzima na forma livre	80

Figura 14: Atividades enzimáticas relativas observadas em função do pH para enzima imobilizada	81
Figura 15: Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação k_d em função da temperatura, na forma de Arrhenius, para a invertase na forma livre	85
Figura 16: Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação k_d em função da temperatura, na forma de Arrhenius, para a invertase imobilizada	86
Figura 17: Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais a 40°C para a invertase livre, considerando cinética de inibição pelo substrato ..	92
Figura 18: Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais a 50°C para a enzima livre, considerando cinética de inibição pelo substrato ..	93
Figura 19: Forma de Lineweaver-Burk aplicada a taxas iniciais de reação modificada (v^*) para a cinética de inibição pelo substrato a 40°C.....	97
Figura 20: Forma de Lineweaver-Burk aplicada a taxas iniciais de reação modificada (v^*) para a cinética de inibição pelo substrato a 50°C.	98
Figura 21: Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S) = DS/D_0$ para a enzima livre a 40°C.	100
Figura 22: Comparação dos resultados experimentais e previstos pelo modelo, corrigido pelo fator $f(S) = DS/D_0$ para a enzima livre a 50°C.	100
Figura 23: Normalização em termos de parâmetros aparentes...	104

Figura 24: Comparação do modelo de Michaelis-Menten com os dados experimentais	105
Figura 25: Ajuste de D_e aos pontos experimentais, pela equação 76.	114

N O M E N C L A T U R A

- a = atividade enzimática (Eq. 1), $\mu\text{mol}/\text{min}$, $\text{mol}/\text{l}.\text{min}$
 $\bar{a}$ = atividade relativa (Eq.18), adimensional
 a^* = fator de frequência (Eq.I.12a), $\mu\text{mol}/\text{min}$, $\text{mol}/\text{l}.\text{min}$
 a_o = atividade enzimática sem inativação térmica (Eq. I.10),
 $\mu\text{mol}/\text{min}$, $\text{mol}/\text{l}.\text{min}$
 a° = coeficiente de atividade (Eq. 26), adimensional
 a_1, a_2 = atividades específicas (Eqs.16 e 17), adimensional
 A = parâmetro de transformação (Eq.37), adimensional
 A_s = área superficial da esfera de alginato de cálcio, cm^2
 B = constante (Eq. 51), adimensional
 $c_{1,0}, c_{1,L}$ = concentrações de soluto na fase sólida, nas
posições 0 e L respectivamente (Fig. 7), g/cm^3
 $c_{1,00}$ = concentração inicial de soluto numa placa semi infinita
(Eq.69a), g/cm^3
 c_s = concentração do soluto na fase sólida (Eq.75d), g/cm^3
 c_s^0, c_s^t = concentrações do soluto na fase sólida para $t=0$ e $t=t$
respectivamente (Eqs. 75a e 75d), g/cm^3
 c_s^∞ = concentração média do soluto na fase sólida em equilíbrio
com a fase líquida (Eq. 79), g/cm^3
 $C = S/S_b$ = concentração relativa (Eq.35e), adimensional
 $C^* = C/A$ = concentração relativa transformada (Eq.38e),
adimensional
 $\bar{C}$ = concentração media no gel, (Eq.74), g/l
 $C_{1,0}, C_{1,L}$ = concentração de soluto na fase líquida, nas
nas posições 0 e L (Fig. 7), g/cm^3
 C_L = concentração de soluto na fase líquida (Eq.75d), g/cm^3

C_L^0, C_L^t = concentrações do soluto na fase líquida para $t=0$ e $t=t$ respectivamente (Eq.76), g/cm^3

C_L^{∞} = concentração média do soluto na fase líquida, em equilíbrio com fase sólida (Eq.79), g/cm^3

d_p = diâmetro médio das esferas do gel, cm

D = diâmetro das pás do agitador, cm

$D(S)$ = coeficiente de difusão da sacarose em água, cm^2/s

D_0 = coeficiente de difusão da sacarose à infinita diluição, cm^2/s

D_e = $D(S) \cdot \epsilon / \tau$ = difusividade efetiva da sacarose, cm^2/s

$D_e(0)$ = difusividade efetiva da sacarose à infinita diluição, cm^2/s

$D_{1,2}$ = difusividade do soluto (1) em solvente (2) (Eq. 63)

E = concentração de enzima (Eq.8), mol/l

E/V = concentração de enzima (Eq.3), mol/l

E_0 = concentração inicial de enzima (Eq.9), mol/l

E_a = energia de ativação, cal/mol

E_d = energia de ativação da degradação térmica, cal/mol

E_1, E_2 = concentrações de enzima modificadas termicamente (Eq.18) mol/l

ES = concentração do complexo enzima-substrato (Eq.21), mol/l

E_t = concentração total de enzima (Eqs. II.1 e II.2), mol/l

E^+, E^- = concentrações de enzima nas formas inativas (Eq. II.3), mol/l

E_i = $E^+ + E^-$ = concentração total de enzima nas formas inativas (Eq. II.3), mol/l

f = função

$f(S) = v/v^* =$ fator de correção da cinética de inibição pelo substrato (Eq. III.1), adimensional

F = concentração de frutose (Eq. 28), mol/l

F_0 = vazão volumétrica de alimentação no reator, cm^3/s

G = concentração de glicose (Eq. 29), mol/l

G/M = razão entre ácido gulurônico e manurônico.

H^+ = concentração de prótons, mol/l

H_m^+ = concentração de prótons no interior do suporte (Eq. 7), mol/l

H_M^+ = concentração de prótons no exterior ao suporte (Eq. 7), mol/l

j = fluxo de massa para o interior da matriz, $\text{mol}/\text{cm}^2.\text{s}$

k_d = constante de desativação (Eq. 8), min^{-1}

k_{do} = constante (Eq. 20), min^{-1}

k_f = constante de inibição pela frutose (Eq. 28), mol/l

k_g = constante de inibição pela glicose (Eq. 29), mol/l

k_p = coeficiente de partição (Eq. 79), adimensional

k_{e1}, k_{e2} = constantes de equilíbrio (Eqs. II.1 e II.2)

k_o = fator de frequência (Eq. 6), min^{-1}

k_1, k_2 = constantes de desativação (Eq. 12), min^{-1}

k_1, k_{-1}, k_2 = constantes de velocidade de reação (Eq. 21)

K = constante cinética (Eq. I.7), min^{-1}

K' = constante cinética (Eq. 3), min^{-1}

K_B = constante de Boltzmann (Eq. 63)

K_{H^+} = coeficiente de partição de prótons (Eq. 7), adimensional

K_i = constante de inibição pelo substrato, mol/l

K_L = coeficiente de transferência de massa na camada limite (Eq. 50), cm/s

K_m = constante de Michaelis-Menten (Eq. 2) mol/l, mol/cm³
 K_m^{op} = constante de Michaelis-Menten aparente, mol/cm³
 K_m' = constante de Michaelis-Menten para inibição competitiva (Eq. 28), mol/l
 K_s, K_s' = constantes de inibição pelo substrato (Eq. 27), mol/l
 K_1 = K_m/S_b (Eq. 35b), adimensional
 K_2 = $K_i.S_b$ (Eq. 35c), adimensional
 K_1^* = K_1/A (Eq. 38c), adimensional
 K_2^* = $K_2.A$ (Eq. 38d), adimensional
 L = espessura da placa sólida (Fig. 7), cm
 L_c = dimensão característica (Eq. 39), cm
 m_1, m_2 = constantes (Eq. 51), adimensional
 M = peso molecular da sacarose (Eq. III.18), g/mol
 M_2 = peso molecular do solvente (Eq. 64), g/mol
 n = número de hidratação da sacarose
 n_o = n° de hidratação da sacarose à infinita diluição
 N = frequência de agitação (Eq. 61), rps
 N_p = número de potência (Eq. 60), adimensional
 pH_m = pH de máxima atividade enzimática
 P = consumo de potência na agitação (Eq. 53), erg/s
 P_o, P_b = concentração de açúcar invertido na alimentação e no reator, respectivamente (Eq. 78), adimensional
 q_n = raízes positivas e não nulas (Eq. 78), adimensional
 r = coordenada radial na esfera do gel, cm
 $r(S)$ = taxa de reação no interior do gel, mol/cm³.s
 R = constante dos gases ideais (1,9872 cal/mol.K)
 R = raio da esfera, cm
 R_o = raio do soluto (Eq. 63)

Re_p, Re_v, Re_i = números de Reynolds (Eq. 54 e 55), adimensionais

$Re_o = D^2 N / \nu$ = número de Reynolds de agitação, adimensional

S = concentração de substrato, mol/l, mol/cm³

S^* = concentração de substrato disponível à reação (Eq. 27),
mol/l

S_b = concentração de substrato na fase líquida do reator
(Eq. 33b), mol/cm³

$Sc = \nu / DS$ = número de Schmidt, adimensional

$Sh_p = K_p d_p / DS$ = número de Sherwood para esferas em meio agitado, adimensional

S_s = concentração de substrato na alimentação do reator,
mol/cm³

S_o = concentração de substrato na alimentação do reator, mol/cm³

t = tempo, s, min

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida (Eq. 10), min

T = temperatura, °C, °K

T_i = diâmetro interno do reator de mistura, cm

u = velocidade relativa fluido-partícula (Eq. 52a), cm/s

v = taxa inicial de reação, mol/l.min

v^* = $v/f(S)$ = taxa inicial de reação modificada, mol/l.min

v_{obs} = taxa inicial de reação observada, mol/l.min

V = volume de reação, l, cm³

V_{gel} = volume de esferas de alginato de cálcio, cm³

V_L = volume da fase líquida (Eq. 77), cm³

V_{max} = taxa máxima de reação, mol/l.min, mol/cm³.s

V_{max}^{ap} = taxa máxima de reação aparente, mol/cm³.s

V_{max}' = taxa máxima de reação para inibição parcialmente competitiva (Eq. 29), mol/l.min

V_p = volume da esfera de alginato de cálcio, cm^3
 V_r = volume líquido do reator, cm^3
 $\bar{V}_1$ = volume molar do soluto na temperatura de ebulição (Eq. 64)
 cm^3/mol
 X = r/R = posição radial (Eq. 35d), adimensional
 $\bar{X}$ = concentração de sacarose (Eq. III.17), g/g
 X^* = (Eq. III.17); 0,81 g/g
 W = massa de fluido no reator (Eq. 53), g
 W_o = concentração molar de água pura, mol/l
 W_f = concentração molar de água livre, mol/l
 W_t = concentração molar de água total (livre + ligada), mol/l
 z = posição no sólido semi infinito em relação à superfície
(Eq. 69), cm

Símbolos gregos:

α = $(V_L)/(V_{\text{gel}} \cdot k_p)$ (Eq. 77), adimensional
 α_D = rotação da luz polarizada, graus
 α_p = $K_L \cdot R/D_e$ = número de Sherwood modificado (Eq. 36), adimens.
 α_1 e α_2 = razão entre atividades específicas (Eq. 19), adimens.
 β = $(R^2 \cdot V_{\text{max}})/(K_m \cdot D_e)$ (Eq. 35a), adimensional
 δ = constante de proporcionalidade (Eq. III.5), g/mol
 ϵ = P/W = taxa de dissipação de energia por unidade de massa
(Eq. 53), cm^2/s^3
 ϵ_A = (área disponível)/(área total), (Eq. 68), adimensional
 ϕ = módulo de Thiele (Eq. 39), adimensional
 ϕ_2 = parâmetro de associação do solvente (Eq. 64)
 γ = constante (Eq. 29), adimensional
 η = fator de efetividade (Eq. 41), adimensional

η_1 = eficiência de imobilização, adimensional

η_K = $(\nu^3/\varepsilon)^{1/4}$ = escala de comprimento de Kolmogoroff (Eq. 56)
cm

μ = viscosidade de soluções, g/cm.s

$\mu(S)$ = viscosidade de soluções de sacarose, g/cm.s

μ_0 = viscosidade da água pura, g/cm.s

μ_2 = viscosidade do solvente (Eq. 64), cP

ν = μ/ρ = viscosidade cinemática, cm²/s

ρ = densidade de soluções, g/l

ρ_L = densidade da fase líquida, g/l

ρ_s = densidade do gel, g/l

ρ_0 = densidade da água pura, g/l

τ = tortuosidade (Eq. 68), adimensional

ξ = $z/\sqrt{4.D_e.t}$ (Eq. 70), adimensional

RESUMO

Neste trabalho foi dado ênfase especial aos aspectos cinéticos envolvidos na hidrólise da sacarose pela enzima invertase, nas formas livre e imobilizada em gel de alginato de cálcio. Os parâmetros cinéticos foram determinados levando em conta as taxas iniciais de reação, de forma a evitar os fenômenos de inibição causados pelo produto (glicose e frutose). Para tanto estudaram-se os efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática, assim como a estabilidade térmica da enzima.

Os parâmetros cinéticos para a enzima livre foram determinados a 40 e 50°C, baseando-se em três suposições sobre o "efeito físico" na cinética de transformação do substrato: duas relacionadas com a concentração de água livre e outra baseada na difusividade molecular da sacarose.

Para a enzima imobilizada os parâmetros intrínsecos foram determinados a 40°C em reator de mistura operado continuamente, com relações geométricas padrão.

O coeficiente de difusão efetivo da sacarose, necessário para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, foi determinado por dois métodos: o primeiro utilizando-se o modelo de placa semi-infinita em contato com uma fase líquida de concentração constante de sacarose, no estado não estacionário e, o segundo, utilizando-se esferas do gel inicialmente isentas de sacarose e imersas em um volume finito de solução de sacarose de concentração conhecida, em estado não estacionário.

Na caracterização da invertase, obteve-se respectivamente para a enzima livre e imobilizada pH ótimo de 4,5 e 4,0; e temperaturas de máxima atividade ao redor de 60°C para a enzima nas formas livre e imobilizada. Quanto à estabilidade térmica, a enzima mostrou-se muito estável abaixo de 40°C. Entretanto a enzima imobilizada, mostrou-se menos estável que a forma livre.

Para as formas livre e imobilizada, respectivamente, as energias de ativação obtidas para a reação de inversão foram de 7853 cal/mol e 10258 cal/mol. enquanto que as energias de ativação da degradação térmica obtidas foram de 141171 cal/mol e 116883 cal/mol.

O melhor ajuste do modelo cinético, para taxas iniciais de reação, foi obtido quando se considerou o modelo cinético de inibição pelo substrato, corrigido por um fator relacionado com a difusividade de massa. Os valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e de inibição (K_i) foram respectivamente 0,0506 mol/l e 0,309 mol/l a 40°C e 0,0587 mol/l e 0,377 mol/l a 50°C.

O modelo clássico de Michaelis-Menten foi o que melhor se ajustou à cinética de reação com enzima imobilizada, tanto em termos de constantes aparentes como efetivas. Não foram observados os fenômenos de inibição pelo substrato e efeitos difusionais verificados no caso da enzima livre, até a concentração de substrato estudada (500 g/l). Os valores intrínsecos de K_m para a enzima imobilizada foi 0,031M e V_{max} foi 60% do V_{max} observado para a enzima livre, nas mesmas concentrações enzimáticas. A difusividade efetiva da sacarose no gel foi de $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, correspondendo a 67% da difusividade da sacarose em solução.

S U M M A R Y

In this work special emphasis was given to the study of the kinetics of sucrose hydrolysis by invertase. The enzyme was used in free as well immobilized in calcium alginate forms. The kinetic parameters were determined considering the initial rates of reaction, in order to avoid the inhibition phenomena caused by the products glucose and fructose. The pH and temperature effects on enzymatic activity, as well as the thermal stability of enzyme were studied.

The parameters for the free enzyme were determined at 40°C and 50°C. Three assumptions related to the "physical effect" on the kinetic of substrate transformations were considered: Two of them were related to the concentration of free water and the other one was related to the molecular diffusivity of sucrose.

The intrinsic parameters of the immobilized enzyme were determined at 40°C in a continuous stirred tank reactor, with standard geometric relations.

The effective diffusion coefficients of sucrose, needed for the determination of the kinetic parameters for the immobilized enzyme, were determined by two methods: The first one, used the theory of semi-infinite plate in contact with a liquid phase with constant concentration of sucrose, at unsteady state and, the second, used gel spheres, initially free of sucrose, that were immersed in a finite volume of solution of known sucrose concentration, at unsteady state.

The optimum conditions of enzymatic reaction were pH 4,0 -

4,5 and 60°C in both free and immobilized forms. In terms of thermal stability the enzyme was stable at temperature lower than 40°C. But, the immobilized enzyme was less stable than the free form.

The activation energies obtained for inversion reaction were found to be 7853 and 10258 cal/mol. While the deactivation energies were 141171 and 116883 cal/mol for the free and immobilized forms, respectively.

Better agreement for the kinetic model, for the initial rates of reaction, was obtained when the kinetic model of substrate inhibition was considered, corrected by a factor related to mass diffusivity. Values for Michaelis-Menten (K_m) and the inhibition (K_i) constants were respectively, 0.0506 mol/l and 0.309 mol/l at 40°C and 0.0587 mol/l and 0.377 mol/l at 50°C.

On the other hand, the classic model of Michaelis-Menten fitted well the results for immobilized enzyme, either in terms of apparent or effective constants. The inhibition phenomena of substrate were not observed neither diffusional effects, as verified for free enzyme, up to a substrate concentration of 500 g/l. The intrinsic value of K_m for immobilized enzyme was 0.031M and V_{max} was found to be 80% of the observed V_{max} for the free enzyme, in the same enzymic concentration. The sucrose effective diffusivity in the gel was $0.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, corresponding to 67% of the sucrose diffusivity in solution.

I. INTRODUÇÃO

Na indústria de produtos açucarados, a sacarose é o principal ingrediente, mas na formulação de determinados produtos, adicionam-se outros açúcares com o objetivo principal de controle de cristalização, necessário à obtenção do produto desejado. Dentre estes açúcares, os de maior importância são os xaropes de glicose e os xaropes de açúcar invertido (glucose + frutose).

No caso específico do açúcar invertido, atualmente a produção industrial é quase exclusivamente obtida pelo processo ácido, consistindo em hidrolisar soluções de sacarose com ácido a quente, posteriormente neutralizando-a com uma base. O inconveniente deste método é a obtenção de um produto escuro, decorrente de reações paralelas indesejáveis, além de uma concentração salina final relativamente elevada.

Alternativamente a este processo, a inversão da sacarose pode ser catalisada pela enzima invertase, com a vantagem de se produzir um produto de melhor qualidade, já que não se produzem substâncias indesejáveis provenientes de reações paralelas, apesar destas vantagens, a inversão enzimática é dispendiosa se comparada ao processo ácido, devido ao alto custo relativo da enzima.

O uso de invertase imobilizada, no entanto, torna o processo muito mais econômico pois, além de poder ser reutilizada por um longo período, os reatores são muito mais compactos e podem ser operados continuamente. Assim sendo, o produto final terá características constantes, isento de produtos indesejáveis e possível de ser obtido em reatores com

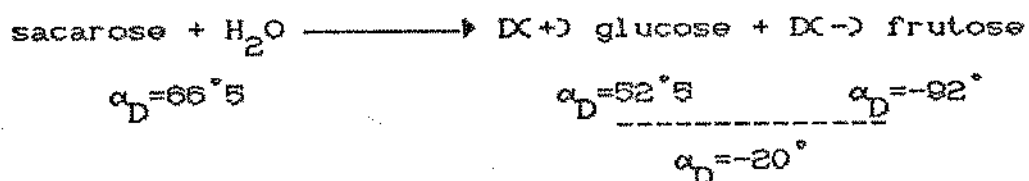
alta produtividade. Por outro lado, nos critérios de projetos de reatores, necessitam-se conhecer as condições ótimas de operação e os parâmetros efetivos que mostram o comportamento do processo com enzima imobilizada, possibilitando a previsão das taxas de reação em qualquer condição de processo.

Os objetivos do presente trabalho foram: i) verificar a influência do pH na atividade enzimática. ii) influência da temperatura na atividade enzimática em termos de ativação e de estabilidade térmica. iii) obter o modelo cinético para taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato para a invertase livre, determinar seus parâmetros cinéticos e verificar qual a melhor função de correção necessária ao ajuste do modelo. iv) obter modelos cinéticos para taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato para a invertase imobilizada em termos de parâmetros aparentes e efetivos. v) verificar a validade da metodologia utilizada por alguns pesquisadores (23,72), na determinação de parâmetros cinéticos intrínsecos para a invertase imobilizada. vi) determinar a difusividade efetiva da sacarose e o coeficiente de partição em alginato de cálcio.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. GENERALIDADES

A invertase (β -D-frutofuranosidase E.C.3.2.1.26), hidrolisa a sacarose, produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose. O nome "invertase" é decorrente da mudança de rotação da luz polarizada entre a solução de sacarose e a solução equimolar de glicose e frutose, como esquematizado a seguir:



Sendo a sacarose um β -frutofuranosídeo e um α -glicosídeo, esta pode ser hidrolisada por dois tipos de enzimas: a β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) e a α -D-glicosidase (E.C.3.2.1.20) que atacam nos terminais da frutose e glicose respectivamente (53,61).

Várias fontes de invertase são encontradas na natureza, tais como leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais. Entretanto, REED(61), considera que para produção industrial de invertase, somente a enzima obtida de leveduras (β -D-frutofuranosidase) é importante.

Em leveduras, a invertase é encontrada em duas formas: uma enzima externa de alto peso molecular, localizada entre a membrana plasmática e a parede celular, sendo esta uma glicoproteína contendo 50% de manana e 3% de glicosamina e outra, enzima intracelular, desprovida de carboidrato, localizada no protoplasma e de peso molecular inferior (26,27,55).

A enzima externa, corresponde a maior fração produzida pela

célula de levedura, possui peso molecular de aproximadamente 270000 enquanto que a interna de menor fração, possui peso molecular de 135000 (1,63).

II.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

II.2.1. Medida da atividade

O primeiro passo na caracterização enzimática, é o conhecimento de sua concentração na forma ativa, porém, não é possível a determinação desta por métodos analíticos usuais. Contorna-se o problema, utilizando-se de um artifício na determinação de uma concentração característica, não em termos de unidades de concentração de uso corrente, mas através da grandeza denominada atividade enzimática.

A atividade enzimática é relacionada à capacidade de uma determinada "quantidade" de enzima, de converter substrato por unidade de tempo em condições padrão de temperatura, pH e concentração de substrato.

Define-se atividade enzimática a , em determinadas condições padrão, como:

$$a = (-dS/dt) \cdot V \quad (1)$$

onde: $(-dS/dt)$ = taxa inicial de conversão de substrato

V = volume de reação

O módulo da atividade pode ser expresso em termos de Unidades Internacionais (U.I.), onde 1 U.I. corresponde a "quantidade" de enzima necessária para converter $1\mu\text{mol}$ de substrato por minuto, nas condições padrão.

A cinética pode ser descrita pelo modelo de Michaelis - Menten, na forma:

$$-dS/dt = V_{\max} \cdot S / (K_m + S) \quad (2)$$

onde: $V_{\max} = K' \cdot (E/V)$ = taxa máxima de reação (3)

S = concentração de substrato

K_m = constante de Michaelis-Menten

K' = constante cinética

E/V = concentração de enzima

V = volume de reação

Costuma-se padronizar a concentração de substrato, de tal forma que $S \gg K_m$, logo $(-dS/dt) = V_{\max}$, daí, a atividade será máxima, podendo ser escrita como:

$$a = K' \cdot E \quad (4)$$

Para o caso de cinética de inibição por excesso de substrato, $V_{\max}$ não é atingido, e neste caso, padroniza-se a concentração na qual se observa a máxima taxa inicial de reação, a atividade pode ser escrita na forma:

$$a = K' \cdot E \cdot \frac{S}{K_m + S + S^2/K_i} \quad (5)$$

sendo padronizada a temperatura, K_m e K_i são constantes, logo:

$$S/(K_m + S + S^2/K_i) = \text{constante, e} \quad a \propto K' \cdot E$$

Entretanto, neste caso de inibição pelo substrato, quando se verifica a influência da temperatura na atividade enzimática, K_m e K_i podem variar, já que são dependentes da temperatura.

II.2.2. Influência da temperatura na atividade enzimática

O módulo da constante cinética K' é fortemente dependente da temperatura, influenciando em consequência a atividade enzimática. A constante K' , pode ser correlacionada com a temperatura, através da equação de Arrhenius:

$$K'(T) = k_0 \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (6)$$

onde: $K'(T)$ = constante cinética à temperatura T

E_a = energia de ativação
 R = constante dos gases ideais
 k_o = constante de proporcionalidade
 T = temperatura absoluta

DICKENSHEETS et al.(19), determinaram energias de ativação de 7322 cal/mol e de 4052 cal/mol para invertase livre e imobilizada, obtida de *Candida utilis*.

MANSFELD e SCHELLENBERGER(42), encontraram energias de ativação de 7693 cal/mol e 7788 cal/mol para invertase livre e imobilizada.

Verifica-se experimentalmente, que a atividade enzimática não cresce indefinidamente com a temperatura, como prevista pela equação de Arrhenius. A partir de uma determinada temperatura (convencionalmente denominada temperatura ótima), verifica-se um decréscimo na atividade com o aumento de temperatura, observando-se também que a conversão de substrato ($-dS$) não é linear com o tempo, mesmo para enzimas bastante diluídas. Determina-se então uma atividade aparente, fixando-se um tempo de medida da atividade, fazendo-se $(-dS/dt) = (-\Delta S/\Delta t)$, com Δt pré fixado.

Neste caso, ocorrem dois efeitos em paralelo, um dos quais é a ativação da enzima através do aumento da constante K' , e outro é o decréscimo da atividade, decorrente da diminuição da concentração de enzima na forma ativa E devido à inativação térmica.

As Figura 1 e 2, esquematizam a variação da atividade com a temperatura:

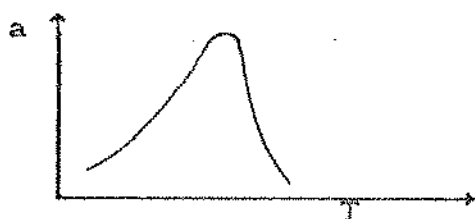


Figura 1: variação da atividade com a temperatura

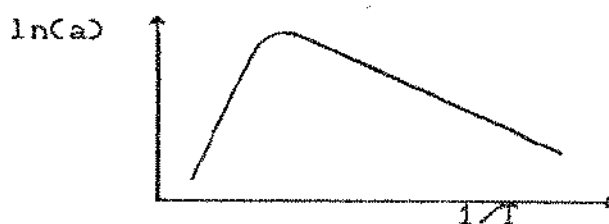


Figura 2: forma de Arrhenius para a atividade

II.2.3-Influência do pH na atividade enzimática

LAILER, citado por Bowski et al.(7), sugere o seguinte mecanismo de ligação do sítio ativo da invertase com grupos ácidos e básicos:



Através deste mecanismo, tem-se enzimas carregadas eletricamente, onde as formas não neutras são inativas. Existe um determinado valor de pH em que a concentração da forma ativa é máxima, acarretando uma atividade máxima. Este pH de máxima atividade é denominado pH ótimo.

A figura 3, apresenta de forma esquemática, o comportamento da atividade com o pH.

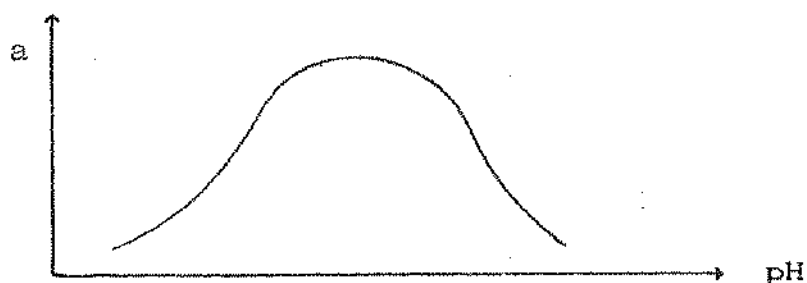


Figura 3: comportamento da atividade enzimática em relação à variação de pH.

De um modo geral, o pH ótimo da invertase de leveduras se situa entre 4,4 a 5,5 e a temperatura ótima entre 50 e 60°C. Geralmente utiliza-se pH=4,5 e T=55°C em xaropes de sacarose a 60°brix, como citado por Durand e Monsan (20).

Quanto ao pH, nota-se um deslocamento do pH ótimo para a enzima imobilizada, quando comparada à enzima livre. Este deslocamento é aparente, visto que, se o suporte contendo a enzima está carregado com cátions ou ânions, o pH no seu interior difere da solução exterior, isto podendo ser caracterizado por um fenômeno de partição de prótons (20).

$$K_H^+ = (H_m^+) / (H_M^+) \quad (7)$$

onde: H_m^+ = concentração de prótons no interior do suporte

H_M^+ = concentração de prótons no exterior

Alguns trabalhos com invertase (19,33,41,43,44) em diversos tipos de suportes, evidenciam esta mudança no ótimo de pH.

Se o suporte for carregado positivamente, o pH ótimo para a enzima imobilizada será menor que o pH para a enzima livre, e vice-versa.

II.3. ESTABILIDADE TÉRMICA

Sendo as enzimas de natureza proteica, sofrem desnaturação térmica, perdendo em consequência total ou parcialmente sua atividade. O conhecimento da estabilidade térmica é de grande importância no projeto de reatores contínuos com enzimas imobilizadas.

Normalmente uma cinética de desativação térmica de primeira ordem é suficiente para descrever o comportamento da atividade com o tempo de operação, utilizando-se do modelo:

$$-\frac{dE}{dt} = k_d \cdot E \quad \text{ou} \quad -\frac{1}{E} \cdot \frac{dE}{dt} = k_d \quad (8)$$

onde: E = concentração enzimática (ou atividade)

k_d = constante de desativação (ou taxa específica de desativação).

Integrando-se a (Eq. 8), sujeita à condição inicial $t=0$, $E=E_0$, obtém-se:

$$-\ln(E/E_0) = k_d \cdot t \quad \text{ou} \quad E = E_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (9)$$

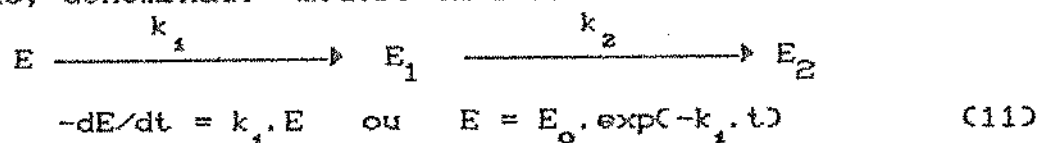
Costuma-se também expressar a estabilidade térmica em termos de meia vida, a qual é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% da sua atividade inicial, ou seja: $E/E_0=0,5$. O tempo de meia vida $t_{1/2}$ pode ser relacionado a constante de desativação k_d , através da equação 9, como:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d} \quad (10)$$

HENLEY e SADANAC(30) fazem uma revisão da literatura e classificam as curvas de desativação em duas grandes categorias: numa a atividade será sempre menor que a atividade inicial e na outra, a atividade pode ser maior que a inicial em algum período de tempo. Dentre estas duas categorias, pode-se ainda distinguir 14 casos diferentes.

Para explicar o fato de ocorrer um aumento de atividade com o tempo, deve-se assumir um estado intermediário de desnaturação da enzima, no qual ela é mais ativa que a enzima nativa.

Para tal, considera-se o seguinte mecanismo de desnaturação, denominado "modelo em série":



$$-dE_1/dt = k_2 \cdot E_1 - k_1 \cdot E \quad (12)$$

Substituindo-se a equação 11 em 12, reescreve-se como:

$$\frac{-dE_1}{dt} = k_2 \cdot E_1 - k_1 \cdot E_0 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (13)$$

Integrando-se a equação 13, com a condição inicial $t=0$ e $E_1=0$, obtém-se:

$$E_1 = \frac{k_1 \cdot E_0}{k_2 - k_1} \cdot [\exp(-k_1 \cdot t) - \exp(-k_2 \cdot t)] \quad (14)$$

e ainda $E_2 = E_0 - E - E_1$ e substituindo-se as equações 8 e 14, obtém-se:

$$E_2 = E_0 \cdot \left[1 - \exp(-k_1 \cdot t) - \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \right] \quad (15)$$

A atividade total resultante num determinado tempo, pode ser proveniente das três diferentes formas da enzima com sua respectiva atividade.

considerando-se:

E, E_1, E_2 = concentrações enzimáticas

a, a_1, a_2 = atividades específicas

α_1 e α_2 = razão entre atividade específica e atividade na forma nativa.

$$\alpha_1 = a_1/a \quad \text{quando } E_1=E \quad (16)$$

$$\alpha_2 = a_2/a \quad \text{quando } E_2=E \quad (17)$$

A atividade relativa total $\bar{a}$ pode ser descrita na forma:

$$\bar{a} = \frac{E + \alpha_1 \cdot E_1 + \alpha_2 \cdot E_2}{E_0} \quad (18)$$

Substituindo-se as equações 8, 14 e 15 em 18, obtém-se a forma geral da atividade relativa no tempo:

$$\bar{a} = \alpha_2 + \left[\frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) - \left[\frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_1}{k_2 - k_1} \right] \exp(-k_2 \cdot t) \quad (19)$$

Desta equação geral, se $\alpha_2 > 1$, podemos obter atividade superior à inicial num determinado período de tempo. Se α_1 e α_2 forem nulos, recai na cinética de primeira ordem (Eq. 11), onde $\bar{a} = E/E_0$.

Os 14 casos descritos por HENLEY e SADANA(30), podem ser obtidos por simulação de dados da (Eq. 19), ou da coletânea de dados da literatura.

GRECO e GIANFREDAC(29), analisam dois tipos de processos de desativação térmica:

i) considerando que a enzima é uma mistura de duas isoenzimas que diferem na sua atividade específica, "modelo em paralelo".



ii) "Modelo em série", como visto anteriormente



Utilizando-se destes modelos, GRECO e GIANFREDA (29), analisam o comportamento no estudo da β -frutofuranosidase de leveduras, a 60°C e 63°C, verificando uma mudança de inclinação quando plotados na forma $\log(ED)$ em função do tempo, discriminados em duas regiões distintas que podem ser descritos pelos dois processos considerados simultaneamente.

A estabilidade térmica é dependente das condições do meio em que se encontra a enzima, se está imobilizada e/ou complexada a outro componente e ainda pode ser influenciada pela própria concentração de substrato.

OOSHIMA et al.(58), estudaram a estabilidade da invertase em relação à concentração de substrato para valores inferiores a 0,1M, demonstrando não haver influência da concentração de substrato na estabilidade térmica.

MONSAN et al(52), verificam um aumento na estabilidade da invertase para altas concentrações de substrato. Observaram que a 60°C, a meia vida da invertase imobilizada por ligação covalente em sabugo de milho, permanecia constante quando a concentração de substrato era inferior a 1,5M. A partir deste valor observaram que a meia vida crescia consideravelmente com o aumento de concentração e que a 2,75M a meia vida é de várias vezes superior à meia vida para soluções diluídas.

LÓPEZ-SANTIN et al.(40), imobilizaram invertase em argila ativada, obtendo significativa desativação acima de 30°C. A desativação entre 25°C e 50°C pôde ser descrita por uma cinética de primeira ordem. Encontraram a constante k_d igual a 0,008 min^{-1} e 0,012 min^{-1} nas temperaturas de 40°C e 50°C respectivamente para a enzima imobilizada, correspondendo a meia vida de 116 min e 58 minutos respectivamente.

MAEDA e SUZUKI(41), imobilizaram invertase em dietilaminoacetil celulose (DEAA-celulose), verificando uma estabilidade semelhante entre a enzima na forma livre e na forma imobilizada. O complexo mostrou-se estável por 9 dias de inversão contínua em um sistema de coluna a 30°C, porém, a 40°C o complexo mostrou-se instável antes de 3 dias de operação.

MASON e WEETALL(44), comparando tipos de imobilização, verificaram diferenças significativas quanto à estabilidade, quando invertase foi imobilizada por ligação covalente em

partículas de vidro poroso e em derivados de celulose. Encontraram a 23°C as seguintes características de estabilidade térmica: vidro poroso ($k_d = 6,8 \cdot 10^{-4} h^{-1}$, ou meia vida de 42,5 dias) e celulose ($k_d = 7,8 \cdot 10^{-8} h^{-1}$, ou meia vida de 3,7 dias).

HUSAIN et al.(33), melhoraram a estabilidade da invertase, complexando-a com concanavalin A. Comparando-se a estabilidade da invertase nativa, do complexo invertase Con A, ligação cruzada do complexo Con A-Invertase e oclusão do complexo Con A-invertase em alginato de cálcio, verificaram que as formas complexadas foram bem mais estáveis que a enzima nativa.

ARNOLD(4), comparando a estabilidade de invertase em relação ao teor de carboidratos em sua molécula, verificou que o teor de manana na enzima estabiliza-a termicamente. Desta forma a enzima externa a membrana periplasmática é termicamente mais estável que a interna.

OOSHIMA et al.(58), fazem um estudo da estabilidade térmica de invertases nas formas nativa, imobilizada covalentemente em vidro poroso e imobilizada ionicamente em resina de troca iônica. Neste último caso, utilizam-se de um pH ótimo e outro não ótimo. Os dados de desativação térmica foram feitos na faixa de 54 a 70°C e as seguintes conclusões foram obtidas: i) a desativação térmica de todas as formas seguem cinética de primeira ordem ii) as taxas de desativação aumentam na ordem: nativa, ligação covalente e ligação iônica. No caso de pH não ótimo a desativação mostrou-se maior que no ótimo, e foi sugerido que a ligação iônica dá maior perda comparada à ligação covalente.

OOSHIMA et al.(58), também colocam seus dados de k_d em função da temperatura na forma de Arrhenius, determinando energias de ativação para a desativação térmica, encontrando para a enzima nativa o valor de 94,6 Kcal/mol e valores inferiores para as enzimas imobilizadas.

A forma de Arrhenius para a desativação térmica é interessante do ponto de vista de interpolação de dados de k_d , na faixa de temperatura de suas determinações, e ainda para avaliar dados de k_d para temperaturas inferiores, visto que, para baixas temperaturas, o procedimento experimental é de difícil e demorada obtenção.

A forma de Arrhenius para k_d , pode ser expressa como:

$$k_d = k_{do} \cdot \exp(-E_d/RT) \quad \text{ou} \quad \ln(k_d) = \ln(k_{do}) - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (20)$$

onde: k_d = constante de desativação à temperatura T.

k_{do} = constante de proporcionalidade.

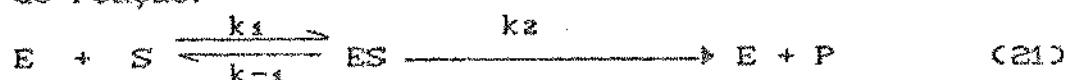
R = constante dos gases ideais.

T = temperatura absoluta.

E_d = energia de ativação da reação de degradação

II.4. CINÉTICA DA INVERTASE NA FORMA LIVRE

a cinética enzimática de uma forma geral, parte do seguinte mecanismo de reação:



onde: E = concentração de enzima

S = concentração de substrato

ES = concentração do complexo enzima-substrato

P = concentração de produto de reação.

A partir deste mecanismo de reação, Michaelis-Menten derivaram o seguinte modelo cinético:

$$v = \frac{-dS}{dt} = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S} \quad (22)$$

onde: $V_{\max}$ = taxa máxima de desaparecimento de substrato.

v = taxa de desaparecimento de substrato.

K_m = constante de Michaelis-Menten.

Verifica-se empiricamente que as taxas iniciais de reação em soluções diluídas de substrato, seguem este modelo (equação 22), porém, para altas concentrações de substrato e/ou na presença de produtos de reação ou ainda de outras substâncias, podem ocorrer efeitos inibidores sobre a taxa de reação. Surgindo tais efeitos, a cinética pode ser descrita pelo modelo de Michaelis-Menten com adição de parâmetros cinéticos que descrevam algum tipo de inibição.

No caso específico da invertase, verifica-se que taxas iniciais de reação em soluções diluídas de substrato, seguem o modelo de Michaelis-Menten, entretanto, para altas concentrações de substrato, surge o efeito de inibição por excesso de substrato (7,5).

Através de equilíbrios, deduz-se o novo modelo cinético, que contém o parâmetro denominado constante de inibição pelo substrato K_i , adicionado ao modelo-base de Michaelis-Menten, dado na forma:

$$v = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S + S^2/K_i} \quad (23)$$

Entretanto, verifica-se experimentalmente, que o modelo de inibição pelo substrato (equação 23), por si só, não é

suficiente para descrever o comportamento cinético(7). As taxas de reação iniciais observadas a altas concentrações de sacarose são inferiores as taxas previstas pelo modelo.

BOWSKI et al.(7), estudaram o comportamento deste desvio, considerando como correção do modelo, os efeitos da mudança do coeficiente de difusão molecular da sacarose, viscosidade e concentração de água livre. O ajuste do modelo cinético para taxas iniciais de reação foi obtido quando se considerou um fator de correção em termos de água livre sobre o modelo de cinética de inibição por excesso de substrato, reescrevendo-a como:

$$v = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S + S^2/k_i} \cdot \frac{W_f}{W_t} \quad (24)$$

onde: W_f = concentração de água livre

W_t = concentração de água total (livre + ligada).

A concentração de água livre é dependente do número de hidratação da molécula de sacarose. BOWSKI et al.(7), determinaram o número de hidratação(n) requerido ao ajuste a 25°C, obtendo n=7 para soluções diluídas, concordando com valores apresentados na literatura (21), e para o aumento de concentração de sacarose, os valores decresceram até n=4 em soluções 2M, ou seja, diminuindo o número de hidratação com o aumento de concentração na razão aproximada de 1,5 para variação de 1M na concentração de sacarose.

SCATCHARD(65), determinou números de hidratação para a sacarose, a partir de dados de atividade de água obtidas por pressão de vapor de soluções de sacarose a 0°C e 30°C. Calculou através destes dados o número de hidratação ao redor de n=6 para soluções diluídas e n=4 para soluções concentradas a 0°C e n=5 e n=4 a 30°C.

ALLEN e WOOD(2), fizeram uma revisão da literatura com respeito a interação sacarose-água, verificando uma grande discrepância dos valores de números de hidratação obtidos por vários pesquisadores, os quais utilizaram diferentes métodos de determinação. Os valores apresentados variaram desde $n=1,8$ a $n=21$. Partindo-se da estrutura química da sacarose, é provável que em soluções diluídas, as moléculas de sacarose sejam associadas com certo número de moléculas de água, não excedendo a onze, que estão em equilíbrio dinâmico com as moléculas remanescentes de água livre. A base disto é a presença de onze átomos de oxigênio nas moléculas de sacarose, que potencialmente podem formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Dos dados apresentados de números de hidratação, pode-se concluir apenas que o número de hidratação n decresce com o aumento de concentração de sacarose e com o aumento de temperatura.

Com respeito à difusão molecular, BOWSKI et al.(7), utilizaram o fator de correção para uma temperatura fixa T , como:

$$\frac{D(S)}{D_0} = \frac{\mu_0}{\mu(S)} \quad (25)$$

onde: $D(S)$ = coeficiente de difusão à concentração S .

D_0 = coeficiente de difusão à infinita diluição

μ_0 = viscosidade da água pura

$\mu(S)$ = viscosidade da solução.

Este fator, foi baseado na equação de Stokes-Einstein, considerando a não variação do raio do soluto com respeito à concentração, e ainda, este fator foi verificado sobre a cinética de Michaelis-Menten e não sobre a cinética de inibição pelo substrato.

Para soluções diluídas de sacarose(70), a seguinte equação de difusão é válida,

$$D(S) = D_0 \left[1 + \frac{d \ln a^+}{d \ln S} \right] \cdot \frac{\mu_0}{\mu(S)} \quad (26)$$

onde: a^+ = coeficiente de atividade

MC BAIN e LIUC(47), verificaram que a equação de Stokes-Einstein não é adequada para prever coeficientes de difusão molecular, pela correção de viscosidade em soluções de sacarose. Quando se varia a concentração de 2% a 30%, a viscosidade aumenta ao triplo, enquanto que o coeficiente de difusão decresce apenas 18%.

ENGLISH e DOLE(22), determinaram a difusividade molecular da sacarose para altas concentrações de substrato, verificaram que a difusividade decresce linearmente com a concentração de sacarose em % em peso, e que a extrapolação para difusividade praticamente nula, é obtida a 81% em peso, ou seja, ao redor do ponto de máxima solubilidade da sacarose.

ALMEIDA CUNHA e VITOL(3), estudaram a atividade da invertase com respeito à variação da viscosidade da solução. Para tal, fixaram a concentração de sacarose em 10%(w/v) e a variação da viscosidade foi obtida pela adição de quantidades variáveis de carboximetilcelulose (CMC), obtendo viscosidades na faixa de 1,3 a 8,6 cP. Obtiveram uma correlação linear quando se plotou o inverso da atividade em função da viscosidade, evidenciando com isto, o efeito físico da solução na atividade.

BESSERDICH et al.(5), verificaram que o modelo de correção da cinética de inibição pelo substrato em termos de W_f/W_t como apresentado por Bowski et al.(7), foi inadequada para ajustar seus dados experimentais de taxas de reação em função da

concentração de sacarose para a invertase livre. Entretanto, para a invertase imobilizada, os dados experimentais, ajustaram-se bem ao modelo de inibição pelo substrato, sem necessidade de um fator de correção.

COMBES et al.(14) e COMBES e MONSANT(15), abordam o problema do decréscimo da atividade em relação ao aumento de concentração de sacarose, não por intermédio de um fator de correção, mas, considerando tal efeito proveniente da alteração da estrutura da sacarose, pela presença de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, tal como observam alguns pesquisadores (6,45,46). Consideram que as moléculas de sacarose contendo estas pontes de hidrogênio intramolecular não são disponíveis à inversão. Desta forma, propõem o seguinte modelo cinético:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S^*}{K_m + S^* + S^{*2}/K_e + S^{*3}/K_e'} \quad (27)$$

onde: S^* = concentração de substrato disponível à reação.

K_e e K_e' = constantes de inibição pelo substrato.

COMBES e MONSANT(15), estudaram ainda, o efeito da inibição pelo produto de reação, em soluções diluídas de sacarose para eliminar o efeito da inibição desta. O experimento foi efetuado em separado em relação a glicose e a frutose. Verificaram que a frutose promove um efeito de inibição competitiva, enquanto a glicose promove um efeito de inibição parcialmente competitiva. Os seguintes efeitos foram determinados para glicose e frutose:

$$K_m' = K_m(1 + F/k_f) \quad (28)$$

$$v'_{\max} = v_{\max} \cdot \frac{[1 + \gamma/k_g(G)]}{[1 + (G)/k_g]} \quad (29)$$

onde: F = concentração inicial de frutose

G = concentração inicial de glicose

K_f e K_g = constantes de inibição da frutose e glicose

γ = constante

Colocando-se os dois efeitos em conjunto, tem-se:

$$v = V_{\max} \cdot \frac{1 + \gamma/K_g(G)}{1 + (G)/K_g} \cdot \frac{S}{K_m [1 + (F)/K_f] + S} \quad (30)$$

II.5. CARACTERÍSTICAS DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO

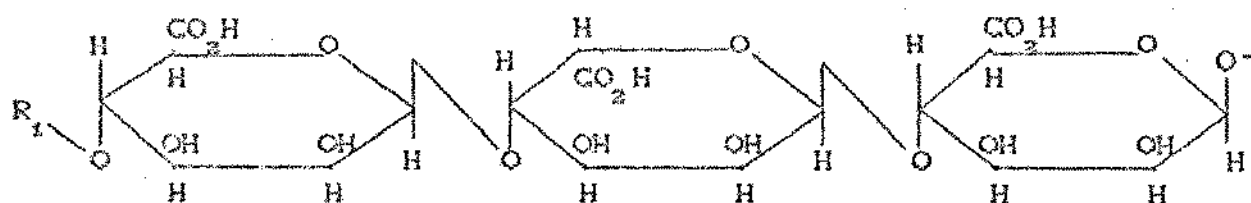
Um dos primeiros trabalhos sobre enzimas imobilizadas foi de Nelson e Griffin em 1918, citado por Messing (49), que estudaram a adsorção da invertase em carvão e em alumina, demonstrando a retenção da atividade desta enzima.

A grande vantagem dos processos que utilizam enzimas imobilizadas comparadas a processos que utilizam-na na forma livre, é a reutilização deste catalizador e a viabilização de processos contínuos. Desta forma, minimiza-se custos com enzima e custos operacionais (42,43).

Vários métodos de imobilização tem sido estudados nos últimos anos, os quais podem ser resumidos em: imobilização por ligação e por oclusão. O método de oclusão se resume em: oclusão em géis, oclusão em fibras e microencapsulação em membranas. Dentre os métodos de oclusão, o que se utiliza de géis, aprisiona as moléculas da enzima no seu interior, entre as moléculas do polímero. Possuindo a enzima alto peso molecular, esta ficará impedida de difundir para o exterior, enquanto que o substrato e produtos de reação, tendo peso molecular bem inferior, podem difundir entre a solução externa e interna do gel (23).

O processo de oclusão de enzimas em alginato de cálcio, baseia-se na insolubilização de soluções de ácido algínico (ou na forma de sal de sódio) contendo a enzima, em solução de cloreto de cálcio (34).

O ácido algínico é um polímero constituído de várias proporções de ácido D-manurônico e de ácido L-gulurônico em ligação α 1-4, como esquematizada a seguir sua estrutura (59).



Embora insolúveis em água, o ácido alginico é facilmente solubilizado em soluções aquosas de hidróxido de metais alcalinos e dão soluções de alta viscosidade. Por outro lado, ions de metais polivalentes dão produtos insolúveis. As proporções de metais polivalentes necessárias para obter precipitado de alginato cresce na ordem Ba < Pb < Cu < Sr < Cd < Ca < Zn < Ni < Co < Mn < Fe < Mg. As propriedades físicas variam de acordo com as proporções de ácido D-manurônico e ácido L-gulurônico presentes (59).

As características do gel podem ser resumidas em sua porosidade e resistência mecânica necessárias ao processo. A porosidade está intimamente ligada a capacidade do gel reter a enzima desejada e de alterar a difusividade efetiva do substrato (13).

KIERSTAN et al.(37), investigando a difusão de moléculas de baixo peso molecular em geis de alginato de cálcio com diferentes proporções entre ácido gulurônico e manurônico, verificam que geis de alto conteúdo de ácido manurônico possuíam boa porosidade característica, enquanto que geis de alto conteúdo de ácido gulurônico possuíam baixa porosidade.

CHEETHAM et al.(13), estudando a imobilização de células em alginato de cálcio, verificaram boa resistência a compressão e a abrasão em altas concentrações de sacarose, utilizando-se de um reator em coluna. As propriedades físicas do alginato foram

bem melhores, quando comparadas a géis de poliacrilamida.

Os géis de poliacrilamida possuem poros menores que os géis de alginato de cálcio, sendo desta forma mais aconselhável para imobilização de enzimas de moléculas menores, enquanto que o alginato é mais apropriado para imobilização de enzimas de alto peso molecular e para células. O alginato possui ainda uma vantagem a mais, porque é bioquimicamente inerte e células podem ser oclusas nos espaços intersticiais, podendo ser utilizado substrato de valor alimentício, não possuindo reagente tóxico no processo de imobilização (13).

CHEETHAM et al.(13), determinaram ainda o coeficiente de partição para a sacarose em alginato de cálcio livre de células, determinando o valor 0,84, indicando com isto que 84% do volume interno do gel é acessível à sacarose, evidenciando a presença de um limitado número de pequenos poros ou espaços intersticiais inacessíveis dentro do gel.

TANAKA et al.(67), estudaram o efeito do peso molecular de substratos na difusão em alginato de cálcio, determinando seus valores do exterior para o interior e vice-versa. Os coeficientes de difusão de substâncias como glucose, L-triptofano e α -lactoalbumina (com peso molecular inferior a 20000), tiveram comportamento semelhante ao das substâncias em água, isto é, estes substratos podem difundir facilmente pelo gel. Esta difusão também não foi alterada quando se aumentou a concentração de alginato ou a concentração de cloreto de cálcio na preparação.

No caso de substâncias com alto peso molecular (67), tais como albumina (P.M = 69000), γ -globulina (P.M. =154000) e

fibrinogênio (P.M. = 341000), o comportamento da difusão foi bem diferente, não havendo difusão destas substâncias e somente albumina foi parcialmente absorvida de fora para dentro. Para altos pesos moleculares pode ocorrer pequena difusão, e nestes casos, a concentração do gel afeta mais a difusão que a concentração de cloreto de cálcio. A Tabela 1. a seguir, resume os resultados obtidos.

Tabela 1: Coeficientes de difusão (em $10^{-4} \text{ cm}^2/\text{min}$) de substratos em água e para o interior e do interior para o exterior do gel de alginato de cálcio a 30°C .

substrato	p/ interior				p/ exterior	
	em água	2%	4%		2%	4%
glucose.....	4,08	4,10	-		4,10	-
L-triptofano.....	4,02	4,00	-		-	-
α -lactoalbumina.....	0,61	0,61	0,61		0,61	-
albumina	0,42	nao dif	-		0,21	0,054
γ -globulina.....	0,27	-	-		0,12	0,040
fibrinogenio.....	0,12	-	-		0,02	-

JOHANSEN e FLINK(34), apresentam dois processos de insolubilização do alginato de cálcio (interno/externo), que produzem diferenças na distribuição das zonas de junção e promovendo diferenças no tamanho da matriz de alginato.

No processo usual de insolubilização (externo), ocorre a sinérese do gel, com aumento de 30% em sua concentração, como reportado por JOHANSEN e FLINK(35). Desta forma, na preparação

de alginato com 2% (w/w), sua concentração final será de 2,6%, da mesma forma para 3% e 4% obtém-se concentração final de 3,9 e 5,4%, respectivamente.

HUSAIN et al.(33), imobilizaram enzimas em alginato de cálcio, e para prevenirem possíveis perdas por difusão, complexou-as com concanavalin-A, verificaram que complexos de glucose oxidase, invertase e amiloglicosidase com concanavalin A previnem a difusão das mesmas.

Como mencionado previamente, a invertase de leveduras é composta de duas frações, uma interna de peso molecular 135000 e outra externa a membrana periplasmática de peso molecular 270000 (1,63), e que a externa de peso molecular maior é mais estável termicamente (4). Destas considerações, conclue-se, que é mais interessante a imobilização apenas da fração externa à célula.

COSTA(16), dá uma contribuição no sentido de produção de invertase extracelular, selecionando cepas de leveduras que produzem maior atividade desta fração. O intuito do trabalho foi eliminar pelo menos uma etapa do processo de extração enzimática, diminuindo custos de processos.

II.6. CINÉTICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

Alguns pesquisadores (19,41,47), descrevem a cinética de enzimas imobilizadas em termos de parâmetros aparentes. Na determinação destes, normaliza-se na forma de Lineweaver-Burk os dados de taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato obtidos de um reator em estado estacionário. Regan et al. (62), entretanto, mostram através de dados obtidos por simulação, a grande influência do diâmetro da matriz nos valores

dos parâmetros aparentes. Por outro lado, outros pesquisadores (23,24,28,32,51,64,72), abordam o problema em termos de parâmetros efetivos. Na determinação destes, utiliza-se de um balanço de massa envolvendo difusividade de massa e taxa de reação. Os princípios e considerações sobre este balanço são sumarizadas a seguir.

Na determinação de parâmetros efetivos, é necessário o conhecimento do perfil de concentração de substrato no interior da matriz. Para tal, deve-se determinar num primeiro passo o coeficiente de transferência de massa na camada limite (K_L), com intuito de se calcular a concentração na superfície da matriz. A partir daí, determina-se o perfil de concentração no interior por intermédio de um balanço de massa envolvendo difusividade de massa e taxa de reação. Para uma matriz porosa, o substrato presente no reator, difunde-se para dentro da matriz, e em presença da enzima se transforma em produto(s). O substrato e produtos de reação podem difundir através dos poros, enquanto que a enzima de alto peso molecular fica aprisionada entre as moléculas do gel.

A Figura 4. a seguir, mostra de forma esquemática, o tipo de perfil de concentração de substrato em uma matriz esférica contendo enzima imobilizada e imersa em um meio agitado, sendo R , S_e e S_b o raio da matriz, concentração de substrato na superfície externa e concentração de substrato no meio líquido do reator, respectivamente.

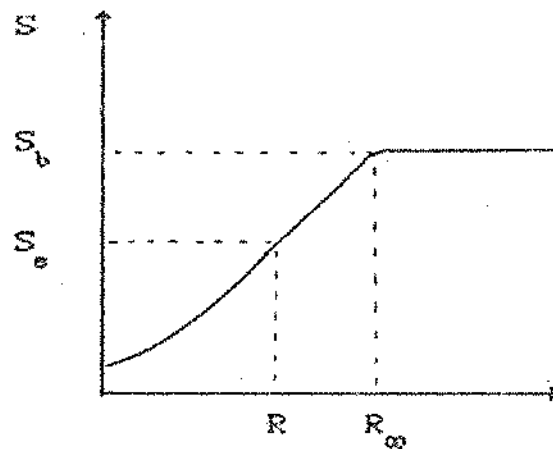


Figura 4 : Esquema do perfil de concentração de substrato em suporte esférico, contendo enzima imobilizada.

No balanço de massa no interior da matriz, as seguintes suposições são admitidas (23,72): a) a enzima é homogeneamente distribuída no interior da matriz, b) o sistema está em estado estacionário, c) o modelo cinético da taxa de reação é de forma análoga à enzima livre, d) a difusividade efetiva de massa D_e no interior é constante em qualquer posição, e e) o substrato e produtos de reação podem difundir através da matriz, enquanto que a enzima não.

Partindo-se de tais suposições, e tomando-se um elemento de volume dV no interior de uma matriz esférica, como esquematizada na Figura 5:

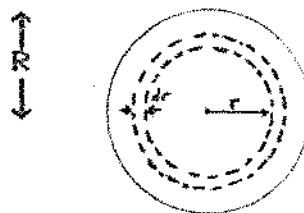


Figura 5. Esquema de um elemento de volume no interior de uma matriz esférica.

A diferença entre o fluxo de substrato entre a área da esfera na posição $r+dr$ e a área na posição r , é devido ao desaparecimento por reação enzimática no elemento de volume dV , desta forma, o balanço de massa em termos de substrato pode ser escrito como:

$$j \cdot A|_{r+dr} - j \cdot A|_r = r(S) \cdot dV \quad (31)$$

onde: j = fluxo de massa.

$r(S)$ = taxa de reação no elemento de volume dV

$A|_{r+dr}$ e $A|_r$ = áreas superficiais da esfera na posição respectiva.

Pela primeira lei de Fick, pode-se escrever o fluxo de massa j como:

$$j = -D_e \cdot \frac{dS}{dr} \quad (32)$$

onde: D_e = difusividade efetiva de substrato no suporte.

Substituindo-se a equação 32 em 31 e expandindo na série de Taylor, pode-se deduzir a seguinte equação geral:

$$D_e \cdot \left[\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right] = r(S) \quad (33)$$

Admitindo as seguintes condições de contorno:

a) O gradiente de concentração no centro da esfera é nulo.

$$\frac{dS}{dr} \Big|_{r=0} = 0 \quad (33a)$$

b) O fluxo de substrato para o interior da matriz, devido à transferência de massa por convecção na camada limite, deve ser igual ao fluxo de substrato por difusão molecular para o interior da mesma.

$$j = D_e \cdot \frac{dS}{dr} \Big|_{r=R} = K_L \cdot (S_b - S_e) \quad (33b)$$

Vários trabalhos são apresentados na literatura, realizados em diversos tipos de reatores e em diversas geometrias de matriz

contendo enzimas e utilizando-se deste procedimento.

RONY(64), aborda o problema de controle de difusão para catalizadores em múltiplas fases e em três tipos de geometria: coordenadas cartesianas, cilíndricas e esféricas, através de um balanço de massa no interior das fases e com cinética de primeira ordem.

VIETH et al.(71), desenvolveram seus trabalhos, considerando reação de primeira ordem e isotérmicas para dois tipos de operação, leito fixo e batelada, com reação reversível ou irreversível em geometria plana ou esférica de membranas.

WADIAK e CARBONELL(73), utilizaram-se de modelos apropriados no estudo da β -galactosidase imobilizada em microcápsulas de membrana de nitrato de celulose em reator de mistura.

Outros trabalhos são apresentados, alguns considerando cinética de Michaelis-Menten e outros com adição de termos de inibição em vários tipos de reatores, dando desta forma, uma gama de possibilidades do uso de modelos através do balanço de massa (23, 24, 28, 32, 51, 64, 72).

REGAN et al.(62), mostraram os efeitos do raio do suporte, concentração enzimática, difusividade efetiva de substrato e constante cinética de Michaelis-Menten na cinética da enzima imobilizada. Partiram do balanço de massa, simulando as variáveis e obtendo taxas de reação. Os dados assim obtidos de taxas de reação em função da concentração de substrato na superfície foram normalizados na forma de Lineweaver-Burk como exemplificado na Figura 6, esquematicamente, para o caso da variação do raio do suporte.

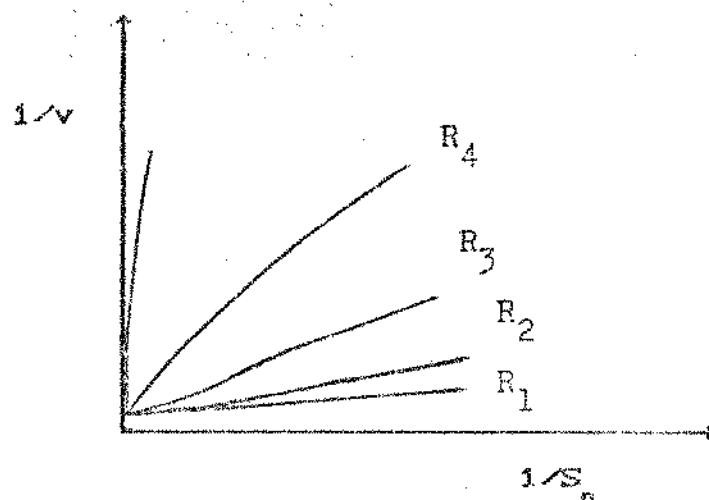


Figura 6 : Influência do raio do suporte na taxa de reação global, com: $R_4 > R_3 > R_2 > R_1$. Segundo Regan et al. (62).

Verifica-se pela Figura 6, que o coeficiente linear, pela extrapolação da reta, é impreciso, logo $V_{\max}$ é de difícil obtenção. Quanto ao coeficiente angular na faixa em que é linear, observa-se a forte dependência da constante de Michaelis-Menten aparente em relação ao raio da matriz. Evidencia-se por esta simulação, que o método de Lineweaver-Burk na determinação de parâmetros aparentes, é adequado apenas para obter a relação entre $K_m/V_{\max}$ aparente.

Várias abordagens tem sido feitas, para resolução da equação 33, determinando em consequência o perfil de concentração de substrato no interior da matriz.

No caso específico da invertase, que sofre o efeito de inibição pelo substrato, a equação da taxa de reação em conjunto com o balanço de massa, considerando difusividade efetiva constante e a não presença do efeito físico da solução, pode ser escrita na forma:

$$D_e \cdot \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right) = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S + S^2/K_i} \quad (34)$$

Para soluções diluídas, D_e pode ser considerado constante, e o efeito físico da solução pode ser desprezível. Entretanto, para soluções concentradas, há um decréscimo da difusividade efetiva em relação à concentração, e a taxa de reação referida do lado direito da equação 34 também é menor do que prevista pela cinética de inibição pelo substrato. Desta forma, o decréscimo na difusividade efetiva tende a anular o efeito físico.

BESSEPDICH et al.(5), quando normaliza seus dados de taxas iniciais de reação para invertase immobilizada na forma de Lineweaver-Burk, verifica que o modelo de inibição pelo substrato foi adequado na modelagem, sem necessidade de adição de um fator de correção na taxa de reação.

WADIAK e CARBONELL(72), abordam teóricamente o problema de inibição pelo substrato, partindo da equação 34, com metodologia mostrada a seguir:

Tornando adimensional a equação 34 na forma:

$$\frac{d^2 C}{dX^2} + \frac{2}{X} \cdot \frac{dC}{dX} = \frac{\beta \cdot K_1 \cdot C}{K_1 + C + K_2 \cdot C^2} \quad (35)$$

$$\text{onde: } \beta = R^2 V_{\max} / D_e K_m \quad (35a)$$

$$K_1 = K_m / S_b \quad (35b)$$

$$K_2 = K_i \cdot S_b \quad (35c)$$

$$X = r/R \quad (35d)$$

$$C = S/S_b \quad (35e)$$

onde S_b , K_m e K_i as concentração média no reator, constante de Michaelis-Menten e constante de inibição pelo substrato, respectivamente, R o raio da esfera e D_e a difusividade efetiva de substrato no interior da matriz.

As condições de contorno são:

$$a) \quad \left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=0} = 0 \quad (35f)$$

$$b) \quad \left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=1} = \alpha_p \cdot (1 - C|_{X=1}) \quad (35g)$$

onde: $\alpha_p = K_L R_L / D_e$ = número de Sherwood modificado (36)

K_L = coeficiente de transferencia de massa na camada limite

É proposto um parâmetro de transformação de N_a e N_a , como citado por Wadiak e Carbonell (72), com intuito de simplificar a integração numérica, transformando o problema de valor de contorno em problema de valor inicial, introduzindo-se o parâmetro de transformação A , na forma:

$$C = A \cdot C^* \quad \text{tal que } C^*|_{X=0} = 1 \quad (37)$$

A (Eq. 35), pode ser reescrita na forma:

$$\frac{d^2 C^*}{dX^2} + \frac{2}{X} \cdot \frac{dC^*}{dX} = \frac{\beta \cdot K_1^* \cdot C^*}{K_1^* + C^* + K_2^* \cdot C^{*2}} \quad (38)$$

com condições iniciais:

$$a) \quad C^*|_{X=0} = 1 \quad (38a)$$

$$b) \quad \left. \frac{dC^*}{dX} \right|_{X=0} = 0 \quad (38b)$$

$$\text{onde: } K_1^* = K_1 / A \quad (38c)$$

$$K_2^* = K_2 \cdot A \quad (38d)$$

$$C^* = C / A \quad (38e)$$

Da segunda condição de contorno:

$$\left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=1} = \alpha_p \cdot (1 - C|_{X=1}) \implies \left. \frac{dC^*}{dX} \right|_{X=1} = \alpha_p \cdot (1/A - C^*|_{X=1})$$

$$A = \left[\frac{1}{\alpha_p} \cdot \frac{dC^*}{dX} \Big|_{x=1} + C^* \Big|_{x=1} \right]^{-1} \quad (38f)$$

A integração é feita, estimando-se K_1^* , K_2^* e β na equação 38, sujeitas as condições iniciais 38a e 38b, obtendo-se o perfil de concentração adimensional C^* , desta forma determinando-se $C^* \Big|_{X=1}$ e $(dC^*/dX) \Big|_{X=1}$.

Conhecendo-se α_p , A pode ser obtido pela equação 38f e os parâmetros K_1 , K_2 , perfil de concentração adimensional em C e o gradiente de concentração adimensional na superfície $(dC/dX) \Big|_{x=1}$ podem ser determinados.

Na determinação dos parâmetros cinéticos, a integração é feita variando-se os parâmetros na equação 38, até que o gradiente de concentração na superfície (dC/dX) seja coincidente com o obtido experimentalmente pela taxa de reação.

Conhecidos os parâmetros cinéticos intrínsecos da enzima imobilizada, as taxas de reação previstas em determinadas condições, podem ser normalizadas em cartas apropriadas, relacionando o fator de efetividade em função do módulo de Thiele generalizado ϕ .

O módulo de Thiele generalizado(24), pode ser definido como:

$$\phi = L_c \left[\frac{r(S_b)}{D_e \cdot S_b} \right]^{1/2} \quad (39)$$

onde: L_c = dimensão característica (L=R para esfera)

$r(S_b)$ = taxa de reação na matriz contendo a enzima, se a concentração do substrato fosse idêntica à do reator (S_b).

Reescrevendo o módulo de Thiele ϕ em função dos parâmetros

cinéticos adimensionais para cinética de inibição pelo substrato, chega-se a:

$$\phi = \left[\frac{\beta \cdot K_1}{K_1 + 1 + K_2} \right]^{1/2} \quad (40)$$

O fator de efetividade $\eta = \frac{\text{taxa de reação observada}}{r(S_b)}$ (41) que representa a reação entre a taxa observada no reator em relação ao volume do suporte, e a taxa de reação que seria observada se o suporte estivesse com concentração homogênea e igual a média do reator.

Partindo-se da definição de η na (Eq. 41), da primeira lei de Fick (Eq. 32) e da relação entre fluxo de massa j e taxa de reação $r(S)$,

$$j = D_e \cdot \frac{dS}{dr} \Big|_r = R = v_{obs} \cdot \frac{R}{3}$$

Pode-se demonstrar que:

$$\eta = \frac{3}{\phi^2} \cdot \frac{dC}{dX} \Big|_{x=1} \quad (42)$$

WADIAK e CARBONELL(72), integraram numericamente a equação 38, sujeita às condições iniciais 38a e 38b, usando o método de Runge-Kutta de 4^a ordem com passos de 0,01 em X , fixando-se $K_2^* = 1$ e variando-se os outros parâmetros β , K_1^* e α_p . Através da simulação, construíram cartas do fator de efetividade η em função do módulo de Thiele generalizado ϕ . Observando pelas cartas, regiões de fator de efetividade bastante superiores à unidade e apresentando também a possibilidade de múltiplos estados estacionários.

FINK et al.(23), utilizam-se do mesmo procedimento, mas para cinética de Michaelis-Menten, construindo cartas do fator

de efetividade em função do módulo de Thiele; neste caso o módulo de Thiele é o mesmo da equação 40 com $K_2^* = 0$.

RAMACHANDRAN(60), propõe como forma alternativa, métodos de colocação para resolver o perfil de concentração na forma de:

$$C(X) = C(1) + (1-X^2) \sum_{i=1}^N a_i \cdot P_{i-1}(X^2) \quad (43)$$

onde: a_i = coeficiente indeterminado

$P_{i-1}(X^2)$ = polinômio ortogonal que pode ser do tipo Jacobi, Legendre ou Chebycheff.

A cinética enzimática expressa pelo modelo de Michaelis-Menten, sempre admite uma simplificação quando $S \ll K_m$, neste caso o modelo pode ser descrito por uma cinética de primeira ordem, e a equação do modelo cinético obtido do balanço de massa pode ser escrito na forma:

$$\frac{d^2C}{dX^2} + \frac{2}{X} \cdot \frac{dC}{dX} = \beta \cdot C \quad (44)$$

a qual admite solução analítica (10,18), com perfil de concentração adimensional:

$$C(X) = C|_{X=1} \cdot \frac{\sinh(\phi \cdot X)}{X \cdot \sinh \phi} \quad (45)$$

onde: $\phi = \beta^{1/2}$ = módulo de Thiele para cinética de primeira ordem. (46)

Derivando-se a equação 45 em X, obtém-se:

$$\frac{dC}{dX} |_{X=1} = C(1) \cdot \left[\frac{\phi}{\tanh \phi} - 1 \right] \quad (47)$$

Das equações 42, 47 e 35g, pode-se demonstrar que:

$$\eta = \frac{3}{\phi^2} \cdot \left[\frac{1}{\alpha_p} + \frac{\tanh \phi}{\phi - \tanh \phi} \right]^{-1} \quad (48)$$

se $\alpha_p = \infty \Rightarrow C(1) = 1$ e,

$$\eta = \frac{3}{\phi^2} \cdot \left[\frac{\phi}{\tanh \phi} - 1 \right] \quad (49)$$

II.7. TRANSFERÊNCIA DE MASSA NA CAMADA LIMITE

Na determinação de parâmetros intrínsecos da enzima imobilizada, é necessário o conhecimento da concentração de substrato na superfície da matriz. Para a determinação, deve-se conhecer o fluxo de massa de substrato j para a superfície da matriz, a qual é obtida pela taxa de reação e do coeficiente de transferência de massa na camada limite K_L .

Define-se fluxo de massa (18) em relação às concentrações no reator (S_b) e na superfície da matriz (S_e), através do coeficiente de transferência de massa na camada limite K_L , na forma:

$$j = K_L \cdot (S_b - S_e) \quad (50)$$

As correlações de transferência de massa para esferas submersas em fluidos, podem ser descritas em função de números adimensionais, como:

$$Sh_p = 2 + B \cdot Re_p^{m_1} \cdot Sc^{m_2} \quad (51)$$

onde: $Sh_p = K_L \cdot d_p / DSD = n^\circ$ de Sherwood

$Re_p = n^\circ$ de Reynolds

$Sc = \nu / DSD = n^\circ$ de Schmidt

d_p = diâmetro da matriz esférica

DSD = coeficiente de difusão do substrato em solução

$\nu = \mu / \rho$ = viscosidade cinemática

m_1, m_2 = constantes

Para esferas fixas em fluidos em movimento, com velocidades efetivas conhecidas, a equação de Ranz e Marshall,

$$Sh_p = 2 + 0,6 \cdot Re_p^{0,5} \cdot Sc^{1/3} \quad (52)$$

é largamente empregada, onde $Re_p = \frac{d_p \cdot u}{\nu}$ (52a)

sendo u = velocidade relativa fluido-partícula.

Para tanques agitados, costuma-se relacionar o número de Reynolds com o consumo de potência por unidade de massa (ϵ), que em termos de engenharia é bem apropriada, visto que relaciona-se com o custo de operação do sistema.

A teoria de Kolmogoroff, como citado por Levins e Glastonbury (38), afirma que para grandes números de Reynolds, os pequenos redemoinhos de um sistema de agitação, são independentes do movimento da solução média do reator e são isotrópicos. As propriedades destes redemoinhos são função da taxa de dissipação de energia por unidade de massa: ϵ , dada por

$$\epsilon = P / W \quad (53)$$

onde: P = potência consumida

W = massa de fluido

Para sistemas agitados, o número de Reynolds é definido como:

$$Re_v = \left[\frac{\epsilon \cdot d_p^4}{\nu^3} \right]^{1/2} \quad \text{para } \eta_k \gg d_p \quad (54)$$

$$Re_I = \left[\frac{\epsilon \cdot d_p^4}{\nu^3} \right]^{1/2} \quad \text{para } \eta_k \ll d_p \quad (55)$$

onde: η_k = escala de comprimento de Kolmogoroff, definido como:

$$\eta_k = (\nu^3 / \epsilon)^{1/4} \quad (56)$$

Vários trabalhos foram realizados, utilizando-se desta abordagem aos dados experimentais. Foi verificado ainda, a influência da diferença de densidades entre as partículas em suspensão e a solução e a geometria do reator em termos do

diâmetro das pás do agitador e diâmetro do tanque (D/T_i).

BRIAN e HALESC(8), BRIAN et al. (9), fazem uma abordagem geral em termos experimentais e teóricos para transferência de calor e massa, em esferas submersas em fluidos no estado não estacionário, e com mudança de diâmetro das partículas no processo. Verificou-se ainda (9), que as correlações são independentes das diferenças de densidades de sólidos e líquidos, quando estes estão na faixa de 0,8 a 1,25.

LEVINS e GLASTONBURY(38), verificaram uma dependência do coeficiente de transferência de massa com D/T_i , encontrando correlações na forma $K=f(\epsilon, D/T_i)$, através de dados obtidos da literatura e analisados estatisticamente em função da diferença de densidades, encontrando:

$$\text{para: } \Delta\rho = 100 \text{ Kg/m}^3 \quad K_L \propto (\epsilon)^{0,20} \cdot (D/T_i)^{0,12}$$

$$\Delta\rho = 280 \text{ Kg/m}^3 \quad K_L \propto (\epsilon)^{0,22} \cdot (D/T_i)^{0,27}$$

De uma forma geral(39), pode-se expressar o adimensional Sh_p como função dos parâmetros:

$$Sh_p = 2 + f(d_p, \epsilon, v, D_e, D, T_i, \rho_s, \rho_L)$$

Nas equações gerais de transferência de massa (equação 51), certas condições podem propiciar $Sh_p=2$, quando o termo da direita da equação se tornar desprezível em relação ao valor absoluto 2. Isto ocorre principalmente quando o diâmetro das partículas for muito pequeno. NAGATA(54), verifica $Sh_p=2$ para diâmetros de partículas inferiores a 10μ , sendo que a densidade das mesmas neste caso é significativamente superior à solução. O'NEILL(57), estima $Sh_p=2$ em transferência de massa em partículas de diâmetro inferiores a 200μ contendo enzima

imobilizada, com densidades levemente superiores à da solução.

Revisando dados da literatura para partículas suspensas em tanques agitados, LEVINS e GLASTONBURY(39) descrevem as seguintes correlações:

i) Estabelecendo-se que o coeficiente de transferência de massa não é uma função dependente da diferença de densidade entre partícula e solução, a correlação pode ser escrita como:

$$\frac{K_L \cdot d_p}{D \Delta S} = 2 + 0,47 \cdot \left[\frac{d_p^{4/3} \cdot \epsilon^{1/3}}{\nu} \right]^{0,62} \cdot \left[\frac{D}{T_i} \right]^{0,17} \left[\frac{\nu}{D \Delta S} \right]^{0,36} \quad (57)$$

ii) Quando uma diferença significativa de densidade existe, uma equação similar à proposta para convecção forçada é recomendada:

$$\frac{K_L \cdot d_p}{D \Delta S} = 2 + 0,44 \cdot \left[\frac{d_p \cdot u}{\nu} \right]^{1/2} \cdot \left[\frac{\nu}{D \Delta S} \right]^{0,38} \quad (58)$$

sendo proposto um procedimento para o cálculo da velocidade efetiva u .

Analogamente, para outros tipos de reatores, correlações semelhantes são obtidas, como mostra TESHIMA e OHASHI(68) para reator de cesto contendo catalizador:

$$Sh_p = 2,0 + 0,012 \cdot \left[\frac{\epsilon \cdot d_p^4}{\nu^3} \right]^{0,41} \cdot Sc^{0,64} \quad (59)$$

Selecionada a correlação mais adequada, resta ainda um procedimento para determinação de $\epsilon = P/W$.

Para tanques agitados, e com geometria padronizada, se tem correlações listadas na literatura, relacionando o número de potência (N_p) com número de Reynolds de agitação e número de Froude. Para regime turbulento ($Re_a > 2000$) com reator munido de

defletores, o número de Potência fica independente do número de Reynolds e assume um valor constante.

$$N_p = \text{constante} = \frac{P}{\rho_L \cdot N^3 \cdot D^5} \quad (60)$$

Desta forma, trabalhando-se em regime turbulento, mantém-se o número de potência constante, e pela geometria padronizada conhece-se o seu valor. Pode-se relacionar ϵ da seguinte forma:

$$\epsilon = \frac{N_p \cdot N^3 \cdot D^5}{V_r} \quad (61)$$

onde: V_r = volume líquido do reator

D = diâmetro das pás do agitador

N = frequência de agitação

com $Re_a = \frac{D^2 \cdot N}{\nu} > 2000 \quad (62)$

II.8. COEFICIENTES DE DIFUSÃO

Na determinação de parâmetros intrínsecos da enzima imobilizada, a concentração na superfície do suporte é determinada por intermédio de correlações de transferência de massa na camada limite, necessitando-se para tanto do coeficiente de difusão de substrato em solução $[D(S)]$. Para o perfil interno de concentração, necessita-se do coeficiente de difusão efetivo no interior do suporte, e ainda, se houver efeito de partição, o coeficiente k_p .

II.8.1. Difusividade de Massa em solução $D(S)$

A equação de Stokes-Einstein é a mais comumente utilizada na avaliação de difusão em líquidos(18), dada na forma:

$$D_{1,2} = \frac{K_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot R_0} \quad (63)$$

onde: $D_{1,2}$ = difusividade do (soluto 1) em (solvente 2)

K_B = constante de Boltzmann

μ_2 = viscosidade do solvente

R_o = raio do soluto

T = temperatura absoluta

Várias correlações semi empíricas são encontradas na literatura(18), aplicadas a classes de solutos-solventes. Uma das correlações semi empíricas de bastante uso, é a correlação de Wilke-Chang, dada na forma:

$$D_{1,2} = \frac{7,4 \cdot 10^{-8} \cdot (\phi_2 \cdot M_2)^{0,5} \cdot T}{\mu_2 \cdot \bar{V}_1^{0,6}} \quad (64)$$

onde: $D_{1,2}$ = coeficiente de difusão (cm^2/s)

T = temperatura ($^\circ\text{K}$)

μ_2 = viscosidade do solvente (cP)

$\bar{V}_1$ = volume molar do soluto na T_{eb} (cm^3/mol)

ϕ_2 = parâmetro de associação do solvente

$\phi_{\text{agua}} = 2,26$

M_2 = peso molecular do solvente (g/mol)

Uma característica das correlações de difusividade, é sua dependência da temperatura e viscosidade:

$$[D(S) \cdot \mu_2] / T = \text{constante} \quad (65)$$

A Tabela 2 a seguir, resume alguns dados de coeficientes de difusão de sacarose e glucose/frutose em soluções diluídas:

Tabela 2: Coeficientes de difusão de sacarose, glucose e frutose em soluções aquosas diluídas, em $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, (b) usando a equação 65 e partindo-se do valor $0,5223 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 25°C , (c) utilizando a equação 64.

soluto	T(°C)	D(S)	ref
sacarose	25	0,5228	18
sacarose	25	0,54	12
sacarose	50	0,933	31
sacarose	50	0,927	(b)
glucose	30	0,69	36
glucose/frutose	25	0,69	12
sacarose	25	0,476	(c)

II.8.2. Difusividade efetiva de massa D_e

Tem-se dois casos gerais na abordagem da difusividade efetiva: no primeiro caso, a concentração de substrato na superfície da matriz é análoga à solução externa, com barreira ao fluxo de massa devido a limitação da área disponível e ao caminho efetivamente percorrido pela molécula no interior dos poros; no segundo caso, além destas limitações, temos uma concentração de equilíbrio entre o interior e exterior da matriz, resumidas no coeficiente de partição k_p .

Considerando uma membrana porosa, podemos resumir os dois casos, como na Figura 7 a seguir:

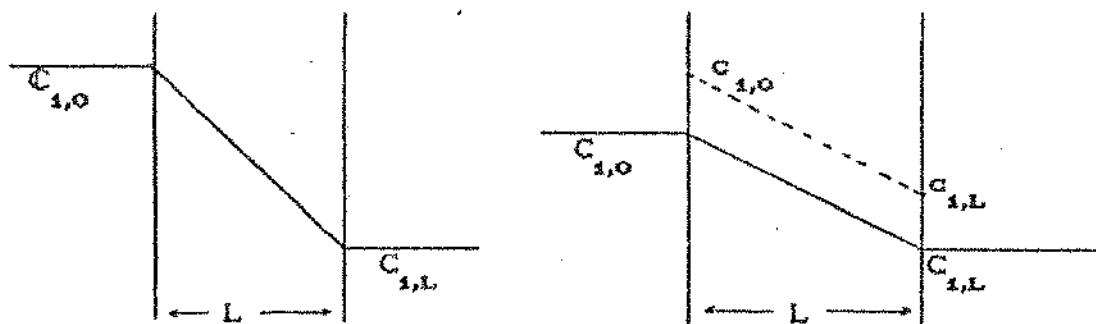


Figura 7. Representação esquemática do perfil de concentração no interior de sólidos, no estado estacionário.

As equações de fluxo de massa j , podem ser escritos para estes dois casos como:

$$(a) \quad j = \frac{D_o}{L} \cdot (C_{1,0} - C_{1,L}) \quad (66)$$

$$(b) \quad j = \frac{D_o \cdot k_p}{L} \cdot (C_{1,0} - C_{1,L}) \quad (67)$$

onde: $C_{1,0}$, $C_{1,L}$ = concentrações na fase líquida

$c_{1,0}$, $c_{1,L}$ = concentrações na fase sólida

$$c_1 = k_p \cdot C_1$$

L = espessura do sólido

A difusividade efetiva, pode ser relacionada com a difusividade em solução, pela equação:

$$D_o = D \cdot S \cdot \epsilon_A / \tau \quad (68)$$

$$\text{onde: } \epsilon_A = (\text{área disponível}) / (\text{área total}) \quad (69a)$$

$$\tau = \text{tortuosidade} = (\text{distância média real percorrida pela molécula}) / (\text{espessura do sólido } L) \quad (69b)$$

O método mais comum de determinação da difusividade em solução, é por intermédio da célula de diafragma(18), formada de dois compartimentos de solução com o soluto em estudo e em concentrações diferentes, separadas por um diafragma poroso. Através da medida da variação das concentrações no tempo é possível a determinação do coeficiente de difusão.

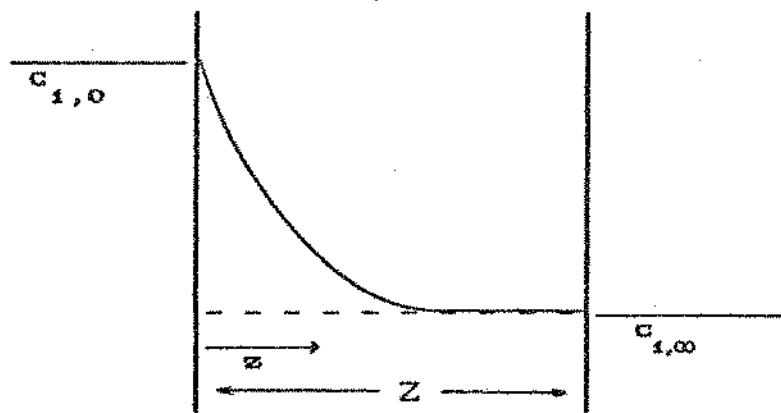
Para a determinação da difusividade efetiva, utilizando-se da célula de diafragma, basta substituir o diafragma por uma membrana do gel em estudo. Apesar da simplicidade desta técnica, surgem problemas de determinação de D_e quando se utiliza de certos géis, os quais podem se romper durante o experimento, devido a instabilidade mecânica.

Outros métodos para determinação da difusividade efetiva, são encontrados na literatura (17,18,66), baseados em sólidos semi-infinitos ou em sólidos finitos.

TODA e SHODA(69), determinaram a difusividade de sacarose em agar gel 2,0%(w/v) a 47,5°C, utilizando-se de um tubo contendo o gel, imerso em uma solução de sacarose de volume relativamente elevado em relação ao gel e de concentração 117 mM sob agitação por 990 minutos. Após este tempo, o tubo foi retirado e o gel fatiado, analisou-se a concentração de sacarose em cada fatia, obtendo-se um perfil de concentração.

A metodologia utilizada por TODA e SHODA (69), basea-se na teoria desenvolvida para placas semi-infinitas, considerando o tubo com gel, um sólido semi-infinito imerso em uma solução de concentração constante no tempo.

O perfil de concentração de soluto no interior de uma placa semi-infinita, é descrita pela segunda lei de Fick como esquematizada a seguir:



$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D_e \cdot \frac{\partial^2 c_1}{\partial z^2} \quad (\text{2ª lei de Fick}) \quad (69)$$

com as condições de contorno:

$$t = 0 \text{ para qualquer } z \Rightarrow c_1 = c_{1,0} \quad (69a)$$

$$t > 0 \text{ e } z=0 \Rightarrow c_1 = c_{1,0} \quad (69b)$$

$$z = \infty \text{ para qualquer } t \Rightarrow c_1 = c_{1,\infty} \quad (69c)$$

Resolve-se a (Eq. 69) por combinação de variáveis (18), na forma de: $\xi = z / \sqrt{4 \cdot D_e \cdot t}$ (70)

$$\frac{c_1 - c_{1,0}}{c_{1,\infty} - c_{1,0}} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \int_0^{\xi} e^{-\eta^2} \cdot d\eta = \text{erf}(\xi) \quad (71)$$

onde $\text{erf}(\xi)$ = função erro

Determinando-se experimentalmente o perfil de concentração, como efetuado por TODA e SHODA (69), podem-se estimar valores da difusividade efetiva, de tal forma que os dados experimentais se ajustem à equação 71.

Os requisitos básicos deste método são: a concentração de soluto no meio de agitação deve permanecer constante, e outro, o tempo do experimento deve ser tal, que a frente de concentração não atinja a outra extremidade do sólido.

O método transcrito é laborioso, já que se devem medir concentrações em função da posição, porém, pode-se simplificar o

método, através da determinação de uma concentração média do gel.

Pode-se demonstrar, a partir da equação 70, que, o fluxo instantâneo na superfície j é:

$$j|_{z=0} = \sqrt{\frac{D_0}{\pi \cdot t}} \cdot (c_{1,0} - c_{1,\infty}) \quad (72)$$

e o fluxo médio $\bar{J}$, como:

$$\bar{J}|_{z=0} = \frac{1}{t} \cdot \int_0^t j|_{z=0} \cdot dt \quad \text{ou}$$

$$\bar{J}|_{z=0} = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_0}{\pi \cdot t}} \cdot (c_{1,0} - c_{1,\infty}) \quad (73)$$

O fluxo médio é facilmente determinado, através da concentração média $\bar{C}$, pela expressão:

$$\bar{J}|_{z=0} = \frac{\bar{C} \cdot V_{g+l}}{\text{Área} \cdot t} \quad (74)$$

TANAKA et al.(67), MERCHANT et al.(48), determinaram difusividades efetivas de solutos em alginato de cálcio, utilizando-se do estado não estacionário, em esferas do gel imersas em volume líquido finito.

A abordagem deste problema, pode ser tanto em termos de difusão do interior para o exterior ou vice-versa. As equações sumarizadas a seguir são detalhadas por CRANK(17).

Esferas imersas em uma fase líquida finita:

Considerando o caso de difusão do exterior para o interior; quando uma esfera inicialmente isenta de soluto é imersa em uma fase líquida finita bem agitada, com concentração uniforme de valor C_L^* , a equação do balanço de massa no interior da esfera pode ser descrita como:

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = D_0 \cdot \left[\frac{\partial^2 c_s}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial c_s}{\partial r} \right] \quad (75)$$

com as seguintes condições de contorno:

$$t=0 \quad 0 < r < R \quad c_s^* = 0 \quad (\text{concentração inicial no sólido}) \quad (75a)$$

$$t=0 \quad r > R \quad C_L = C_L^* \quad (\text{concentração inicial no líquida}) \quad (75b)$$

$$t > 0 \quad r=0 \quad \partial c_s / \partial r = 0 \quad (75c)$$

$$t > 0 \quad r=R \quad V_L \cdot \frac{\partial C_L}{\partial t} = k_p \cdot A_s \cdot D_0 \cdot \frac{\partial c_s}{\partial r} \Big|_{r=R} \quad (75d)$$

onde: $c_s(R, t) = k_p \cdot c_L(t)$

Pode-se demonstrar que:

$$\frac{C_L^t}{C_L^*} = \frac{\alpha}{1 + \alpha} \left\{ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1 + \alpha)}{9 + 9\alpha + q_n^2 \cdot \alpha^2} \cdot \exp \left[\frac{-D_0 \cdot q_n^2 \cdot t}{R^2} \right] \right\} \quad (76)$$

$$\text{onde: } \alpha = \frac{V_L}{V_{gel} \cdot k_p} \quad (77)$$

q_n = raízes positivas não nulas e sucessivas da função:

$$\tan q_n = \frac{3 \cdot q_n}{3 + \alpha \cdot q_n^2} \quad (78)$$

O coeficiente de partição, pode ser determinado pelo mesmo experimento, considerando tempo relativamente longo, até que as concentrações na fase sólida e na fase líquida entrem em equilíbrio,

$$k_p = c_s^{\infty} / C_L^{\infty} \quad (79)$$

Do levantamento dos dados experimentais, pode-se obter a curva na forma C_L / C_L^* em função do tempo, e do equilíbrio, pode-se determinar k_p . A determinação da difusividade efetiva, é obtida por estimativas da mesma na equação 76, utilizando-se de um programa computacional, até que os dados obtidos pela

equação, acarretem menor desvio padrão em relação aos dados experimentais.

No caso específico de géis de alginato de cálcio, que são utilizados na forma esférica, este método deve ser o mais adequado na determinação de D_v , visto que o gel sofre o efeito de sinérese como demonstrado por JOHANSEN e FLINK(34) e a influência do processo de insolubilização do alginato, ocasionando diferenças nas zonas de junção (35).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. REAGENTES

A enzima invertase foi obtida da Novo Ferment, na forma de pó branco e solúvel em água. O ácido algínico da Kelco Gel LV (Algin), divisão da Merck & Co Inc. Rahway - New Jersey USA. Outros reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto, a sacarose comercial utilizada no reator com enzima imobilizada.

III.2. METODOLOGIA

III.2.1. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO

DNS (50)

a) Preparação do reagente DNS

1416 ml de água destilada

10,16 g de ácido 3,3 dinitrosalicílico

19,8 g de hidróxido de sódio

misturar e dissolver estes reagentes (obs: a quente a solubilização é mais rápida), adicionar a esta mistura:

7,6 ml de fenol (fundido a 50°C)

8,3 g de metabissulfito de sódio

Guardar este reagente em frasco protegido da luz.

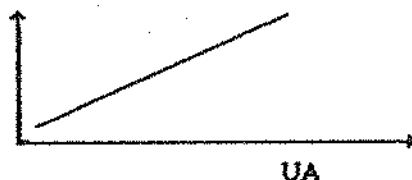
Paralelamente, preparar solução de tartarato duplo de sódio e potássio 11,25 g/l e guardar em outro frasco.

b) Curva padrão

Prepararam-se soluções de partes iguais de glucose e frutose, com concentrações na faixa de 0,1 a 1 g/l de açúcares redutores. Tomou-se 1 ml destas soluções de concentração conhecida e adicionou-se em um tubo de ensaio contendo 1 ml de reagente DNS, levando ao banho

maria em ebulição por 5 minutos. Finalizada esta reação, resfriou-se instantaneamente pela imersão dos tubos em banho de gelo fundente. Adicionou-se em seguida 16 ml de solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 11,25 g/l para estabilizar a cor. Agitou-se o tubo para homogeneizar e fez-se a leitura a 540 nm em espectrofotômetro B 382 da Micronal. O branco foi feito conjuntamente com as amostras, substituindo-se a solução de açúcar redutor, por 1 ml de água destilada. Após obtidas as leituras de absorbância (UA) em função da concentração, construiu-se a curva, como esquematizada a seguir:

g/l de
açúcares
redutores



e através de regressão linear, obtém-se a curva:

$$g/l = f(UA)$$

c) Determinação de açúcares redutores em uma amostra desconhecida:

Fizeram-se diversas diluições, de tal forma a se obter concentração de açúcares redutores na faixa de 0,1 a 1,0 g/l. Desta amostra convenientemente diluída, tomou-se 1 ml e procedeu-se da mesma forma descrita no item anterior, determinando-se a absorbância e com o auxílio da curva padrão, obtendo-se a concentração de açúcares redutores totais.

Obs: todas as vezes em que se preparou solução de reagente DNS, construiu-se nova curva padrão.

d) Determinação da sacarose

No estudo da cinética de reação, não se determinou o teor de sacarose, partindo-se do valor conhecido na preparação das soluções. Para os experimentos de determinação da difusividade efetiva de massa, a concentração de sacarose foi determinada, invertendo-se a sacarose da solução em solução concentrada de enzima e, posteriormente, determinando-se o teor de açúcares redutores pelo método de DNS.

III.2.2 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA NA FORMA LIVRE

A padronização foi baseada nos dados do fornecedor da enzima, alterada apenas a temperatura de reação de 20 para 30°C, para melhor controle de temperatura.

Preparou-se soluções de enzima em concentração adequada, ou seja, ao redor de 0,02 g/l em tampão citrato 0,05 M pH=4,7. Paralelamente preparou-se solução de sacarose p.a. 64,8 g/l em tampão citrato 0,05 M pH=4,7.

reação enzimática

10 ml de solução de sacarose 64,8 g/l

2 ml de solução de enzima

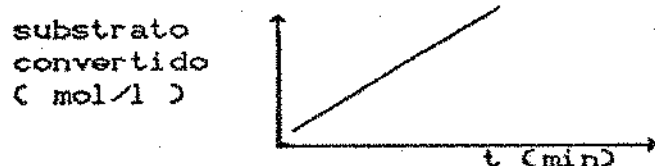
T = 30°C

concentração final de sacarose na mistura = 54 g/l

A reação foi efetuada em um reator de laboratório, munido de agitador magnético e envolto em uma camisa externa com recirculação de água proveniente de um banho termostatizado. Adicionou-se 10 ml de solução de sacarose, e após atingir 30°C, adicionou-se a solução de enzima marcando o tempo inicial de

reação. Amostras de 1 ml da solução de reação foram tomadas nos tempos de 1/2 , 1 , 2 , 3 e 4 minutos e introduzidas em um tubo contendo 1 ml de solução de hidróxido de sódio 1 N, para interromper a reação. As amostras assim coletadas, foram diluídas adequadamente e procedeu-se a análise de açúcares redutores pelo método DNS. Determinada as concentrações de açúcares redutores, pode-se calcular a concentração de substrato convertido em mol/l, dividindo-se a concentração de açúcares redutores em g/l por 360.

A taxa inicial de reação, foi obtida, plotando-se substrato convertido nas ordenadas e tempo nas abcissas, como esquematizado a seguir:



Através da taxa inicial de reação ($-dS/dt$), pode-se determinar a atividade em unidades internacionais. No presente trabalho, utilizou-se desta medida de atividade em termos de U.I. apenas para caracterizar a enzima na forma original desidratada, expressando-a em U.I. por grama de enzima. Para caracterização em termos de temperatura, pH e estabilidade térmica, utilizou-se de taxas iniciais de reação, em mol/l min visto interessar apenas a ordem relativa da mesma.

III.2.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Mediu-se a atividade em termos de taxas iniciais de reação, nas mesmas condições padrão já mencionadas na medida da atividade, variando-se apenas a condição de temperatura.

Mediu-se taxas iniciais de reação ($-dS/dt$) na faixa de temperatura entre 21 a 77,5°C.

Para baixas temperaturas, graficou-se os dados de taxas iniciais de reação na forma de Arrhenius, para obtenção da energia de ativação E_a , na forma:

$$\ln(a) = \ln(a^*) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (80)$$

Para altas temperaturas, não se obteve linearidade entre substrato convertido em função do tempo, neste caso mediu-se a atividade na forma:

$$a = \frac{-\Delta S}{\Delta t} \quad (81)$$

para Δt entre 0 e 4 minutos.

Na modelagem matemática para a atividade em relação à temperatura, determinou-se as energias de ativação E_a para baixas temperaturas e a energia de ativação da reação de degradação térmica E_d foi obtida dos dados de estabilidade térmica e foram usados no desenvolvimento da equação I.12, descrito no ANEXO I. A equação tem a seguinte forma:

$$a = a_0 \cdot \frac{1 - \exp(-k_d \cdot t)}{k_d \cdot t}$$

onde: $a_0 = a^* \cdot \exp(-E_a/RT)$

$k_d = k_{d0} \cdot \exp(-E_d/RT)$

III.2.4. INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Mediu-se taxas iniciais de reação ($-dS/dt$), nas mesmas condições padrão, exceto, o pH que foi alterado na faixa de 3,0 a 6,4. Para a obtenção de pH nesta faixa, preparou-se soluções de sacarose 64,8 g/l em solução de ácido cítrico e outra em solução de citrato de sódio, ambas a 0,05 M. Através de misturas

apropriadas destas soluções e utilizando-se para isto, de um medidor de pH, preparou-se soluções de sacarose na faixa de pH desejado. Para que a solução enzimática não alterasse o pH no ato da mistura, a enzima foi diluída em tampão citrato a pH=4,7 em concentração diluída 0,005 M.

A determinação do pH ótimo de reação, bem como o comportamento da atividade em relação a este, foi obtido através de uma modelagem matemática com considerações teóricas, descritas no ANEXO II e representado pela equação II.9, na forma:

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{K \cdot E_t} + \frac{k_{es}}{K \cdot E_t} \cdot \left[10^{(2pH_m - pH)} + 10^{pH} \right]$$

III.2.5. ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA NA FORMA LIVRE

Preparou-se soluções de enzima ao redor de 0,05 g/l em tampão citrato 0,05 M pH=4,7. Estas soluções foram incubadas a diferentes temperaturas (50 a 63°C). De cada amostra incubada, esperou-se atingir a temperatura referida e tomou-se a primeira amostra considerada como inicial (t=0). Tomou-se em sequência, amostras em espaços de tempo apropriados. Cada amostra coletada era instantaneamente resfriada em gelo fundente, procedendo-se em seguida a determinação de sua atividade remanescente, como descrita no item III.2.2, isto é, nas condições padrão de atividade.

Os dados de atividade em relação ao tempo de incubação para cada temperatura e considerando-se a cinética de desativação como sendo de primeira ordem, procedeu-se à determinação das constantes de desativação k_d , graficando-se $\ln(a/a_0)$ em função

do tempo, na forma da equação 9. Após determinação de k_d e sendo $k_d = f(T)$, determinou-se a energia de ativação da reação de degradação E_d , graficando-se estes dados na forma de Arrhenius.

III.2.6. CINÉTICA DA ENZIMA NA FORMA LIVRE

Preparou-se soluções de enzima 0,02 g/l em tampão citrato 0,05 M a pH=4,7 e soluções de sacarose, no mesmo tampão, com concentrações variando na faixa de 2 a 600 g/l.

Determinou-se taxas iniciais de reação a 40 e 50°C para cada concentração de substrato considerada, misturando-se 10 ml da solução de sacarose com 1 ml da solução de enzima em reator de laboratório, como descrito no item III.3.

Após mistura da solução de sacarose com a solução de enzima, tomou-se amostras a 1/2;1;2;3 e 4 minutos e transferida diretamente em tubos de ensaio contendo 1 ml de reagente DNS, que sendo muito básico, interrompe a reação. Procedeu-se a determinação de açúcares redutores diretamente nestas amostras coletadas, sem diluição. Caso em que a conversão de substrato não tenha se mostrado linear com o tempo, ou caso em que a absorbância tenha excedido o limite de leitura, diluiu-se a enzima à metade, refez-se o teste e posteriormente multiplicou-se a taxa pelo fator 2.

Após coleta de dados de taxas de reação iniciais em função da concentração de substrato, procedeu-se aos métodos usuais de determinação das constantes cinéticas. Inicialmente, considerou-se cinética de inibição por excesso de substrato, plotando-se os dados na forma de Lineweaver-Burk, para baixas e altas concentrações. Para baixas concentrações quando $S \ll K_i$, temos:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (82)$$

e para altas concentrações, quando $S \gg K_m$, temos:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{K_i \cdot V_{\max}} \cdot S \quad (83)$$

onde: v = taxa inicial de reação observada

S = concentração de substrato

K_i = constante de inibição pelo substrato

K_m = constante de Michaelis-Menten

$V_{\max}$ = taxa máxima de reação

Em altas concentrações de substrato, não se observou a linearidade entre $(1/v)$ em função da concentração (S) , como descrita na equação 83. Considerou-se então a cinética como sendo de inibição pelo substrato, porém, com adição de um fator de correção $f(S)$, de forma que a equação tornou-se a seguinte:

$$v = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S + S^2/K_i} \cdot f(S) \quad (84)$$

e na formalização de Lineweaver-Burk, temos:

$$\frac{f(S)}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S}, \text{ para } S \ll K_i \quad (85)$$

$$\frac{f(S)}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{K_i \cdot V_{\max}} \cdot S, \text{ para } S \gg K_m \quad (86)$$

Algumas considerações foram feitas acerca do fator $f(S)$, como consta no ANEXO III. A partir destas considerações, verificou-se qual a mais adequada para satisfazer as equações 85 e 86.

III.2.7. PREPARAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO 3,5%

Preparou-se 500 ml de solução de CaCl_2 0,05 M. Pesou-se 1,75 g de alginato, completando o peso a 40 gramas com água destilada, aquecendo a solução até 80°C para dissolver o alginato. Após a dissolução, resfriou-se a aproximadamente 40°C. Adicionou-se então 10 ml de solução de enzima e acertando-se o peso final a 50 gramas com água destilada, quando necessário, ficando desta forma com concentração de 3,5% em peso de alginato.

Com auxílio de uma bomba peristáltica de laboratório e com mangueira apropriada, bombeou-se a solução de alginato gotejando-a sobre a solução de cloreto de cálcio sob agitação, formando pequenas esferas de alginato com diâmetro médio praticamente uniforme (neste caso $d_p = 0,42$ cm) contendo a enzima oclusa no seu interior. A Figura 8 ilustra o sistema utilizado.

Após terminada esta operação, deixou-se o alginato em geladeira por uma noite. Em seguida, lavou-se as esferas com solução tampão de citrato contendo cloreto de cálcio. Foram estocadas em seguida no mesmo tampão em geladeira.

O diâmetro das esferas foi medido após a completa insolubilização do alginato, que, pelo efeito de sinérese tende a se retrair. outra consequência da sinérese é o aumento da concentração de alginato, superando os 3,5% iniciais.

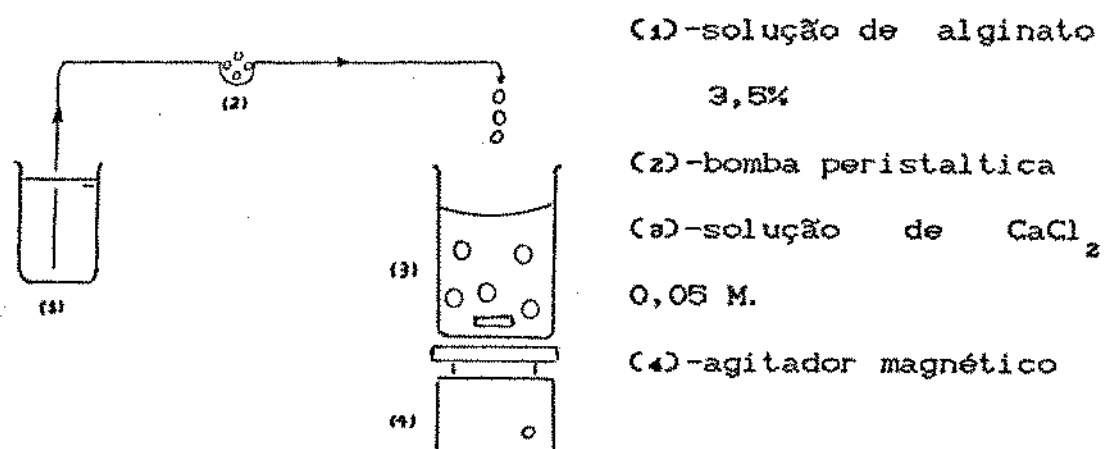


Figura 8: Esquema do processo de imobilização de invertase em alginato de cálcio contendo enzima oclusa no seu interior.

III.2.8. MEDIDA DA ATIVIDADE PARA ENZIMA IMOBILIZADA

Foi feito um estudo preliminar, com o intuito de melhor padronizar uma condição para medida da atividade. Inicialmente foi verificado o efeito do tampão citrato concomitante com a concentração de cloreto de cálcio. Esferas de alginato de cálcio foram agitadas por uma noite a 30°C em solução tampão citrato 0,05 M contendo diferentes concentrações de CaCl_2 (0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 e 0,05 M). Analisou-se qualitativamente as amostras, verificando a formação visível de precipitado de citrato de cálcio para as concentrações acima de 0,03 M, e ao mesmo tempo perda da textura das esferas. Para concentrações de 0,02 e 0,03 M não houve presença de precipitado, entretanto observou-se ainda uma mudança da textura. Apenas para a concentração de 0,01 M de CaCl_2 não houve na prática alteração de textura. Por precaução, padronizou-se a concentração de CaCl_2

em 0,01 M e reduziu-se a concentração do tampão citrato a 0,005M.

A medida da atividade foi feita em reator em batelada sob agitação. Padronizou-se uma alta razão entre o volume de solução de sacarose e o volume de alginato utilizado (60 ml de solução para aproximadamente 1 ml de esferas de alginato de cálcio), com o objetivo de se obter um estado "pseudo" estacionário, já que haverá pequena alteração da concentração de açúcar invertido no tempo, mesmo que a taxa de reação dentro do gel seja alta.

O tempo de tomada de amostras do meio em reação, teve um comportamento não linear nos cinco primeiros minutos de reação. Entretanto, entre 5 e 30 minutos, mostrou-se linear, podendo-se supor, nesta faixa de tempo, um "pseudo" estado estacionário.

Testou-se ainda o efeito do volume das esferas de alginato na taxa de reação medida entre 5 e 20 minutos, manteve-se constante o volume de solução de sacarose a 60 ml e variou-se o volume do gel de aproximadamente 1,2ml (30 esferas) a 3,6ml (90 esferas), observando-se uma proporcionalidade da taxa de reação com o volume das esferas de alginato de cálcio. A partir de medidas destes testes preliminares, padronizou-se o tempo da atividade da enzima imobilizada entre 5 e 20 minutos, nas seguintes condições:

- 60 ml de solução de sacarose 64,8 g/l em tampão citrato contendo 0,01 M de CaCl_2 e pH=4,7.
- 1 ml de esferas de alginato de cálcio contendo enzima imobilizada nas mesmas condições do tampão da sacarose.

- $T = 30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 4,7$

- Tomada de amostras em 5 ; 10 ; 15 e 20 minutos

III.2.9. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA

Mediu-se a atividade nas condições descritas no item anterior, exceto, para a temperatura que foi alterada propositadamente de $30,5$ a 67°C em um lote de enzima imobilizada.

Para baixas temperaturas (menores que a temperatura de máxima atividade), graficou-se os dados de taxas de reação iniciais observadas em função da temperatura absoluta na forma de Arrhenius, com intuito de se obter a energia de ativação E_a , os dados foram normalizados na forma da (Eq. 80).

Para altas temperaturas, isto é, acima da temperatura ótima de atividade, a medida relativa como feita para a enzima na forma livre, também não era adequada, já que nos primeiros cinco minutos de reação, o comportamento da inversão é bastante complexo. Neste caso, mediu-se da mesma forma que a feita para a enzima livre, entretanto estes dados são considerados com certas restrições de precisão.

A modelagem matemática da atividade em relação à temperatura, foi feita de forma idêntica à modelagem para a enzima na forma livre, ou seja, através das energias de ativação obtidas a baixas e altas temperaturas e com a constante k_d , como consta no ANEXO I (equação I.12).

III.2.10. INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DA ENZIMA IMOBILIZADA

Mediu-se a atividade em termos de taxas iniciais de reação

e nas condições padrão, exceto para o pH, que foi alterado propositadamente. Para a variação do pH, preparou-se duas soluções de sacarose a 64,8 g/l contendo 0,01 M de CaCl_2 , sendo que uma delas foi preparada em 0,005 M de ácido cítrico e a outra em 0,005 M de citrato de sódio, através de misturas apropriadas de ambas, e utilizando-se de um medidor de pH, preparou-se soluções de sacarose 64,8 g/l com pH entre 3,0 e 6,0, fixando-se desta forma a concentração de íons citrato em 0,005 M.

O suporte de alginato de cálcio contendo a enzima, foi inicialmente preparado a pH=4,7. Durante as medidas da atividade enzimática, as esferas foram imersas em grande volume de soluções de citrato de sódio/ácido cítrico contendo CaCl_2 a concentração 0,01 M, no pH desejado, por aproximadamente 1 hora antes da medida ser efetuada, com intuito de ser estabelecido um equilíbrio com o novo pH.

A determinação do pH ótimo, foi obtida pela observação dos pontos experimentais, e neste caso, não se utilizou da modelagem matemática, como feita para a enzima na forma livre.

III.2.11. ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

Incubou-se esferas de alginato de cálcio com invertase oclusa no seu interior a diferentes temperaturas (50 a 59,5°C), em soluções tampão citrato 0,005 M contendo CaCl_2 a concentração 0,01 M, pH=4,0 e sem sacarose. Em seguida, retirou-se amostras em intervalos de tempo apropriados, e transferidas para tubos de ensaio contendo solução tampão nas mesmas condições, previamente resfriadas abaixo de 10°C, e imersas em banho de gelo fundente. Com as amostras assim coletadas, procedeu-se a determinação da

atividade enzimática como descrita no item III.2.2, exceto para o pH, aqui igual a 4,0.

Determinada as taxas iniciais de reação para cada tempo de amostragem e na referida temperatura, colocaram-se as mesmas em termos relativos à atividade inicial (a/a_0). Fazendo-se uso da equação 9, determinou-se as constantes de desativação k_d . Utilizando-se da equação 20, determinou-se a energia de ativação para a degradação térmica E_d .

III.2.12. OBTENÇÃO DE DADOS DO REATOR DE MISTURA

Fixada uma condição no reator, e esperado o tempo de entrada em regime, procedeu-se a tomada de 1 ml de amostra da alimentação e do meio do reator, determinando-se em seguida o teor de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A concentração de substrato no reator (S_b) foi determinada através da concentração de entrada (S_0) conhecida, subtraída do correspondente valor do açúcar invertido no reator.

Os cálculos efetuados, foram feitos na seguinte sequência:

- (a) cálculo de $\epsilon = P/W$ pela equação 61
- (b) cálculo do coeficiente de transferência de massa na camada limite (K_L) pela equação 57.
- (c) cálculo da taxa de reação (v), na forma:

$$v = (S_0 - S_b) \cdot F_0 / V_p \quad (87)$$

$$\text{onde: } (S_0 - S_b) = (P_b - P_0) / 360 \quad (88)$$

F_0 = vazão volumétrica de alimentação

V_p = volume de esferas de alginato de cálcio
(≈ 6 ml)

S_0 , S_b , P_0 e P_b = concentração de substrato em mol/l
e de produto em g/l, respectivamente

(d) Fluxo de massa de sacarose para o interior da esfera (j)

$$j = v \cdot V_p / A_s \quad \text{ou} \quad j = v \cdot R/3 \quad (89)$$

onde: V_p , A_s e R são o volume, a área superficial e o raio da esfera de alginato de cálcio, respectivamente.

(e) concentração superficial (S_e) pela equação 50

$$j = K_L \cdot (S_b - S_e)$$

Obs: todos os dados foram obtidos em unidades CGS, com: $V_p = 5,9 \text{ cm}^3$, $d_p = 0,42 \text{ cm}$ e $D(S) = 0,75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ a 40°C para soluções a infinita diluição. Para altas concentrações de substrato, a difusividade $D(S)$ foi corrigida, baseando-se nos trabalhos de ENGLISH e DOLE (22), e outras propriedades físicas pela referência (56).

III.2.13. Determinação dos parâmetros intrínsecos da invertase imobilizada.

Graficou-se os dados de taxas de reação (v) em função da concentração de substrato na superfície do gel (S_e), na forma de Lineweaver-Burk, na faixa de concentração em que obedece a cinética de Michaelis-Menten. Obtém-se assim, taxas de reação a partir da concentração superficial por interpolação aos dados experimentais na forma:

$$1/v = 1/V_{\max}^{\text{ap}} + [K_m/V_{\max}]^{\text{ap}} \cdot (1/S_e) \quad (90)$$

Para facilitar os cálculos na integração numérica, considerou-se a concentração adimensional como sendo $C = S/S_e$, já que podemos calcular a concentração superficial, desta forma $\alpha_p = \infty$.

Na integração numérica da (Eq. 38):

$$\frac{d^2 C^*}{dX^2} + \frac{2}{X} \cdot \frac{dC^*}{dX} = \frac{\beta \cdot K_1 \cdot C^*}{K_1^* + C^* + K_2^* \cdot C^{*2}}$$

obtem-se o gradiente de concentração na superfície (dC/dX) para $X=1$, quando se estima os parâmetros β , K_1^* e K_2^* . O ajuste dos parâmetros é feito quando se compara o gradiente na superfície obtido pela integração numérica com o obtido experimentalmente.

Os dados experimentais, podem ser calculados a partir da expressão:

$$\left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=1} = \frac{v \cdot R^2}{3 \cdot D_e \cdot S_b} \quad \text{com } S_b = S_0 \quad \text{e} \quad C|_{X=1} = 1 \quad (91)$$

onde se conhece, para cada S_0 , a correspondente taxa de reação (v) observada.

O procedimento de ajuste, foi o de variar as estimativas dos parâmetros na equação geral, integrando numericamente pelo método das Diferenças finitas (11), (anexo IV), obtendo-se o gradiente de concentração na superfície (dC/dX) $|_{X=1}$. O ajuste foi obtido quando o resultado numérico coincidiu com os valores experimentais, ou seja,

$$\left[\left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=1} \right]_{\text{numérico}} = \left[\left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=1} \right]_{\text{experimental}} \quad (92)$$

Entretanto, a equação geral possui três parâmetros desconhecidos, ficando praticamente impossível a estimativa concomitante destes. Para contornar o problema, determinou-se parâmetros em faixas de concentrações em que certas considerações podem ser feitas:

1º passo Pela extrapolação de dados para faixas de concentrações muito baixas ($S \ll K_m$), a cinética da enzima imobilizada pode ser representada por uma cinética de primeira ordem. A equação geral com apenas um parâmetro (β) desconhecido, pode ser facilmente resolvido, inclusive, analiticamente.

O procedimento para determinação de β , encontra-se no ANEXO V, utilizando-se da seguinte expressão analítica:

$$\frac{\phi}{\tanh\phi} = 1 + \frac{1}{3} \cdot \frac{V_{\max}^{ap}}{K_m^{ap}} \cdot \frac{R^2}{D_e} \quad \text{onde } \beta = \phi^2$$

2º passo: Fazendo-se $K_2^* = 0$, a equação geral, recai na cinética de Michaelis-Menten. utilizando-se do método das diferenças finitas (ANEXO IV), varia-se o parâmetro K_1^* até que resulte em gradiente de concentração superficial numérico igual ao experimental, usando o valor de β determinado no primeiro passo.

3º passo: Trabalhando-se em faixas de concentração em que se verifica o efeito de inibição pelo substrato, integra-se a equação geral, onde se conhece a princípio β e K_m , estima-se K_1^* e K_2^* até que o gradiente de concentração superficial numérico seja coincidente com o experimental, e que também resulte em k_m igual ao previamente determinado no 2º passo.

III.2.14. DETERMINAÇÃO DA DIFUSIVIDADE EFETIVA DA SACAROSE EM SOLUÇÕES DILUIDAS.

Dois métodos de determinação foram utilizados: método de placas semi-infinitas em estado não estacionário, imersas em fase líquida de concentração constante e o método de esferas imersas em uma fase líquida finita em estado não estacionário.

1º método: O maior problema na metodologia, foi a preparação de um tubo de alginato de cálcio apropriado. Inicialmente, introduziu-se um tubo de vidro contendo solução de alginato 3,5%, sem enzima, em solução de cloreto de cálcio 0,05 M e deixado em repouso até a formação do gel. Porém, a medida que se formava o alginato de cálcio, este não se mantinha no formato do tubo, desprendendo-se para a solução em forma espiralada. Como

segunda tentativa, utilizou-se do mesmo tubo, conectando-o em uma de suas extremidades, um pequeno pedaço de mangueira flexível, de diâmetro um pouco menor que o tubo, com intuito de reter o alginato de cálcio e obter um gel uniforme. Neste caso, conseguiu-se o desejado, quando se vedou a extremidade da mangueira com algodão. No entanto, devido as barreiras de difusão dos íons cálcio para o interior do gel, ficou prejudicada a insolubilização. Mesmo após 10 dias, apenas metade do tubo apresentava-se sólido. Como terceira tentativa, foi utilizado sacos de diálise, permeáveis aos íons cálcio, mas não ao alginato. Neste caso, introduziu-se a solução de alginato 3,5% no interior deste saco de diálise, amarrando as bordas, ficando com o formato de um cilindro. Introduziu-se este em solução de cloreto de cálcio 0,05 M para insolubilização pelo período de dois dias. Em seguida, retirou-se do invólucro de diálise, imergindo-o em solução tampão para padronização das condições. Selecionou-se um tubo de vidro de mesmo diâmetro, com as duas extremidades abertas, e o alginato foi introduzido no seu interior, aparando-se as extremidades, ficando, desta forma, o gel internamente contido dentro do tubo nas condições geométricas desejáveis ao experimento.

O procedimento para determinação da difusividade efetiva, foi introduzir este tubo contendo o alginato, em solução de sacarose 30 g/l nas mesmas condições tampão e sob intensa agitação a 40°C por 48 horas. Após este tempo, retirou-se o tubo e determinou-se concentração média de sacarose no gel. A difusividade efetiva foi determinada através das equações 73 e 74.

2º método: Prepararam-se esferas de alginato de cálcio, a partir de solução de alginato a 3,5%, sem enzima, obtendo-se no final da insolubilização e estabilização no tampão, um diâmetro de 0,446 cm.

Na determinação da difusividade efetiva, utilizou-se um reator de laboratório, munido de camisa externa com recirculação de água proveniente de um banho termostaticado a 40°C, onde se introduziu 35,0 ml de solução de sacarose a 20 g/l nas mesmas condições de concentração do tampão e pH, contendo 0,01 M de CaCl_2 . Após estabilizada a temperatura, introduziu-se 16,24 ml (350 unidades) de esferas de alginato de cálcio, previamente aquecidas a 40°C. O contato foi efetuado sob intensa agitação, e amostras de 0,1 ml em intervalos de tempo apropriados, foram coletadas e introduzidas em tubos contendo 1,9 ml de solução de invertase 0,05 g/l, para completa inversão da sacarose (10 minutos no mínimo). Procedeu-se a amostragem, até que se observou a não variação da concentração no tempo, ou seja, até atingir o equilíbrio entre a fase sólida e líquida. Determinou-se o teor de açúcares redutores nas amostras pelo método DNS, calculando em consequência a correspondente concentração de sacarose na fase líquida. A determinação do teor médio de sacarose no interior do gel, foi obtido através do decréscimo de concentração na fase líquida e pela razão dos volumes conhecidos das duas fases.

No experimento, foi determinado o coeficiente de partição k_p , pelos dados de concentração nas duas fases, quando atingido o equilíbrio. Para confirmar a concentração final na fase sólida, determinou-se a concentração da sacarose diretamente,

tomando-se as esferas do experimento e introduzindo-as em um balão volumétrico de 500 ml, completando o volume com solução de invertase 0,05 g/l em tampão citrato sem cloreto de cálcio, agitando-as nesta solução por aproximadamente três horas. A concentração resultante no balão foi analisada, e o teor de açúcar presente inicialmente nas esferas de alginato de cálcio determinada. A adição de solução de enzima isenta de íons cálcio, foi feita com o intuito de sequestrar estes íons do interior do gel, desestruturando-o, e provavelmente solubilizando-o. No presente caso, não ocorreu a solubilização, entretanto, o gel perdeu sua estrutura original, verificado pela perda de consistência e aumento (crescimento) ao triplo aproximadamente do seu volume original.

Um segundo experimento foi efetuado, da mesma forma, utilizando-se de 39,1 ml de solução de sacarose a 20 g/l e volume de esferas de alginato de cálcio de 16,3 ml (350 unidades).

Os dados de concentração de sacarose na fase líquida (C_L) em função do tempo, foram normalizados na forma relativa à concentração inicial (C_L/C_L^0), com o propósito de escreve-la na forma da equação 76.

Através da determinação do coeficiente de partição k_p e dos dados de volumes das duas fases (V_L e V_{gel}) conhecidos, determinou-se o parâmetro α , pela equação 77. Conhecido α , calculou-se as raízes q_n , descritas na equação 78, utilizando-se de um programa computacional, obtendo 150 valores de q_n positivos e não nulos pelo método iterativo de Newton.

A equação 76, foi resolvida por intermédio de um programa computacional, dando-se estimativas da difusividade efetiva D_e e utilizando-se dos valores de α e $q_n(s)$ pré determinados. Para cada valor de D_e estimado, obteve-se curvas do tipo (C_L/C_{Lo}) em função do tempo. A determinação de D_e , foi obtida quando a estimativa deste, se aproximou melhor aos dados experimentais, ou seja, resultando em menor desvio médio quadrático entre os dados experimentais e dados previstos pela equação 76.

III.3. EQUIPAMENTOS

III.3.1. GEOMETRIA E DIMENSÃO DO REATOR DE MISTURA UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos intrínsecos (reais) da enzima imobilizada, utilizou-se de um reator de mistura em estado estacionário, como esquematizado na Figura 9. geometricamente similar ao utilizado por FURUSAWA e SMITH(26), com número de potência conhecido ($N_p = 9,5$). O reator consta de um becker de 1 litro, no qual foi introduzido um sistema de 8 defletores inclinados à 45° . A agitação foi feita por um agitador contendo 8 pás planas igualmente espaçadas e introduzidas no centro da solução. A alimentação do substrato foi feita por intermédio de uma bomba peristáltica de vazão regulável.

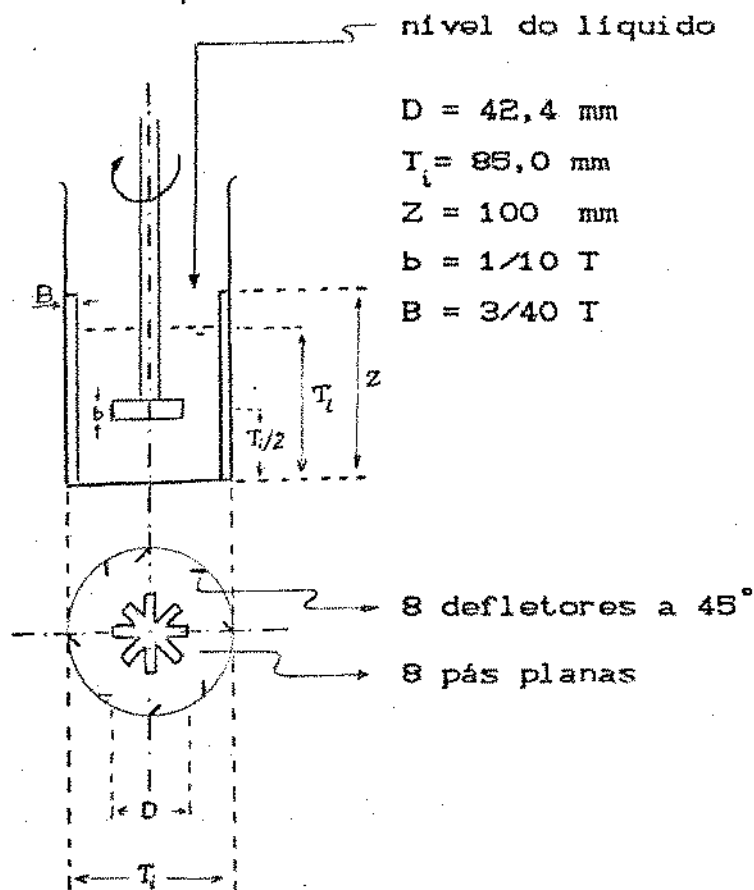


Figura 9: Reator utilizado nos experimentos

III.3.2. SISTEMA DE OPERAÇÃO DO REATOR DE MISTURA

Para a determinação das constantes cinéticas intrínsecas da enzima imobilizada, é necessário o conhecimento da taxa de reação inicial e a respectiva concentração de substrato na superfície do gel, cujas dimensões são conhecidas.

Prepararam-se esferas de alginato de cálcio, como descritas o item III.2.7., partindo-se de uma solução de alginato (3,5% w/w) contendo $4 \cdot 10^{-6} \text{ g}$ de composto enzimático por cm^3 de solução, obtendo-se no final da insolubilização um diâmetro médio do gel $d_p = 0,42 \text{ cm}$.

O reator foi operado a 40°C , com alimentação contínua de soluções de diferentes concentrações de sacarose em tampão citrato $0,005\text{ M}$ em $\text{pH}=4,0$, contendo CaCl_2 a concentração $0,01\text{ M}$, e com volume aproximado de 6 ml de esferas de alginato de cálcio, como esquematizado na Figura 10. A vazão de alimentação foi controlada de tal forma a se obter baixa concentração de produtos de reação (glicose/frutose), com intuito de eliminar o efeito de inibição pelo produto. A agitação foi controlada para obter número de Reynolds de agitação turbulento, podendo ser utilizado desta forma o número de potência N_p constante e de valor $9,5$.

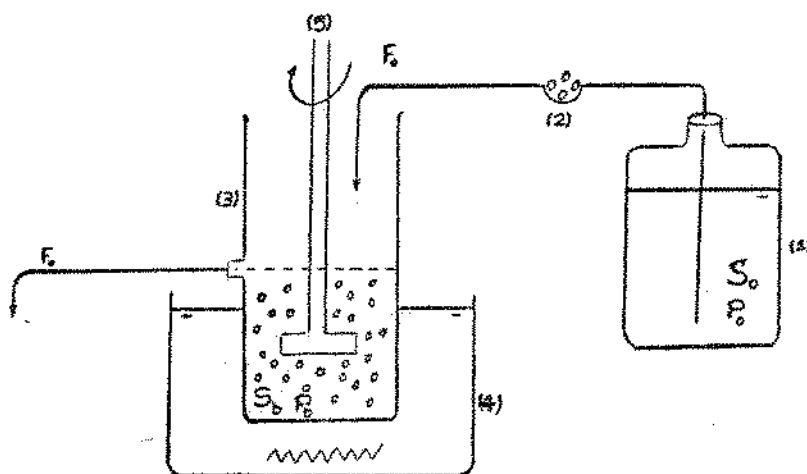


Figura 10: Esquema do processo de reação utilizando-se do reator de mistura em estado estacionário. (1) frasco contendo solução de sacarose com concentração conhecida. (2) bomba peristáltica. (3) sistema reator-agitador. (4) banho termostatizado para controle de temperatura. (5) agitador com controle de agitação. (F_0) = vazão de alimentação. $(S$ e $P)$ = concentrações de substrato e produtos de reação.

No experimento, dentro das vazões utilizadas, o regime foi atingido ao redor de 7 horas de operação. Tomou-se amostras após 20 horas, por garantia.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 - CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

Obteve-se taxas iniciais de reação de 0,324 g/l de sacarose invertida por minuto a 30°C nas condições padrão, utilizando 2 ml de solução enzimática contendo $2 \cdot 10^{-5}$ g de composto enzimático/ml sobre 10 ml de solução de sacarose, correspondendo a 284200 U.I./g de composto.

IV.2 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As Tabelas 3 e 4, mostram dados obtidos experimentalmente de atividade enzimática relativa em função da temperatura para a enzima na forma livre e na forma imobilizada, nas condições padrão.

Tabela 3 : Atividade enzimática relativa, em função da temperatura, para a enzima na forma livre nas condições padrão, (pH=4,7 em tampão citrato 0,05 M).

T (°C)	a	T (°C)	a
21	0,261	50	0,860
22	0,258	55	0,974
25	0,304	57	1,000
26	0,356	60	0,962
31	0,467	65	0,806
34,5	0,452	65,5	0,515
35	0,524	67	0,294
39	0,579	70	0,196
44	0,718	72	0,050
44	0,698	76	0,022
45	0,773	77,5	0,018

Tabela 4 : Atividade enzimática relativa em função da temperatura, para enzima imobilizada em alginato de cálcio 3,5%. (pH=4,7 em tampão citrato 0,05 M contendo CaCl_2 0,01 M).

T°C	a	T°C	a
30,5	0,283	53	0,911
35	0,385	56	0,967
40	0,494	60	1,000
42	0,554	62	0,832
45	0,613	67	0,291
49,5	0,803		

Pelas tabelas 3 e 4, verifica-se que a temperatura ótima é de 57°C para a enzima livre e 60°C para a enzima imobilizada, concordando com dados apresentados na literatura, que se situam ao redor de 50 a 60°C (20).

Para baixas temperaturas, os dados foram normalizados na forma de Arrhenius, obtendo-se linearidade na forma:

-Para a enzima livre:

$$\ln(a) = 12,1206 - 3952 \cdot 1/T \quad r = -0,992$$

$$\text{Energia de ativação } E_a = 7853 \text{ cal/gmol}$$

-Para a enzima imobilizada:

$$\ln(a) = 15,769 - 5162 \cdot 1/T \quad r = -0,993$$

$$\text{Energia de ativação } E_a = 10258 \text{ cal/gmol}$$

A energia de ativação obtida para a enzima na forma livre (7825 cal/gmol), está de acordo com valores obtidos por outros pesquisadores, tais como: 7322 cal/gmol (19) e 7693 cal/gmol (42).

Quanto à energia de ativação da enzima imobilizada, era de

se esperar um decréscimo quando comparada à enzima livre, onde seria neste caso, igual no máximo a média aritmética entre as energias de ativação da reação química e a energia de ativação da difusão molecular, como relata Wheeler , citado por Messing (49), e no mínimo igual a energia de ativação para difusividade molecular, quando esta controlar o processo. Para soluções diluídas de sacarose, pode-se determinar através de dados de difusão obtidos da literatura, uma energia de ativação ao redor de 4400 cal/gmol, desta forma, a energia máxima previsível para a invertase neste caso, seria de 6112 cal/gmol, contra 10221 cal/gmol obtida, havendo uma diferença de 4100 cal/gmol. Dickensheets et al. (19), obtiveram 4052 cal/gmol para invertase imobilizada, estando ao redor da energia de ativação da difusividade da sacarose, Mansfeld e Schellenberger (42), encontraram valor idêntico à enzima na forma livre, ou seja 7788 cal/gmol, porém, utilizaram concentração de sacarose altas, e neste caso, como relata English e Dole (22), a energia de ativação para a difusividade de massa se situa ao redor de 7500 cal/gmol, ou seja ao redor da energia de ativação da reação química.

A previsão da atividade em função da temperatura, através de um modelo matemático descrito no ANEXO I. equação I.12, é comparada com os resultados experimentais nas Figuras 11 e 12. A equação é a seguinte:

$$a = a_0 \cdot \left[\frac{1 - \exp(-k_d \cdot t)}{k_d \cdot t} \right]$$

onde: $a_0 = a^* \cdot \exp(-E_a/RT)$ e $k_d = k_{do} \cdot \exp(-E_d/RT)$
sendo para enzima livre,

$$t = 4 \text{ min} , a^* = 1,836 \cdot 10^5 , E_a = 7853 \text{ cal/gmol}$$

$$k_{do} = 1,0251 \cdot 10^{91} \text{ min}^{-1} , E_d = 141171 \text{ cal/gmol}$$

e para enzima imobilizada:

$$t = 20 \text{ min} , a^* = 7,053 \cdot 10^6 , E_a = 10258 \text{ cal/gmol}$$

$$k_{do} = 4,0395 \cdot 10^{75} \text{ min}^{-1} , E_d = 116883 \text{ cal/gmol}$$

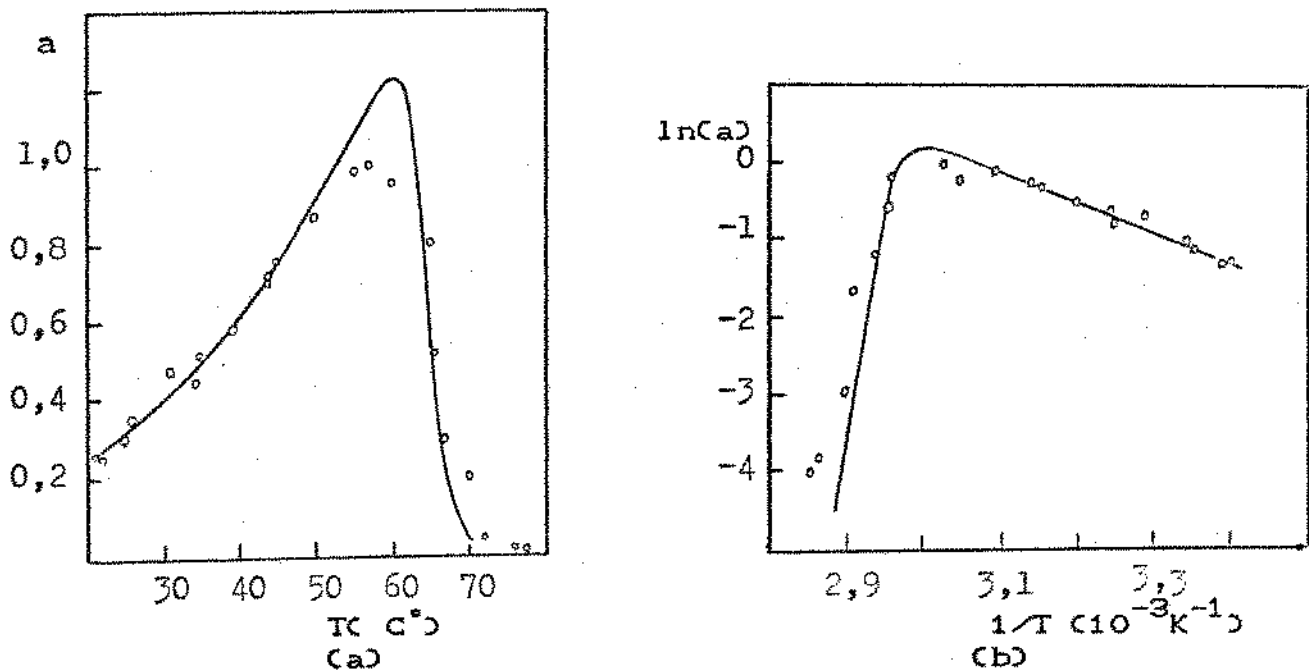


Figura 11 : Comparação entre os resultados práticos obtidos (pontos) e o modelo matemático (linha contínua) representado pela (Eq. I.12), para valores de atividade da enzima livre em função da temperatura.

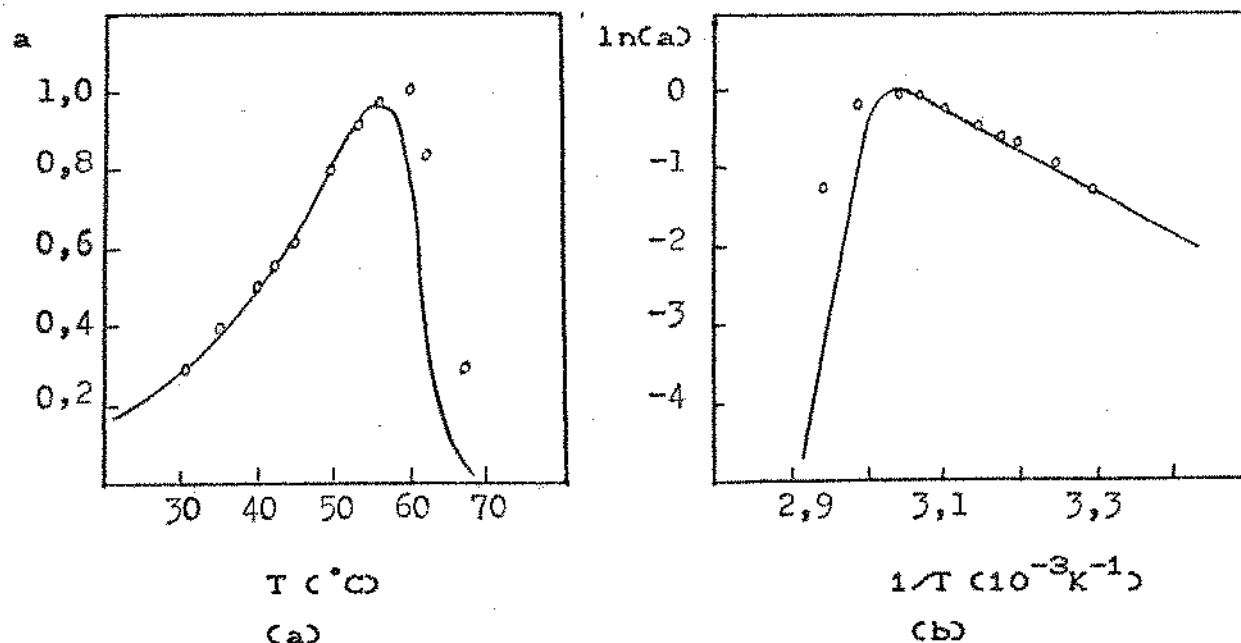


Figura 12 : Comparação entre os resultados práticos obtidos (pontos) e o modelo matemático (linha contínua) representado pela (Eq. I.12), para valores de atividade da enzima imobilizada em função da temperatura.

Pela análise das Figuras 11 e 12, tanto os resultados práticos como os previstos pelo modelo matemático, mostram que a temperatura de máxima atividade situa-se entre 55°C e 60°C para a invertase livre e imobilizada.

De uma forma geral, o modelo proposto descreve aceitavelmente o comportamento da atividade em função da temperatura, e é importante no caso em que se deseja estimar a atividade a altas temperaturas, onde a determinação experimental é praticamente impossível.

IV.3 - INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As Tabelas 5 e 6, mostram dados de atividade observadas em função do pH, para a enzima na forma livre e na forma imobilizada.

Tabela 5 : Atividade enzimática em função do pH, obtidas experimentalmente para enzima livre.

pH	a (%)	pH	a (%)
3,0	85,4	4,7	99,7
3,5	93,8	4,8	98,5
3,75	97,9	5,5	94,6
4,2	99,4	5,75	91,7
4,3	99,7	6,0	84,2
4,5	99,4	6,25	78,0
4,6	100,0	6,4	66,1

Tabela 6 : Atividade enzimática relativa em função do pH, para enzima imobilizada.

pH	a (%)	pH	a (%)
3,0	81,5	5,0	92,1
3,5	94,9	5,5	86,0
4,0	100,0	6,0	56,7
4,5	97,2		

A modelagem matemática, como consta no ANEXO II, foi aplicada para descrever o comportamento da influência do pH na atividade enzimática da forma livre, bem como, para ajuste do melhor pH de máxima atividade pH_m .

Pela estimativa do pH_m , e colocando-se os dados experimentais na forma $(1/a)$ em função de $(10^{2pH_m - pH} + 10^{pH})$, obtém-se os resultados, como apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 : Coeficientes de correlação (r) obtidos, quando se estimou o pH_m sobre a equação II.9 ajustada aos dados experimentais.

estimativa de pH_m	coeficiente linear	coeficiente angular	coeficiente de correlação (r)
3,0	$10,2130 \cdot 10^{-3}$	$1,7566 \cdot 10^{-9}$	0,9375
3,5	10,3676 "	1,7599 "	0,9385
4,0	10,1754 "	1,7916 "	0,9476
4,3	10,0671 "	1,8770 "	0,9724
4,4	9,9916 "	1,9185 "	0,9851
4,5	9,8979 "	1,9316 "	0,9915
4,6	9,8304 "	1,8237 "	0,9682
4,7	9,9019 "	1,4595 "	0,8782

Pelos resultados da Tabela 7, o modelo se ajustou melhor, quando foi estimado o valor de 4,5 para o pH_m , com um coeficiente de correlação 0,9915. Verifica-se também que o ajuste é bastante sensível, já que pequena variação na estimativa, varia-se consideravelmente o coeficiente de correlação, como pode ser visto com $r=0,9851$ para $\text{pH}_m=4,4$ e $r=0,9682$ para $\text{pH}_m=4,6$.

Desta maneira, a equação geral que descreve o comportamento da atividade com o pH, pode ser escrita na forma:

$$a = \left[9,8979 \cdot 10^{-3} + 1,9316 \cdot 10^{-9} \cdot (10^{9-\text{pH}} + 10^{\text{pH}}) \right]^{-1}$$

O gráfico da Figura 13, representa, o comportamento da atividade em relação ao pH, considerando os dados experimentais com os dados preditos pelo modelo.

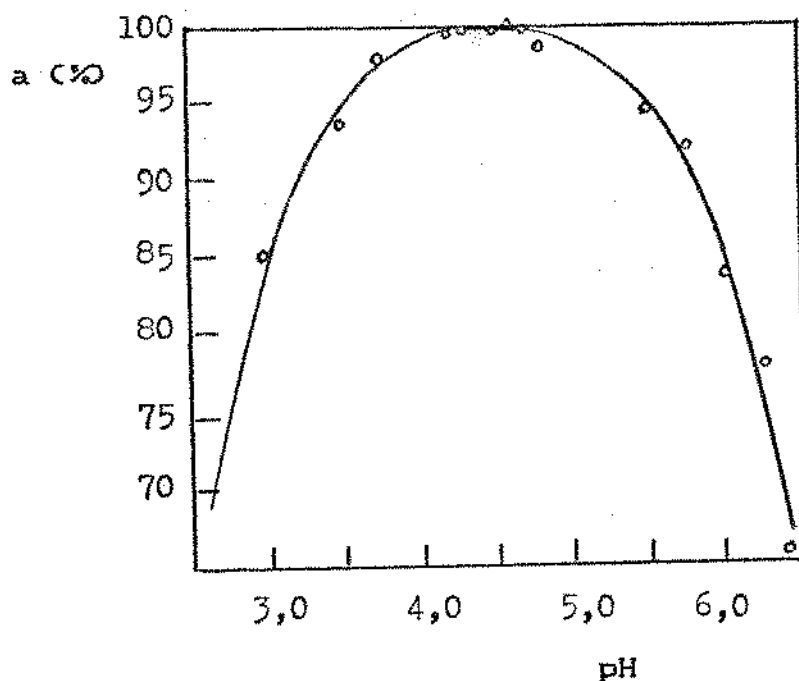


Figura 13 : Resultados práticos obtidos (pontos) e preditos pelo modelo (linha contínua) de atividade enzimática em função do pH para a enzima na forma livre.

Através da equação ajustada, pode se determinar as constantes de equilíbrio k_{e1} e k_{e2} da reação descrita no ANEXO II, bem como a atividade total que seria observada, se toda a enzima estivesse na forma ativa. Os valores obtidos neste caso são: $k_{e1} = 1,9516 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$, $k_{e2} = 1,9516 \cdot 10^2 \text{ l/mol}$ e atividade total = 101,0%. O modelo prevê para o pH ótimo obtido de valor $\text{pH}_m = 4,5$, atividade relativa de 99,8%, evidenciando que mesmo para pH de máxima atividade, uma pequena quantidade de enzima, (neste caso 1,2% se encontra na forma inativa).

Os resultados observados da atividade em relação ao pH, estão de acordo com resultados apresentados na literatura, ou seja, de que o pH de ótima atividade se situa ao redor de 4,5. Verifica-se também pela Figura 13, a existência de uma larga faixa de alta atividade, entre pH 3,5 e pH 5,5.

O efeito do pH na atividade enzimática para a enzima imobilizada, é mostrado na Figura 14. Não foi utilizada aqui a modelagem matemática para ajuste aos dados experimentais, visto a cinética neste caso ser mais complexa e ainda pelo fato das determinações experimentais estarem bastante sujeitas a erros.

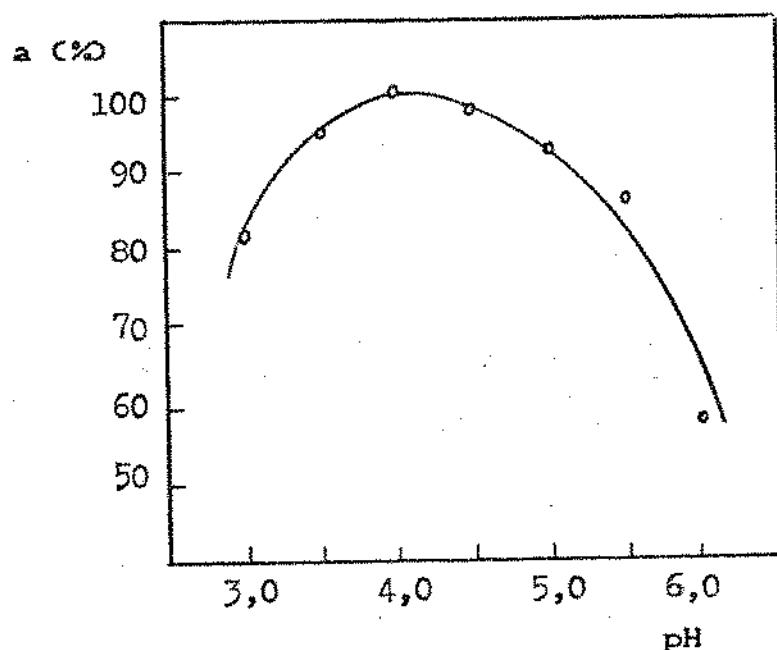


Figura 14 : Atividades enzimáticas relativas, observadas em função do pH para enzima imobilizada.

Pela análise da Figura 14, observa-se um decréscimo do pH ótimo da enzima imobilizada, comparada à enzima na forma livre. O pH_m de 4,0 obtido é aparente, já que este é o pH da solução e não o do interior do gel. Admitindo o efeito de partição de prótons (20), é previsível que no interior do gel, o pH seja de 4,5 e mantenha equilíbrio com pH de 4,0 na solução externa.

IV.4 - ESTABILIDADE TÉRMICA

As Tabelas 8 e 9, mostram o decaimento com o tempo, da atividade enzimática a diferentes temperaturas de incubação.

Tabela 8 : Atividades enzimáticas relativas observadas em função do tempo de incubação, para a enzima livre, à diferentes temperaturas.

T (°C)	t min	a/a ₀ -	T (°C)	t min	a/a ₀ -	T (°C)	t horas	a/a ₀ -
63,0	0	1,00	58,0	0	1,000	54,0	0	1,000
	1	0,89		10	0,969		1	0,962
	2	0,79		30	0,811		2	0,996
	3	0,59		50	0,682		3	0,930
	4	0,52		60	0,691		4	0,991
	5	0,42		70	0,601		5	0,853
	6	0,38		80	0,670		21	0,666
	8	0,26		90	0,582		22	0,662
	9	0,21		100	0,547		23	0,679
60,5	0	1,0	56,0	0	1,000	50	0	1,000
	10	0,73		60	0,919		4,8	0,967
	20	0,594		90	0,833		24,0	0,973
	30	0,532		120	0,796		51,1	0,862
	40	0,381		150	0,783		72,0	0,905
	50	0,302		180	0,729		76,8	0,824
	60	0,284		210	0,724		144,0	0,751
	70	0,221		240	0,638		216,0	0,649
	80	0,195		270	0,670		240,0	0,589
58,5	0	1,00	360	0,511				
	10	0,860						
	20	0,673						
	35	0,663						
	50	0,515						
	65	0,444						
	80	0,420						

Tabela 9 : atividades enzimáticas relativas observadas em função do tempo de incubação, para enzima imobilizada, à diferentes temperaturas.

T (°C)	t min	a/a ₀ -	T (°C)	t horas	a/a ₀ -	T (°C)	t horas	a/a ₀ -
59,5	0	1,000	54,5	0	1,000	52,5	0	1,000
	5	0,758		1	0,854		2	0,803
	10	0,577		2	0,681		4,5	0,661
	15	0,385		3	0,462		20,0	0,282
	20	0,309		4	0,434		21,5	0,274
	25	0,236		5	0,328		23,0	0,212
							25,5	0,163
57,0	0	1,000	50,0	0	1,000			
	10	1,087		24	0,535			
	20	0,869		48	0,320			
	30	0,800		72,5	0,181			
	40	0,739		100	0,184			
	50	0,555		120	0,157			
	60	0,474		148	0,131			
	70	0,347						
	80	0,304						

Considerando cinética de primeira ordem para a inativação térmica, os dados obtidos experimentalmente, mostrados nas Tabelas 8 e 9, foram normalizados na forma da equação 9, ou seja $\ln(a/a_0) = k_d \cdot t$. Obteve-se assim as constantes de desativação k_d pelos coeficientes angulares das retas, como mostrados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 : Valores obtidos das constantes de desativação k_d em relação à temperatura, para a enzima na forma livre.

$T(^{\circ}C)$	$k_d(\text{min}^{-1})$	r
50	$3,469.10^{-4}$	-0,986
54	$3,337.10^{-4}$	-0,986
56	$1,711.10^{-3}$	-0,970
58	$7,948.10^{-3}$	-0,995
58,5	$1,134.10^{-2}$	-0,990
60,5	$2,030.10^{-2}$	-0,993
63	0,1749	-0,997

Tabela 11 : Valores obtidos das constantes de desativação k_d em relação à temperatura para a enzima na forma imobilizada.

$T(^{\circ}C)$	$k_d(\text{min}^{-1})$	r
50	$3,886.10^{-4}$	-0,999
52,5	$1,064.10^{-3}$	-0,992
54,5	$3,886.10^{-3}$	-0,987
57	$1,828.10^{-2}$	-0,988
59,5	$5,899.10^{-2}$	-0,997

Para o cálculo da energia de desativação da enzima, colocou-se os dados na forma da equação de Arrhenius e graficou-se em função da temperatura, como mostra as Figuras 15 e 16.

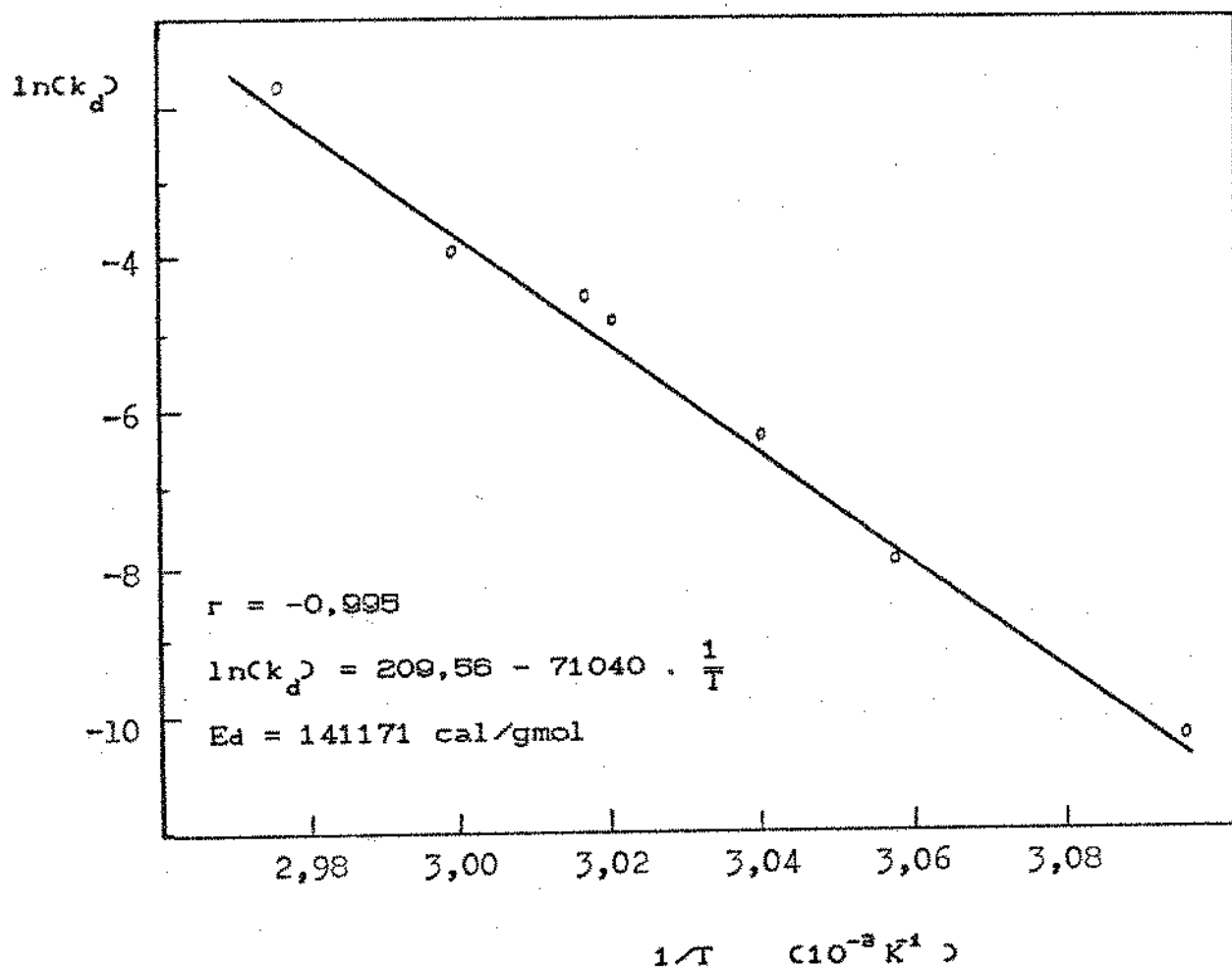


Figura 15 : Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação k_d em função da temperatura, na forma de Arrhenius, para a invertase livre.

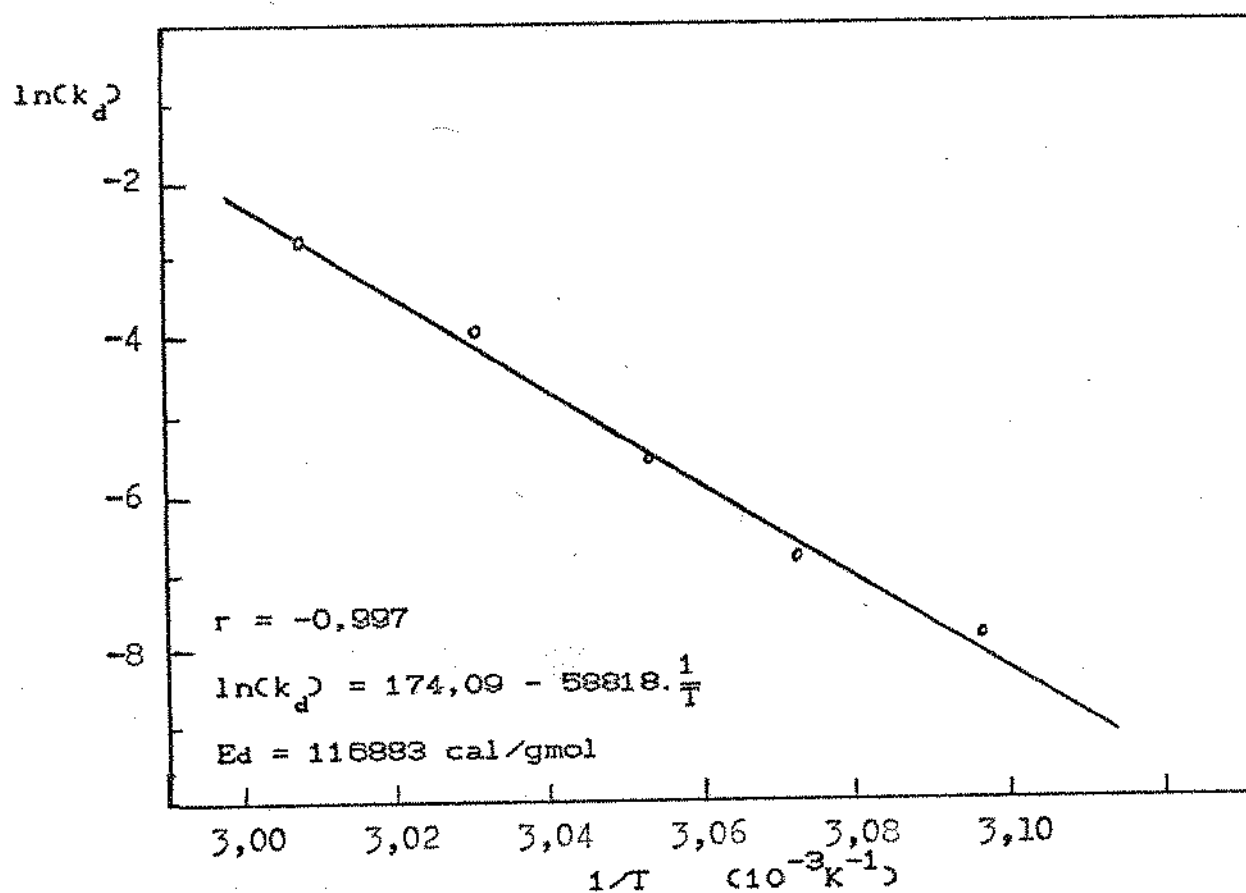


Figura 16 : Ajuste dos dados experimentais das constantes de desativação k_d em função da temperatura, na forma de Arrhenius, para a invertase imobilizada.

Pelos resultados obtidos, pode-se expressar o modelo de inativação térmica, como obedecendo uma simples cinética de primeira ordem, não necessitando de modelos mais complexos para descrever seu comportamento, tais como os modelos de inativação em série ou paralelo.

Para a faixa de temperatura em estudo, podemos interpolar dados de inativação térmica, utilizando-se das equações normalizadas de Arrhenius obtidas das Figuras 15 e 18, e ainda, considerando que tais equações possam ser extrapoladas para

temperaturas inferiores, podemos estimar dados de estabilidade térmica para baixas temperaturas.

Costuma-se expressar os dados de inativação térmica, em termos de meia vida, que é definida como o tempo necessário para inativar 50% da atividade original. Supondo-se que possamos extrapolar e interpolar dados, pode-se escrever a equação de k_d em função da temperatura, em termos de tempo de meia vida $t_{1/2}$, como:

-para enzima livre:

$$t_{1/2} = 6,7618 \cdot 10^{-92} \cdot \exp(-71040/T)$$

-para a enzima imobilizada:

$$t_{1/2} = 1,7159 \cdot 10^{-76} \cdot \exp(58818/T)$$

Partindo-se destas equações, pode-se estimar tempo de meia vida, como mostra a Tabela 12, para a forma livre e a imobilizada.

Tabela 12 : Tempos de meia vida ($t_{1/2}$) estimados para a faixa de 40 a 60°C, para a enzima livre e imobilizada.

T(°C)	$t_{1/2}$	
	enzima livre	enzima imobilizada
60	30,0 minutos	8,8 minutos
58	3,0 horas	25,6 minutos
56	6,7 horas	1,3 horas
54	1,1 dias	3,8 horas
52	4,0 dias	11,3 horas
51	7,8 dias	19,8 horas
50	15,5 dias	1,5 dias
49	30,6 dias	2,6 dias
48	60,9 dias	4,5 dias
47	122,0 dias	8,0 dias
46	243,0 dias	14,2 dias
45	1,3 anos	25,4 dias
40	47,7 anos	1,3 anos

Verifica-se pela Tabela 12, que a desativação térmica é bastante sensível à temperatura, isto é, pequenas variações de temperatura, promovem grandes variações na estabilidade. A avaliação a 40°C, evidencia a grande estabilidade da invertase a baixas temperaturas. Estes dados porém, devem ser vistos de forma qualitativa, já que são extrapolações. Utilizando-se destes dados, pode-se estimar, por exemplo, qual será o tempo para a perda de 1% da atividade inicial a 40°C. Obtendo-se 252 dias para a enzima livre e aproximadamente 8 dias para a imobilizada.

Pelos resultados apresentados, verifica-se que a enzima na forma livre mostrou-se significativamente mais estável que a forma imobilizada, mesmo assim, muito estáveis a baixas temperaturas. Apesar da enzima imobilizada se mostrar inferior em termos de estabilidade, isto não descarta sua vantagem sobre a livre, visto que, utilizar-se a mesma a baixas temperaturas (ao redor de 40°C), ter-se-á boa estabilidade e com vantagem de reutilização. No caso da enzima livre, apesar de ser mais estável, não pode ser reutilizada, sendo descartada juntamente com o produto de reação.

No caso específico da invertase, as reações são feitas normalmente em xaropes a 60°Brix. Monsan et al. (52), demonstraram que a estabilidade da invertase é função extremamente dependente da concentração de substrato e em soluções concentradas, esta estabilidade é superior do que em soluções diluídas. Como no presente caso a determinação de estabilidade foi efetuada na ausência de substrato, é de se prever que na utilização da enzima em presença de substrato, teremos uma estabilidade superior a estimada.

Com respeito aos valores de energia de ativação E_d , obtidos para a invertase nas duas formas, estão de acordo com valores apresentados na literatura, e sua ordem de grandeza se situa em 100 Kcal/gmol (49,58).

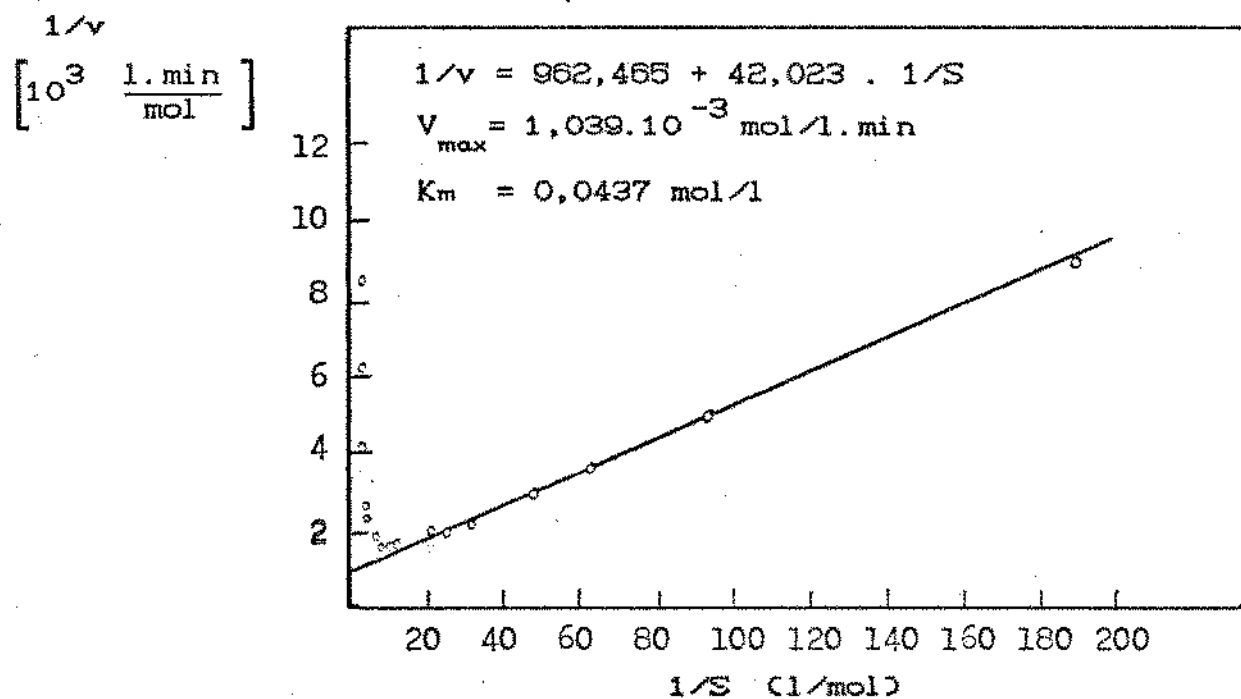
IV.5 - CINÉTICA DA INVERTASE NA FORMA LIVRE

A Tabela 13 mostra dados de taxas iniciais de reação obtidas para enzima na forma livre a 40 e 50°C.

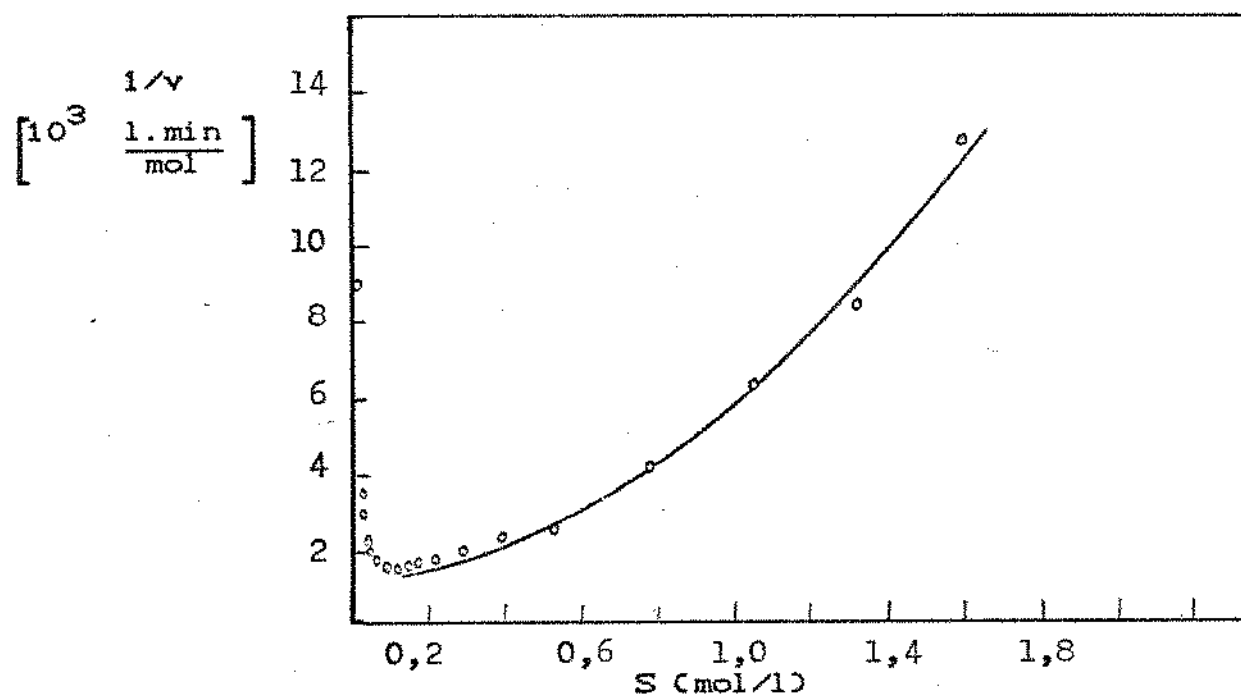
Tabela 13 : Taxas iniciais de reação (v) em função da concentração de substrato (S), para a invertase na forma livre. As concentrações de invertase nos experimentos foram de $1,82 \cdot 10^{-3}$ g/l e $0,91 \cdot 10^{-3}$ g/l a 40 e 50°C, respectivamente.

S (mol/l)	v (10^{-3} mol/l.min)	
	40°C	50°C
0,00532	0,1128	0,0647
0,01063	0,2024	0,1239
0,01595	0,2779	0,1669
0,02127	0,3407	0,1980
0,03190	0,4651	0,2657
0,04253	0,5122	0,2927
0,05316	0,5380	0,3513
0,08506	0,6055	0,3874
0,1063	0,6357	0,4194
0,1329	0,6101	0,4212
0,1595	0,5882	0,4100
0,2127	0,5562	0,3508
0,2658	0,5168	0,3540
0,3987	0,4388	0,2740
0,5316	0,3805	0,2493
0,7974	0,2401	0,1765
1,063	0,1610	0,1261
1,329	0,1189	0,0871
1,595	0,0808	0,0668

Inicialmente considerou-se o modelo cinético de inibição pelo substrato, para descrever o comportamento das taxas iniciais de reação. Os dados obtidos experimentalmente, foram colocados na forma de Lineweaver-Burk, segundo as equações 82 e 83 com intuito de se determinar os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-menten (K_m) e constante de inibição pelo substrato (K_i), como mostrados nas Figuras 17 e 18.

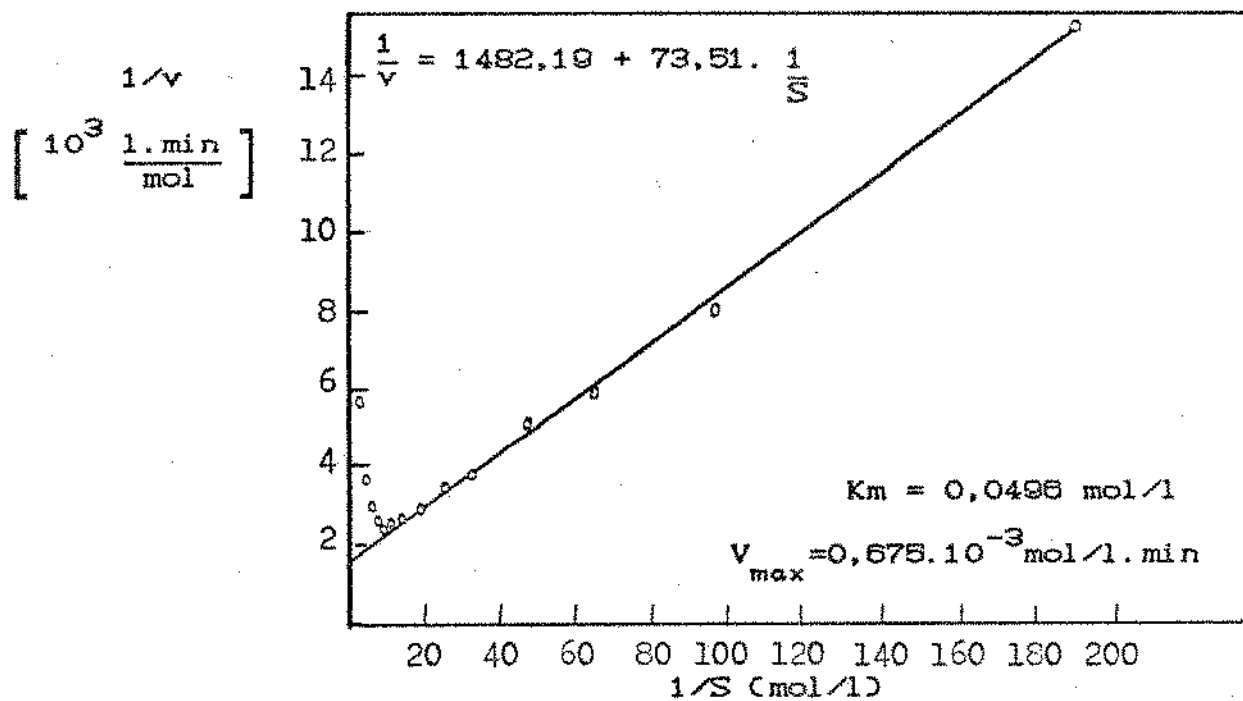


(a)

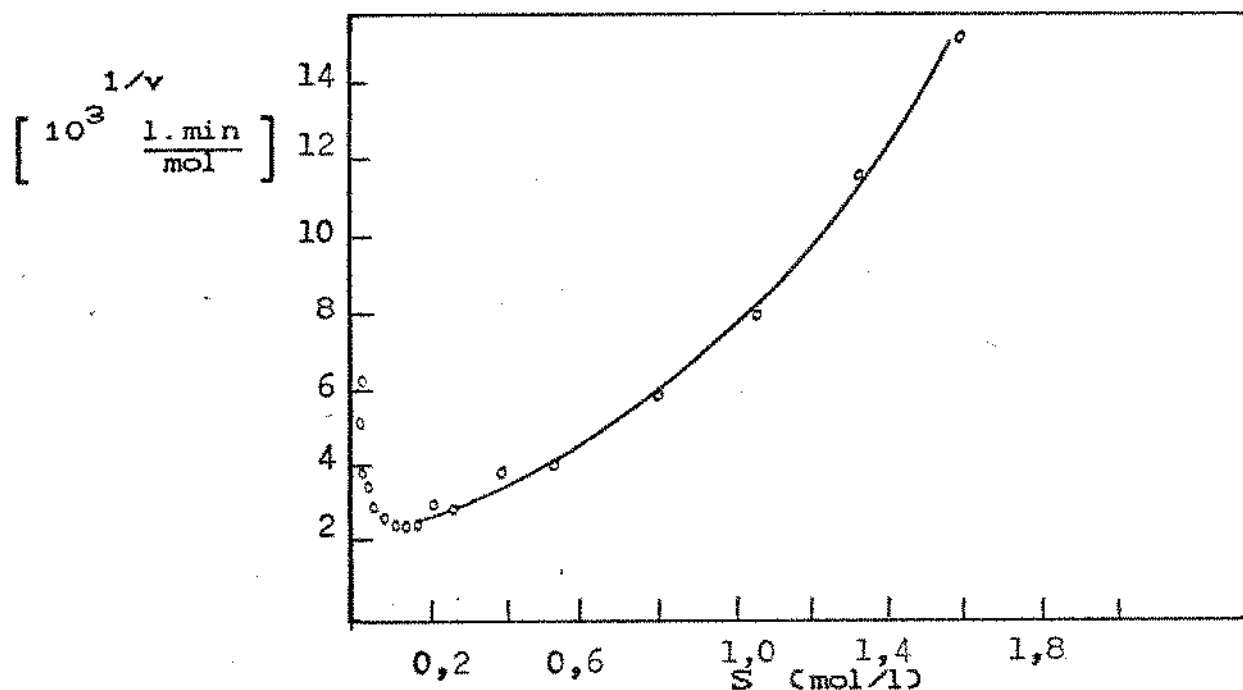


(b)

Figura 17 : Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais a 40°C para a invertase livre, considerando-se cinética de inibição pelo substrato: (a) para $S \ll K_i$ e (b) para $S \gg K_m$.



(a)



(b)

Figura 18 : Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais a 50°C para a invertase livre, considerando-se cinética de inibição pelo substrato: (a) para $S \ll K_i$ e (b) para $S \gg K_m$

Verifica-se pelos gráficos anteriores, que a forma de Lineweaver-burk para baixas concentrações de substrato é adequada, mostrando a existência de linearidade entre $1/v$ e $1/S$. Para altas concentrações de substrato, porém, o mesmo não foi observado, confirmando assim, que o modelo de inibição pelo substrato, por si só, não é suficiente para descrever o comportamento cinético da invertase. Desta forma, considerou-se a cinética como de inibição pelo substrato, acrescida de um fator de correção $f(S)$, como mostrada na equação 84. Conhecida a função $f(S)$, pode-se expressar a cinética na forma de Lineweaver-Burk modificada, como mostra as equações 85 e 86.

Três considerações são feitas para o fator $f(S)$ descritas no ANEXO III. Duas delas baseando-se no desvio proveniente da concentração de água livre e uma terceira na mudança de difusividade de massa.

Algumas complicações surgem, quando se considera o efeito de concentração de água livre, já que esta é função do número de hidratação (n) das moléculas de sacarose, devendo portanto, conhecer-se a priori este número e sua variação com a concentração. Entretanto, alguns valores apresentados na literatura, diferem significativamente entre si, como mostrado na revisão feita por Allen e Wood (2). Bowski et al. (7), assumiram o número de hidratação igual a sete, para soluções diluídas. Para soluções concentradas, o valor foi determinado de tal forma que se ajustasse aos dados experimentais.

De um modo geral, quando se utiliza a concentração de água livre como fator de correção, não se conhece, a princípio, o comportamento da função $f(S)$. Deve-se fazer, portanto,

estimativas para verificar o ajuste. Analisando as equações teóricas do ANEXO III, pode-se notar que, para baixas concentrações de substrato, a função de correção sempre será insignificante, e qualquer estimativa de n pode ser válida.

Como uma primeira tentativa de ajuste, utilizou-se o fator de correção $f(S) = D(S)/D_0$. Neste caso, pode-se determinar os valores de $f(S)$ para cada concentração utilizada no experimento, como mostra a Tabela III.1 do Anexo III. Com o uso destes fatores, recalculou-se as taxas observadas de reação em termos de taxa modificada (v^*), que é relacionada na forma:

$$v_{obs} = v^* \cdot f(S)$$

Desta maneira, se $f(S)$ for adequado, v^* poderá ser representado pela cinética de inibição pelo substrato. Os valores assim calculados, são apresentados na Tabela 14 e nas Figuras 19 e 20 na forma de Lineweaver-Burk.

Tabela 14 : taxas iniciais de reação a 40 e 50°C, na forma modificada (v^*), utilizando-se do fator $f(S) = X(S)/D_0$.

S (mol/l)	v^* (10^{-3} mol/l.min)	
	40°C	50°C
0,00532	0,1131	0,06487
0,01063	0,2033	0,1245
0,01595	0,2798	0,1680
0,02127	0,3438	0,1998
0,03190	0,4715	0,2694
0,04253	0,5216	0,2981
0,05316	0,5504	0,3594
0,08506	0,6280	0,4019
0,1063	0,6654	0,4391
0,1329	0,6460	0,4461
0,1595	0,6301	0,4393
0,2127	0,6099	0,3849
0,2658	0,5803	0,3977
0,3987	0,5233	0,3270
0,5316	0,4827	0,3167
0,7974	0,3470	0,2556
1,063	0,2676	0,2103
1,329	0,2302	0,1694
1,595	0,1853	0,1541

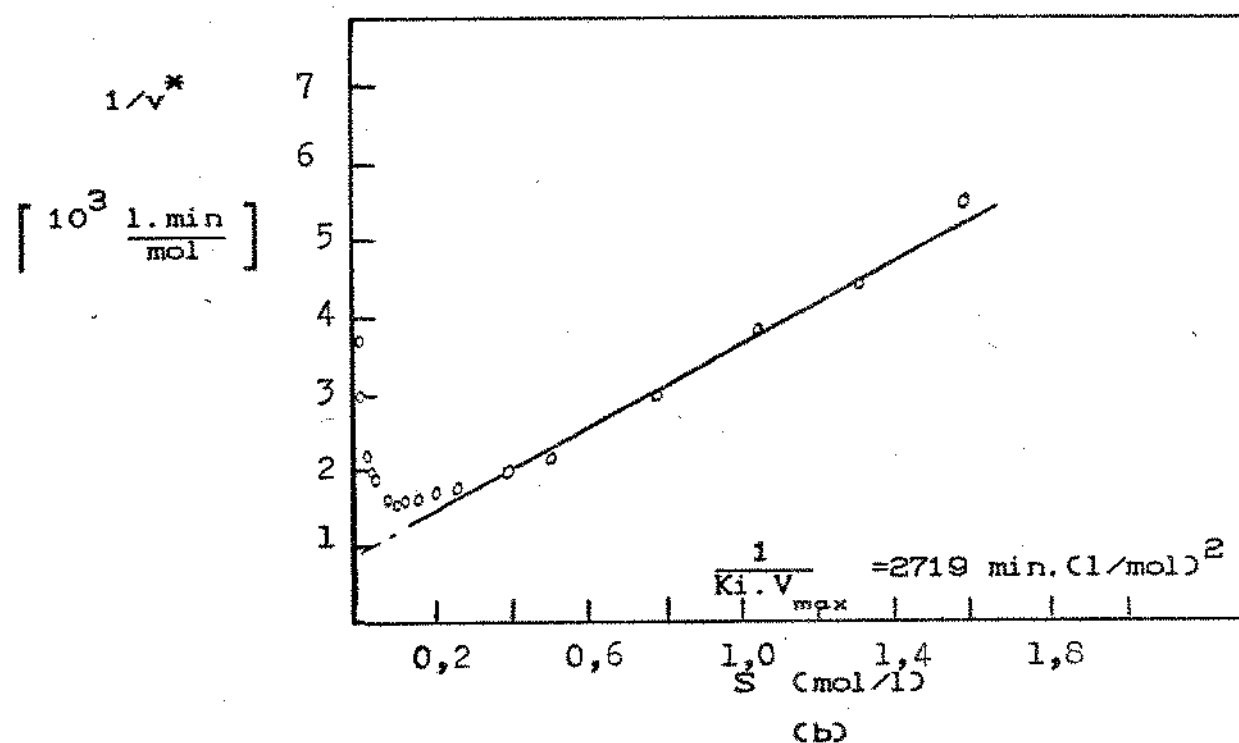
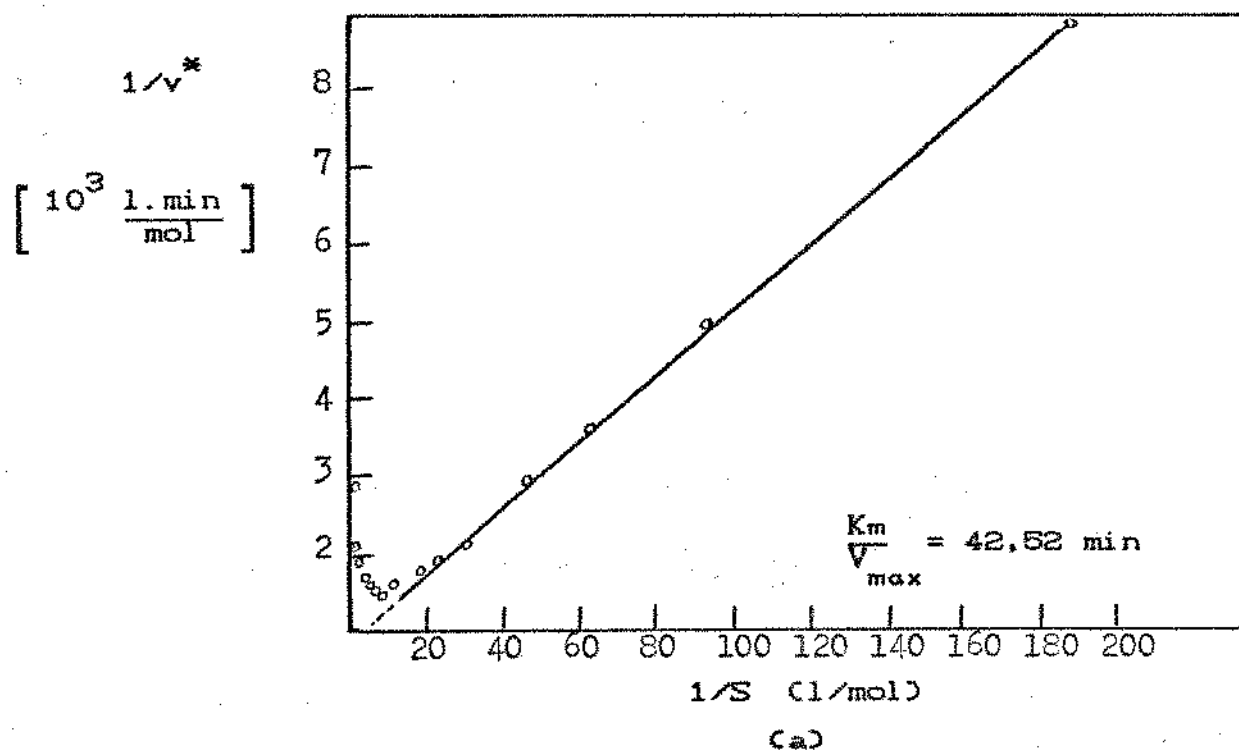


Figura 19 : Forma de Lineweaver-Burk aplicada a taxas iniciais de reação modificada (v^*) para cinética de inibição pelo substrato a 40°C: (a) para $S \ll K_i$ e (b) para $S \gg K_m$.

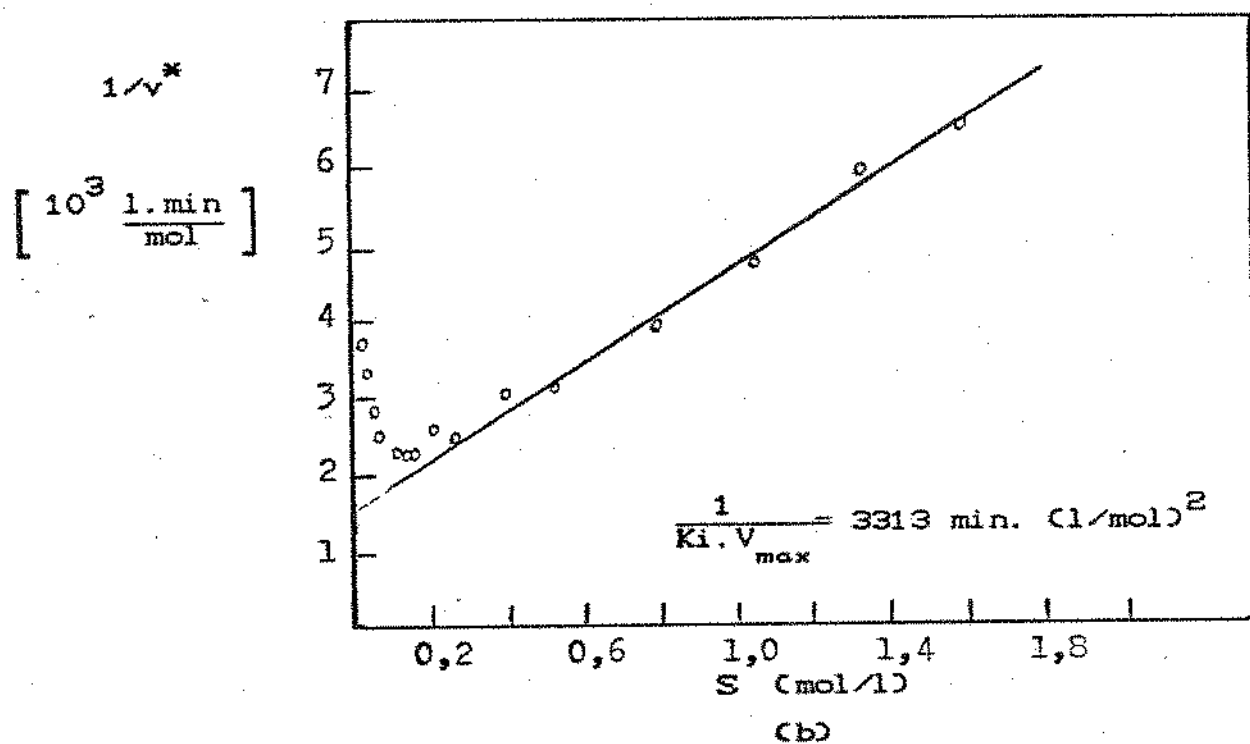
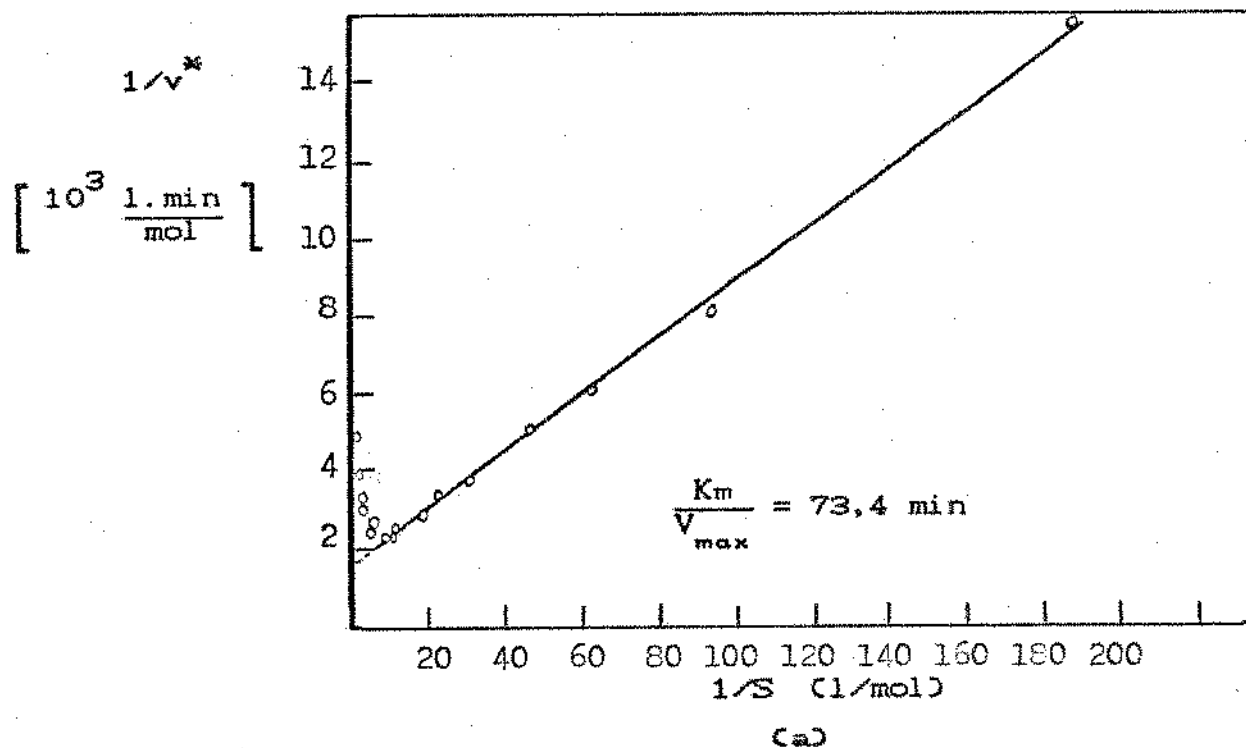


Figura 20 : Forma de Lineweaver-Burk aplicada a taxas iniciais de reação modificada (v^*) para cinética de inibição pelo substrato a 50°C: (a) para $S \ll K_i$ e (b) para $S \gg K_m$.

Pela análise das Figuras 19 e 20, verifica-se que o modelo com correção pela difusão mostrou-se eficiente para descrever o comportamento cinético. Houve linearidade a baixas e altas concentrações, quando graficou-se na forma de Lineweaver-Burk, resultando em coeficientes lineares praticamente iguais, o que é um pré requisito para o ajuste.

Ajustando-se melhor as curvas quanto ao coeficiente linear, chega-se a:

$$\text{-para } 40^{\circ}\text{C: } 1/v^* = 840 + 42,52 \cdot 1/S + 2719 \cdot S$$

$$1000 \ v = 1,191 \cdot \frac{S}{0,0506 + S + S^2/0,309} \cdot \left[1 - 0,4255 \cdot \frac{S}{1+0,1276 \cdot S} \right]$$

$$\text{-para } 50^{\circ}\text{C: } 1/v^* = 1250 + 73,4 \cdot 1/S + 3313 \cdot S$$

$$1000 \ v = 0,800 \cdot \frac{S}{0,0587 + S + S^2/0,377} \cdot \left[1 - 0,4274 \cdot \frac{S}{1+0,1275 \cdot S} \right]$$

A tabela 15 mostra as constantes cinéticas Km e Ki obtidas. As Figuras 21 e 22 mostram a comparação dos modelos propostos com os dados experimentais.

Tabela 15: Constantes cinéticas a 40°C e 50°C para a invertase livre e imobilizada.

T (°C)	Km (mol/l)	Ki (mol/l)
40	0,0506	0,309
50	0,0587	0,377

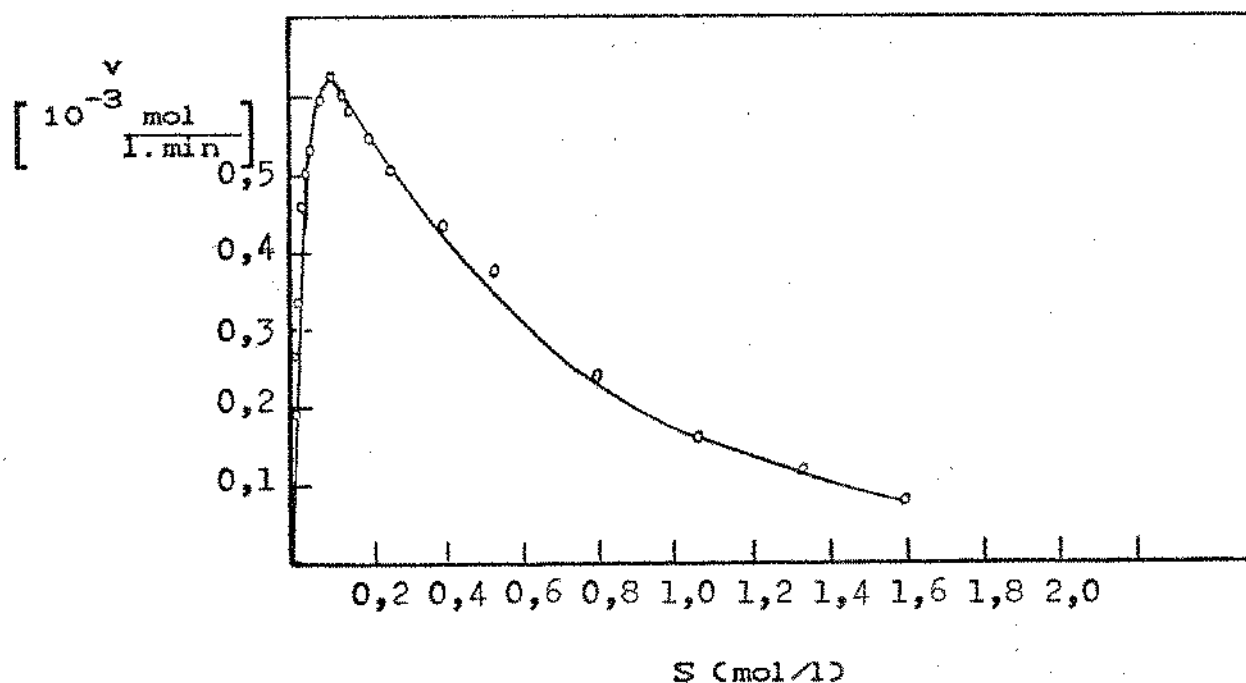


Figura 21 : Comparação dos resultados experimentais (pontos) e previstos pelo modelo (linha contínua) corrigido pelo fator $f(S) = D(S)/D_0$ para a enzima livre a 40°C .

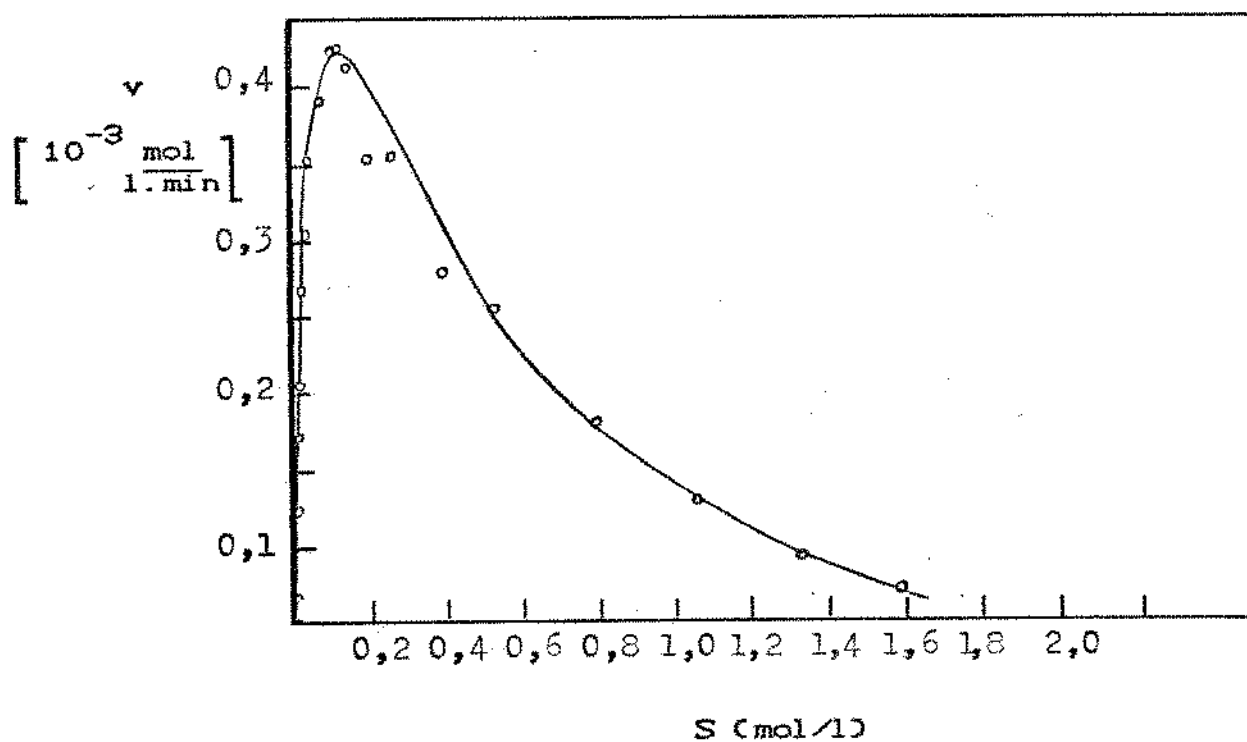


Figura 22 : Comparação dos resultados experimentais (pontos) e previstos pelo modelo (linha contínua), corrigido pelo fator $f(S) = D(S)/D_0$ para a enzima livre a 50°C .

Quanto as duas outras suposições descritas no ANEXO III, pode-se estimar valores do número de hidratação n , mostrados na Tabela 15, necessários ao ajuste do modelo.

Tabela 16 : estimativa de números de hidratação necessários ao ajuste do modelo cinético, baseados em concentração de água livre.

S (mol/l)	n	
	W_f/W_t	W_f/W_o
0,1	22,6	11,0
0,2	21,9	10,8
0,3	21,1	10,5
0,5	19,7	10,0
0,8	17,6	9,2
1,0	16,3	8,7
1,5	13,3	7,6
2,0	10,6	6,6

Verifica-se através dos resultados da Tabela 16, que o fator $f(S) = W_f/W_t$, como sugerido por Bowski et al. (7) é inadequado, porque exige altos valores para o número de hidratação. Isto também pode ser confirmado pelos resultados de Besserdich et al. (5), em que tal suposição, não ajustou seus dados experimentais. Quanto ao fator $f(S) = W_f/W_o$, a princípio não se pode descartar tal suposição, já que os números de hidratação obtidos, estão na ordem de grandeza de valores apresentados na literatura. Porém, o modelo considerando o fator $f(S) = D(S)/D_o$ foi suficientemente preciso e não foi considerado necessário a continuação destes ajustes.

IV.6 - CINÉTICA DA INVERTASE NA FORMA IMOBILIZADA

A Tabela 17, mostra dados obtidos do reator de mistura em estado estacionário, utilizando $5,9 \text{ cm}^3$ de alginato de cálcio, em forma de esferas ($d_p = 0,42 \text{ cm}$), contendo invertase imobilizada. O sistema foi operado a 40°C .

Tabela 17: Dados do reator de mistura a 40°C

S_o (10^{-3} mol/cm^3)	$(S_o - S_b)$ (10^{-3} mol/cm^3)	S_b (10^{-3} mol/cm^3)	N (rps)	F_o (cm^3/s)
0,00874	0,446	0,00829	7,5	0,0681
0,01747	0,999	0,01648	7,7	0,0528
0,02912	1,351	0,02777	7,5	0,0583
0,04368	1,303	0,04238	7,3	0,0708
0,07281	1,874	0,07093	7,3	0,0706
0,2320	2,937	0,2291	8,3	0,0658
0,2899	2,214	0,2877	7,3	0,0889
0,5828	3,312	0,5795	9,2	0,0614
0,8756	2,987	0,8726	8,2	0,0739
1,168	3,227	1,165	8,3	0,0681
1,459	2,985	1,456	7,6	0,0683

A Tabela 18, mostra dados calculados a partir da Tabela 17, dos valores de taxas iniciais de reação (v) e concentração de substrato na superfície (S_s).

Tabela 18: Dados de taxas de reação e concentração de substrato na superfície do gel de alginato de cálcio.

S_o 10^{-3} mol/cm^3	ϵ cm^2/s^3	K_L 10^{-3} cm/s	v $10^{-9} \text{ mol/cm}^3 \cdot \text{s}$	S_a 10^{-3} mol/cm^3
0,00874	12350	6,60	5,15	0,00824
0,01747	13191	6,67	8,93	0,01638
0,02912	12350	6,56	13,36	0,02763
0,04368	11544	6,36	15,64	0,04221
0,07281	11544	6,25	22,41	0,07091
0,2320	16940	6,35	32,80	0,2287
0,2899	11544	6,67	33,36	0,2873
0,5828	22547	5,38	34,5	0,5791
0,8756	15944	4,10	37,4	0,8720
1,168	16940	3,17	37,2	1,164
1,459	12765	2,07	34,6	1,455

Verifica-se pelas Tabelas 17 e 18, que o efeito da camada limite é desprezível nestas condições de turbulência, onde a concentração superficial calculada, é levemente inferior à concentração líquida no reator.

Os dados assim obtidos de taxas iniciais de reação em função da concentração de substrato, são normalizados na forma de Lineweaver-Burk, como mostrado na Figura 23, para determinação dos parâmetros aparentes.

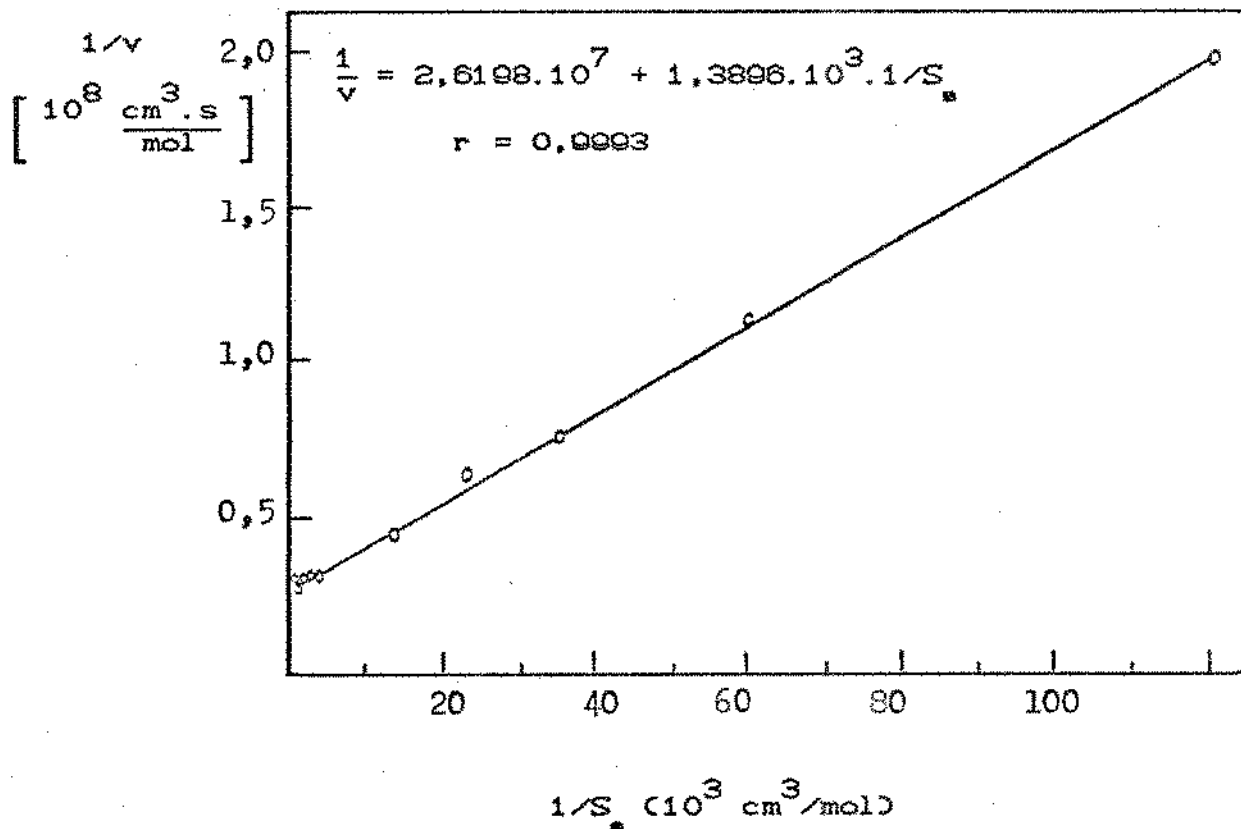


Figura 23 : Normalização em termos de parâmetros aparentes.

Verifica-se pela Figura 23, que os dados experimentais ajustam bem ao modelo cinético de Michaelis-Menten, em termos de parâmetros aparentes, obtendo-se:

$$V_{\max}^{\text{ap}} = 38,17 \cdot 10^{-9} \text{ mol/cm}^3 \cdot \text{s}$$

$$K_m^{\text{ap}} = 5,304 \cdot 10^{-5} \text{ mol/cm}^3 \text{ (0,05304 mol/l)}$$

$$v = 38,17 \cdot 10^{-9} \cdot \frac{S}{5,304 \cdot 10^{-5} + S}$$

Na Figura 24, compara-se o modelo com os dados experimentais.

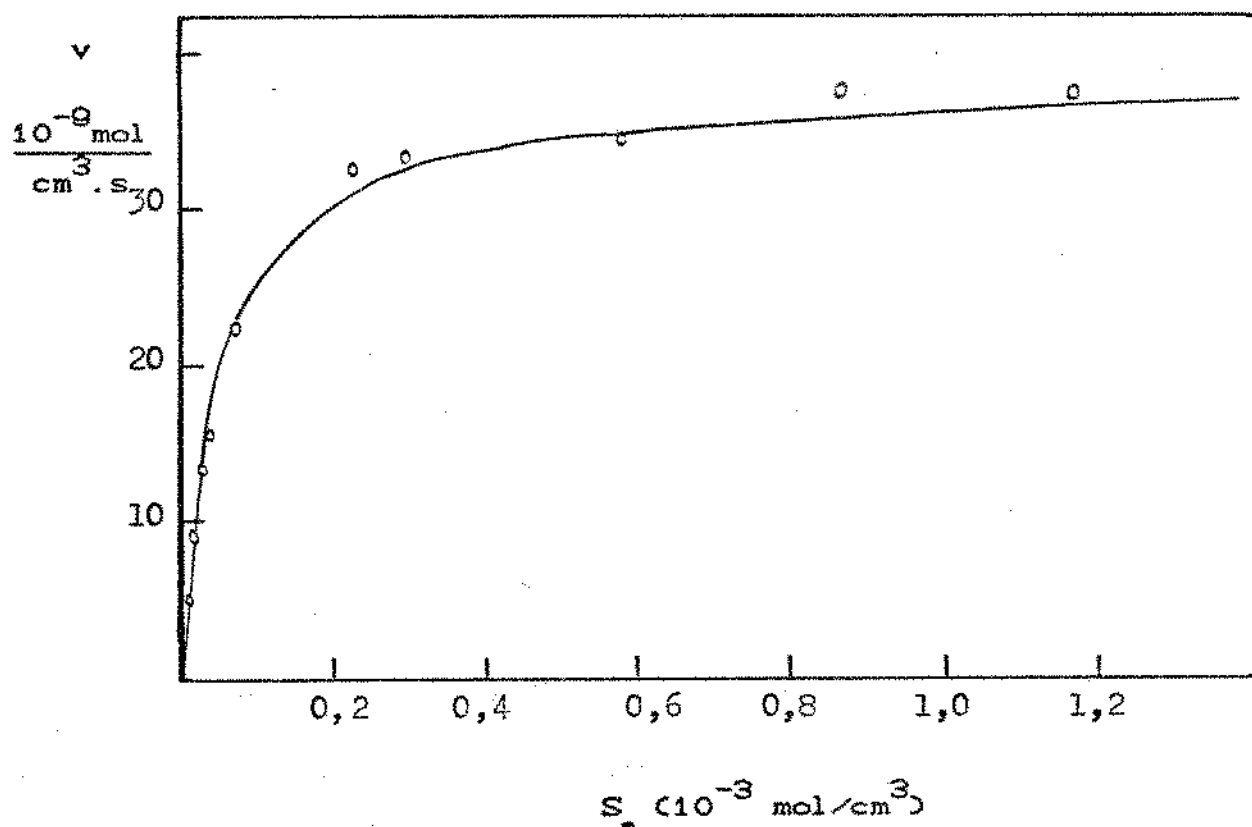


Figura 24 : Comparação do Modelo de Michaelis-Menten (linha contínua) com os dados experimentais (pontos).

Verificou-se pela análise dos resultados obtidos, que o modelo ajustou-se à cinética de Michaelis-Menten sem necessidade de um fator de correção $f(S)$, como necessário para a enzima na forma livre. Interessante notar, que mesmo para altas concentrações de substrato, neste caso não se verificou praticamente o efeito de inibição. A constante de inibição neste caso, deve ser de valor bastante elevado. Estes resultados diferem dos obtidos por Besserdich et al.(5), que observaram para a enzima imobilizada, que seus dados experimentais ajustaram bem ao modelo de inibição pelo substrato, entretanto também não observaram o desvio da cinética, como observado para a enzima livre.

Partindo-se da equação 31 do balanço de massa, pode-se demonstrar que:

$$\frac{dS}{dr} \cdot \frac{dD_e}{dr} + D_e \cdot \left[\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right] = r(S)$$

onde: D_e = Difusividade efetiva de massa

$r(S)$ = taxa de reação em cada posição no interior do gel.

Pelo balanço de massa, temos um perfil de concentração no interior do gel, e sabendo-se que D_e decresce com o aumento de concentração de sacarose, poderia se supor a princípio, que D_e varia com a posição no interior do gel, entretanto, a medida que S decresce para o interior, os produtos de reação estão em concentração maior, promovendo de certa forma uma compensação sobre D_e em termos de variação de concentração. Devido a essas considerações podemos supor que $dD_e/dr=0$, isto é, D_e é independente da posição. A equação acima pode ser escrita como a equação 33, ou seja:

$$D_e \left[\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right] = r(S)$$

Entretanto, D_e varia em relação à mudança de concentração de substrato no reator, e baseando-se no ANEXO III, podemos escrever:

$$D_e = D_e(0) \cdot f(S)$$

onde: $D_e(0)$ = Difusividade efetiva de massa de sacarose em soluções à infinita diluição.

Considerando que no interior do gel, a taxa de reação possa ser descrita por um modelo análogo à enzima livre, esta será representada por:

$$r(S) = v^* \cdot f(S)$$

onde: $r(S)$ é a taxa de reação em cada posição no interior do gel, v^* é a taxa seguindo cinética de inibição pelo substrato e $f(S)$ o fator de correção.

Supondo que o fator de correção seja em termos de difusividade de massa, a equação geral, pode ser escrita da seguinte maneira:

$$D_e(0) \cdot f(S) \cdot \left[\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right] = v^*(S) \cdot f(S)$$

ou

$$D_e(0) \cdot \left[\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dS}{dr} \right] = v^*(S)$$

Desta forma, o balanço de massa, é aparente, como se a difusividade efetiva de massa fosse independente da concentração de substrato, e a cinética da enzima podendo ser descrita pelo modelo de inibição pelo substrato, sem necessidade do fator de correção.

Para a determinação dos parâmetros intrínsecos da enzima, utilizou-se de um programa computacional, constante do ANEXO IV. Entretanto, a obtenção do ajuste é difícil, já que necessitamos estimar dois parâmetros desconhecidos (K_i^* e β).

Para contornar o problema, extrapolou-se dados para faixa de concentração, onde verifica-se uma cinética de primeira ordem. Nestas condições o parâmetro β pode ser determinado analiticamente, através de parâmetros aparentes já obtidos, como demonstrado no ANEXO V, pela equação V.6, na forma:

$$\frac{\phi}{\tanh \phi} = 1 + \frac{1}{3} \left[\frac{V_{\max}}{K_m} \right]^{ap} \cdot \frac{R^2}{D_e} \quad \text{onde } \beta = \phi^2$$

Através de $(V_{\max}/K_m)^{ap}$ já determinado e usando-se o valor de D_e para soluções diluídas, como determinado no (item IV.7) a seguir, ou seja, $D_e(0) = 0,50 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, o valor de $\beta=9,766$ é obtido.

Conhecido o parâmetro β , a integração numérica, (ANEXO IV), pode ser facilmente resolvida, variando-se apenas K_1^* para a integração. Os resultados devem ser comparados com dados experimentais.

A Tabela 19, apresenta dados experimentais na forma de $(dC/dX)|_{X=1}$ obtidos pela equação,

$$\frac{dC}{dX}|_{X=1} = \frac{v \cdot R^2}{3 \cdot D_e \cdot S_b}, \text{ com } S_b = S_*$$

e integrando-se numericamente, obtém-se o valor de K_m intrínseco.

Tabela 19 : Obtenção da constante de Michaelis-Menten intrínseca, pelo método numérico.

S_* (mol/cm ³)	$(dC/dX) _{X=1}$	K_1	K_m (mol/cm ³)
$1 \cdot 10^{-5}$	1,7971	3,06	$3,06 \cdot 10^{-5}$
$2 \cdot 10^{-5}$	1,5511	1,53	$3,06 \cdot 10^{-5}$
$1 \cdot 10^{-4}$	0,7403	0,32	$3,20 \cdot 10^{-5}$

Pela integração numérica, obteve-se K_m intrínseco igual a $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/cm}^3$ (0,031 mol/l). Conhecido β e K_m , obtém-se a taxa máxima de reação $V_{\max} = 34 \cdot 10^{-9} \text{ mol/cm}^3 \cdot \text{s}$.

O valor de $V_{\max}$ intrínseco obtido mostrou-se um pouco menor

que o aparente ($V_{\max}^{\text{ap}} = 38,17 \cdot 10^{-9} \text{ mol/cm}^3 \cdot \text{s}$), entretanto, como demonstrado por Regan et al. (62), através de simulação, os valores podem diferir.

Se considerarmos o $V_{\max}^{\text{ap}}$ como correto, ou seja, igual ao intrínseco, não seria necessário a integração numérica para determinação de parâmetros para a cinética de Michaelis-Menten. Pode-se entretanto, considerar como tal, apenas para efeito de estimativa na determinação de K_m intrínseco.

A Tabela 20, resume dados de parâmetros cinéticos obtidos para a invertase na forma livre e na forma imobilizada, para efeito de comparação.

Tabela 20 : Parâmetros cinéticos da invertase a 40°C

Especificação	K_m (mol/l)	K_i (mol/l)	$f(S)$
enzima livre	0,0506	0,3089	necessário
enzima imobilizada (aparentes)	0,0530	-	ausente
enzima imobilizada (intrínsecos)	0,031	-	presente, mas não necessário

Verifica-se a mesma ordem de grandeza de K_m . Entretanto o K_m intrínseco mostrou-se menor que o da enzima na forma livre, evidenciando com isto maior afinidade da enzima com o substrato. A ausência do efeito de inibição pelo substrato, na faixa de concentração utilizada no experimento, é uma vantagem a mais da enzima imobilizada, mostrando que são Observadas taxas de reação próximas à máxima possível, enquanto que na forma livre atinge

no máximo 53% de $V_{\max}$.

Para verificar a eficiência de imobilização, em termos de disponibilidade da enzima imobilizada em catalizar a inversão, pode-se estimar a razão entre $V_{\max}$ da enzima livre e da imobilizada, considerando que ambas tenham o mesmo comportamento cinético na forma $a=K.E$. Para tal relacionou-se ambas as formas em termos de atividade máxima por unidade de massa de enzima.

Para a enzima na forma livre, a solução em reação continha $1,82 \cdot 10^{-6}$ g de composto enzimático / cm^3 , obtendo $V_{\max} = 1,191 \cdot 10^{-3}$ mol/l.min nestas condições, correspondendo a:

$$0,01097 \frac{\text{mol de substrato convertido/segundo}}{\text{grama de composto enzimático}}$$

Para a enzima imobilizada, o gel continha $4 \cdot 10^{-6}$ g de enzima por cm^3 de alginato na preparação, obtendo $V_{\max} = 34 \cdot 10^{-9}$ mol/ cm^3 .s, correspondente a:

$$0,0085 \frac{\text{mol de substrato convertido/segundo}}{\text{grama de composto enzimático}}$$

Desta forma, podemos especificar a eficiência da imobilização, para mesma quantidade de enzima, como:

$$\eta_1 = \frac{0,0085}{0,01097} \times 100\% = 77,5\%$$

Se considerarmos ainda, o efeito de sinérese do gel, a concentração da enzima no interior do mesmo é ao redor de 30% superior, logo a eficiência nesta base será de aproximadamente:

$$\eta_1 = 77,5\% / 1,3 = 59,6\%$$

Esta eficiência, pode nos indicar que parte da enzima imobilizada foi inativada ou bloqueada de tal forma, que não está disponível à reação enzimática.

Apesar de serem observadas taxas de reação superiores ao

$V_{\max}$ intrínseco, este fato pode ter sido consequência de erros experimentais. Considerando a taxa máxima de reação $V_{\max}$ intrínseco e aparente iguais a 34.10^{-9} mol/cm³.s, pode-se calcular o K_m aparente como, $K_m^{ap} = 4.7.10^{-5}$ mol/cm³.

A Tabela 21, mostra previsão de K_m^{ap} , calculados a partir do K_m intrínseco nas mesmas condições do experimento, variando-se apenas o raio do alginato de cálcio, a determinação foi efetuada a partir da equação V.6 do ANEXO V, na forma:

$$\frac{\phi}{\tanh \phi} = 1 - \frac{1}{3} \left[\frac{V_{\max}}{K_m} \right]^{ap} \cdot \frac{R^2}{D_0}$$

onde: $\phi = \beta^{1/2} = R \cdot \left[\frac{V_{\max}}{K_m} \right]^{1/2}$

com $V_{\max} = V_{\max}^{ap} = 34.10^{-9}$ mol/cm³.s

$D_0 = 0.5.10^{-5}$ cm²/s

$K_m = 3.1.10^{-5}$ mol/cm³

Tabela 21: Previsão de K_m^{ap} para diferentes raios.

R (cm)	β	ϕ	$\frac{\phi}{\tanh \phi}$	K_m^{ap} (10^{-5} mol/cm ³)
4,0	3510	59,24	59,24	62,3
2,0	877	29,62	29,62	31,7
1,0	219	14,81	14,81	16,4
0,5	54,8	7,405	7,405	8,9
0,211	9,77	3,125	3,137	4,7
0,1	2,19	1,481	1,643	3,5
0,05	0,549	0,741	1,176	3,2
0,01	0,022	0,148	1,007	3,1
0	-	-	-	3,1

Verifica-se pela Tabela 21, que para altos valores do raio, o Km^{op} é proporcional a este, e a medida em que R diminui, o Km^{op} tende ao valor de Km intrínseco, que neste caso serão iguais quando o raio do alginato for inferior a 0,05 cm.

IV.7. DIFUSIVIDADE EFETIVA DA SACAROSE EM SOLUÇÕES DILUIDAS

1º Método: Utilizou-se de um tubo de vidro de duas extremidades abertas, contendo no seu interior um cilindro de alginato de cálcio. Este tubo de 4,5 cm de comprimento, foi imerso em solução de sacarose a 30 g/l sob intensa agitação a 40°C por 48 horas. Após este tempo, o tubo contendo o alginato foi retirado e a concentração média de sacarose no seu interior determinada, obtendo-se $\bar{C} = 16,09$ g/l.

Igualando-se as equações 73 e 74,

$$\bar{J} = \frac{\bar{C} \cdot (A \cdot Z)}{(2A) \cdot t} = 2 \sqrt{\frac{D_e}{t \cdot \pi}} \cdot C_{i,0}$$

obtem-se o valor $D_e = 0,66 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$

2º Método: A Tabela 22, mostra dados obtidos do comportamento da concentração de sacarose na fase líquida de volume $V_L = 35,0$ ml a 20 g/l com o tempo, quando esferas de alginato de cálcio de volume $V_{gel} = 16,24$ ml (350 unidades de $R = 0,223$ cm) são colocadas em contato, sob agitação e inicialmente isentas de sacarose, e dados calculados da concentração média no interior do gel.

Tabela 22 : Dados de penetração de sacarose em esferas de alginato de cálcio a 40°C, em função do tempo (t).
 C_L : concentração de sacarose na fase líquida, C_L^0 : concentração inicial na fase líquida, c_s : concentração de sacarose na fase sólida.

t (s)	C_L (g/l)	c_s (g/l)	C_L/C_L^0
0	20	0	1,0
150	17,35	5,71	0,868
300	16,09	8,43	0,805
600	15,19	10,37	0,760
900	14,64	11,55	0,732
1200	13,66	13,67	0,683
1500	14,21	12,48	0,711
1800	14,64	11,55	0,732
2400	12,84	15,43	0,642
3000	13,27	14,51	0,664
3600	13,74	13,49	0,687
4800	13,62	13,75	0,681
6000	13,62	13,75	0,681
∞	13,62	13,75	0,681

Dos dados obtidos da Tabela 22, calcula-se o coeficiente de partição K_p quando as duas fases entram em equilíbrio, obtendo-se:

$$K_p = c_s^{\infty} / C_L^{\infty} = 1,0$$

e

$$\alpha = V_L / (V_{gel} \cdot K_p) = 2,155$$

Com α conhecido, determinou-se 150 valores de q_n , segundo a equação 78. Em seguida estimou-se valores de D_e para a equação 76, com $n=150$, obtendo-se perfis de concentração na forma

C_L/C_L^0 em função do tempo. O melhor ajuste do modelo foi obtido quando se estimou D_e ao redor de $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$.

A comparação do modelo com os pontos experimentais é feita na Figura 25.

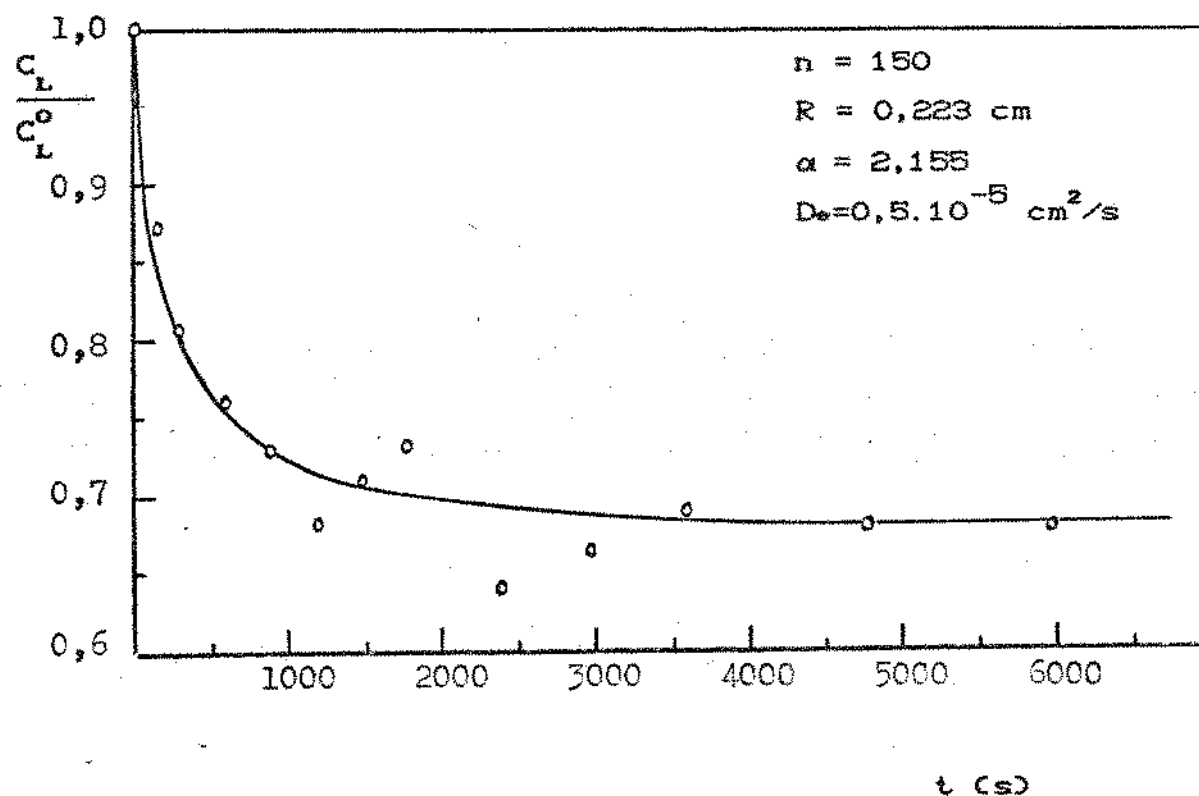


Figura 25 : Ajuste de D_e aos pontos experimentais pela equação 76.

Foi feito um segundo experimento nas mesmas condições, obtendo-se o mesmo valor da Difusividade efetiva de massa D_e .

O Coeficiente de partição K_p diferiu do valor 0,84 apresentado por Cheetham et al.(13). Entretanto, outros trabalhos (48, 67) utilizando outros substratos, inclusive de peso molecular superior à sacarose, ajustaram seus dados a

valores de $K_p=1$, mas com difusividade efetiva também iguais à difusividade em solução. No presente trabalho, entretanto a difusividade efetiva obtida mostrou-se bem inferior quando comparada à difusividade da sacarose em solução ($D_o = 0,75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), correspondendo a 88% e 66,7% de D_o para o 1º e 2º métodos respectivamente. Estes resultados diferem, portanto, neste aspecto, dos obtidos por aqueles autores.

Considerou-se o valor obtido pelo 2º método $D_e=0,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ como o mais correto, visto o gel utilizado neste experimento possuir as mesmas características estruturais do gel utilizado no reator.

Como forma alternativa, para a determinação do coeficiente D_e , pode-se determiná-lo de uma forma indireta, utilizando dados de taxas de reação obtidas do reator, normalizados em diferentes raios do suporte. Visto k_m intrínseco ser independente do raio, assim como a razão (V_{max}/K_m) aparente poder ser determinada na forma de Linwever-Burk, a Difusividade efetiva D_e , bem como K_m intrínseco podem ser obtidos pelo ajuste dos dados experimentais na equação V.6 do Anexo V, com dados de pelo menos dois raios distintos.

V - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

As seguintes conclusões podem ser tiradas do trabalho:

- A máxima atividade da invertase situou-se na faixa entre 55°C e 60°C para as formas livre e imobilizada, concordando com valores apresentados na literatura.

- O valor da energia de ativação para a invertase ($E_a = 7855$ cal/mol), mostrou ser praticamente igual a valores obtidos por outros pesquisadores, tais como 7322 cal/mol (19) e 7693 cal/mol (42). Entretanto o valor de energia de ativação para a invertase imobilizada ($E_a = 10258$ cal/mol), não concordou com outros trabalhos, que obtiveram valores inferiores aos obtidos para a invertase na forma livre.

- A enzima invertase é bastante estável na sua forma livre, sendo que a imobilização em alginato de cálcio afetou negativamente esta característica, diminuindo a estabilidade térmica.

- A reação de inativação térmica pode ser descrita por uma cinética de primeira ordem, concordando com os resultados de Ooshima et al. (58).

- O pH de máxima atividade obtido para a invertase livre foi de valor 4,5, enquanto que para a forma imobilizada, obteve-se um menor valor igual a 4,0, evidenciando o efeito de partição de prótons.

- Os modelos propostos do efeito do pH e temperatura na atividade enzimática mostraram que as hipóteses foram corretas.

- O modelo clássico de inibição pelo substrato não se aplicou à cinética da invertase livre, havendo necessidade de um fator de correção, definido por $f(S)$.

- A aplicação do fator de correção $f(S)$ em termos de concentração de água livre e de água total W_f/W_t como sugerido por Bowski et al. (7), não foi adequado ao modelo, como também verificado por Besserdich et al. (5), já que para aplicá-lo, deve-se assumir valores do número de hidratação para a sacarose bem superiores aos mencionados na literatura.

No presente trabalho, o fator de correção que mostrou ser mais adequado foi em termos de difusividade de massa na forma $f(S) = KS/D_0$.

A constante de Michaelis-Menten obtida a 50°C ($K_m = 0,0587$ mol/l) foi levemente superior a 40°C ($K_m = 0,0506$ mol/l), mostrando que a elevação de temperatura diminui a afinidade da enzima ao substrato. Por outro lado a constante de inibição pelo substrato a 50°C ($K_i = 0,377$ mol/l) mostrou ser maior que a 40°C ($K_i = 0,309$ mol/l), diminuindo em consequência o efeito de inibição em relação ao aumento de temperatura.

- A cinética da invertase imobilizada, mostrou um comportamento tipo cinética de Michaelis-Menten, com uma inibição pelo substrato praticamente desprezível (não detectada).

- Não houve necessidade de um fator de correção, tipo $f(S)$ sobre o modelo cinético da invertase imobilizada, como também observado por Besserdich et al. (5).

- A teoria apresentada por alguns pesquisadores (23,72), para determinação de parâmetros intrínsecos da enzima imobilizada, baseados no balanço de massa no interior da matriz, mostrou ser correta, apesar de se considerar a difusividade efetiva da sacarose (D_0) constante e igual ao valor obtido para

soluções diluídas de sacarose.

- A ausência do fator $f(S)$ observado na cinética da enzima imobilizada aliada ao uso da difusividade efetiva da sacarose de valor constante e numericamente igual a mesma em soluções diluídas $D_e(0)$, sustenta a suposição do fator $f(S)$ ser função da correção de difusividade, já que no balanço de massa a correção de difusividade anula a correção da cinética de reação.

- A metodologia utilizada para determinação do parâmetro β a partir de parâmetros aparentes na forma $(V_{\max}/K_m)^{ap}$ foi apropriada e também útil para avaliar parâmetros aparentes a partir de parâmetros intrínsecos.

- A constante de Michaelis-Menten intrínseca da invertase imobilizada (0,031 mol/l) foi bem inferior a constante da invertase livre (0,0506 mol/l), evidenciando maior afinidade da invertase à sacarose na forma imobilizada.

- A eficiência de imobilização foi de 80%, indicando que na imobilização, parte da enzima foi inativada ou bloqueada de tal forma, que não ficou disponível à reação.

- A difusividade efetiva de sacarose em alginato de cálcio ($D_e = 0,50 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) foi aproximadamente 67% da difusividade em solução ($D_o = 0,75 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), discordando de resultados apresentados por Tanaka et al. (67) em alginato, que obtiveram valores praticamente iguais para solutos de peso molecular inferior a 20000.

- O coeficiente de partição k_p obtido foi igual à unidade, diferindo do valor 0,84 apresentado por Cheethan et al. (13).

Como recomendações para trabalhos futuros, podemos sugerir o seguinte:

- Estudar o efeito de inibição pelo produto na cinética da invertase, bem como o comportamento do efeito físico em presença de produtos de reação.

- Estudar a imobilização em outros suportes de forma a manter ou aumentar a estabilidade da enzima.

VI - BIBLIOGRAFIA

1. ABRAMS, B.B.; HACKEL, R.; MIZUNAGA, T e LAMPEN, J.O. - "Relationship of large and small invertases in *Saccharomyces* mutant selectively deficient in small invertase". J. Bacteriol., 135, 809-817, (1978).
2. ALLEN, A.T. e WOOD, R.M. - "Molecular Association in the Sucrose-Water system". Sugar Tech. Reviews, 2, 165-180, (1974).
3. ALMEIDA CUNHA, B.C. de e VITOLO, M. - "Effect of Viscosity on Sucrose Hydrolysis Catalyzed by Invertase Obtained from *S. cerevisiae*". Biotech. Bioeng., 27, 811-813, (1984).
4. ARNOLD, W.N. - "Heat inactivation Kinetics of yeast β -fructofuranosidase a polydisperse system". Biochem. Biophys. Acta, 178, 347-353, (1969).
5. BESSERDICH, H.H.; KAHRIG, E.; KRENZ, R. e KIERSTEIN, D. - "Kinetische Untersuchungen zur substratüberschusshemmung gelöster und trägerfixierter invertase". J. Mol. Catal., 2, 361-367, (1977).
6. BOCK, K. e LEMIEUX, R.U. - "The conformational properties of Sucrose in aqueous solution: Intramolecular hydrogen-bonding". Carbohydr. Res., 100, 63-74, (1982).

7. BOWSKI, L.; SAINI, R.; RYU, D.Y. e VIETH, W.R. - "Kinetic Modeling of the Hydrolysis of Sucrose by Invertase". Biotech. Bioeng., 13, 641-656, (1971).
8. BRIAN, P.L.T.; HALES, H.B. - "Effects of Transpiration and Changing Diameter on Heat and Mass Transfer to Spheres". AIChE J., 15(3), 419-425, (1969).
9. BRIAN, P.L.T.; HALES, H.B. e SHERWOOD, T.K. - "Transport of Heat and Mass Between Liquids and Spherical Particles in an Agitated Tank". AIChE J., 15(5), 727-733, (1969).
10. BUCHHOLZ, K. - "Reaction Engineering Parameters for Immobilized Biocatalysts". Advances in Biochemical Engineering, 24, 39-69, (1982).
11. CARNAHN, B.; LUTHER, H.A.; WILKES, J.O. - "Applied Numerical Methods". New York, J. Wiley, (1969).
12. CHANDRASEKARAN, S.K. e KING, C.J. - "Multicomponent Diffusion and Vapor-Liquid Equilibria of Dilute organic components in Aqueous Sugar Solutions". AIChE J., 18(3), 513-519, (1972).
13. CHEETHAM, P.S.J.; BLUNT, K.W. e BUCKE, C. - "Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels". Biotech. Bioeng., 21, 2155-2168, (1979).

14. COMBES, D.; MONSAN, P. e MATHLOUTHI, M. - "Enzymic hydrolysis of Sucrose". Carbohydr. Res., 93, 312-316, (1981).
15. COMBES, D.; MONSAN, P. - "Sucrose hydrolysis by invertase. Characterization of Products and Substrate inhibition". Carbohydr. Res., 117, 215-228, (1983).
16. COSTA, F.A. de A. - "Contribuição ao Estudo de Produção de Invertase Extracelular por Leveduras". Tese de Mestrado: Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, (1986).
17. CRANK, J. - "The mathematics of diffusion" 2^a ed. Oxford, Clarendon, (1975).
18. CUSSLER, E.L. - "DIFFUSION - Mass transfer in fluid systems". Cambridge, Cambridge University Press (1984).
19. DICKENSHEETS, P.A.; CHEN, Li Fu e TSAO, G.T. - "Characteristics of Yeast Invertase Immobilized on Porous Cellulose Beads". Biotech. Bioeng., 19, 365-375, (1977).
20. DURAND, G. e MONSAN, P. - "LES ENZYMES - Production et utilisations industrielles". Bordas, Paris, (1982).
21. EINSTEIN, A. - "investigations on the theory of Brownian Movement". Dover Publ. Inc., New York, 54-56, (1956).

22. ENGLISH, A.C. e DOLE, M. - "Diffusion of Sucrose in Supersaturated Solutions". J. Am. Chem. Soc., 72, 3261-3267, (1950).
23. FINK, D.J.; NA, T. e SCHULTZ, J.S. - "Effectiveness Factor Calculations for Immobilized Enzyme Catalysts". Biotech. Bioeng., 15, 879-888, (1973).
24. FROWS, M.J.; VELLENGA, K. e WILT, H.G.J. - "Combined External and internal Mass Transfer Effects in Heterogeneous (Enzyme) Catalysis". Biotech. Bioeng., 18, 53-62, (1976).
25. FURUSAWA, T. e SMITH, J.M. - "Fluid-Particle and Intraparticle Mass Transport Rates in Slurries". Ind. Eng. Chem. Fundam., 12(2), 197-203, (1973).
26. GASCÓN, S. e LAMPEN, J.O. - "Purification of the internal invertase of yeast". J. Biol. Chem., 243, 1567-1572, (1968).
27. GASCÓN, S. e OTTOLENGHI, P. - "Invertase isozymes and their localization in yeast". C. R. Trav. Lab. Carlsberg, 36, 85-93, (1967).
28. GEORGAKIS, C.; CHAN, P. C-H. e ARIS, R. - "The Design of Stirred Reactors With Hollow Fiber Catalysts for Michaelis-Menten Kinetics". Biotech. Bioeng., 27, 99-106, (1975).

29. GRECO Jr, G. e GIANFREDA, L. - "An Experimental Technique for discrimination between Series and Parallel mechanisms of Enzyme deactivation". Biotech. Letters, 6(11), 693-698, (1984).
30. HENLEY, J.P. e SADANA, A. - "Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism". Enzyme Microb. Technol., 7, 50-60, (1985).
31. HENRION, P.N. - "Diffusion in Sucrose + Water System". Trans. of Faraday Soc., 60, 72-74, (1964).
32. HORVATH, C. e ENGASSER, J.M. - "External and Internal Diffusion in Heterogeneous Enzyme Systems". Biotech. Bioeng., 16, 909-923, (1974).
33. HUSAIN, Q.; IQBAL, J. e SALEEMUDDIN, M. - "Entrapment of Concanavalin A-Glycoenzyme Complexes in Calcium Alginate Gels". Biotech. Bioeng., 27, 1102-1107, (1985).
34. JOHANSEN, A. e FLINK, J.M. - "Influence of alginate properties on Sucrose inversion by immobilized whole cell invertase". Enzyme Microb. Technol., 8, 485-490, (1986).
35. JOHANSEN, A. e FLINK, J. M. - "Immobilization of yeast cells by internal gelation of alginate". Enzyme Microb. Technol., 8, 145-148, (1986).

36. KELLER, K.H.; CANALES, E.R. e SU II YUM. - "Tracer and Mutual Diffusion Coefficients of Proteins". J. Phys. Chem., 75, 379-387, (1971).
37. KIERSTAN, M.; DARCY, G. e REILLEY, J. - "Studies on the characteristics of Alginate Gels in Relation to their Use in Separation and Immobilization Applications". Biotech. Bioeng., 24, 1507-1517, (1982).
38. LEVINS, D.M. e GLASTONBURY, J.R. - "Application of Kolmogoroff's theory to particle-liquid mass transfer in agitated vessels". Chemical Eng. Science, 27, 537-543, (1972).
39. LEVINS, D.M. e GLASTONBURY, J.R. - "Particle-Liquid Hydrodynamics and Mass Transfer in a Stirred Vessel - Part II - Mass Transfer". Trans. Instn. Chem. Engrs., 50, 132-146, (1972).
40. LÓPEZ SANTIN, J.; SOLÀ, J.M. e CAMINAL, G. - "Invertase Immobilized on Activated Clay: Properties and Kinetic Study". J. Chem. tech. Biotechnol., 33B, 101-106, (1983).
41. MAEDA, H. e SUZUKI, H. - "Preparation of Immobilized Invertase". Biotech. Bioeng., 15, 403-412, (1973).
42. MANSFELD, J. e SCHELLENBERGER, A. - "Invertase Immobilized on Macroporous Polystyrene: Properties and Kinetic Characterization". Biotech. Bioeng., 29, 72-78, (1987).

43. MARCONI, W.; GULINELLI, S. e MORISI, F. - "Properties and Use of Invertase Entrapped in Fibers". Biotech. Bioeng., 16, 501-511, (1974).
44. MASON, R.D. e WEETALL, H.H. - "Invertase covalently coupled to Porous Glass: Preparation and Characterization". Biotech. Bioeng., 14, 637-645, (1972).
45. MATHLOUTHI, M.; LUU, C.; MEFEROY-BIGET, A.M. e LUU, D.V. - "LASER-RAMAN study of Solute-Solvent interations in aqueous Solutions of D-Fructose, D-Glucose and Sucrose". Carbohydr. Res., 81, 213-223, (1980).
46. MATHLOUTHI, M. - "X-Ray diffraction study of the molecular association in aqueous solutions of D-fructose, D-glucose, and Sucrose". Carbohydr. Res., 91, 113-123, (1981).
47. McBAIN, J.W. e LIU, T.H. - "Diffusion of Eletrolytes, non-Eletrolytes and colloidal Eletrolytes". J. Amer. Chem. Soc., 53, 59-73, (1931).
48. MERCHANT, F.J.A.; MARGARITIS, A. e WALLACE, J.B. - "A Novel Technique for Measuring Solute Diffusivities in Entrapment Matrices Used in Immobilization". Biotech. Bioeng., 30, 936-945, (1987).
49. MESSING, R.A. - "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors". New York, Academic Press, Inc. (1975).

50. MILLER, G.L. - "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". Analytical Chem., 31, 426-428, (1959)
51. MOGENSEN, A.O. e VIETH, R. - "Mass Transfer and Biochemical Reaction with Semipermeable Microcapsules". Biotech. Bioeng., 15, 467-481, (1973).
52. MONSAN, P.; COMBES, D. e ALEMZADEH I. - "Invertase Covalent Grafting onto corn Stover". Biotech. Bioeng., 26, 658-664, (1984).
53. MYRBACK, K. - "Invertases". In: the Enzymes. BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBACK, K., eds. Academic Press, N.Y., (1960).
54. NAGATA, S. - "MIXING - Principles and application". Tokio, Kodansha, (1975).
55. NEUMANN, N.P. e LAMPEN, J.O. - "Purification and properties of yeast invertase". Biotechnology, 6, 468-475, (1967).
56. NORRISH, R.S. - "Selected Tables of Physical Properties of Sugar Solutions". Leatherhead, BFMIRA. British Food Manufacturing Industries Research Association. Scientific and Technical Surveys, 51, July (1967).
57. O'NEILL, S.P. - "External Diffusional Resistances in Immobilized-Enzyme Catalysis". Biotech. Bioeng., 14, 675-678, (1972).

58. OOSHIMA, H.; SAKIMOTO, M. e HARANO, Y. - "Kinetic Study on Thermal Stability of Immobilized Invertase". Biotech. Bioeng., 22, 2169-2178, (1980).
59. PIGMAN, W. e HORTON, D. - "THE CARBOHYDRATES - Chemistry and Biochemistry", ed. by W. Pigman, D. Horton and A. Herp, 2^a ed. N.Y., Academic Press (1970).
60. RAMACHANDRAN, P.A. - "Solution of Immobilized Enzyme Problems by Collocation Methods". Biotech. Bioeng., 17, 211-226, (1975).
61. REED, G. - "Invertases In: Enzymes in Food Processing". REED, G., ed Academic Press, N.Y., (1975).
62. REGAN, D.L.; LILLY, M.D. e DUNNILL, P. - "Influence of Intraparticle Diffusional Limitation on the Observed Kinetics of Immobilized Enzymes and on Catalyst Design". Biotech. Bioeng., 16, 1081-1093, (1974).
63. RODRIGUEZ, L.; RUIZ, T.; VILLANUEVA, J.R. e SENTANDREU, R. - "Yeast invertase: subcellular distribution and possible relationship between the isoenzymes". Current Microbiol., 1, 41-44, (1978).
64. RONY, P.R. - "Multiphase Catalysis II. Hollow Fiber Catalysts". Biotech. Bioeng., 13, 431-447, (1971).

65. SCATCHARD, G. - "The Hydration of Sucrose in Water Solution as Calculated from vapor-pressure measurements". J. Am. Chem. Soc., 43, 2406-2418, (1921).
66. SCHWARTZBERG, H.G. e CHAO, R.Y. - "Solute Diffusivities in Leaching Processes". Food Technology, 36(2), 73-86, (1982).
67. TANAKA, H.; MATSUMURA, M. e VELIKY, I.A. - "Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads". Biotech. Bioeng. 26, 053-058, (1984).
68. TESHIMA, H. e OHASHI, Y. - "Particle to Liquid Mass Transfer in a Rotating Catalyst Basket Reactor". J. Chem. Engrs. of Japan, 10(1), 70-72, (1977).
69. TODA, K. e SHODA, M. - "Sucrose Inversion by Immobilized Yeast Cells in a Complet Mixing Reactor". Biotech. Bioeng., 17, 481-497, (1975).
70. TUWINER, S.B. - "Diffusion and Membrane Technology". by Tuwiner, L.; Miller, L.P. and Brown, W.E., New York. Reinhold Publishing Corporation (1962).
71. VIETH, W.R.; MENDIRATTA, A.K.; MOGENSEN, A.O.; SAINI, R. e VENKATASUBRAMANIAN, A.O. - "Mass transfer and biochemical reaction in enzyme membrane reactor systems - I. Single enzyme reactions". Chem. Eng. Science, 28, 1013-1020, (1973).

72. WADIAK, D.T. e CARBONELL, R.G. - "Effectiveness Factors for Substrate and Product Inhibition". Biotech. Bioeng., 17, 1761-1773, (1975).

73. WADIAK, D.T. e CARBONELL, R.G. - "Kinetic Behavior of Microcapsulated β -Galactosidase". Biotech. Bioeng., 17, 1157-1181, (1975).

A N E X O I

MODELAGEM MATEMÁTICA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUANTO A TEMPERATURA

A atividade enzimática é medida através da taxa inicial de reação ($-dS/dt$), pela seguinte relação:

$$a = - \frac{dS}{dt} \cdot V \quad (I.1)$$

e para altas temperaturas, onde se verifica a inativação térmica, pela relação:

$$a = - \frac{\Delta S}{\Delta t} \cdot V \quad (I.2)$$

com Δt pré fixado.

Partindo-se das equações 6, 9 e 20, na forma:

$$K = K_o \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (I.3)$$

$$E = E_o \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (I.4)$$

$$K_d = K_{do} \cdot \exp(-E_d/RT) \quad (I.5)$$

e da equação da cinética de inibição pelo substrato, para taxas iniciais de reação,

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{K' \cdot E}{V} \cdot \frac{S}{K_m + S + S^2/K_i} \quad (I.6)$$

Na medida da atividade, S é fixo e constante, assumindo-se K_i independentes da temperatura, o termo da direita da equação I.6 é constante, podendo ser englobado em K' . Fazendo-se $K=K' \cdot S/(K_m+S+S^2/K_i)$, reescreve-se a equação I.6 como:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{K \cdot E}{V} \quad (I.7)$$

Substituindo-se a equação I.4 em I.7, obtém-se:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{K}{V} \cdot E_o \cdot \exp(-K_d \cdot t) \quad (I.8)$$

Integrando-se a equação I.8 de S_o a S no tempo de 0 a t pré fixado, chega-se a:

$$(S_0 - S) = \frac{K \cdot E_0}{V \cdot k_d} \cdot [1 - \exp(-k_d \cdot t)] \quad (I.9)$$

fazendo-se: a_0 , como atividade se não houvesse inativação térmica e a , atividade medida no tempo t , ou seja:

$$a_0 = K \cdot E_0 \quad (I.10)$$

$$a = \frac{(S_0 - S)}{t} \cdot V \quad (I.11)$$

Substituindo-se as equações I.10 e I.11 em I.9, chega-se a equação geral, na forma:

$$a = a_0 \cdot \left[\frac{1 - \exp(-k_d \cdot t)}{k_d \cdot t} \right] \quad (I.12)$$

$$\text{onde: } a_0 = a^* \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (I.12a)$$

$$K_d = K_{d0} \cdot \exp(-E_d/RT) \quad (I.12b)$$

Da equação geral I.12, obtém-se a modelagem da atividade versus temperatura, como esquematizado nas Figuras 1 e 2.

A equação geral I.12, admite algumas simplificações, que são os casos particulares para baixas e para altas temperaturas. casos particulares:

a) para baixas temperaturas, onde não se verifica a desativação térmica, $K_d \cdot t \rightarrow 0$, e

$$\lim_{k_d \cdot t \rightarrow 0} \left[\frac{1 - \exp(-k_d \cdot t)}{k_d \cdot t} \right] = 1$$

neste caso a equação geral, recai na forma de Arrhenius para baixa temperatura, ou seja: $a = a^* \cdot \exp(-E_a/RT)$.

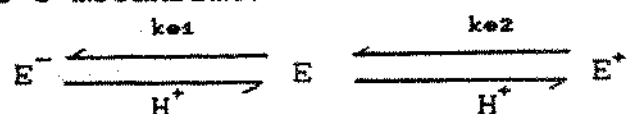
b) para altas temperaturas, $\exp(-K_d \cdot t) \ll 1$, e

$$\left[\frac{1 - \exp(-K_d \cdot t)}{K_d \cdot t} \right] = \frac{1}{K_d \cdot t}, \text{ logo: } a = \frac{a_0}{K_d \cdot t}$$

A N E X O I I

MODELAGEM MATEMÁTICA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA QUANTO AO pH

Baseando-se no mecanismo sugerido por Laidler (7), a invertase mantém um equilíbrio dinâmico com os prótons em solução, segundo o mecanismo:



com: $k_{e2} = E^+ / (E \cdot H^+)$ e $k_{e1} = (E^- \cdot H^+) / E$

onde: E = concentração da enzima ativa

E^- e E^+ = concentração das formas inativas

H^+ = concentração de prótons

E_t = concentração total de enzima (ativa + inativa)

$E_i = E^+ + E^-$ = concentração total da enzima inativa

k_{e2} , k_{e1} = constantes de equilíbrio

Partindo-se das constantes de equilíbrio k_1 e k_2 , pode-se escrever as concentrações de enzima inativas E^+ e E^- , na forma:

$$E^+ = k_{e2} \cdot (E_t - E_i) \cdot H^+ \quad (II.1)$$

$$E^- = k_{e1} \cdot (E_t - E_i) / H^+ \quad (II.2)$$

Somando-se as equações II.1 e II.2,

$$E^+ + E^- = E_i = (E_t - E_i) \cdot (k_{e2} \cdot H^+ + k_{e1} / H^+) \quad (II.3)$$

$$\frac{E_i}{E_t} = \frac{k_{e2} \cdot H^+ + k_{e1} / H^+}{1 + k_{e2} \cdot H^+ + k_{e1} / H^+} \quad (II.4)$$

Partindo-se da definição de atividade $a = K \cdot E$

$$a = K \cdot (E_t - E_i) \quad (II.5)$$

$$a = K \cdot E_t (1 - E_i / E_t) \quad (II.6)$$

Substituindo-se a equação II.4 em II.6, chega-se a:

$$a = K \cdot E_t \cdot (1 + k_{e2} \cdot H^+ + k_{e1} / H^+)^{-1} \quad (II.7)$$

Para o ponto de máxima atividade: $da/dH^+ = 0$ e $H^+ = 10^{-pH_m}$,
onde: $pH_m = pH$ de máxima atividade.

Derivando-se a equação II.7 em relação a H^+ , para o ponto de máxima atividade, obtém-se uma relação entre as constantes de equilíbrio, na forma:

$$k_{e2} = k_{e1}/10^{-2pH_m} \quad (II.8)$$

Substituindo-se a equação II.8 em II.7 e fazendo-se $H^+ = 10^{-pH}$, chega-se a seguinte relação geral:

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{K.E_t} + \frac{k_{e1}}{K.E_t} \cdot [10^{(2pH_m - pH)} + 10^{pH}] \quad (II.9)$$

Pela equação geral II.9, tem-se uma relação linear entre:

$$1/a \text{ em função de } (10^{(2pH_m - pH)} + 10^{pH}) \quad (II.10)$$

Procedimento de ajuste: através de dados experimentais de atividade em função do pH e colocados na forma expressa pela relação II.10, pode-se ajustar a melhor curva aos dados experimentais. Porém, o pH_m não é conhecido com precisão. Desta forma, através de um programa computacional, varia-se pH_m até obter a melhor correlação linear, determinando em consequência: pH_m , k_{e1} = coeficiente angular/ coeficiente linear, k_{e2} (pela equação II.8) e $K.E_t = 1/(\text{coeficiente linear})$.

A N E X O I I I

FATORES DE CORREÇÃO PARA TAXAS INICIAIS DE REAÇÃO SOBRE A CINÉTICA DE INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO.

Escrevendo-se as taxas iniciais de reação observadas, como:

$$v_{obs} = v^* \cdot f(S) \quad (III.1)$$

onde: v_{obs} = taxa inicial de reação observada

v^* = taxa inicial de reação seguindo o modelo de inibição pelo substrato.

$f(S)$ = fator de correção (desvio da cinética de inibição pelo substrato).

Serão feitas aqui, três suposições acerca do fator de correção $f(S)$.

1ª suposição

$$f(S) = W_f/W_t \text{ (como sugerido por Bowski)} \quad (III.2)$$

onde: W_f = concentração de água livre

W_t = concentração de água total (livre + ligada)

A diferença entre a concentração de água livre (W_f) e a concentração de água total (W_t), se deve ao efeito de ligação de água na molécula de sacarose (correspondente ao número de hidratação n).

As seguintes relações a seguir, podem ser escritas:

$$W_t = (\rho - 342.S)/18 \quad (III.3)$$

$$W_f = W_t - n.S \quad (III.4)$$

Através de tabelas da literatura (56) sobre densidades de soluções de sacarose, pode-se escrever a densidade da mesma, como uma função linear da concentração:

$$\rho = \rho_0 + \delta.S \quad (III.5)$$

onde: ρ = densidade da solução (g/l)

ρ_o = densidade da água (g/l)

S = concentração da sacarose (mol/l)

n = número de hidratação

δ = constante de proporcionalidade (g/mol)

$$\frac{W_f}{W_t} = \frac{W_t - n.S}{W_t} \quad (\text{III.6})$$

Substituindo-se as equações III.3 e III.5 em III.6, obtém-se:

$$f(S) = \frac{W_f}{W_t} = 1 - \frac{18.n.S}{\rho_o + (\delta - 342).S} \quad (\text{III.7})$$

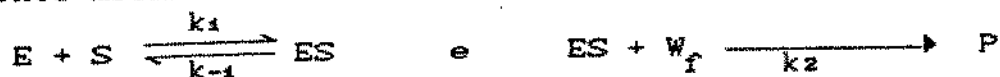
2ª suposição:

$$f(S) = W_f/W_o \quad (\text{III.8})$$

onde: W_f = concentração de água livre

W_o = concentração de água pura

O argumento para esta suposição, é análoga a anterior, ou seja, que a água ligada não seja disponível à reação e que a mesma influencie na formação de produtos de reação, pelo seguinte mecanismo:



A partir destas suposições,

$$v = k_2 \cdot ES \cdot W_f \quad (\text{III.9})$$

$$V_{\max} = k_2 \cdot E_t \cdot W_o \quad (\text{III.10})$$

$$\text{Desta forma:} \quad v_{\text{obs}} = v \cdot W_f/W_o \quad (\text{III.11})$$

Pelas equações III.4, III.3 e

$$W_o = \rho_o/18, \text{ obtém-se:} \quad (\text{III.12})$$

$$W_f = \frac{\rho - 342 \cdot S}{18} - n.S \quad (\text{III.13})$$

$$W_f = \frac{(\rho_o - \delta \cdot S)}{18} - \frac{342 \cdot S}{18} - n \cdot S \quad (\text{III.14})$$

obtem-se a equação geral na forma:

$$\frac{W_f}{W_o} = 1 + \frac{18}{\rho_o} \left[\frac{\delta}{18} - \frac{342}{18} - n \right] \cdot S \quad (\text{III.15})$$

3ª suposição:

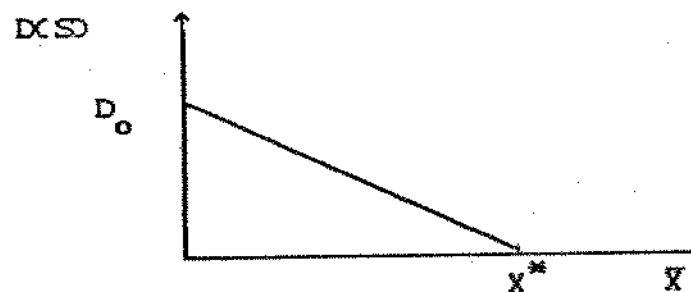
$$f(S) = D(S)/D_o \quad (\text{III.16})$$

onde: $D(S)$ = difusividade molecular da sacarose à concentração S de sacarose.

D_o = difusividade molecular da sacarose à diluição infinita.

Bowski testou esta correção de forma inadequada, já que utilizou a correção baseada nas equações de Stokes-Einstein e Michaelis-Menten e não sobre a cinética de inibição pelo substrato.

Segundo os dados de ENGLISH e DOLE (22), em que a difusividade $D(S)$ decresce linearmente com a concentração de sacarose em % em peso, e a extrapolação de $D(S)=0$ é assumida ao redor de 81% em peso, como ilustrado abaixo.



onde: $\bar{X}$ = concentração de sacarose em (g/g)

$$X^* = 0,81 \text{ g/g}$$

Assim sendo, tem-se:

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_0} = 1 - \frac{1}{X^*} \cdot \bar{X} \quad (\text{III.17})$$

Sendo que normalmente se trabalha com concentração de sacarose S em mol/l, a relação de conversão pode ser escrita na forma:

$$\bar{X} = S \cdot M / \rho$$

onde: S = concentração de sacarose em mol/l

ρ = densidade da solução em g/l

M = peso molecular da sacarose (342 g/mol)

Sendo $\rho = \rho_0 + \delta \cdot S$

$$X = \frac{S \cdot M}{\rho_0 + \delta \cdot S} \quad (\text{III.18})$$

Obtém-se a relação geral na forma:

$$f(S) = \frac{D(S)}{D_0} = 1 - \frac{M}{X^*} \cdot \frac{S}{\rho_0 + \delta \cdot S} \quad (\text{III.19})$$

Através de dados de densidades tabuladas na literatura, obtém-se:

a 40°C: $\rho = 992,2 + 126,575 \cdot S$

$$\frac{D(S)}{D_0} = 1 - 0,4255 \cdot \frac{S}{1 + 0,1276 \cdot S} \quad (\text{III.20})$$

a 50°C: $\rho = 988,0 + 125,945 \cdot S$

$$\frac{D(S)}{D_0} = 1 - 0,4274 \cdot \frac{S}{1 + 0,1275 \cdot S} \quad (\text{III.21})$$

A Tabela III.1, mostra os fatores $f(S)$, calculados a partir das equações III.20 e III.21.

Tabela III.1 : Fatores $f(S)$ em função de S , baseados na difusividade de massa

S (mol/l)	$f(S)$ a 40°C	$f(S)$ a 50°C
0,00532	0,9977	0,9977
0,01083	0,9955	0,9955
0,01595	0,9932	0,9932
0,02127	0,9910	0,9909
0,03190	0,9865	0,9864
0,04253	0,9820	0,9819
0,05316	0,9775	0,9774
0,08506	0,9642	0,9640
0,1063	0,9554	0,9552
0,1329	0,9444	0,9441
0,1595	0,9335	0,9333
0,2127	0,9119	0,9115
0,2658	0,8906	0,8901
0,3987	0,8386	0,8378
0,5316	0,7882	0,7872
0,7974	0,6920	0,6906
1,063	0,6017	0,5997
1,329	0,5165	0,5143
1,595	0,4361	0,4335

ANEXO IV

METODO DAS DIFERENÇAS FINITAS

Partindo-se da equação 38, pode-se escrever:

$$\frac{d^2 C^*}{dX^2} + \frac{2}{X} \frac{dC^*}{dX} = F(C^*) \quad (\text{IV.1})$$

onde:

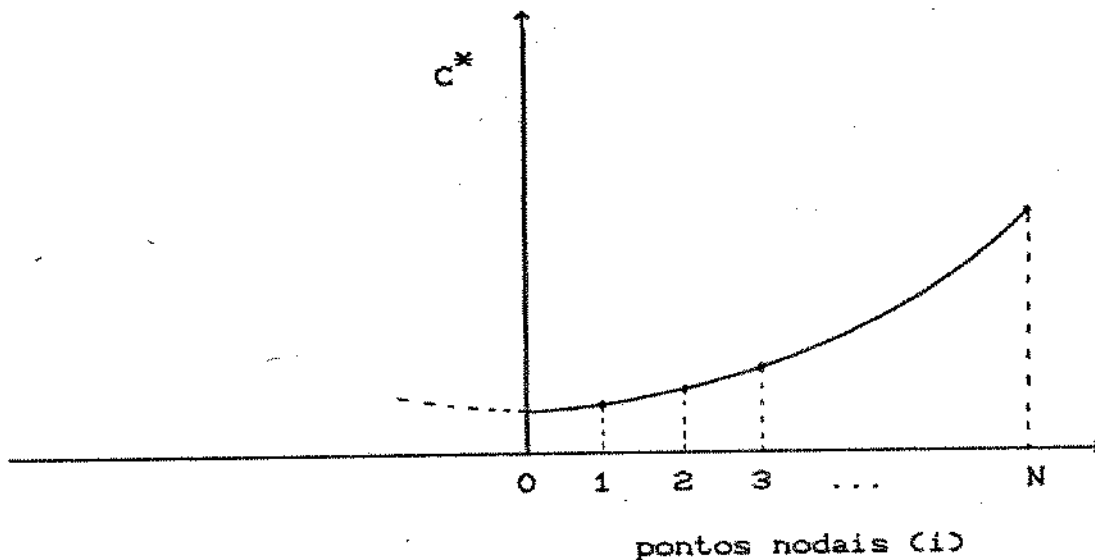
$$F(C^*) = \frac{\beta \cdot K_1^* \cdot C^*}{C^* + K_1^* + K_2^* \cdot C^{*2}} \quad (\text{IV.2})$$

com condições iniciais:

$$C^*|_{X=0} = 1 \quad (\text{IV.3})$$

$$\frac{dC^*}{dX}|_{X=0} = 0 \quad (\text{IV.4})$$

Dividindo-se o perfil de concentração C^* em N intervalos iguais, com N+1 pontos nodais, como mostrado na figura a seguir:



onde: $i=0$ (centro da esfera)

$i=N$ (superfície da esfera)

$h=1/N$ (passo de X)

$X = i \cdot h$

Pelo método das diferenças finitas: fazendo-se $U = C^*$

$$\frac{dU(i)}{dx} = \frac{U(i+1) - U(i-1)}{2h} \quad \text{(IV.5)}$$

$$\frac{d^2 U(i)}{dx^2} = \frac{U(i-1) - 2U(i) + U(i+1)}{h^2} \quad \text{(IV.6)}$$

Para $i=0$ (centro da esfera)

$$\lim_{X \rightarrow 0} \frac{2}{X} \cdot \frac{dU}{dX} = 2 \frac{d^2 U}{dx^2} \quad (\text{regra de L'Hopital}) \quad \text{(IV.7)}$$

Substituindo-se a equação IV.7 em IV.1 para $X=0$, obtém-se:

$$3 \frac{d^2 U(0)}{dx^2} = F[U(0)] \quad \text{(IV.8)}$$

a qual colocada na forma da equação IV.6, para $i=0$, fica:

$$3 \left[\frac{U(i-1) - 2U(i) + U(i+1)}{h^2} \right] = F[U(0)] \quad \text{ou}$$

$$3 \left[\frac{U(-1) - 2U(0) + U(1)}{h^2} \right] = F[U(0)] \quad \text{(IV.9)}$$

$$\text{sendo: } \frac{dU}{dx}(0) = 0 = \frac{U(1) - U(-1)}{2h} \quad \text{(IV.10)}$$

$$U(1) = U(-1)$$

Substituindo-se a equação IV.10 em IV.9, obtém-se a equação para determinação de U no segundo ponto nodal $U(1)$, já que se conhece o primeiro ponto nodal $U(0)$.

$$U(1) = U(0) + \frac{h^2}{6} \cdot F[U(0)] \quad \text{(IV.11)}$$

para $i=1$ a $N-1$

Da equação geral IV.1 e aplicando-se a regra das diferenças finitas IV.5 e IV.6, escreve-se a mesma na forma geral:

$$\frac{U(i-1) - 2U(i) + U(i+1)}{h^2} + \frac{2}{1 \cdot h} \cdot \frac{U(i+1) - U(i-1)}{2h} = F[U(i)] \quad \text{(IV.12)}$$

Reagrupando os termos da equação IV.12, chega-se a:

$$UC_{i+1} = \frac{1}{i+1} \left[h^2 \cdot F [UC_i] - (1 - 1/i) \cdot UC_{i-1} + 2UC_i \right] \quad (IV.13)$$

Para a determinação de $\frac{dU}{dX}(N)$, calcula-se um ponto fictício fora da esfera UC_{N+1} , utilizando-se da equação IV.13 para $i=N$.

$$\frac{dU}{dX}(N) = \frac{UC_{N+1} - UC_{N-1}}{2h} \quad (IV.14)$$

O método numérico consiste em estimar β , K_1^* e K_2^* , partindo-se de $UC(0)=1$, determinando $UC(1)$ através da equação IV.11 e $UC(2)$ e UC_{N+1} pela equação IV.13 e $\frac{dU}{dX}(N)$ pela equação IV.14.

Para a conversão do perfil de concentração da forma transformada para a forma original, deve-se determinar o parâmetro A, pela equação a seguir:

$$A = \left[\frac{1}{\alpha_p} \cdot \frac{dU}{dX}(N) + UC_N \right]^{-1} \quad (IV.15)$$

e converter:

$$C(i) = UC(i) \cdot A$$

$$K_1 = K_1^* \cdot A$$

$$K_2 = K_2^* / A$$

$$\frac{dC}{dX}(N) = \frac{dU}{dX}(N) \cdot A$$

O fragmento de programa a seguir, determina valores de k_1 , K_2 , $dC/dX|_{X=1}$ bem como $C(i)$ para $i=0$ a N , a partir da estimativa de β , α_p , K_2^* e K_1^* .

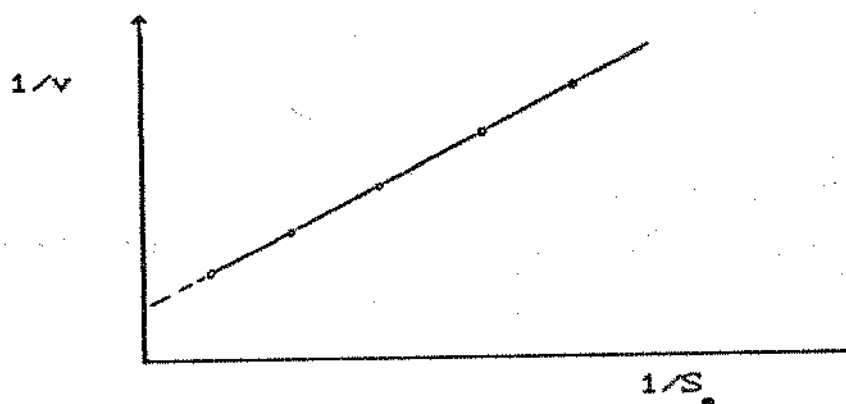
Programa computacional

```
15 INPUT "numero de Sherwood modificado: ALFA="; ALFA
20 INPUT "numero de intervalos: N="; N
25 H = 1/N
30 INPUT "Parametro beta: B="; B
35 INPUT "Parametro k2 asterisco: k2ast="; K2AST
40 DIM UCN+2),FCN+1),CCN+1)
45 INPUT "Parametro k1 asterisco: k1ast="; K1AST
50 UC0) = 1
55 UC1)=UC0)+(CH^2)/6)*(B*K1AST*UC0))/(UC0)+K1AS+k2AST*(UC0)^2)
60 FOR I=1 TO N
65 FC1)=B*K1AST*UC1)/(UC1)+K1AST+K2AST*(UC1)^2)
70 UKI+1)=(CI/CI+1))*(CH^2*FC1) + 2*UC1) - (1-1/I)*UKI-1))
75 NEXT I
80 DERIV = (UCN+1)-UCN-1))/(2*H)
85 REM "CALCULO DE A"
90 A = 1/(DERIV/ALFA + UCN)
95 K1 = K1AST*A
100 K2 = K2AST/A
105 DC = DERIV*A
110 FOR I=1 TO N
115 CCI) = UKI)*A
120 NEXT I
```

ANEXO V

Determinação de β segundo a equação: $\beta = \frac{R^2 \cdot V_{\max}}{K_m \cdot D_e}$

A partir de dados experimentais de taxa de reação (v) em função da concentração superficial (S_s), pode-se normalizar os dados na forma de Lineweaver-Burk como esquematizado no gráfico a seguir:



Pode-se prever taxas de reação, a partir de parâmetros aparentes na forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}^{ap}} + \frac{K_m^{ap}}{v_{\max}^{ap}} \cdot \frac{1}{S_s} \quad (V.1)$$

O modelo de Michaelis-Menten, sempre assume a condição de cinética de primeira ordem quando $S \rightarrow 0$ ($S \ll K_m$), podendo-se escrever a equação V.1 na forma:

$$\lim_{S_s \rightarrow 0} \left[\frac{v}{S_s} \right] = \frac{v_{\max}}{K_m^{ap}} \quad (V.2)$$

onde: K_m^{ap} = constante de Michaelis-Menten aparente.

Para cinética de primeira ordem, a equação proveniente do balanço de massa:

$$\frac{d^2C}{dX^2} + \frac{2}{X} \frac{dC}{dX} = \beta \cdot C \quad (V.3)$$

admite solução analítica, e o gradiente adimensional de concentração na superfície pode ser escrito como:

$$\left. \frac{dC}{dX} \right|_{X=1} = \frac{j \cdot R}{D_e \cdot S_b} = C(1) \cdot \left[\frac{\phi}{\tanh \phi} - 1 \right] \quad (V.4)$$

onde: j = fluxo de massa = $v \cdot R/3$

R = raio da matriz

D_e = difusividade efetiva de substrato

S_b = concentração de substrato no reator

$C(1) = S_a/S_b$ = concentração adimensional de substrato na superfície da matriz.

ϕ = módulo de Thiele para cinética de 1^a ordem

V_{max} , K_m = parâmetros intrínsecos da enzima imobilizada

$$\beta = \phi^2$$

Substituindo-se o fluxo de massa (j) em termos de taxas de reação (v) na equação V.4 :

$$\frac{v \cdot (R/3) \cdot R}{D_e \cdot S_b} = \frac{S_a}{S_b} \cdot \left[\frac{\phi}{\tanh \phi} - 1 \right] \quad \text{ou}$$

$$\frac{v}{S_a} \cdot \frac{R^2}{3 \cdot D_e} = \frac{\phi}{\tanh \phi} - 1 \quad (V.5)$$

Substituindo-se a equação V.2 em V.5, chega-se a:

$$\frac{\phi}{\tanh \phi} = 1 + \frac{1}{3} \cdot \frac{V_{max}}{K_m^{ap}} \cdot \frac{R^2}{D_e} \quad (V.6)$$

Determinando-se $(V_{max}/K_m)^{ap}$ e conhecendo-se R e D_e , pode-se determinar o valor de ϕ .

Sendo $\beta = \phi^2$, determina-se β .