

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E
INFORMÁTICA

ESTUDO E MODELAGEM DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO
DA BROMELINA POR MICELAS REVERSAS EM UMA
COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSANTES

Autor : Gilvan Anderson Fischer

Orientador : Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

FEVEREIRO / 2006
CAMPINAS – SÃO PAULO

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

F523e Fischer, Gilvan Anderson
Estudo e modelagem do processo de extração da
bromelina por micelas reversas em uma coluna de
campânulas pulsantes / Gilvan Anderson Fischer.--
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Extração (Química). 2. Redes neurais
(Computação). 3. Bromelina. 4. Micelas. 5.
Modelagem de dados. I. Tambourgi, Elias Basile. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Study and modeling of bromelain extraction process by
reversed micelles in a pulsed cap column

Palavras-chave em Inglês: Bromelain, Reversed micelles, Extraction,
Modeling, Neural network

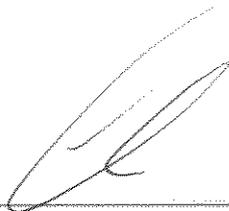
Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutor em Engenharia Química

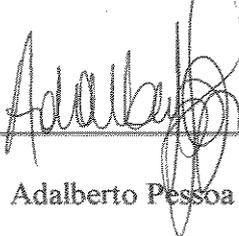
Banca examinadora: Adalberto Pessoa Junior, Flávio Vasconcelos da Silva,
Francislene Andréia Hasmann e Michele Vitolo

Data da defesa: 23/02/2006

Tese de Doutorado defendida por Gilvan Anderson Fischer e aprovada em 23 de fevereiro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



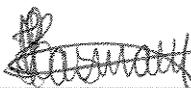
Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi – Orientador – Unicamp



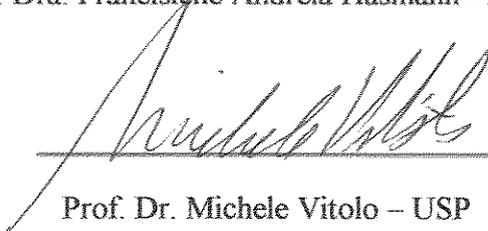
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. – USP



Prof. Dr. Flávio Vasconcelos da Silva – Unicamp



Prof. Dra. Francislene Andréia Hasmann - Faenquil



Prof. Dr. Michele Vitolo – USP

Esta redação corresponde a versão final da Tese de Doutorado defendida por Gilvan Anderson Fischer em 23 de fevereiro de 2006.

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi – Orientador

*Dedico:
A toda minha Família, especialmente para meu
pai Avelino Alcindo Fischer (in memoriam).*

Agradecimentos

A Deus.

Ao professor Elias Basile Tambourgi, pela orientação, amizade e incentivo que estiveram presentes durante o desenvolvimento do projeto.

A professora Ana M. Frattini Fileti pelo auxílio, amizade, e pela oportunidade do estágio docência, muito importantes durante a execução do projeto.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química pelo apoio e amizade dispensados durante a realização do trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

À minha família pelo incentivo, apoio, amizade, interesse e paciência que foram a mim dispensados.

A todos os amigos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Resumo

Bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. Com a necessidade de desenvolver novos processos de purificação e concentração desses compostos a extração líquido-líquido por micela reversa mostra-se como uma técnica atrativa, pois possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, como o extrato bruto do abacaxi. Dentre os equipamentos disponíveis para a extração líquido-líquido foi usada uma micro-coluna de campânulas pulsantes, visando a separação e purificação de biomoléculas em operação contínua. A melhor condição de extração da bromelina com micelas reversas em operação batelada foi aplicada na coluna de extração. Com o objetivo de encontrar as condições ótimas de operação da coluna foi utilizada a técnica de planejamento de experimentos do tipo estrela, de forma a abranger toda região de operação. Para isto variou-se a razão Vazão Fase Leve/Vazão Total e o intervalo entre os pulsos na entrada para determinar as variações na saída do rendimento de proteína total e o fator de purificação. Os valores dos pontos ótimos para as variáveis respostas encontrados foram: fator de purificação de 5 vezes e produtividade de 1,28 mg/min. E as condições operacionais que levam ao ótimo das respostas foram: Vazão Fase Leve/Vazão Total de 0,67 e intervalo entre os pulsos de 1s. Para representar a dinâmica de operação da coluna de extração usou-se uma simples aproximação baseada nas redes neurais, pois este modelo de conexão tem a habilidade de aprender procedimentos complexos do sistema físico. As entradas foram representadas pelos passados e presentes valores da razão vazão fase leve/vazão total e no intervalo entre os pulsos, e as saídas o valor presente do rendimento de proteína total e o fator de purificação. Com o objetivo de encontrar a melhor topologia, treinou-se a rede com o algoritmo Regularização Bayesiana, variando-se o número de neurônios da camada intermediária para encontrar o melhor modelo. A topologia final da rede neural foi 16-9-2, com funções de ativação sigmoidal. Observou-se o bom desempenho da rede neural com respeito à Proteína Total e o Fator de Purificação em toda a faixa de valores desejada.

Palavras-chaves: Bromelina, micelas reversas, extração, modelagem, redes neurais.

Abstract

Bromelain is a set of proteolytic enzymes found in vegetables of the Bromeliaceae family, from which pineapple is known more. Bromelain has several uses, all based on its proteolytic activity. There is the necessity to develop new processes for purification and concentration of these composites, the liquid-liquid extraction for reversed micelles reveals as one attractive technique, therefore it has had the specific capacity of getting soluble biomolecules of an aqueous solution, as the crude extract of the pineapple. Amongst equipment for the liquid-liquid extraction available it was developed a micro-column of pulsed caps, with the purpose to get an equipment for the accomplishment of extraction processes liquid-liquid, appropriate for the separation and purification of biomolecules in continuous operation. The best condition of bromelain extraction with reversed micelles in batch operation was applied in the extraction column. To find the best operation conditions of the column, the star design of experiments was used, covering all region of operation. For this it had been varied the ratio between low density phase to total flow and the range of time between pulses on the input to determine the variations of the total protein yield and purification factor on output each three minutes. The best values found were: 5 for purification factor and 1.28 mg/min for productivity. And operational conditions that lead to results were: 0.67 for the ratio between low-density phase to total flow and 1s for range of time between pulses. To represent the dynamics of operation of the extraction column a simple approach based on the neural networks was used, therefore this model of connection has the ability to learn complex procedures of the physical system. The input had been represented by the pasts and presents values of the ratio between low density phase to total flow and the range of time between pulses, and the outputs the present value of the total protein yield and purification factor. To find the best topology, the network was trained with Bayesian Regularization algorithm, varying the number of neurons on hidden layer to find the best model. The final topology of the neural network was 16-9-2, with sigmoid activation functions. It was observed that the performance of the neural network is good with respect to the total protein yield and purification factor in all range of values desired.

Key words: Bromelain, reversed micelles, extraction, modeling, neural network.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
NOMENCLATURA	8
LETRAS GREGAS.....	9
ABREVIATURAS.....	10
1 Introdução	11
2 Objetivos	13
3 Revisão Bibliográfica	14
3.1 Bromelina:.....	14
3.2 Desnaturação	16
3.3 Extração Líquido-Líquido por Micela Reversa.....	17
3.4 Micelas	18
3.4.1 Partição de proteínas em sistemas micelares.....	20
3.5 Influência dos parâmetros do sistema.....	21
3.5.1 Surfactante.....	21
3.5.2 Solvente orgânico	23
3.5.3 Sal	24
3.5.4 pH.....	25
3.6 Extração	25
3.7 Re-Extração.....	26
3.8 Equipamentos Usados nos Processos de Extração	27
3.8.1 Coluna Agitada por Campânulas Pulsantes	28
3.8.2 Fração de Retenção da Fase Dispersa ("Hold-up")	29

3.8.3	As Regiões de Operação	30
3.9	Modelagem da extração líquido-líquido	31
3.10	Redes Neurais Artificiais	32
3.10.1	O Modelo Computacional das Redes Neurais Artificiais	33
3.10.2	O Neurônio Artificial	34
3.10.3	Topologia de uma Rede Neural Artificial	36
3.10.4	Treinamento da RNA	37
3.10.5	Dinâmica de treinamento	37
3.10.6	Algoritmo de Treinamento Levenberg-Marquardt	39
3.10.7	Generalização	40
3.11	Uso de Redes Neurais em Extração Líquido-Líquido	43
4	Materiais e Métodos	45
4.1	Preparo das Amostras	45
4.1.1	Preparação da amostra a partir do extrato bruto	45
4.1.2	Preparo das soluções Micelares	45
4.1.3	Preparo das soluções de Re-Extração:	45
4.2	Procedimento da Extração e Re-Extração	46
4.2.1	Extração:	46
4.2.2	Re-Extração	47
4.3	Extração Contínua	48
4.4	Descrição do Equipamento	48
4.4.1	Operação da Micro-coluna	49
4.5	Métodos Analíticos	50
4.5.1	Determinação de Proteínas	50

4.5.2	Método para a determinação da atividade Proteolítica.....	50
4.6	Metodologia de cálculo.....	50
5	Resultados e Discussões.....	52
5.1	Extração da Bromelina em Batelada.....	52
5.2	Extração da Bromelina em Operação Contínua.....	59
5.3	Análise estatística da extração em contínuo.....	61
5.3.1	Otimização das Respostas.....	67
5.3.2	Modelos para Predição dos dados experimentais.....	70
5.3.3	Validação dos modelos.....	75
5.3.4	Estudo da hidrodinâmica do processo de Extração:.....	76
5.4	Modelagem dinâmica da coluna de extração via redes neurais.....	80
5.4.1	Normalização.....	82
5.4.2	Função de Ativação.....	82
5.4.3	Análise do Treinamento.....	82
5.4.4	Seleção do tempo Retroativo (valores passados).....	83
5.4.5	Treinamento da Rede Neural.....	85
6	Conclusões.....	88
7	Bibliografia:.....	89
APÊNDICE A.....		100
	Descrição do método para determinação de proteínas totais - Método de Lowry (1951).....	100
APÊNDICE B.....		101
	Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica – Caseína	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial para a extração da Bromelina com tensoativo AOT.....	52
Tabela 5.2 – Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para extração da Bromelina com AOT e resposta (Fator de Purificação- FP) após a reextração.....	53
Tabela 5.3 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.	54
Tabela 5.4 - Planejamento Fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.	55
Tabela 5.5 – Níveis escolhidos para a operação em contínuo.....	59
Tabela 5.6 - Níveis usados para o Planejamento Estatístico para a extração da Bromelina em operação contínua.....	59
Tabela 5.7 - Matriz de Planejamento Experimental Estrela e Respostas para Operação Contínua.	60
Tabela 5.8 - Efeitos para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Fator de Purificação.	63
Tabela 5.9 – ANOVA para Fator de Purificação	63
Tabela 5.10 - Efeitos para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Produtividade.....	65
Tabela 5.11 – ANOVA para Produtividade	65
Tabela 5.12 – Coeficientes de regressão para o modelo para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Fator de Purificação (modelo polinomial).....	71
Tabela 5.13 - Coeficientes de regressão para o modelo para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Produtividade (modelo polinomial).	73
Tabela 5.14 – Validação dos modelos de extração da bromelina em operação contínua.	75
Tabela 5.15 – Variáveis de entrada usadas no modelo neural e intervalos.....	82
Tabela 5.16 – Variáveis de saída usadas no modelo neural e intervalos.	82

Tabela 5.17 – Treinamento da rede para seleção do tempo de retardo para representação da dinâmica do processo de extração da bromelina.	83
Tabela 5.18 – Treinamento da rede neural variando-se o número de neurônios na camada intermediária.	85
ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura 2.1 – Agitação através de campânulas pulsantes numa coluna de extração líquido-líquido pulsada. (a) campânula parada durante o intervalo entre pulsos. (b) movimento descendente durante o pulso.	29
Figura 2.2 – Esquema da micro coluna de campânulas pulsantes (Adaptado de Rabelo, 1999).	48
Figura 2.3 - RNA e suas interconexões.	33
Figura 2.4 - Modelo de um Neurônio Artificial.	35
Figura 2.5 - Conexões por Alimentação Direta e Retro-Alimentação.....	36
Figura 2.6 – RNA do tipo Perceptron com três camadas.....	38
Figura 2.7 – Gráfico do treinamento com algoritmo Parada Antecipada.	42
Figura 4.1 - Representação esquemática da etapa de extração da bromelina por micelas reversas.....	46
Figura 4.2 - Representação esquemática da etapa de re-extração da bromelina por micelas reversas.....	47
Figura 5.1 - Gráfico de Pareto para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.	56
Figura 5.2 - Gráfico das superfícies de resposta para análise dos fatores que influenciam a extração batelada da bromelina com tensoativo BDBAC.	57
Figura 5.3– Gráfico de Pareto para análise dos fatores que influenciam a extração.....	61
Figura 5.4– Gráfico da superfície de resposta Fator de Purificação em função da razão vazão fase leve/vazão total e intervalo entre os pulsos.	62
Figura 5.5 – Gráfico de Pareto para análise dos fatores que influenciam a extração.	64

Figura 5.6 - Gráfico da superfície da resposta Produtividade em função da razão vazão fase leve/vazão total e intervalo entre os pulsos.	66
Figura 5.7 – Gráfico das funções <i>desirability</i>	68
Figura 5.8 – Superfície de resposta para a função “ <i>desirability</i> ” global.	69
Figura 5.9 – Curvas de nível para a função <i>desirability</i> global.	69
Figura 5.10 – Gráfico dos dados experimentais do Fator de Purificação.	72
Figura 5.11 – Gráfico dos dados preditos pelo modelo do Fator de Purificação.	72
Figura 5.12 – Gráfico dos dados experimentais da Produtividade.	74
Figura 5.13 – Gráfico dos dados preditos pelo modelo da Produtividade.	74
Figura 5.14 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando o intervalo dos pulsos para 7 s (a) e para 1 s (b)..	76
Figura 5.15 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando Vazão fase leve/Vazão total para 0,217 (a) e para 0,782 (b).	77
Figura 5.16 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,7 e o intervalo dos pulsos para 2 s (a) e alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,7 e o intervalo dos pulsos para 6 s (b).	78
Figura 5.17 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,3 e o intervalo dos pulsos para 2 s (a) e alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,3 e o intervalo dos pulsos para 6 s (b).	79
Figura 5.18 - Representação da rede neural usada para a modelagem dos dados para extração da bromelina.	81

Figura 5.19 – Gráfico da média quadrática do erro versus número de neurônios na entrada para a variável Fator de Purificação.....	84
Figura 5.20 – Gráfico da média quadrática do erro versus número de neurônios na entrada para a variável Proteína total.	84
Figura 5.21 – Gráfico dos parâmetros da rede durante o treinamento.....	86
Figura 5.22 – Gráfico dos dados preditos pela rede versus os dados experimentais observados durante o treinamento para as variáveis de saída.	86
Figura 5.23 – Gráfico dos dados preditos pela rede versus os dados experimentais observados para o conjunto de teste para as variáveis de saída.....	87

NOMENCLATURA

a - componente do vetor de entrada

b - saída do neurônio

bias – ativação residual

c - saída calculada

d - saída desejada

D - conjunto de dados

e - erro

E - erro quadrático

f - frequência (pulsos/s)

f() - função de ativação

g - aceleração da gravidade = $9,81(\text{m/s}^2)$

H - matriz de Hessian

i - i-ésimo componente da camada de entrada

I - vetor de entrada

j - j-ésimo componente da camada intermediária

$J(\bar{y})$ - matriz Jacobiana dos erros

k - k-ésimo componente da camada de saída

k - constantes

L - número de neurônios camada de entrada

M - modelo de rede neural usado

M - número de neurônios da camada de saída

n - n-ésimo componente da camada intermediária

N - número total de parâmetros da rede

N - número de neurônios da camada intermediária

$P(D|\alpha, \beta, M)$ - fator de normalização

$P(D|w, \beta, M)$ - função de probabilidade dos dados

$P(w|\alpha, M)$ - probabilidade anterior

$P(w|D, \alpha, \beta, M)$ - probabilidade posterior

T - transposta

v - pesos da camada intermediária

v - velocidade das fases (cm/min ou m/min)

V - volume (m^3)

w - pesos da camada de saída

w - vetor peso da rede

w^{MP} - ponto mínimo da densidade posterior

LETRAS GREGAS

α - coeficiente do momentum

β - constante de proporcionalidade

δ - declínio do gradiente

∂ - derivada parcial

ϵ - erro da saída

η - taxa de aprendizado

Δ - variação (anterior – atual)

ρ - massa específica (kg/m^3)

γ - número efetivo de parâmetros

α - parâmetro da função objetivo

β - parâmetro da função objetivo

μ - viscosidade (mPa.s)

ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

AOT – di-octil sulfosuccinato de sódio

AP – Porcentagem de atividade enzimática recuperada

BDBAC – cloreto de benzil dodecil bis(hidroxietil) amônio

BSA – “Bovine serum albumine”; albumina de soro bovina

CTAB – Brometo de cetiltrimetil amônio

D - dados experimentais

FP – Fator de Purificação

IA - Inteligência Artificial

NEP - Número efetivo de parâmetros

PEG- Polietileno Glicol

PT - Porcentagem de proteína total recuperada

R - Dados das Redes

RNA - Redes Neurais Artificiais

SQE - Soma quadrática dos erros

SQP - Soma quadrática dos pesos

MQE – Média quadrática dos erros

1 Introdução

A Bromelina é uma protease de origem vegetal obtida de diversas espécies da família *Bromeliaceae*, que está presente no talo e no fruto do abacaxi. O uso da bromelina é baseado em sua atividade proteolítica nas indústrias alimentícias e principalmente na farmacêutica brasileira. A Bromelina tem sido muito bem documentada pelos seus efeitos curativos em todas condições inflamatórias, além de ter sua eficácia provada na cura de vários outros problemas de saúde tais como: angina, indigestão e problemas respiratórios. (Hale *et al.* 2005).

A bromelina comercial é obtida do caule do abacaxi. O fruto é uma alternativa de matéria prima devido a enzima presente neste, possuir uma atividade proteolítica maior que o talo, além de haver grande quantidade de resíduos do fruto do abacaxi proveniente das indústrias de conserva (Park, 2001).

O processo de purificação comercial é a precipitação. Esta é uma técnica de fácil ampliação de escala e com viabilidade para operação contínua a custos aceitáveis para grandes volumes, porém, é uma técnica mais de concentração do que propriamente de purificação (Zellner *et. al*, 2005).

Um processo que tem sido aplicado em diferentes setores da indústria química e farmacêutica é a extração líquido-líquido por micelas reversas, usada para a separação de antibióticos e na recuperação de ácidos orgânicos diretamente do extrato bruto (Kilikian *et al.*, 2000).

A extração em processo descontínuo exige elevada mão de obra. O processo em contínuo em colunas de extração reduz a mão de obra e automatiza o processo, levando também a produtos mais homogêneos. A escolha do tipo de coluna de extração líquido-líquido é função da natureza dos produtos e das características físicas e químicas do sistema em estudo, além de ser função do desempenho do equipamento, considerando-se as condições de extração (Rabelo, 1999).

Para a representação da extração líquido-líquido podem ser usados vários tipos de modelos como o físico ou o empírico (Fischer, 2002). O primeiro é desenvolvido pelas leis da física e da química, como a lei da conservação de massa, energia e momento. Enquanto

o segundo não é baseado em pressupostos teóricos, e usado para descrever um certo conjunto de pontos experimentais conhecidos. Dentre os modelos empíricos, podemos destacar os estatísticos e polinomiais, capazes de ajustar pontos experimentais de diferentes processos. Estes podem ser usados para representar a operação de colunas de extração em estado estacionário.

Outra ferramenta para a modelagem empírica são as redes neurais, que tem a habilidade de *aprender* procedimentos complexos do sistema físico. Essas redes são capazes de representar a dinâmica de operação da extração líquido-líquido, que é um sistema não linear e transiente.

Para determinar a dinâmica de operação da coluna de extração pode-se usar o planejamento experimental estatístico, onde alterações propositais são feitas nas variáveis de entrada para avaliar as possíveis alterações sofridas pela variável resposta.

Neste projeto, foi utilizada como matéria prima o suco do fruto do abacaxi, que foi extraído com o sistema de micelas reversas BDBAC/isooctano/hexanol em uma micro-coluna de campânulas pulsantes. Foi utilizada a técnica de planejamento de experimentos do tipo estrela de forma a abranger toda região de operação da coluna de extração. Para isto variou-se a razão Vazão Fase Leve/Vazão Total e o intervalo entre os pulsos de agitação na entrada da coluna, para determinar as variações na saída do rendimento de proteína total e o fator de purificação da bromelina. Foram obtidos dados provenientes da operação em estado estacionário e de regime transiente. Os primeiros foram ajustados com o uso de modelos estatísticos e polinomiais, e os segundos foram ajustados por modelos de redes neurais.

2 Objetivos

Geral:

- Extração da Bromelina por micelas reversas em uma coluna de campânulas pulsantes.

Específicos:

- Estudo dos fatores Vazão fase leve/Vazão total e intervalo entre os pulsos no rendimento da coluna.
- Definir a região de maior rendimento em produtividade e fator de purificação na operação da coluna dentro da faixa estudada.
- Modelagem estatística e polinomial da extração em operação contínua da bromelina.
- Modelagem dinâmica da coluna com o uso da ferramenta redes neurais.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Bromelina:

Bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontrada nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é o mais conhecido. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.32, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou ainda, bromelina e tem número sistemático EC 3.4.22.33. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica. A bromelina do talo é uma enzima sulfídrica, e este grupamento é essencial para sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico de 4,6 foi determinado por focalização isoelétrica, sendo que mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3 (Hale *et. al.* 2005, Murachi, 1976).

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de protease no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde, com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece. Diferentes partes da planta podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção da bromelina: folhas, talos, polpa da fruta, cascas e resíduos industriais do processamento do fruto (César, 2005).

A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento da soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos,

feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado, etc... Foi verificado por *Rowan et al* (1990) que a bromelina do fruto tem atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8 e a temperatura de 70°C. A bromelina de talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0. A forma da bromelina comercialmente encontrada é a bromelina do talo, apesar da grande quantidade de resíduos de abacaxi fruto proveniente das indústrias de conserva de abacaxi(César, 2005).

As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidasas (Murachi., 1976). *Suh et. al.* (1992) purificou a bromelina do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32,5 e 35 kDa respectivamente, com rendimento de 23 % em atividade. Murachi (1976) purificou a bromelina do talo do abacaxi por cromatografia de gel filtração, e determinou que o pesos molecular da fração pura era de 28 kDa por SDS-PAGE. *Rowan et. al.* (1990) descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina de fruto, bromelina de talo, ananaína e comosaína.

César (2000) estudou a extração da bromelina, utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/sal (fosfato de potássio). Foram obtidos resultados favoráveis e promissores. Obteve-se o coeficiente de partição de aproximadamente 3,9 com pH 9,0, PEG 1500 e concentração de 17,5% PEG e 15% de sal.

César (1999) realizou as análises de proteína total, açúcares redutores e atividade enzimática de amostras preparadas da polpa do fruto, da casca e do talo para a caracterização do meio inicial. O fruto e talo apresentam o mesmo teor de proteína total, porém o talo apresenta cerca de 60% menor quantidade de enzimas proteolíticas. Foi observado que por meio da precipitação em um estágio com 80% (%v/v) de etanol a 5°C, é possível recuperar praticamente toda a enzima originalmente presente, aumentando de 3 a 5 vezes a atividade específica inicial.

Segundo Baldini *et. al.* (1993), a bromelina é uma enzima sulfídrica e como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres

para sua atividade catalítica. Agentes redutores como a cisteína, sulfetos, sulfitos, e também cianetos atuam como ativadores da ação enzimática de acordo com diversos autores citados em seu trabalho.

Estudos cinéticos da desnaturação da bromelina a uma temperatura constante foram realizadas a pH 3,40. A análise da fração de proteína nativa (f_N) mostra que esta varia com o tempo, sendo que a temperaturas elevadas, esta diminui mais rapidamente. Por exemplo a 30,5°C, f_N diminui de 1 a aproximadamente 0,2 em 300 min; a 36,1°C, f_N diminui a aproximadamente 0,1 em 300 min; a 42,3 °C, f_N diminui de 1 a 0 em 150 min e a 46,1 °C, f_N diminui de 1 a 0 em 50 min. Foram realizadas análises entre 30 e 50 °C. Este estudo indica que a desnaturação térmica da Bromelina segue um modelo de dois estados irreversível com cinética de 1ª ordem. Neste estudo a desnaturação é determinada por mudanças na configuração da enzima (Arroyo-Reyna *et. al.*, 1995).

El-Gharbawi e Whitaker (1963) separaram cinco componentes proteoliticamente ativos da bromelina do talo por cromatografia e eletroforese. Esses componentes apresentaram absorvância similar a 280 nm e atividade específica similar em caseína em pH 7. Eles diferem entre outras características, na absorvância a 260 nm e 292 nm, estabilidade térmica e variação na atividade em caseína em diferentes valores de pH. Todos cinco componentes tiveram aproximadamente a mesma atividade específica em pH 7 (aproximadamente 1,02 ou 1,03). Todos os componentes parecem ter ponto isoelétrico de aproximadamente 9,6.

Segundo Rowan (1990) para a azocaseína a atividade específica relativa à bromelina de talo é 1,00 e bromelina do fruto 1,49.

Fossum (1970) comparou diferentes métodos (Kunitz e reação de precipitação da caseína em Agar-Gel) para determinar a atividade de enzimas proteolíticas, além de analisar inibidores de atividade proteolítica, ambos os métodos mostraram-se satisfatórios.

3.2 Desnaturação

Quando uma solução de proteína, como a albumina do ovo é aquecida lentamente até 60° ou 70°C, a mesma torna-se gradualmente leitosa e logo e logo forma um coágulo.

Isto é comum já que ocorre quando fervemos ovos em água. A clara de ovo, que contém albumina, coagula num sólido branco. Depois que o calor coagulou a clara ela não sofre redissolução pelo resfriamento, nem forma outra vez uma solução límpida como a original. Portanto, o aquecimento transformou a ovoalbumina e aparentemente de forma irreversível. Esse efeito em todas as proteínas, não importando seu tamanho ou função biológica, embora a temperatura exata para provoca-lo varie. A mudança provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como desnaturação.

Há uma outra consequência da desnaturação de uma proteína, ela, quase sempre, perde sua atividade biológica característica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até o seu ponto de ebulição por alguns minutos e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica.

A desnaturação de proteínas pode ser causada não apenas pelo calor, mas também por valores inadequados de pH, por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução protéica até a formação abundante de espuma, pela presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, entre outros. Cada uma das formas citadas como causa da desnaturação pode ser considerada como tratamentos relativamente suaves, isto é, a desnaturação pode ocorrer em condições amenas, não há a necessidade de situações drásticas. As moléculas de proteína nativa são frágeis e facilmente desorganizadas pelo calor e outros tratamentos aparentemente suaves (Yao *et. al.*, 2002).

3.3 Extração Líquido-Líquido por Micela Reversa

Em biotecnologia existe a necessidade de desenvolver novos processos de purificação e concentração de compostos biotecnologicamente ativos, tais como proteínas, enzimas, ácidos nucléicos e células. Esses processos devem combinar alta seletividade e biocompatibilidade, além de uma fácil ampliação de escala (Kilikian *et. al.*, 2000).

O processo de extração líquido-líquido, consiste na separação dos componentes de uma mistura de uma fase na outra por contato entre duas fases líquidas imiscíveis, ou parcialmente miscíveis. Esse processo tem sido usado em diferentes setores da indústria

química e farmacêutica, tais como, na separação de antibióticos e na recuperação de ácidos orgânicos diretamente do meio da fermentação, como por exemplo: β -xilosidase, imilase e xilose redutase. Entretanto a aplicação desta técnica na separação, concentração e purificação de proteínas ainda é limitada, principalmente porque estas são insolúveis no solvente orgânico utilizado, ou porque não tem a devida seletividade e/ou capacidade, ou ainda, porque a exposição direta da proteína ao solvente pode causar desnaturação, inviabilizando a sua aplicação posterior como um biocatalisador (Aires-Barros *et. al.*, 1994).

A extração líquido-líquido por micela reversa pode servir a essas propostas, pois possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, como exemplo os meios de fermentação e cultura de células, sendo apontada como uma ferramenta útil e versátil para a recuperação de biomoléculas, especialmente de proteínas (Monteiro *et. al.*, 2005, Ferreira *et. al.*, 2005, Kilikian *et. al.*, 2000).

3.4 Micelas

Surfactantes são moléculas que possuem características anfifílicas, ou seja, possuem na mesma molécula uma porção hidrofílica ou polar, denominada cabeça, e uma porção hidrofóbica ou apolar, a qual é referida como cauda (Shipovskov *et. al.*, 2005).

Quando em meio aquoso, tendem em determinadas condições e concentrações, a naturalmente autoorganizarem-se formando estruturas esféricas ou elipsoidais denominadas micelas; expondo suas porções hidrofílicas ao meio, e por conseguinte retraindo sua porção hidrofóbica ao interior das micelas (Testard e Zemb, 2002, Volpe e Silva Filho, 1995). Já na situação da solubilização de surfactantes em meio orgânico, ocorre devido as características apolares do meio a inversão de conformação micelar, ou seja, a estrutura micelar mantém-se. Porém, neste meio, a porção hidrofóbica é que é fica exposta e a porção hidrofílica se retrai para o interior da micela (Yang e Robb, 2005, Luisi et al, 1997). Nesta situação, temos a chamada micela reversa; aglomerados moleculares analogamente elipsoidais ou esféricos, cujo núcleo por suas características hidrofílicas pode em determinadas condições reter água, a qual fica parcialmente protegida do contato com o solvente orgânico pelo agregado de moléculas de surfactante. É neste núcleo, ou piscina

como se referem muitos autores que a proteína pode ser acondicionada sem perda de atividade (Yang e Robb, 2005, Brandini *et. al.*, 1994; Jolivalt et al, 1993; Pires, Cabral, 1993; Meyer, 1992; Luise *et. al.*, 1998).

A autoorganização do surfactante em sistemas micelares para a purificação de proteínas depende basicamente do equilíbrio em um sistema ternário, constituído pelo solvente orgânico, água e surfactante; variando-os de maneira a atingir-se a concentração micelar crítica (CMC) ou seja, a faixa de concentrações onde ocorre a formação de micelas (Testard e Zemb, 2002, Seoud *et. al.*, 1999).

Do ponto de vista estrutural, define-se as micelas invertidas como sendo aglomerados moleculares relativamente ordenados, caracterizadas por um raio médio, um número de agregação e densidade de empacotamento bem definidos (Martinek *et. al.* 1989, Bordi e Cametti 1998). São estruturas dinâmicas, e não rígidas; que ao colidirem trocam moléculas de tensoativo e componentes do interior da micela entre si e entre a solução, com elevada velocidade (Luisi *et. al.* 1988). Apesar desta mobilidade o tensoativo forma uma interface bem definida tornando o centro hidrofílico praticamente impermeável ao solvente orgânico (Martinek *et. al.*, 1986; Luisi *et. al.*, 1988).

A característica de retenção de água na micela também é importante podendo-se medi-la através de um parâmetro conhecido como W_o , ou seja “water in oil”; definido como sendo a relação entre a concentração de água presente na piscina pela concentração de tensoativo:

$$W_o = \frac{[H_2O]}{[\text{tensoativo}]}$$

Para alguns autores, este parâmetro é de extrema importância no sistema de micelas invertidas pois determina a maioria das propriedades físicas e estruturais das micelas (Shukla e Neubert, 2005). Do valor deste parâmetro podem ser determinados o número de moléculas de surfactante por micela e o raio micelar. Ruckenstein e Karpe (1991) e Luisi *et. al.* (1988) à partir de considerações como assumir as micelas invertidas possuindo uma geometria esférica relacionam o parâmetro W_o com outros parâmetros estruturais das micelas como o raio micelar médio em Angstroms (r) o número de agregação

(Nag) e a concentração molar de micelas em Moles.dm⁻³ (CM), a partir das equações abaixo:

$$r = 1,64W_o$$

$$N_{ag} = 0,611W_o$$

$$CM = 1,64 \frac{[AOT]}{W_o}$$

A validade destas equações foi testada por vários autores, apresentando boa aproximação. Castro e Cabral (1988) confirmaram os valores preditos através de análise com Raios-X, por espalhamento de luz (light scattering), por ultracentrifugação e por ressonância magnética nuclear (RNM). Lundgren *et. al.* (1998) testaram através de métodos fluorimétricos e por espectroscopia.

Obtido o valor do tamanho da micela, e conhecendo-se o tamanho da proteína pode-se verificar previamente se a mesma pode ser encapsulada; ou ainda em que condições teríamos a expulsão da mesma da micela, pelo encolhimento desta última, o qual constitui fator importante na re-extração da proteína na fase orgânica.

Embora o mecanismo de solubilização e acondicionamento das proteínas nas micelas não esteja satisfatoriamente solucionado, alguns estudos e modelos já foram propostos (Chen *et. al.*, 2006, Martinek *et. al.*, 1986; Dungan *et. al.*, 1991; Paradkar e Dordik, 1994; Mandal *et. al.* 1998). Embora os modelos não expliquem satisfatoriamente o processo de solubilização como um todo; sabe-se que as proteínas podem ser eficientemente separadas e recuperadas por extração líquido-líquido utilizando sistemas de micelas reversas, apenas manipulando-se parâmetros do processo (Ex: β -xilosidase, imilase, xilose redutase, amidase, tirosinase, glucose oxidase) (Yang e Robb, 2005, Cortez *et. al.*, 2004, Hasmann *et. al.*, 2003, Kamyshny *et. al.*, 2002, Puchkaev *et. al.*, 2002).

3.4.1 Partição de proteínas em sistemas micelares

A partição de proteínas em sistemas micelares tem como principal força motriz a utilização de tensoativos iônicos especiais em solução orgânica; contatando-se com uma

solução aquosa, e regulando-se a transferência preferencial de proteína entre as fases pela alteração dos parâmetros do sistema.

A recuperação de proteínas neste tipo de sistema se dá através do contato de uma solução salina em pH controlado contendo uma proteína com uma solução orgânica contendo tensoativo. Nesta primeira operação, de extração, a proteína irá migrar da fase aquosa para a orgânica, o que em termos práticos é muito interessante, pois esta fase aquosa poderia ser, por exemplo, o mosto aquoso de meio de fermentação (Porto *et. al.*, 2005). Assim em termos operacionais seria como contactássemos o caldo fermentado diretamente com a fase orgânica, apenas acertando o pH e a força iônica do caldo aos níveis desejados (Cortez *et. al.*, 2004, Hasmann *et. al.*, 2003, Brandini *et. al.*, 1996).

Sendo o sistema micelar relativamente seletivo, muitos aminoácidos e resíduos celulares indesejáveis já estão sendo descartados nesta operação. A etapa seguinte constitui-se em recuperar a fase orgânica a proteína com um grau de pureza maior ou mais concentrada. A esta segunda etapa denomina-se re-extração, e constitui-se do contato da fase orgânica enriquecida com proteína com uma nova fase aquosa com força iônica e pH controlados de maneira que preferencialmente a proteína migre a esta nova fase aquosa (Hasmann *et. al.*, 2003, Dekker *et. al.*, 1986 e Carneiro-da-Cunha *et. al.*, 1994).

Para obter-se a transferência entre fases de maneira a caracterizar e otimizar o processo de extração; faz-se necessário a compreensão de como alterar as propriedades do sistema para promover a partição de proteínas e assim manipular estes fatores em prol de se obter a transferência para a fase desejada. Assim é necessário primeiramente a investigação de como cada propriedade pode participar individualmente, contribuindo na modificação das características do sistema como um todo (Yang e Robb, 2005).

3.5 Influência dos parâmetros do sistema

3.5.1 Surfactante

Quanto ao surfactante para sistemas micelares, é importante a classificação de acordo com a carga de sua porção hidrofílica em: catiônico, aniônico, neutro e anfótero ou

zwiteriônico (Goto *et. al.*, 1997). A escolha de qual surfactante será melhor aplicado ao processo de separação dependerá de características da proteína e do sistema em si.

Dentro da categoria dos surfactantes aniônicos, um dos mais utilizados para a formação das micelas é o AOT(di-octil sufosuccinato de sódio) ou Aerosol-OT. O AOT possui uma cabeça aniônica pequena e duas caudas hidrofóbicas, e que teoricamente lhe confere maior estabilidade na formação de micelas, solubilizando ou não proteínas (Yang e Robb, 2005, Albery *et. al.*, 1987). Outra vantagem da utilização do AOT, em relação aos demais, é a facilidade de formação de micelas invertidas sem a presença dos chamados co-tensoativos. A espontaneidade de formação da micela está relacionada com a capacidade de solubilização da água (cerca de 100 moles de água por mol de surfactante), que no caso do AOT é facilitada pela possibilidade de rotação do grupo etano em torno da ligação carbono-carbono existente na porção hidrofílica do surfactante (Patel *et. al.*, 1996; Regalado *et. al.*, 1996; Zamarro *et. al.*, 1996; Huan, Lee, 1994; Aires-Barros *et. al.*, 1991).

Os tensoativos catiônicos constituem também uma vasta classe, compreendendo por exemplo a dos halogenados de alquil-amônio (CTAB, TOMAC, TTAB); os fosfolipídios e os surfactantes derivados de poli-óxidos de etileno (Tween, Span, Triton), somente para citar alguns. Necessariamente estes surfactantes necessitam um co-surfactante para a formação de micelas (Zheng *et. al.*, 2005). Entretanto, como já descrito anteriormente, pode haver a necessidade imprescindível do uso dos mesmos de acordo com a propriedades da proteína frente ao sistema (Yang e Robb, 2005, Pacheco *et. al.*, 2005, Krei, Hustedt, 1992; Krei *et. al.*, 1995).

A aplicação de tensoativos neutros, tais como o polietilenoglicol (PEG) está mais associado a um outro tipo de sistema que não o micelar; o sistema aquoso bifásico, onde as duas fases em contato constituem-se de água.

O ponto isoelétrico (pI) da proteína é quem definirá a escolha do tipo de surfactante para sistemas micelares, se aniônico ou catiônico. Para situações onde necessita-se trabalhar com a proteína em valores de pH abaixo do seu pI, a mesma apresentará distribuição de estado de ionização dos resíduos positiva; portanto para uma melhor transferência de massa preferencialmente escolheria-se um tensoativo aniônico. Para o caso contrário, ou seja, o pH do sistema acima do pI, o valor da distribuição de

cargas na molécula de proteína seria negativa, portanto o surfactante preferencialmente escolhido para a promoção de transferência entre as fases seria o catiônico (Meyer, 1992).

Outro importante fator relacionado com tensoativos é a sua concentração. Göklen *et. al.* (1986) afirma que aumentando-se a concentração de tensoativo, aumenta-se a capacidade de retenção de água na fase orgânica e por conseguinte há um aumento no tamanho das micelas formadas, pelo aumento do número de agregação de moléculas de tensoativo; desde que respeite os limites impostos pelo diagrama de equilíbrio do sistema.

Este fato pode vir a ser desejável ou não, pois o sistema em questão pode possuir proteínas indesejáveis de grande porte que poderiam vir a ser solubilizadas. Embora o mecanismo para explicar este tipo de efeito não esteja satisfatoriamente explicado, Chang *et. al.* (1994) constataram experimentalmente por análise de dispersão de luz que há um aumento significativo do raio micelar com o aumento da concentração de tensoativo na faixa estudada, compreendida entre 25 à 250 mM de tensoativo.

3.5.2 Solvente orgânico

Com relação aos solventes, a premissa básica para sua utilização no sistema de micelas invertidas é que seja imiscível em a água, pois além de ser o meio mais convencionalmente utilizado em fermentações, a mesma constitui um dos solventes mais comuns da primeira etapa da maioria dos protocolos de purificação, a lixiviação (Yang e Robb, 2005; Chang e Chen, 1996; Luisi *et. al.*, 1988).

Entre os solventes orgânicos utilizados como meio dispersivo na formação de micelas, destacam-se os hidrocarbonetos alifáticos, como o n-octano, isooctano e n-heptano; porém os aromáticos como o benzeno e o xileno e os halogenados como o clorofórmio também podem ser utilizados (Yang e Robb, 2005, Pacheco *et. al.*, 2005, Luisi *et. al.*, 1998; Luisi e Magid, 1986). Chang e Chen (1995) e Chang *et. al.* (1994) e obtiveram bons resultados de recuperação e atividade enzimática, utilizando querosene como solvente orgânico para a formação de micelas, sendo esta uma alternativa atraente em termos de redução de custos com reagentes.

Outra característica vital para a escolha de solventes orgânicos é que os mesmos não desnaturem a proteína quando utilizados em sistemas micelares (Yao *et. al.*, 2005). Trabalhos como os de Chang e Rhee (1990) e Han e Rhee (1986) investigaram a influência de vários solventes quanto a atividade enzimática, determinado empiricamente que para as enzimas estudadas o isooctano seria o solvente que menor influência teria na desnaturação.

Laane *et. al.* (1987) obtiveram empiricamente algumas regras para otimização da escolha do tipo de solvente orgânico em micelas invertidas, baseadas no logaritmo do coeficiente de partição do solvente (log P). Segundo estes autores, a catálise enzimática é altamente favorecida em valores de log P maiores que 4,0. A hipótese mais plausível é de que os solventes com maior grau de polaridade podem interagir com a água intramicelar, desestabilizando as enzimas encapsulados no interior das micelas. Para fins quantitativos, o isooctano por exemplo possui log P de 4,5.

Creagh *et. al.* (1993) estudaram através de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétron o comportamento da alfa- quimiotripsina verificando que sistemas de micelas reversas de AOT/isooctano pouco afetam a enzima estruturalmente; e constataram que além da enzima manter a sua atividade, em determinadas condições de extração até houve um aumento catalítico da mesma.

3.5.3 Sal

Segundo alguns pesquisadores como Nishii *et. al.*, 2004, Hatton *et. al.* (1987) e Liu *et. al.* (1998) os efeitos principais que podem ser inferidos sobre a atuação da força iônica são de modificação das interações eletrostáticas do sistema, causando os efeitos com “salting in” (SI) ou “salting out” (SO), por exclusão ou inclusão molecular de acordo com a concentração de sal no sistema.

Porém, segundo estes mesmos pesquisadores, o principal efeito da ação salina se dá pela alteração na força iônica modificando o equilíbrio existentes entre as forças de repulsão eletrostáticas entre os grupos polares do surfactante, causando a expansão ou retração do tamanho da micela.

Kennedy e Cabral (1993) porém afirmam que dependendo da concentração molar da solução tampão adicionada para controle de pH pode-se promover a separação de fases segundo os mesmos princípios, sem a necessidade intrínseca da adição de sal.

Não somente a concentração, mas também o tipo de sal pode vir a influenciar a transferência de massa entre fases. Marcozzi *et. al.* (1991) e Leser *et. al.* (1992) estudaram a influência de diferentes tipos de sal usados na fase de extração e a influência global desta variável, comparando o rendimento obtido na re-extração.

3.5.4 pH

O valor de pH determina a taxa de dissociação dos resíduos carregados que compõe a estrutura primária da proteína, e assim a distribuição de carga da molécula protéica da fase aquosa. Por conseguinte há o efeito da promoção da transferência da mesma entre as fases (Cabral, e Aires-Barros, 1993).

Porém, alguns autores (Luisi *et.al.*, 1979; Castro *et. al.*, 1988) obtiveram transferência de proteína em situações contrárias as já descritas, ou seja, trabalhando com a proteína apresentando sinal de distribuição de cargas idêntico ao da cabeça iônica do surfactante. Neste caso, a explicação mais plausível é de que a transferência para a fase micelar dos sistemas estudados seja controlada majoritariamente por interações hidrofóbicas de enzima frente ao meio.

Outro importante cuidado concernente ao pH seria a observação para que se operasse o sistema dentro da faixa que a proteína não se desnature. Esta observação primariamente observada para o solvente orgânico estende-se às concentrações de sal e de tensoativo, e constitui limites para estudos de otimização.

3.6 Extração

Fatores de ordem mecânica como velocidade de agitação, razão volumétrica entre as fases e método de contato exercem enorme influência na transferência de enzima entre as fases; e são de extrema importância se o estudo do sistema tem a finalidade de resolução de projetos ou interesses de engenharia (Rabelo, 1999).

Poucos são os autores que focaram estes fatores na extração; destacando-se os trabalhos de Nishiki *et. al.* (1995) que estudaram a influência da velocidade e tempo de agitação assim como a razão entre as fases orgânica e aquosa para a extração de várias enzimas em sistemas micelares; e de Matzke *et. al.* (1992), que estudaram vários métodos de injeção e solubilização, inclusive contato da enzima em estado sólido com a fase orgânica. Regalado *et. al.* (1994) também efetuaram estudos quanto à influência da transferência na extração quanto à razão entre as fases.

Outro fator de relevância tanto na extração quanto na re-extração é a temperatura, principalmente se pretende-se operar o sistema em regiões onde a variação de temperatura seja muito acentuada. Para a maioria das enzimas, a faixa de atuação ideal é a compreendida entre 10° e 38°C; entretanto isto não constitui uma regra geral, necessitando estudar-se cada caso particularmente.

Os cuidados mínimos quanto à temperatura é que a faixa de trabalho não esteja compreendida na região de desnaturação da enzima em questão. O ideal seria a operação na temperatura de máxima atividade catalítica da enzima, caso deseje-se utilizar diretamente a solução de re-extração (Luisi *et. al.*, 1988).

3.7 Re-Extração

Valem para a etapa de re-extração os mesmos comentários sobre a influência de fatores mecânicos mencionados anteriormente para a extração.

Segundo alguns autores, para muitas aplicações de enzimas o grau de pureza alcançado pelo emprego de sistemas de micelas reversas por si só já é satisfatório, não necessitando de outras etapas posteriores de purificação.

Nitin e Luisi (1989), Leser *et. al.* (1993), Dahuron Cussler (1988) realizaram estudos modificando o procedimento clássico de re-extração em sistemas micelares, obtendo enzimas já na disposição final para uso como catalisadores. Respectivamente eles imobilizaram a fase orgânica em gel de poliacrilamida; utilizaram esferas de sílica em contato com a fase orgânica e imobilizaram a fase orgânica em fibras semi-porosas.

Carlson e Nagarajan (1992) estudaram a adição à fase orgânica de substâncias desestabilizadoras de micelas, tais como álcoois, para a liberação das enzimas na re-extração. No artigo são reportados fatores de recuperação de quase 100%, entretanto nada é mencionado quanto à atividade enzimática da proteína obtida por esse método. Este método é particularmente interessante, pois posteriormente o álcool pode ser separado do solvente orgânico por outra extração líquido-líquido, sendo estes reagentes reaproveitados no processo.

3.8 Equipamentos Usados nos Processos de Extração

A escolha de um extrator é função da natureza dos produtos e das características físicas e químicas do sistema em estudo, além de ser função do desempenho do equipamento, considerando-se as condições de extração (Rabelo, 1999).

Para o desenvolvimento de equipamentos de extração líquido-líquido, deve-se avaliar além do sistema de trabalho, os dados de equilíbrio e de transferência de massa nas temperaturas de interesse (Hanson, 1971).

A utilização de extratores verticais nos processos de extração líquido-líquido é justificada pelo fato desses equipamentos ocuparem pequena área, terem boa eficiência de separação e apresentarem facilidades de operação e manutenção. Além disso, nesses equipamentos, o processo de transferência de massa e separação das fases são mais rápidos e o sistema pode atingir o equilíbrio ou aproximar-se dele em um período de tempo menor do que outros tipos de equipamentos (Carneiro-da-Cunha *et. al.*, 1994; Souza, 1997).

Existe um grande número de equipamentos desenvolvidos para a aplicação da extração líquido-líquido, que podem ser classificados de acordo com os princípios gerais de operação e construção. Os extratores dividem-se em duas categorias, de acordo com o tipo de contato entre as fases: sistemas de contato e separação de fases em estágios e sistemas de contato diferencial (Hanson, 1971).

3.8.1 Coluna Agitada por Campânulas Pulsantes

Entre as colunas de contato diferencial foi desenvolvida uma micro-coluna de campânulas pulsantes, que tem a finalidade de obter um equipamento para a realização de processos de extração líquido-líquido, visando a separação e purificação de biomoléculas.

O uso de campânulas em colunas pulsadas foi proposto visando-se obter uma agitação eficiente, mas suave, para a aplicação em processos de separação de compostos lábeis, como as proteínas. Sendo a agitação suave, pretende-se evitar a desnaturação de biomoléculas, que ocorre quando são introduzidas ao sistema excessiva energia mecânica e agitação extremamente vigorosa.

Além disso, as campânulas aumentam o tempo de contato entre as fases na coluna e fazem com que ocorra uma dispersão uniforme das gotas, o que favorece a transferência de massa, fazendo com que o sistema se aproxime do equilíbrio (Rabelo, 1999).

Com o sistema de agitação composto por campânulas pulsantes, as fases que entram na coluna comportam-se da maneira mostrada na figura 2.1. Como pode ser visto, a fase leve entra na micro-coluna pelo fundo e fica retida na campânula. A peneira, da qual a campânula é constituída, não deixa a maior parte da fase leve passar espontaneamente. A campânula retém a fase leve por um tempo maior do que outros dispositivos comumente usados para promover a agitação. Deste modo, ocorre um aumento do tempo de contato entre as fases (Rabelo, 1999).

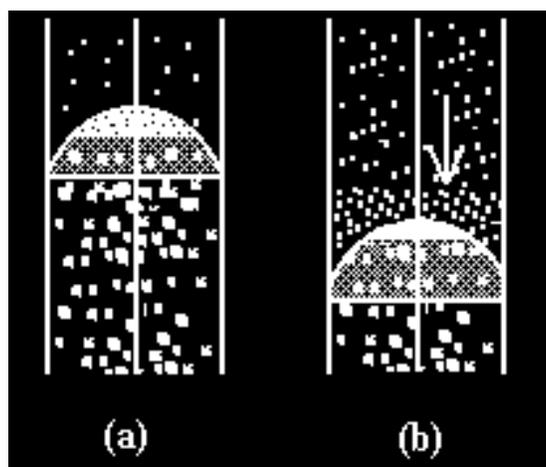


Figura 2.1 – Agitação através de campânulas pulsantes numa coluna de extração líquido-líquido pulsada. (a) campânula parada durante o intervalo entre pulsos. (b) movimento descendente durante o pulso.

Durante o pulso, quando a campânula desce, o líquido mais leve (de menor densidade) que fica concentrado no interior da campânula, é forçado a passar pelos furos da peneira. A fase leve é “quebrada” em gotas bem pequenas. Uma importante característica da agitação obtida através do uso de campânulas pulsantes é a formação de uma dispersão, bastante uniforme e de gotas pequenas, da fase leve na fase contínua, como pode ser visto na figura 2.1. Essas características são favoráveis à transferência de massa. Quando a campânula sobe, o movimento ascendente faz com que as fases misturem-se ainda mais (Rabelo, 1999).

As campânulas devem ser construídas de material inerte que não reaja com as soluções usadas na extração (Rabelo, 1999).

3.8.2 Fração de Retenção da Fase Dispersa ("Hold-up")

A transferência de massa entre as fases líquidas em escoamento em uma coluna de extração depende, entre outros fatores, da área interfacial de contato entre as fases contínuas e dispersa. A área interfacial está relacionada com o tamanho das gotas e com a retenção da fase dispersa no interior da coluna. A retenção da fase dispersa é expressa pela fração volumétrica da fase dispersa contida no volume total da coluna, sendo de grande importância no projeto de colunas de extração líquido-líquido por influenciar a transferência de massa entre as fases (Kumar e Hartland, 1988).

A seguir, são apresentados os fundamentos referentes à tração de retenção da fase dispersa, as regiões de operação existentes em colunas pulsadas e estudos encontrados na literatura relacionados com esta medida.

As publicações existentes na literatura, relacionadas à fração de retenção são, em sua maioria, referentes às colunas com fluxo pulsado, sendo que a quantidade de estudos relativos às colunas com pratos pulsantes é pequena. Assim, baseou-se a revisão

bibliográfica nas colunas de fluxo e pratos pulsados, além de alguns trabalhos sobre a fração de retenção da fase dispersa em colunas de discos rotativos.

3.8.3 As Regiões de Operação

As regiões de operação em colunas pulsadas são definidas como faixas de operação derivadas do comportamento das fases nas colunas (Góis, 1995).

Sege e Woodfield (1954) foram os primeiros autores a descreverem as regiões de operação em colunas pulsadas. Para isso, estes autores construíram gráficos em que foram relacionados à carga total de alimentação ($V_c + V_d$) com a frequência de pulsação e definiram a existência de zonas ou regiões de operação distintas. A seguir é apresentada uma breve descrição de cada região de operação, segundo Sege e Woodfield (1954).

1-Região de operação de completa inundação: Sege e Woodfield (1954) definiram o ponto de inundação ("flooding") como sendo a condição de operação em que as correntes de alimentação da coluna e de entrada do solvente são impossibilitadas de escoarem em contracorrente. Ou seja, as correntes entram e saem da coluna por uma mesma extremidade, sem que possa acontecer um contato adequado entre elas. As gotas da fase que deve se dispersar na fase contínua são rejeitadas por esta fase. Não se dispersam e assim, não ascendem até o topo da coluna, devido às condições nas quais o equipamento é operado. Este tipo de operação é totalmente indesejável em qualquer equipamento de contato contínuo.

2-Região de operação de inundação por pulsação insuficiente: Esta região é parecida com a anteriormente descrita, por se tratar de uma região de operação de inundação. Nesta região de operação, a inundação é causada pela baixa quantidade de energia que é fornecida à coluna. As correntes líquidas não conseguem ultrapassar os furos dos pratos e retomam pela mesma extremidade em que entraram na coluna.

3-Região de operação de mistura-decantação: A operação de mistura-decantação, segundo Sege e Woodfield (1954), ocorre em baixas cargas (vazão total que entra na coluna) e frequências, sendo caracterizada pela separação das duas fases (leve e pesada), sob a forma de camadas distintas entre os pratos durante o pulso. Este tipo de operação é altamente estável, porém menos eficiente quando comparada com a operação da mesma coluna em condições de emulsão.

4-Região de operação de emulsão: A operação tipo emulsão ocorre a cargas e frequências mais elevadas que a da operação mistura-decantação, sendo caracterizada pelo pequeno tamanho das gotas produzido. É uma dispersão uniforme da fase leve na pesada, apresentando, portanto, pequena variação durante o pulso. A grande área de contato interfacial por unidade de volume faz com que este tipo de operação seja mais eficiente que os apresentados anteriormente.

5-Região de operação instável: A operação instável ocorre a cargas e frequências ainda mais elevadas que as da região de emulsão. A mistura das fases forma gotas grandes ou porções de líquido com forma irregular, devido principalmente à coalescência das gotas da fase dispersa.

3.9 Modelagem da extração líquido-líquido

O uso da extração líquido-líquido em processos industriais vem ganhando atenção em muitos tipos de indústrias como a farmacêutica, petroquímica, nuclear e hidrometalurgia. Devido esta técnica oferecer muitas vantagens como a economia de energia e melhorar a qualidade do produto. Devido a isto tem aumentado o interesse no desenvolvimento de técnicas para modelagem e controle desse processo (Chouai *et. al.* 2000).

O objetivo do controle é manter a coluna nas condições ótimas de operação. Essas condições devem ser previamente definidas através da hidrodinâmica e da transferência de massa (Zhang *et. al.*, 2004). Para o controle da coluna deve-se agir na:

- frequência de pulsação
- razão entre as fases
- vazão total da coluna

Para a representação desse processo podem ser usados vários tipos de modelos como (Fischer, 2002):

1. Modelo Físico
2. Representação entrada-saída (caixa preta)

Na primeira categoria, os modelos são desenvolvidos pelas leis da física e da química, como a lei da conservação de massa, energia e momento. Devido à complexidade do processo ou fenômeno a ser matematicamente descrito, o engenheiro deve fazer algumas simplificações para poder representar o sistema. Apesar destas hipóteses, os resultados destes modelos são geralmente descritos por equações diferenciais parciais não lineares.

Na segunda categoria, o modelo (função de transferência, representação de estado, etc.) o qual é desenvolvido pelos engenheiros de controle os quais se preocupam pouco com o processo a ser controlado. A relação causa-efeito entre entrada e saída de um sistema contínuo consiste de um conjunto de equações algébricas, diferenciais, parciais ou não, as quais podem ser discretizadas para simulação ou para o controle.

3.10 Redes Neurais Artificiais

Uma Rede Neural Artificial pode ser considerada como sendo um sistema dinâmico não linear de grande escala, consistindo de um grande número de elementos simples de processamento, chamado nós ou neurônios, os quais estão interconectados de alguma maneira através de pesos ajustáveis. As principais características das redes neurais são o processamento paralelo, memória associativa e distributiva, aprendizado e auto-organização, características que são semelhantes às redes neurais biológicas (Haykin, 1998).

3.10.1 O Modelo Computacional das Redes Neurais Artificiais

Uma rede Neural Artificial (RNA) é uma ferramenta computacional que resultou de pesquisas na área de Inteligência Artificial (IA) que procurava entender e modelar o comportamento do cérebro humano. Com o propósito de desenvolver o mesmo tipo de estrutura para um modelo computacional de comportamento inteligente, neurologistas e pesquisadores de IA propuseram uma rede altamente interconectada de neurônios ou nódulos.

Informações de entrada são colocadas em uma rede de nódulos que interagem matematicamente entre si. Baseado nestas informações, surge um mapeamento do modelo entrada/saída macroscópico esperado, ou seja, as interações entre os nódulos são bem definidas e ajustadas até que as relações entrada/saída sejam obtidas. A interconexão de nódulos forma a RNA, conforme mostra a figura 2.3:

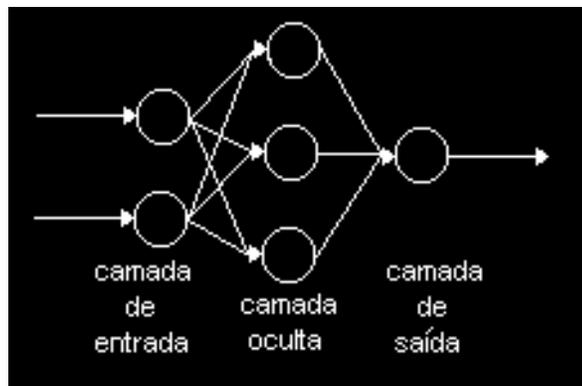


Figura 2.3 - RNA e suas interconexões.

Todas as RNA's devem ter uma camada de neurônios de entrada, uma de saída e, no mínimo, uma camada de neurônios escondida.

Uma RNA pode ser vista como uma caixa preta que recebe informações de entrada específicas em cada nódulo da camada de entrada e então processa estas informações através de suas interconexões entre os nódulos de forma totalmente oculta. Finalmente, a RNA resulta informação final de saída nos nódulos da camada de saída. Resumindo, a camada de entrada recebe informações de fontes externas e passa estas informações para dentro da RNA para processamento. As camadas escondidas recebem informações da camada de entrada e realizam o processamento destas informações. A

camada de saída recebe as informações processadas da RNA e envia os resultados para o receptor externo (Haykin, 1998).

Quando a camada de entrada recebe informações da fonte externa, se torna ativada e emite sinais para sua vizinhança. Esta recebe excitação da camada de entrada e mais uma vez emite uma saída para suas vizinhanças. O resultado é um modelo de ativação que se manifesta na camada de saída. Dependendo da força das conexões, sinais podem excitar ou inibir os nódulos.

Uma característica importante das RNA's é que, dentro da rede, o processamento é numérico embora os resultados possam se manifestar simbolicamente.

A rede retém as informações através da magnitude dos sinais que passam através das conexões dos neurônios com sua vizinhança.

Sendo numéricas as informações retidas na RNA, esta pode ser usada como uma ferramenta importante de modelagem empírica multivariável e com algumas vantagens, como sua habilidade de adaptação.

Imitando o processo humano de aprendizagem, as RNA's "aprendem" e "resolvem" problemas por tentativa-e-erro. As RNA's utilizam-se de algoritmos particulares de treinamento ou aprendizagem, onde iterativamente são ajustados os pesos das conexões entre os nódulos até que os pares desejados de entrada/saída sejam obtidos e as relações de causa-efeito possam ser estabelecidas. Se as condições mudarem de tal modo que o desempenho do modelo não seja mais adequado, pode-se submeter a RNA a mais um treinamento sob estas novas condições de entrada/saída para corrigir o desempenho. Assim sendo, pode-se submeter a RNA a uma atualização periódica, resultando num modelo auto-ajustável em linha.

3.10.2 O Neurônio Artificial

O neurônio é uma unidade fundamental de processamento para a operação da rede neural. Na figura 2.4 está representado o modelo, onde podemos identificar três elementos básicos do modelo.

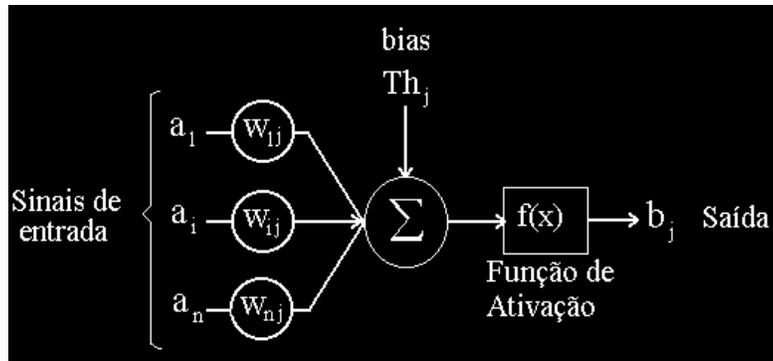


Figura 2.4 - Modelo de um Neurônio Artificial.

Verifica-se então que o neurônio artificial realiza seus cálculos baseado nas informações de entrada. Ele faz o somatório do produto entre os vetores A e Wj, subtrai a ativação residual interna e então passa este resultado para uma forma funcional, $f(\)$, ou seja:

$$f(W_j \cdot A - T_{hj}) = f\left(\sum_{i=1}^n (w_{ij} \cdot a_i) - T_{hj}\right)$$

Funções de Ativação

A função de ativação, define a saída do neurônio em termos de saída local. As funções de ativação mais encontradas na literatura são:

- Função degrau, limita a saída do neurônio a apenas dois valores (0 ou 1). Normalmente é utilizada para criar neurônios que tomem decisões binárias, como nos classificadores. É limitada (“bounded”), porém não é derivável;
- Função linear, não é limitada. Neurônios com esta função de propagação podem ser utilizados como aproximadores lineares;
- Função sigmoideal, permite que a entrada assuma qualquer valor no intervalo $(-\infty$ e $\infty)$ e os comprime para o intervalo $[0, +1]$. É a função geralmente adotada em redes neurais, em virtude de ser contínua, monotônica, não linear e facilmente diferenciável em qualquer ponto;

- Função tangente hiperbólica, mapeia a entrada dos neurônios no intervalo $[-1, +1]$. Possui as mesmas características e emprego da função logística sigmoideal, possibilitando que as saídas sejam simétricas.

O ideal na função de ativação é que ela seja não linear, limitada, monotônica e continuamente derivável em todos os seus pontos.

3.10.3 Topologia de uma Rede Neural Artificial

A topologia de uma RNA se refere à maneira como os neurônios artificiais estão interconectados e organizados em camadas.

Segundo Quattrone e Liu (1991), a conexão intercamadas é particularmente importante para aplicações em Engenharia. Dentro deste esquema de interconexão, existem duas opções: as conexões por retroalimentação e por alimentação direta, conforme a figura 2.5:

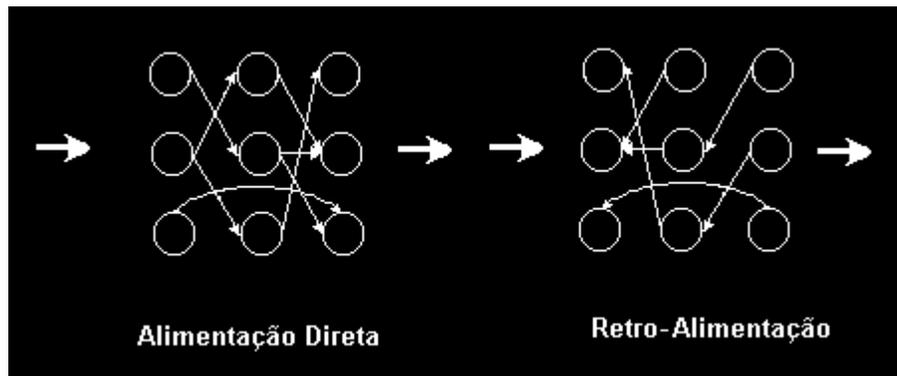


Figura 2.5 - Conexões por Alimentação Direta e Retro-Alimentação.

A topologia ideal deve ser escolhida de acordo com a natureza do problema a ser resolvido. Para modelagens dinâmicas de equipamentos, o que se quer é mapear uma resposta baseada em informações de entrada e para tanto deve ser utilizada a conexão intercamada com alimentação direta. Além disto, uma rede Alimentação Direta (“Feedforward”) com apenas uma camada oculta é suficiente para a representação de funções contínuas (Cybenko, 1989).

3.10.4 Treinamento da RNA

A aprendizagem, ou treinamento, é a etapa onde se codificam as informações. Um sistema aprende uma regra se ele codifica esta regra em sua estrutura. Portanto, esta estrutura deve mudar durante o aprendizado desta informação.

Para treinar RNA's, deve-se ajustar os fatores ponderais, W , até que a resposta calculada (informação de saída da rede), baseada em informações de entrada, reproduza a informação de saída conhecida. O ajuste é feito de forma sistemática sendo denominada treinamento e caracteriza-se então como um problema de otimização onde se busca reduzir erros de predição.

O treinamento precisa produzir uma RNA estável e convergente. Uma RNA representativa deve mapear a saída para qualquer valor do conjunto de entrada. A estabilidade garante o resultado mas não garante a exatidão.

Uma RNA convergente produz relações de entrada/saída exatas. Então, a convergência está relacionada com a exatidão dos resultados da rede. A magnitude do erro entre os valores reais e os preditos pela rede é a medida direta da convergência.

3.10.5 Dinâmica de treinamento

A operação da rede neural constitui-se de 3 etapas:

- 1 treinamento - ajuste dos parâmetros do modelo
- 2 teste - validação dos parâmetros do modelo
- 3 produção - utilização do modelo.

Na etapa do treinamento é escolhido o algoritmo de aprendizado juntamente com os parâmetros de aprendizado. O aprendizado é o processo pelo qual a rede adapta seus parâmetros de forma a satisfazer os requisitos de mapeamento estabelecidos.

Aprendizado por Retropropagação (“Backpropagation”)

Vários modelos de RNA's foram desenvolvidas desde 1943. O modelo de algoritmo mais difundido, e talvez o mais utilizado, é o “backpropagation” (BP), pertencente à classe das RNA's não-recorrentes. Para que este tipo de aprendizado pudesse

não se restringir somente às redes compostas por duas camadas (uma entrada e uma saída) foram criadas uma técnica chamada de retropropagação, “backpropagation”, para redes com conexões intercamadas com alimentação direta (perceptron).

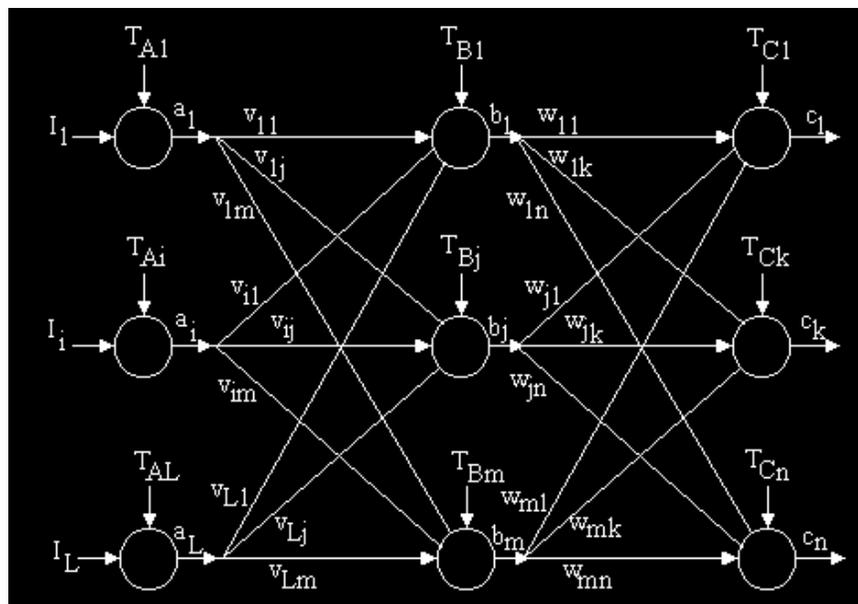


Figura 2.6 – RNA do tipo Perceptron com três camadas.

O “backpropagation” aprende mapeando a entrada com as saídas desejadas pela minimização da função erro. Tipicamente usa-se a soma quadrática dos erros. O componente de saída do vetor do n-ésimo nódulo da camada de saída é calculado, $\epsilon_n = d_n - c_n$, onde d_n é o valor de saída desejado e c_n é o valor de saída calculado. A soma quadrática dos erros, E, é:

$$E = \sum \epsilon_n^2 = \sum (d_n - c_n)^2$$

Ajustam-se os pesos das interconexões, v_{ij} 's e w_{jk} 's mostrados na figura 2.7 para minimizar o erro, E.

O algoritmo backpropagation é uma técnica de aprendizagem do tipo gradiente descendente. Usou-se o método de Newton para minimizar o erro. A vantagem deste método é que os pesos são estimados sistematicamente mais apropriadamente do que arbitrariamente.

Uma dificuldade com os algoritmos “backpropagation” é o tempo requerido para treinar a rede. Dependendo do tamanho da RNA, o treinamento pode levar horas ou dias. Pesquisadores têm investigado diversos procedimentos alternativos numa tentativa de agilizar o processo de aprendizagem e uma destas técnicas é o Aprendizado por Gradiente Descendente.

3.10.6 Algoritmo de Treinamento Levenberg-Marquardt

Os métodos quasi-Newton mostram-se em princípio mais rápidos e mais robustos do que aqueles baseados no gradiente descendente . Com base nisto, Hagan e Menhaj (1994) utilizaram o algoritmo de Levenberg-Marquardt para o treinamento de RNA’s do tipo “Feedforward” e verificaram seu melhor desempenho para os casos onde existiam apenas algumas centenas de dados entrada/saída. Este método consiste numa aproximação do método de Newton e propõe que a atualização dos pesos seja dada pela seguinte equação:

$$\Delta \bar{y} = [J^T(\bar{y})J(\bar{y}) + \mu.I]^{-1} J^T(\bar{y})e(\bar{y})$$

sendo:

$$\bar{y} = [w_{1,1}^1, w_{1,2}^1, \dots, w_{S1,R}^1, b_1^1, \dots, b_{S1}^1, w_{1,1}^2, \dots, w_{i,j}^k, \dots, b_{S,k}^k, \Lambda, b_{SM}^M], \text{ vetor peso;}$$

$$J(\bar{y}) = \begin{bmatrix} \frac{\partial e_1(\bar{y})}{\partial y_1} & \frac{\partial e_1(\bar{y})}{\partial y_2} & \dots & \frac{\partial e_1(\bar{y})}{\partial y_n} \\ \frac{\partial e_2(\bar{y})}{\partial y_1} & \frac{\partial e_2(\bar{y})}{\partial y_2} & \dots & \frac{\partial e_2(\bar{y})}{\partial y_n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial e_{NP}(\bar{y})}{\partial y_1} & \frac{\partial e_{NP}(\bar{y})}{\partial y_2} & \dots & \frac{\partial e_{NP}(\bar{y})}{\partial y_n} \end{bmatrix}, \text{ matriz jacobiana dos erros;}$$

$$\frac{\partial e_q(\bar{y})}{\partial w_{i,j}^k} = \delta_i^k \cdot a_j^{k-1} \quad \text{e} \quad \frac{\partial e_q(\bar{y})}{\partial b_i^k} = \delta_i^k;$$

$$q=1, 2, \dots, Np; \quad k=1, 2, \dots, M-1; \quad i=1, 2, \dots, S_{k+1}; \quad j=1, 2, \dots, S_k.$$

As etapas realizadas no treinamento são as mesmas já descritas. Além disso, os cálculos dos termos de declínio (δ) usam as mesmas equações do método de retropropagação, com uma simples modificação:

$$\bar{\delta} = F(\bar{x}^M)$$

Como se pode notar o cálculo da matriz jacobiana dos erros entre os valores reais e os preditos pela RNA é a etapa que mais exige esforço computacional. Para problemas com grandes quantidades de dados a memória requerida para tal processamento torna-se um fator limitante na utilização do algoritmo.

3.10.7 Generalização

Um dos problemas que ocorre durante o treinamento é o sobreajuste ('overfitting'), que é quando o erro durante o treinamento chega ao mínimo mas quando novos dados são apresentados o erro é grande. A rede memorizou os dados de treinamento e não generalizou para novas situações. Existem dois métodos para melhorar a generalização dos dados : Regularização e a Parada Antecipada.

3.10.7.1 Regularização

A regularização envolve a modificação da função a qual é normalmente a soma dos erros quadráticos do conjunto de treinamento.

A função típica usada para treinar redes neurais retroalimentadas é a soma dos erros quadráticos:

$$F = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N e^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (d_i - c_i)^2$$

Para melhorar a generalização modifica-se a função, um termo que consiste na média da soma dos quadrados dos pesos e bias:

$$F_{\text{reg}} = \alpha F + \beta F_w \quad \text{onde } \alpha \text{ e } \beta \text{ são parâmetros da função objetivo,}$$

$$F_w = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n w_j^2$$

Usando-se esta função os pesos e bias têm valores baixos, isto força a rede a responder suavemente e então o sobreajuste é pouco provável (Foresee,1997).

O problema da regularização é a dificuldade em determinar um valor adequado para a taxa. Se o valor for muito grande poderá levar a um sobreajuste e se for muito pequeno a rede poderá não ajustar adequadamente os dados de treinamento.

É desejável determinar esses parâmetros de uma forma automatizada, uma destas abordagens é um processo que usa a estrutura Bayesiana (MacKay, 1992).

A otimização Bayesiana da regularização dos parâmetros requer o cálculo da matriz de Hessian de $F(w)$ no ponto mínimo w^{MP} . Propomos o uso da aproximação de Gauss-Newton para a matriz Hessian, a qual está disponível se o algoritmo de otimização Levenberg-Marquardt é usado para a localização do ponto mínimo. Os cálculos adicionais requeridos para a otimização da regularização são mínimos.

Sabemos que a cada reestimação, os parâmetros da função objetivo estão mudando, por esta razão o ponto mínimo está se movendo. Se atravessarmos a superfície de desempenho movemos em direção ao próximo ponto mínimo, então as novas estimativas para a função objetivo serão mais precisas. Eventualmente, a precisão poderá ser boa o bastante que a função objetivo poderá não ter mudança significativa nas próximas iterações. Então obteremos a convergência.

Quando a aproximação de Gauss-Newton é usada para a regularização Bayesiana, melhores resultados são obtidos se o conjunto de treinamento é normalizado na faixa de $[-1,1]$ (ou alguma região similar). Normalmente, normaliza-se entrada e saída.

Depois do treinamento, existem algumas inspeções que devem ser feitas. Primeiro, se o número efetivo de parâmetros final, γ , é muito próximo do atual número de parâmetros N , então a rede poderá não ser boa o bastante para representar verdadeiramente a função. Neste caso, é só adicionar mais neurônios à camada intermediária e retreinar. Se a rede maior tiver o mesmo γ , então a rede anterior tinha neurônios suficientes. Caso contrário, mais camadas de neurônios podem ser necessárias. A segunda inspeção é a consistência dos resultados. Se a rede é suficientemente grande, então a rede maior deverá ter valores comparáveis de γ , E_D e E_w .

3.10.7.2 Parada Antecipada

Um outro método para melhorar a generalização é a Parada Antecipada. Os dados são separados em três subconjuntos. O primeiro subconjunto é o conjunto de treinamento, é usado para calcular o gradiente e para atualizar os pesos e bias. O segundo subconjunto é o de validação, o erro da validação é monitorado durante o treinamento. O erro na validação decresce durante a fase inicial de treinamento, como o erro do conjunto de treinamento. Deste modo, quando a rede começar a sobreajustar os dados, o erro no conjunto de validação irá aumentar. Quando o erro na validação aumenta para um número específico de iterações o treinamento é parado, e o peso e bias e o erro mínimo da validação são retornados.

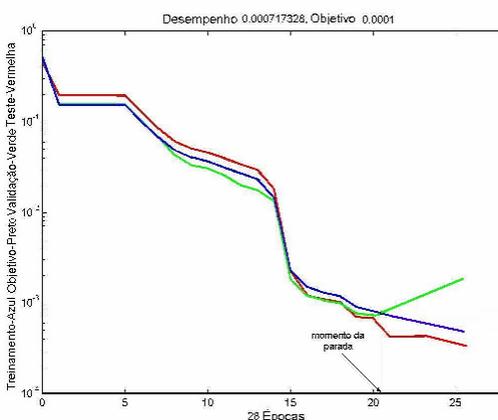


Figura 2.7 – Gráfico do treinamento com algoritmo Parada Antecipada.

O conjunto de teste não é usado durante o treinamento, mas é usado para comparar diferentes modelos. É comum graficar o erro do conjunto de teste durante o treinamento, se o erro no conjunto de teste chega ao mínimo num número diferente de iterações que o conjunto de validação, isto indica se o conjunto está bem dividido.

Tanto a Regularização quanto a Parada Antecipada podem assegurar a generalização da rede quando bem aplicados. Quando estiver usando a regularização Bayesiana, é importante treinar a rede até alcançar a convergência.

Ao se usar a Parada Antecipada deve-se ter muito cuidado de não usar um algoritmo que convirja muito rapidamente. Se estiver usando um algoritmo muito rápido deve-se determinar os parâmetros para que a convergência seja relativamente baixa.

Com a Parada Antecipada, a escolha do conjunto de validação é muito importante. O conjunto de validação deve representar todos os pontos do conjunto de treinamento.

Com ambos algoritmos, é bom treinar a rede iniciando-se de várias condições iniciais. É possível que cada método falhe em certas circunstâncias. Testando de diversas situações iniciais pode-se verificar quão robusto é o desempenho da rede.

A regularização Bayesiana generaliza melhor que a parada antecipada, quando treina-se redes para aproximar funções. Isto é porque a regularização Bayesiana não requer a separação do conjunto de validação e treinamento, usam-se todos os dados. Esta vantagem é especialmente notada quando o conjunto de dados é pequeno.

3.11 Uso de Redes Neurais em Extração Líquido-Líquido

O uso de Redes Neurais na extração é bastante recente, tanto na modelagem de sistemas como no controle de colunas de extração (Zhang *et. al.*, 2004, Farouq, 2005).

Para descrever o equilíbrio líquido em sistemas bifásicos aquosos da proteinase neutra e oxitetraciclano da *Streptomyces rimosus* no sistema PEG- 6000 e sulfato de amônia Bogdan et al (1995) usaram redes neurais. Uma rede “feedforward” multicamada foi treinada aplicando-se o algoritmo “backpropagation” obtendo-se uma topologia 4-2-1.

Na modelagem da extração de terras raras com redes neurais em vários sistemas, observou-se que os raios dos lantanídeos poderiam ser usados para generalizar o procedimento de extração com solventes. Os dados para o treinamento foram pré-processados através de transformação logarítmica. A representação da extração foi melhorada através de camadas do tipo “self-organizing” (Kohonen) na rede neural, obtendo uma topologia 3-10-1 (Gibes *et. al.*, 1996).

Com o objetivo de minimizar a concentração de ácido oxálico no refinado usou-se redes neurais para a modelagem de uma coluna de anéis pulsada, na extração de uma mistura de tributilfosfato e dodecano (como solvente). A resposta de pH e condutividade

para variações de frequências de pulsação e vazão de solvente foram inferenciadas através de um conjunto de dados experimentais. A rede foi treinada com um conjunto de 6000 dados de entrada-saída e um conjunto de teste de 2992 dados, a topologia final obtida foi 11-9-2 (Chouai *et. al.*, 2000).

Fischer (2002) usou a ferramenta de redes neurais para a modelagem da extração do citocromo b5 em um sistema bifásico aquoso em operação descontínua e contínua. As variáveis de entrada usadas para a modelagem em descontínuo foram: massa molar do PEG, viscosidade da fase PEG, e viscosidade da fase sal e como saída o coeficiente de partição do citocromo b5. E o modelo que representou melhor a operação contínua é o que contém as variáveis de entrada: coeficiente de partição, vazão total das fases e frequência de pulsação e como saída: porcentagem de extração e fração de retenção da fase dispersa. A rede neural que apresentou melhor desempenho foi a rede treinada com o algoritmo Regularização Bayesiana. O ajuste dos dados foi da mesma ordem de grandeza dos erros experimentais, representando adequadamente o sistema.

Para a descrição do sistema bifásico formado por PEG/fosfato de potássio Li e Norman (2002) usaram redes neurais com o método evolucionário polimórfico, onde obtiveram uma alta correlação para os dados de teste. A rede obtida foi usada para a predição de novos dados experimentais com um mínimo de condições iniciais necessárias, chegando a ajustes próximos dos dados de testes. Vários modelos de redes treinadas por este método foram candidatas a solução com ajustes similares.

4 Materiais e Métodos

4.1 Preparo das Amostras

4.1.1 Preparação da amostra a partir do extrato bruto

Prepararam-se as amostras com a polpa do abacaxi pérola através da seguinte etapas:

- 1) Moagem da polpa em liquidificador (marca Walita) em velocidade baixa, por 5 min, a temperatura ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), sem a adição de água.
- 2) Filtração em filtro de papel *Método* (nº 101) para retirada de fibras e particulados presentes no extrato.
- 3) Centrifugação do filtrado a 2000 g por 5 min, a temperatura ambiente e separação do sobrenadante.
- 4) Acondicionamento a temperatura de -5°C .

4.1.2 Preparo das soluções Micelares

Para o preparo das soluções micelares usaram-se os tensoativos BDBAC (Merck) de caráter catiônico e AOT (Sigma) de caráter aniônico.

Na solução de AOT usou-se o tensoativo AOT e o solvente isooctano (Merck) e na solução de BDBAC usou-se o tensoativo BDBAC, solvente isooctano (Merck) e co-solvente hexanol (Merck). Para a formação das micelas é necessário a adição de 1% v/v de água deionizada. As concentrações usadas estão apresentadas nos planejamentos experimentais.

4.1.3 Preparo das soluções de Re-Extração:

As soluções de re-extração consistiram de tampão Ácido Cítrico/Fosfato Dissódico (Synth) 1M e NaCl (Synth) adicionado até as condições especificadas no planejamento (1 e 2 M).

4.2 Procedimento da Extração e Re-Extração.

4.2.1 Extração:

Utilizou-se a seguinte seqüência de operação de extração (Figura 4.1):

- Misturou-se a solução de bromelina com igual volume da solução micelar (5 mL).
- Agitou-se a solução em vórtice por 3 minutos até ficar homogêneo (emulsão).
- Centrifugou-se o tubo a 2320 g por 5 min para separação das fases.
- Retirou-se a fase micelar (superior) para ser usada na etapa de re-extração.
- Analisou-se a fase aquosa inicial, determinando-se a proteína total e atividade enzimática.

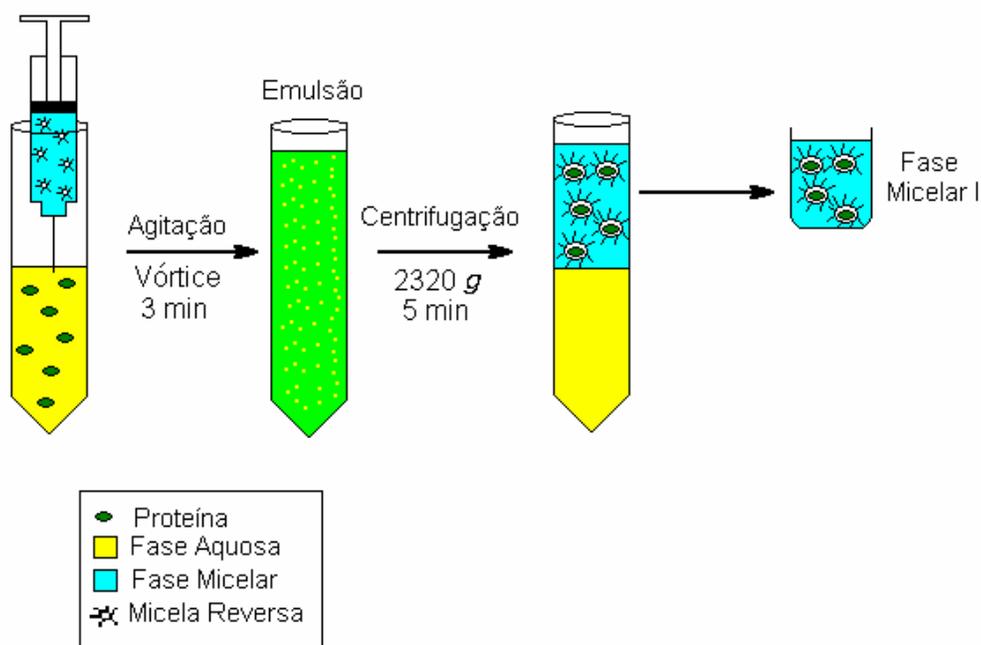


Figura 4.1 - Representação esquemática da etapa de extração da bromelina por micelas reversas.

4.2.2 Re-Extração

Utilizou-se a seguinte seqüência de operação na reextração (Figura 4.2):

- Misturou-se a fase micelar proveniente da extração com uma alíquota de igual volume da solução de re-extração.
- Agitou-se o tubo em vórtice durante 3 minutos e centrifugou-se a 2320 g por 5 min.
- Desprezou-se a fase superior (micelar) e retirou-se a fase inferior (fase aquosa com a enzima) para determinação de proteína total e atividade enzimática.

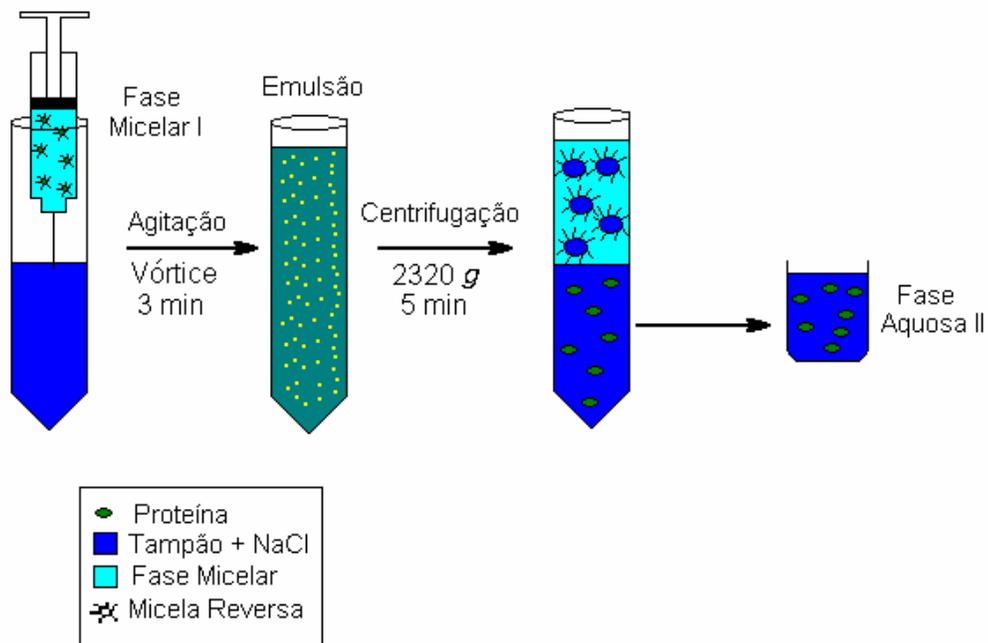


Figura 4.2 - Representação esquemática da etapa de re-extração da bromelina por micelas reversas.

4.3 Extração Contínua

4.4 Descrição do Equipamento

Um esquema da micro-coluna de campânulas pulsantes usada no trabalho é mostrado na figura 4.3. Esta micro-coluna é constituída de um tubo de vidro de 19 cm de altura; 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 de diâmetro interno.

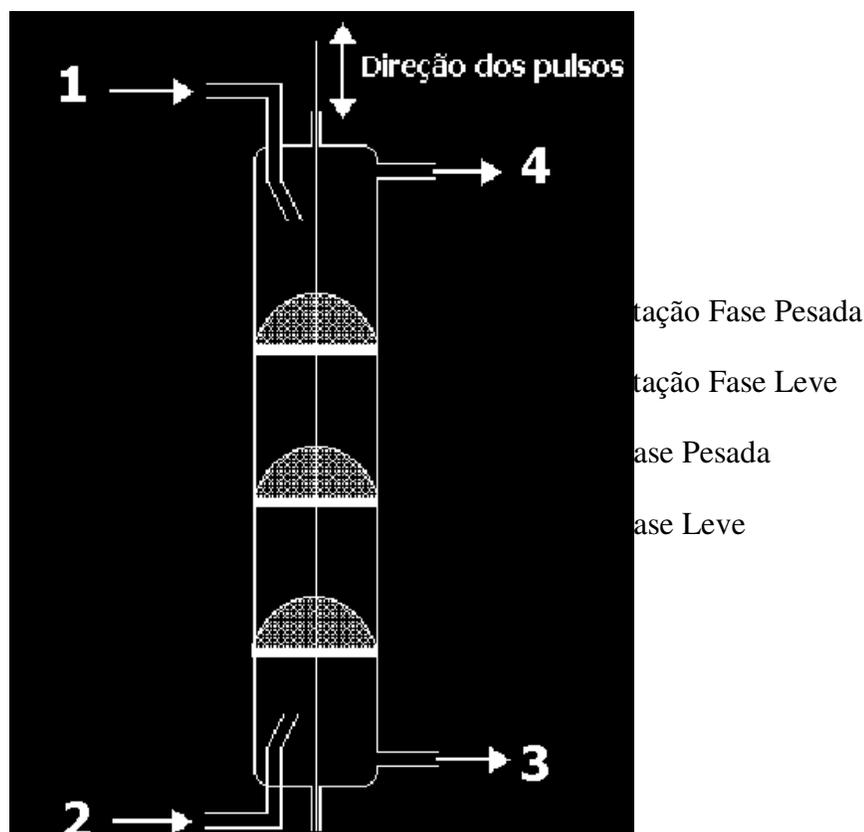


Figura 4.3 – Esquema da micro coluna de campânulas pulsantes (Adaptado de Rabelo, 1999).

No centro desta micro-coluna, está localizada uma haste aço inox, na qual estão soldadas três campânulas, distanciadas 4 cm uma da outra. O diâmetro da base da campânula é 2,49 cm. A peneira de aço inox, da qual a campânula é construída, tem MESH 24 e, portanto, possui uma área livre para o escoamento de 38%. Durante um pulso, a campânula movimenta-se aproximadamente 2,8 cm para baixo e 2,8 cm para cima, o que faz com que a amplitude do pulso seja de aproximadamente 5,6 cm.

Os bocais de alimentação e saída das fases são de aço inox e possuem um diâmetro interno de 3,65 mm e 6,85 mm de diâmetro externo. Os pulsos foram fornecidos por um dispositivo que promove os movimentos alternativos (movimenta o eixo para cima e para baixo) e controlados por um controlador da frequência de pulsação. A entrada das duas fases (fase leve e fase pesada) é feita por meio de uma bomba peristáltica de quatro pontos, previamente calibrada.

Os tubos para conduzir as entrada e saídas das fases são de viton, que é um material resistente à ação da maioria dos solventes. O viton foi escolhido para permitir que outros sistemas sejam usados, já que os sistemas de duas fases aquosas não são corrosivos.

4.4.1 Operação da Micro-coluna

Para a operação da micro-coluna, com a finalidade de obterem-se dados relativos a hidrodinâmica e a eficiência seguiu-se o procedimento a seguir:

Primeiro completou-se a micro-coluna com a fase contínua, ou seja, o caldo do abacaxi. Após ligou-se a bomba peristáltica de entrada e saída da fase dispersa e da fase contínua, ajustando-se aos valores desejados. Após o ajuste da vazão, acionou-se o sistema de pulsação e ajustou-se a sua frequência no valor desejado.

Esperou-se o tempo necessário para a coluna alcançar o estado estacionário (concentrações de saída praticamente não variam), aproximadamente 10 a 15 min, deixou-se a coluna operando neste estado por 5 min e após alterou-se as condições de operação conforme as novas condições especificadas, aguardando-se alcançar ao novo regime permanente.

Durante a operação do equipamento retirou-se amostras da fase leve na saída, que foram posteriormente re-extraídas em batelada e analisadas. Realizou-se as análises de atividade proteolítica e proteína total, para determinar o rendimento da extração. Com esses dados determinou-se o comportamento do rendimento ao longo da operação da coluna, definindo-se quais as melhores condições de operação e o comportamento quando ocorre uma alteração na operação.

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Determinação de Proteínas

O teor de proteínas foi determinado de acordo com o método de Lowry (1951). Utilizou-se como padrão BSA.

4.5.2 Método para a determinação da atividade Proteolítica.

Determinou-se a atividade proteolítica conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984) através da hidrólise enzimática da caseína a 2% (p/v) pH 7,5 a 37°C durante 10 minutos, seguindo-se de precipitação do substrato não hidrolisado com solução de ácido tricloroacético (TCA). A quantidade de produtos hidrolíticos não precipitados, ou seja, de peptídeos solúveis em TCA foi determinada a 280 nm contra um branco do substrato e outro da amostra.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de variar em uma unidade a leitura de absorbância a 280 nm, durante 10 min a 37°C.

4.6 Metodologia de cálculo

Para avaliação da extração serão analisados os seguintes parâmetros abaixo definidos:

a) PT – Rendimento em proteína total

$$PT = \frac{P_2}{P_1} \times 100$$

P₁ – proteínas totais no extrato bruto

P₂ – proteínas totais após a re-extração

b) AP – Rendimento em atividade enzimática

$$AP = \frac{A_2}{A_1} \times 100$$

A₁ – atividade enzimática no extrato bruto

A_2 – atividade enzimática após a re-extração

c) FP – fator de purificação, que representa o aumento de pureza da enzima desejada.

$$FP = \frac{A_2/P_2}{A_1/P_1}$$

d) Produtividade – medida da massa de proteína purificada por minuto.

Produtividade = Vazão Fase Leve x PT

5 Resultados e Discussões

5.1 Extração da Bromelina em Batelada

O processo de extração líquido-líquido da bromelina por micela-reversa foi avaliado sob diferentes condições experimentais, empregando-se a metodologia do planejamento experimental (Barros Neto *et. al.*, 1995; Box *et. al.*, 1978).

Através do estudo das variáveis que influenciam a extração da bromelina em sistemas micelares em batelada, buscou-se determinar os fatores significativos para o processo, assim como as melhores faixas de operação. Para isto foram realizados planejamentos fracionários para determinar quais fatores têm os maiores efeitos utilizando um menor número de experimentos. Foram testados dois tipos de surfactantes, aniônico (AOT) e catiônico (BDBAC), suas eficiências foram analisadas através do fator de purificação (FP) obtido.

Os níveis usados para a extração foram determinados de acordo com o diagrama de fases de cada tensoativo (AOT) ou através de trabalhos experimentais (BDBAC) (Hasmann, 2000). Os pHs usados foram determinados de acordo com a faixa de pH que mantivessem a atividade proteolítica da bromelina e que também favorecessem a extração e re-extração da bromelina conforme a operação usada (Murachi, 1976).

Tabela 5.1 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial para a extração da Bromelina com tensoativo AOT.

Fator	Nível (-1)	Nível (+1)
pH	3	4
[AOT] mM	100	250
pH Reextração	4	6
[NaCl] M	1	2

Para a extração da bromelina com o tensoativo AOT usou-se a faixa de pH 3-4, pois a bromelina deve ter distribuição de cargas positiva, ou seja, abaixo do ponto

isoeletrico (4,6), e o nível mínimo de pH foi delimitado a 3 porque abaixo deste valor a bromelina começa a desnaturar.

Os níveis de concentração de AOT foram determinados entre 100 e 250 mM porque é nesta faixa que há um aumento mais significativo do tamanho da micela.

Os pHs da re-extração foram determinados abaixo e acima do ponto isoeletrico (4,6), para verificar para este sistema se o pH exerce forte influência na re-extração.

Para a concentração de sal (NaCl) foram realizados testes preliminares que demonstraram que nesta faixa que há a maior recuperação de proteínas, além de altas concentrações de sal desnaturarem a enzima (Bertevello, 2001).

A tabela 5.2 mostra a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a extração da bromelina com o tensoativo aniônico AOT, com os valores mínimos (-1) e máximos (+1) de forma codificada, com os seus respectivos resultados.

Tabela 5.2 – Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para extração da Bromelina com AOT e resposta (Fator de Purificação- FP) após a reextração.

Ensaio	pH	[AOT]mM	pH Reext.	[Sal]M	FP	Réplica	Réplica
					1	1	2
1	1	1	1	1	0	0	0
2	1	1	-1	-1	0,036	0,042	0,042
3	1	-1	1	-1	0,084	0,090	0,090
4	1	-1	-1	1	0,040	0,035	0,035
5	-1	1	1	-1	0,019	0,020	0,020
6	-1	1	-1	1	0	0	0
7	-1	-1	1	1	0,110	0,115	0,115
8	-1	-1	-1	-1	0	0	0

Os resultados da extração da bromelina com o tensoativo AOT (Tabela 5.2) apresentaram um fator de purificação muito baixos, entre 0 e 0,115, concluindo-se que este sistema não é adequado para a separação da bromelina. Como os fatores de purificação (FP) foram muito baixos a influência dos fatores na resposta não foram analisados.

Tabela 5.3 - Níveis usados para o Planejamento Fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.

Fator	Nível (-1)	Nível (+1)
pH	6	8
[BDBAC] mM	100	200
% v/v Hexanol	5	10
pH Reextração	3,5	6
[NaCl] M	1	2

Para a extração da bromelina com o tensoativo BDBAC usou-se a faixa de pH 6-8, pois a bromelina deve ter distribuição de cargas negativa, ou seja, acima do ponto isoelétrico, como o limite máximo sem desnaturar é 10,3 (Murachi, 1973), optou-se por um intervalo de 2 unidades de pH.

A faixa de concentração de BDBAC e a porcentagem de hexanol adicionada foram determinadas através de trabalhos anteriores (Hasmann, 2000), devido o diagrama de equilíbrio de fases não ter sido determinado.

A tabela 5.4 mostra a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da bromelina com o tensoativo catiônico BDBAC, com os valores mínimos (-1) e máximos (+1) de forma codificada, com os seus respectivos resultados.

Tabela 5.4 - Planejamento Fatorial fracionário 2^{5-1} para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.

Ensaio	pH	[BDBAC]	% Hexanol	pH Reextração	[NaCl]	FP (R1)	FP (R2)
1	-1	-1	-1	-1	1	0,929	1,015
2	1	-1	-1	-1	-1	1,714	1,716
3	-1	1	-1	-1	-1	0,121	0,730
4	1	1	-1	-1	1	0,846	0,733
5	-1	-1	1	-1	-1	1,285	1,556
6	1	-1	1	-1	1	3,291	1,940
7	-1	1	1	-1	1	0,771	0,584
8	1	1	1	-1	-1	0,948	0,766
9	-1	-1	-1	1	-1	0,000	0,000
10	1	-1	-1	1	1	0,555	0,051
11	-1	1	-1	1	1	0,214	0,000
12	1	1	-1	1	-1	0,000	0,000
13	-1	-1	1	1	1	0,248	0,000
14	1	-1	1	1	-1	0,843	0,193
15	-1	1	1	1	-1	0,000	0,000
16	1	1	1	1	1	0,615	1,013

Os resultados da extração da bromelina com o tensoativo BDBAC (Tabela 5.4) foram analisados com utilizando-se as ferramentas do programa “Statistica”, possibilitando voltar nossa atenção à influência de cada parâmetro acima citado.

O comportamento dos fatores de purificação foram estabelecidos em função do pH da extração, concentração de BDBAC na solução de extração, porcentagem de hexanol na

solução de extração, pH da re-extração e concentração de sal da re-extração. No tratamento estatístico estudou-se a influência de cada um destes parâmetros utilizados no processo.

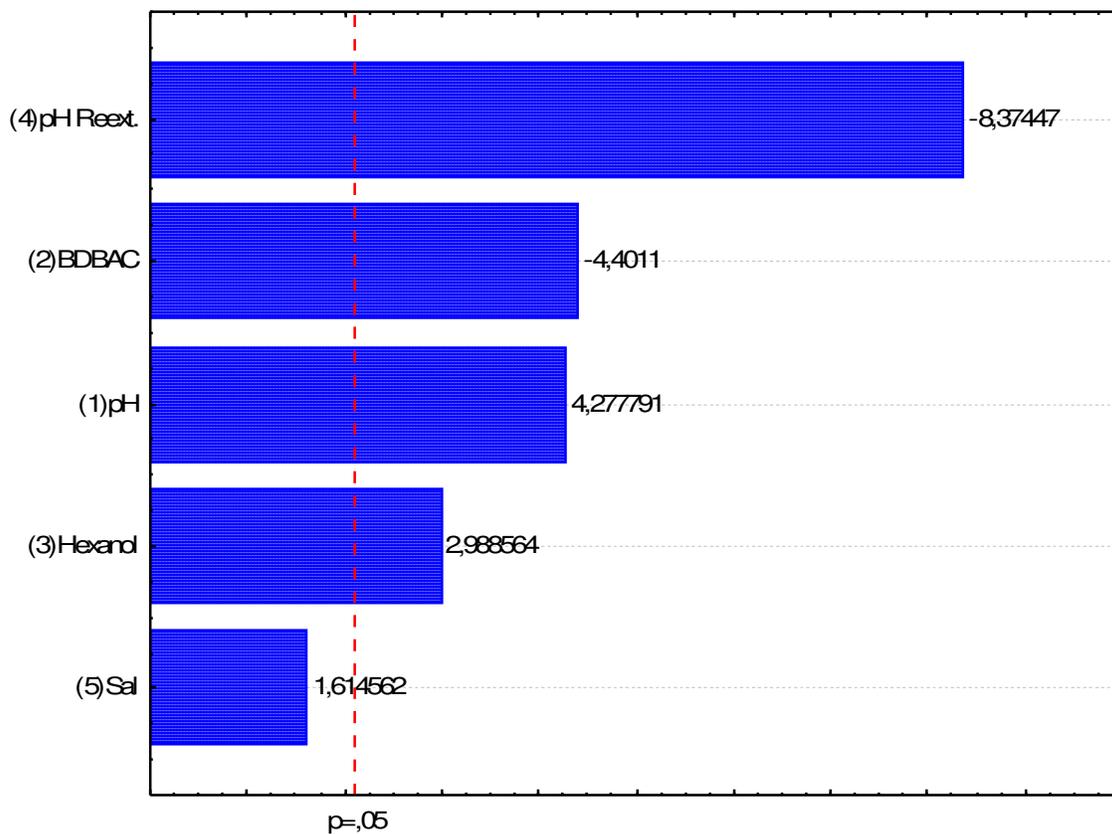


Figura 5.1 - Gráfico de Pareto para a extração da Bromelina em batelada com tensoativo catiônico BDBAC.

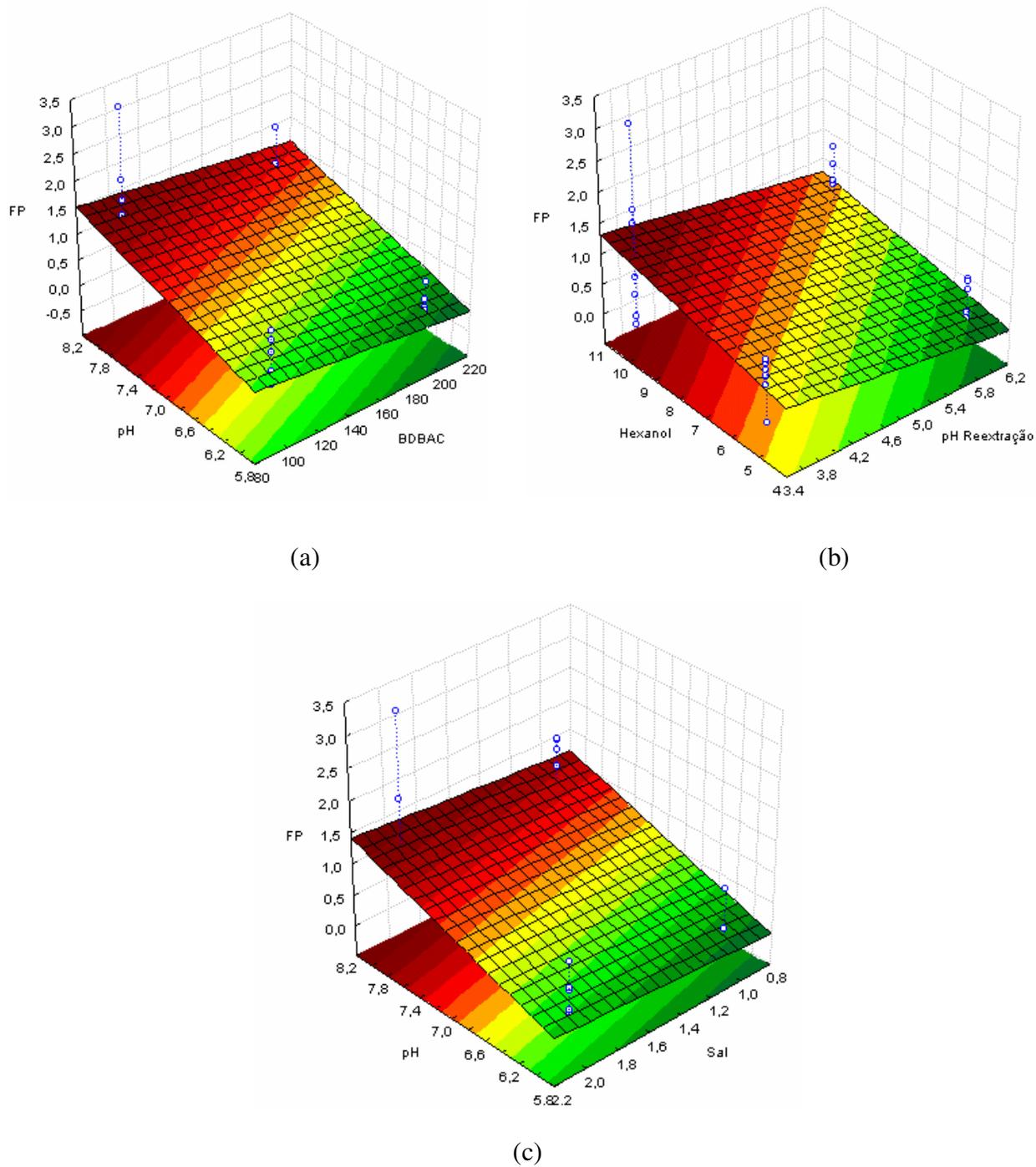


Figura 5.2 - Superfícies de resposta para análise dos fatores que influenciam a extração batelada da bromelina com tensoativo BDBAC.

O gráfico de Pareto expresso na Figura 5.1 mostra que somente a concentração de sal na re-extração não é significativa ao processo, as demais variáveis são significativas.

Observa-se que a concentração de BDBAC e o pH de re-extração apresentam valores negativos de *t student* indicando que para os níveis mínimos utilizados (-1), a resposta será intensificada (Figura 5.2 a, b).

O pH de re-extração apresenta maiores fatores de purificação no menor nível (Figura 5.2 b), pois a distribuição de cargas da bromelina é positiva havendo uma repulsão do interior da micela que também tem carga positiva.

O fator de purificação foi maior no menor nível da concentração de BDBAC (Figura 5.2 a) pois a bromelina é uma enzima relativamente pequena 32,5 kDa, ficando encapsulada no interior da micela mesmo no menor nível de tensoativo. No nível alto a bromelina também encontra-se encapsulada, mas o maior raio da micela dificulta a re-extração pois a micela não consegue reduzir seu volume o suficiente para expulsar a bromelina do seu interior.

O pH da extração apresenta um aumento no fator de purificação no maior nível (Figura 5.2 a), pois quanto maior a diferença entre o ponto isoelétrico e o pH usado, mais negativa é a distribuição de cargas, ou seja, maior a atração da bromelina para o interior da micela.

Os co-solventes são adicionados aos sistemas de micelas reversas de tensoativos catiônicos para aumentar o tamanho das mesmas. Neste caso o nível alto, que leva a um aumento do fator de purificação (Figura 5.2 b), é explicado porque aumenta o tamanho da micela na menor concentração de BDBAC favorecendo o encapsulamento da enzima.

A concentração de sal na re-extração não se mostrou significativa (Figura 5.2 c), pois a solução de re-extração é composta de uma solução tampão adicionada de uma solução de sal que já é o suficiente para expulsar o a enzima do seu interior, não fazendo diferença entre o seu nível mínimo e máximo. Por uma questão de redução de reagentes usou-se o nível mínimo.

5.2 Extração da Bromelina em Operação Contínua

Para os estudo do processo de extração da bromelina em operação contínua os níveis usados (Tabela 5.5) foram determinados através da análise estatística do gráfico de pareto da extração com o tensoativo catiônico BDBAC (Figura 5.1), usando-se os níveis que levam a uma resposta maior fator de purificação.

Tabela 5.5 – Níveis usados na extração da bromelina por micelas reversas em operação contínua.

Fator	Nível Usado
pH	8
[BDBAC] mM	100
% v/v Hexanol	10
pH Reextração	3,5
[NaCl] M	1

Foram selecionadas duas variáveis para o estudo de seus efeitos sobre o fator de purificação e a produtividade da coluna de campânulas pulsadas, a razão vazão fase leve/vazão total e o intervalo entre os pulsos. A vazão total foi mantida fixa no máximo valor possível de operação da coluna (8mL/min). Para estudarem-se os fatores e a interação entre eles em uma ampla faixa de operação usou-se um planejamento tipo estrela (Tabela 5.7). Na Tabela 5.6 mostra os níveis usados na operação da coluna.

Tabela 5.6 – Fatores e níveis usados no Planejamento Estatístico para a extração da Bromelina em operação contínua.

Fator	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Vazão fase leve/Vazão Total	0,3	0,5	0,7
Intervalo entre os pulsos (s)	6	4	2

A Tabela 5.7 apresenta o planejamento em estrela usado (2^2 com 4 pontos centrais e réplica) na extração da bromelina em operação contínua, as variáveis de entrada e os resultados obtidos.

Tabela 5.7 - Matriz de Planejamento Experimental Estrela e Respostas para Operação Contínua.

Ensaio	Vleve/Vtotal (X ₁)	Intervalo Pulsos (X ₂)	Réplica 1		Réplica 2	
			FP	Produtividade (mg/min)	FP	Produtividade (mg/min)
1	-1	-1	2,554	0,665	2,271	0,742
2	-1	1	5,608	0,779	5,391	0,762
3	1	-1	3,204	0,937	3,372	0,931
4	1	1	6,036	1,082	5,605	1,161
5	-1,41421	0	1,815	0,465	2,090	0,455
6	1,41421	0	1,806	1,219	1,766	1,231
7	0	-1,41421	2,712	1,200	2,990	1,152
8	0	1,41421	4,243	1,199	4,271	1,205
9 (C)	0	0	3,860	1,076	5,590	0,902
10 (C)	0	0	3,316	1,151	3,285	1,058
11 (C)	0	0	5,075	1,014	3,516	1,304
12 (C)	0	0	5,571	0,988	3,774	1,085

Os fatores de purificação e a produtividade apresentados na Tabela 5.7 são valores médios após a coluna alcançar o regime permanente final. Como podemos observar pelas respostas obtidas, os valores são maiores que os em operação descontínua em várias condições, isto se deve principalmente pela eficiência na transferência de massa da coluna. Esses dados serão analisados estatisticamente de forma a encontrar a melhor região de operação.

5.3 Análise estatística da extração em contínuo

A Figura 5.3 apresenta o gráfico de Pareto analisando-se como resultado os fatores de purificação, mostrando quais os fatores que foram significativos para a extração.

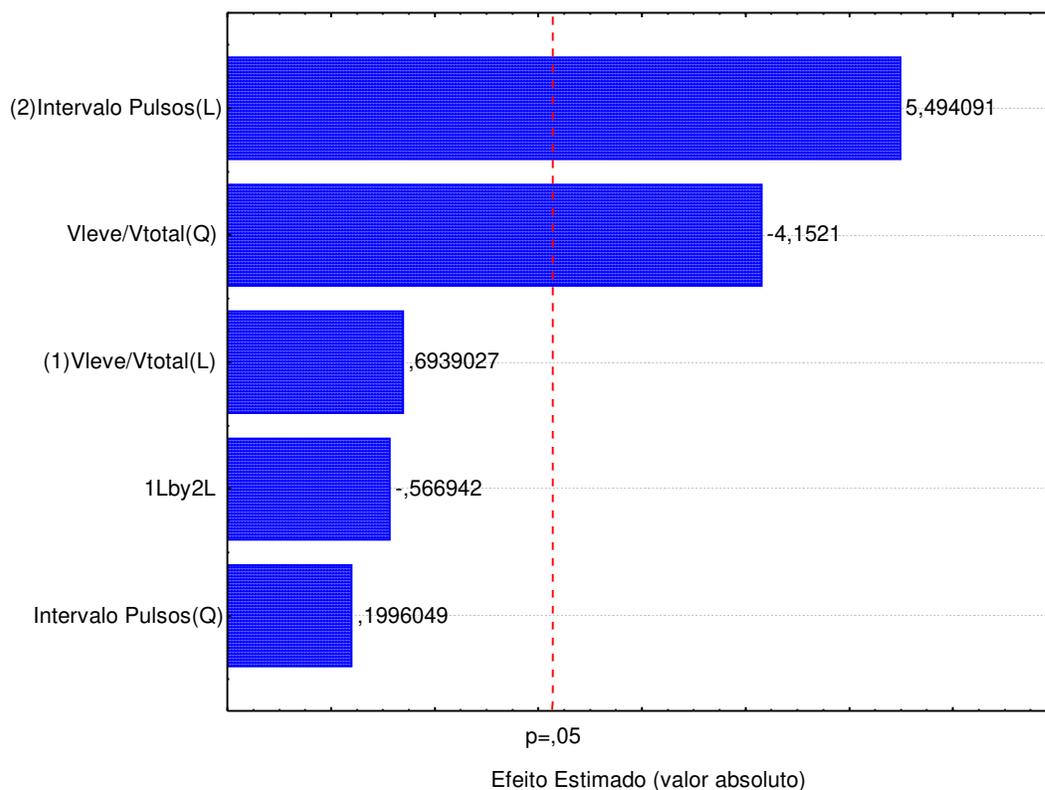


Figura 5.3– Gráfico de Pareto para análise dos fatores que influenciam a extração (1 - razão vazão fase leve / vazão total e 2 - intervalo entre os pulsos).

A Figura 5.3 mostra que o intervalo entre os pulsos foi significativo e positivo, mostrando que diminuindo-se o intervalo entre os pulsos aumenta-se o fator de purificação. A agitação para a coluna deve ser o suficiente para misturar as fases e não tão alta que desnature as enzimas, neste caso a agitação máxima é a ideal (menor intervalo entre os pulsos), como está mostrado na Figura 5.4.

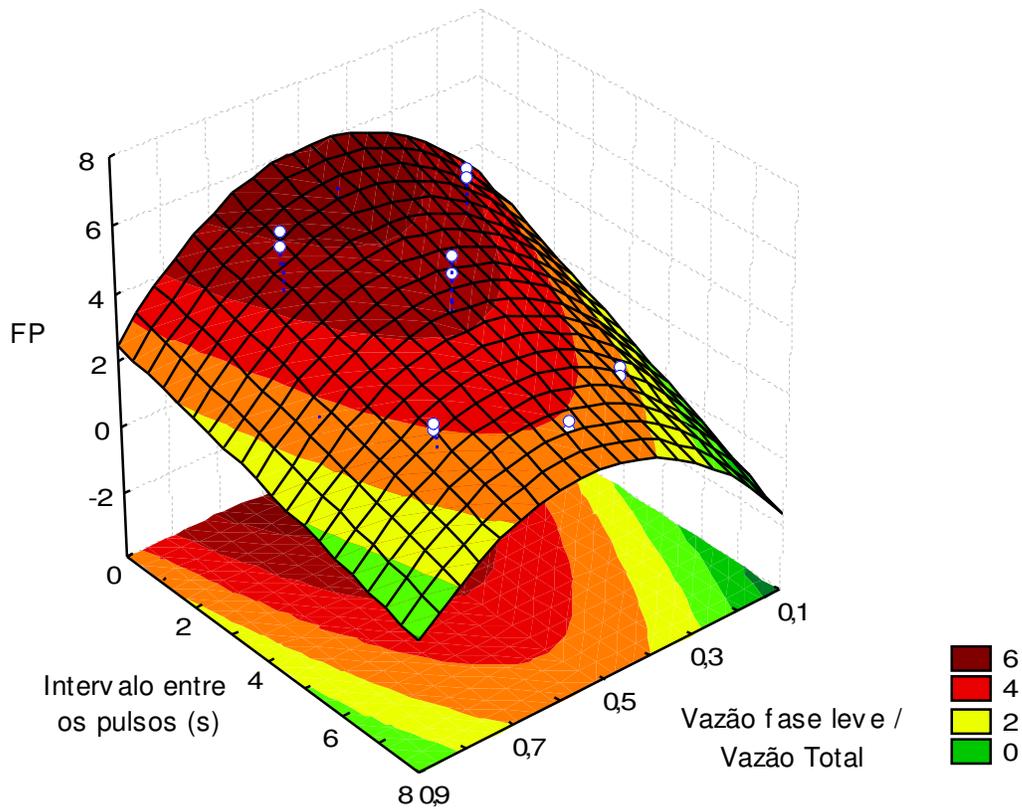


Figura 5.4 – Superfície de resposta para o Fator de Purificação em função da razão vazão fase leve/vazão total e intervalo entre os pulsos.

O termo quadrático da razão vazão fase leve/vazão total também se mostrou significativo e o seu aumento diminui a resposta desejada, como é uma variável quadrática apresenta um máximo no nível 0, ou seja razão vazão fase leve/vazão total de 0,5 como mostra a Figura 5.4.

A Tabela 5.8 apresenta os efeitos da extração da bromelina analisando-se a resposta fator de purificação, a qual confirma os efeitos significativos do gráfico de Pareto.

Tabela 5.8 - Efeitos para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Fator de Purificação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	$t_{(15)}$	p
Média	4,24832	0,244808	17,35369	0,000000
(X ₁)Vleve/Vtotal(L)	0,24024	0,346211	0,69390	0,498349
Vleve/Vtotal(Q)	-1,60718	0,387075	-4,15210	0,000851
(X ₂)Intervalo Pulsos(L)	1,90211	0,346211	5,49409	0,000062
Intervalo Pulsos(Q)	0,07726	0,387075	0,19960	0,844470
X ₁ por X ₂	-0,27758	0,489616	-0,56694	0,579140

O modelo codificado encontrado para a extração foi:

FP = 4,279 - 0,811 * X₁² + 0,9510 * X₂ , para usar-se os valores das variáveis reais

(decodificar): $X_1 = \left(\frac{x-0,5}{0,2} \right)$ e $X_2 = \left(\frac{x-4}{-2} \right)$, onde x = valor da variável real.

Tabela 5.9 – ANOVA para Fator de Purificação

F. Variação	SQ	GL	MQ	Fcalc
Regressão (R)	23,26	2	11,63	11,67
Resíduos (r)	20,92	21	0,996	
Falta de Ajuste (faj)	13,73	6	2,288	4,77
Erro Puro (ep)	7,19	15	0,479	
Total (T)	44,18	23		

$$F_{tab} = 3,4668 \quad \frac{F_{calc}}{F_{tab}} = 3,36$$

$F_{tab} = 2,79 < F_{calc} = 4,77$ o modelo apresenta falta de ajuste

% de variação explicada = 52,64%

% máxima de variação explicável = 83,72%

Com a Tabela 5.9 pode-se verificar através da ANOVA que o modelo apresenta um ajuste baixo ($R^2=0,52$) comparando-se com o que poderia se obter ($R^2=0,83$). Como apresenta razão $\frac{F_{cal}}{F_{tab}}$ menor que 10, quando um bom modelo deveria apresentar valor maior que 10, pode-se apenas usar o modelo como indicador da região ótima e não como modelo preditivo.

A Figura 5.5 mostra o gráfico de pareto para a análise da produtividade, como podemos observar o intervalo entre os pulsos não se mostrou significativo.

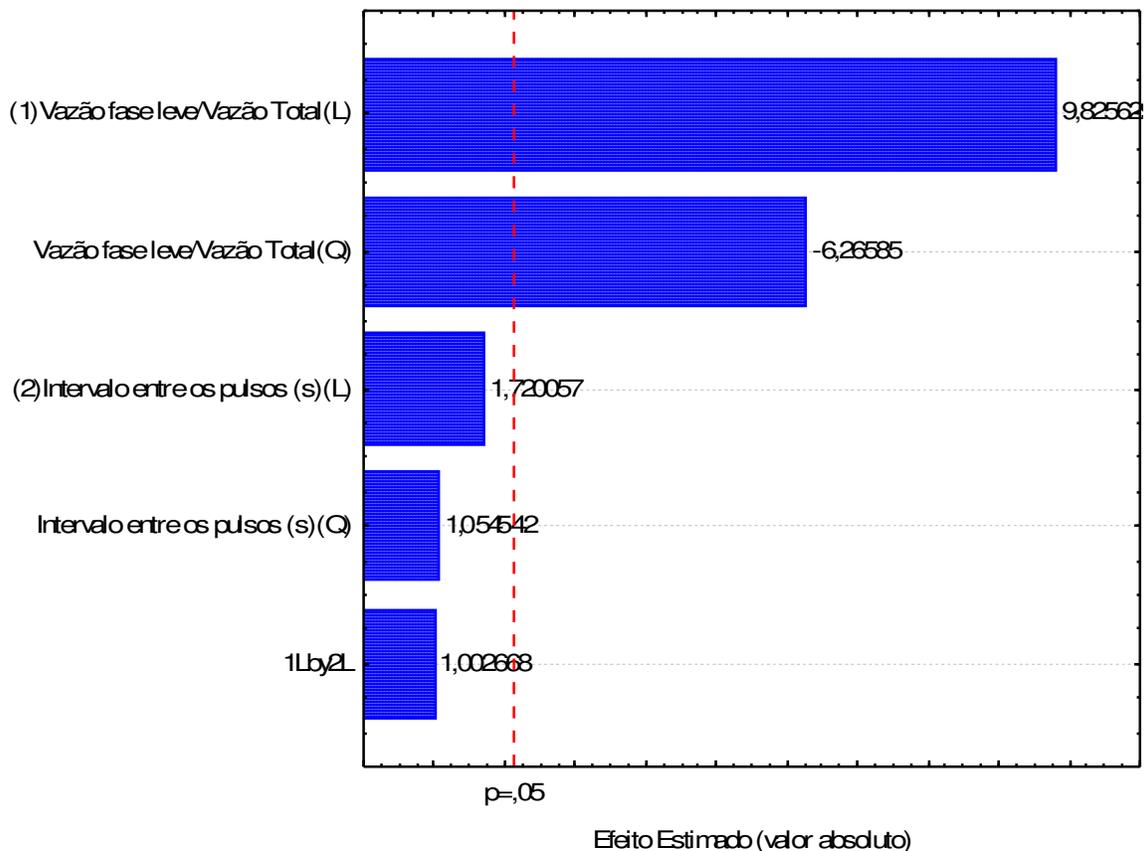


Figura 5.5 – Gráfico de Pareto para análise dos fatores que influenciam a extração.

O termo linear quanto o quadrático da razão vazão fase leve/vazão total se mostraram significativos. O aumento da razão vazão fase leve/vazão total aumenta a produtividade passando por um máximo na razão 0,7.

A Tabela 5.10 apresenta os efeitos da extração da bromelina analisando-se a resposta produtividade, esta tabela confirma os dados apresentados pelo gráfico de pareto.

Tabela 5.10 - Efeitos para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Produtividade.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t ₍₁₅₎	p
Média	1,072350	0,029920	35,84035	0,000000
(X ₁)Vleve/Vtotal(L)	0,415757	0,042314	9,82563	0,000000
Vleve/Vtotal(Q)	-0,296425	0,047308	-6,26585	0,000015
(X ₂)Intervalo Pulsos(L)	0,072782	0,042314	1,72006	0,105980
Intervalo Pulsos(Q)	0,049888	0,047308	1,05454	0,308325
X ₁ por X ₂	0,060000	0,059840	1,00267	0,331923

O modelo codificado encontrado foi:

Produtividade = 1,092 + 0,207 * X₁ - 0,153 * X₁², para usar-se os valores das variáveis reais (decodificar): $X_1 = \left(\frac{x-0,5}{0,2} \right)$ e $X_2 = \left(\frac{x-4}{-2} \right)$, onde x = valor da variável real.

Tabela 5.11 – ANOVA para Produtividade

F. Variação	SQ	GL	MQ	Fcalc
Regressão (R)	1,0044	2	0,5022	36,45
Resíduos (r)	0,2893	21	0,0137	
Falta de Ajuste (faj)	0,1819	6	0,0303	4,20
Erro Puro (ep)	0,1074	15	0,0072	
Total (T)	1,2937	23		

$$F_{tab} = 3,4668 \quad \frac{F_{calc}}{F_{tab}} = 10,51$$

$F_{tab} = 2,79 < F_{calc} = 4,20$, o modelo apresenta falta de ajuste

% de variação explicada = 77,63%

% máxima de variação explicável = 91,69%

Através da ANOVA (Tabela 5.11) verificou-se que o ajuste do modelo é bom, $\frac{F_{cal}}{F_{tab}}$ maior que 10 e $R^2=0,77$, mas o modelo apresenta falta de ajuste ($F_{tab} < F_{calc}$), servindo apenas como um modelo para indicar a região de ótimo.

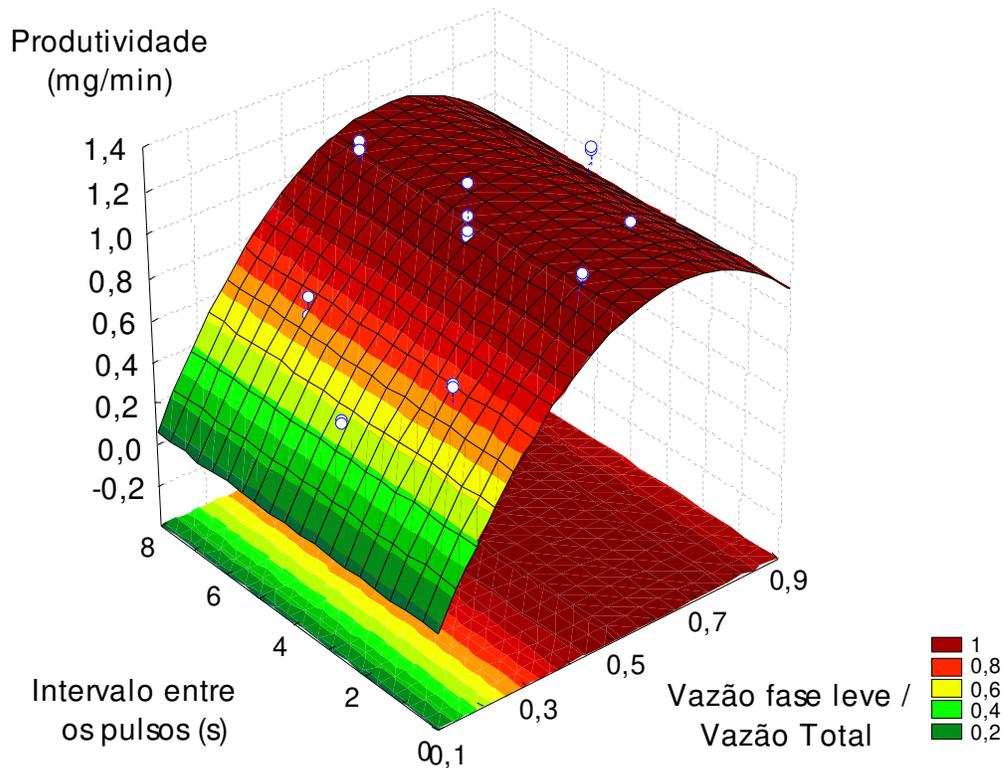


Figura 5.6 - Gráfico da superfície da resposta Produtividade em função da razão vazão fase leve/vazão total e intervalo entre os pulsos.

O ajuste do modelo para o fator de purificação é menor devido ao erro experimental da análise de atividade enzimática que tem uma variabilidade em torno de 20%, e este valor é usado no cálculo do fator purificação causando um menor ajuste no modelo.

Como os modelos encontrados tem um ajuste relativamente baixo, eles servem apenas como estimadores dos valores e não como modelos preditivos.

5.3.1 Otimização das Respostas

Quando se tem mais de uma variável de resposta, geralmente está se interessado em encontrar os valores operacionais ótimos das variáveis independentes que satisfaçam simultaneamente todos os requisitos necessários às variáveis dependentes. A primeira coisa a se fazer é determinar o modelo apropriado para descrever as variáveis de resposta e então encontrar uma série de condições operacionais que otimize todas as respostas ou, no mínimo, mantenha-as em faixas desejáveis. A busca dessa faixa desejável pode ser feita graficamente, através da superposição das curvas de nível para todas as respostas. Uma técnica melhor é usar o procedimento da *otimização com restrição* (Calado e Montgomery, 2003).

Existem muitas técnicas numéricas para resolver esse problema de otimização com restrições. Elas recebem o nome de métodos de programação não linear. O software *Statística* usa a abordagem usada por Derringer e Suich (1980), que propuseram o uso de funções desejabilidade (*desirability*). A abordagem geral consiste em converter primeiro cada resposta y_i em uma função individual desejabilidade d_i que varia em uma faixa de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for aquela que se quer, $d_i = 1$ e se a resposta estiver fora da região aceitável, $d_i = 0$. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global.

As funções desejabilidade para as variáveis são:

Fator de Purificação: valor da resposta desejada $\geq 3,9$.

Produtividade: valor da resposta desejada = 1,3.

A Figura 5.7 mostra os resultados do algoritmo de otimização. As funções desejabilidade das duas respostas, estão nos dois gráficos da última coluna, definidos de acordo com os valores escolhidos para os limites. O gráficos das duas primeira colunas mostram as desejabilidades para cada variável individual, e para a global (dois gráficos de baixo). As linha tracejadas horizontais indicam as desejabilidades máxima para cada uma das respostas e a para a global. Os valores dos pontos ótimos encontrados para as variáveis resposta foram: FP = 4,96 e Produtividade = 1,29. As curvas mostram como as respostas variam com cada fator, mantidos fixos os níveis dos outros fatores nos valores

especificados. As linhas tracejadas verticais sinalizam as condições operacionais que levam a máxima desejabilidade global que são: Vazão fase leve/Vazão Total de 0,67 e intervalo entre os pulsos de 1s.

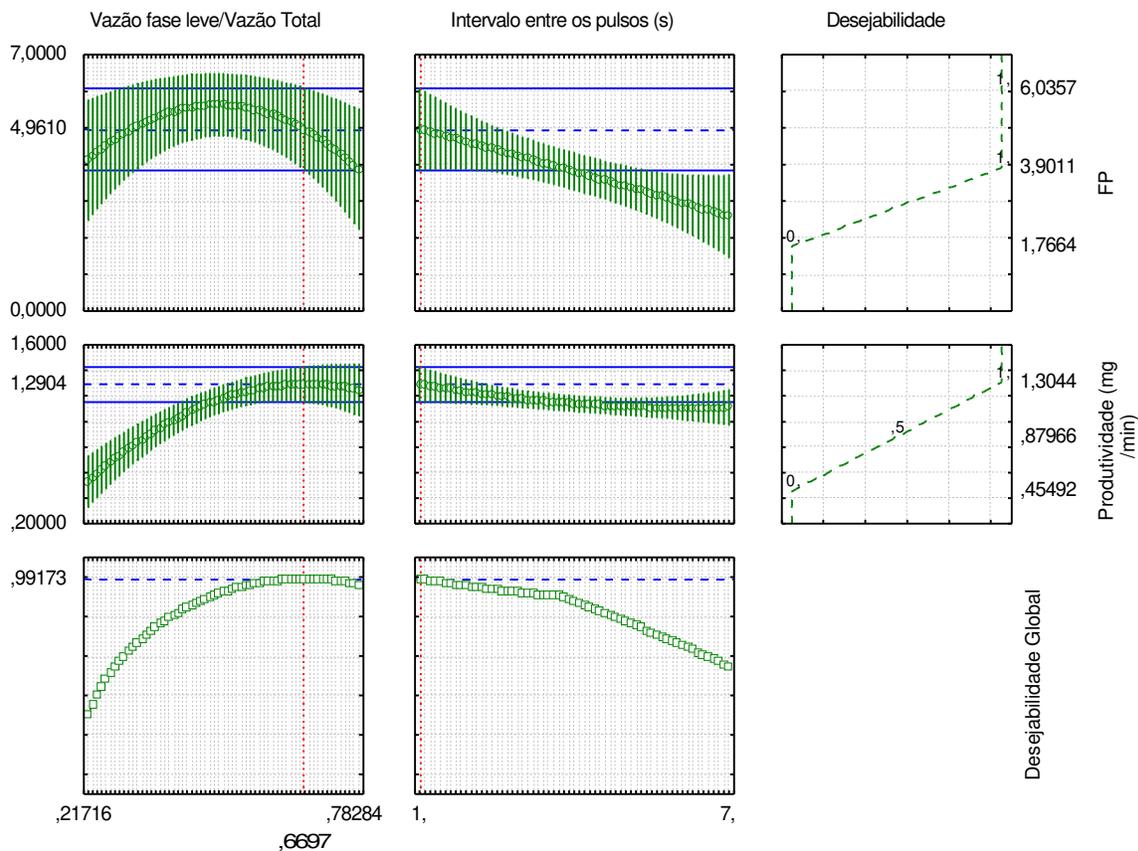


Figura 5.7 – Gráfico das funções desejabilidade.

A região de ótimo fica mais clara com os gráficos da superfície de resposta para a função desejabilidade global (Figura 5.8) e curvas de nível (Figura 5.9), onde podemos observar as condições que levam ao ótimo - Vazão fase leve/Vazão Total de 0,67 e intervalo entre os pulsos de 1s.

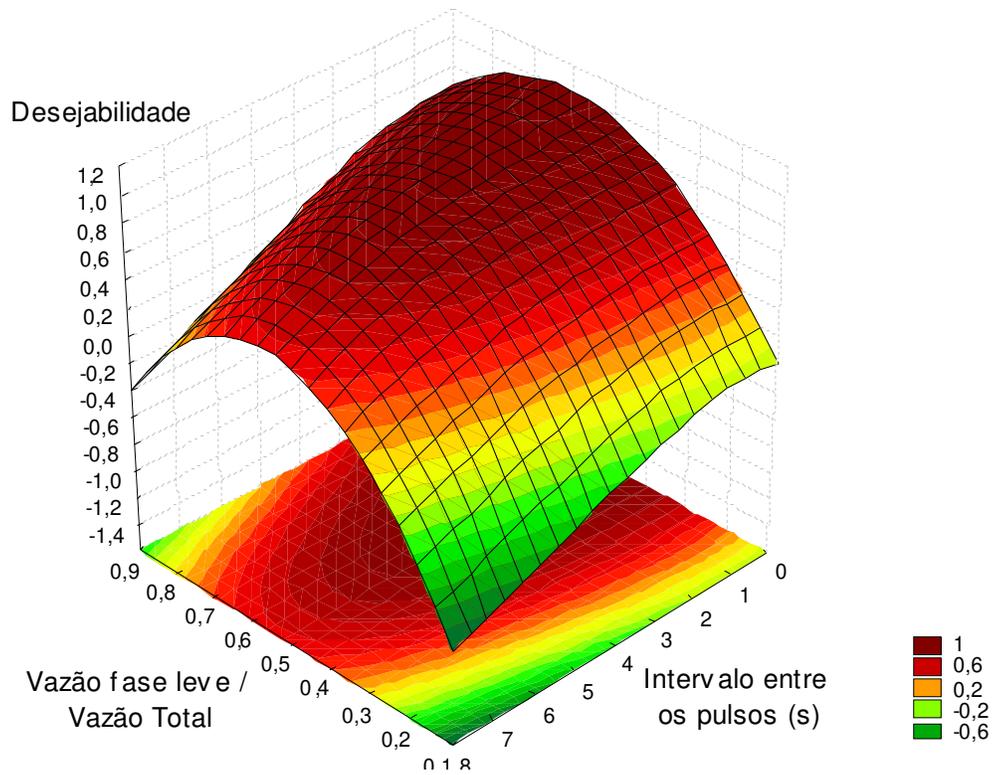


Figura 5.8 – Superfície de resposta para a função desejabilidade global.

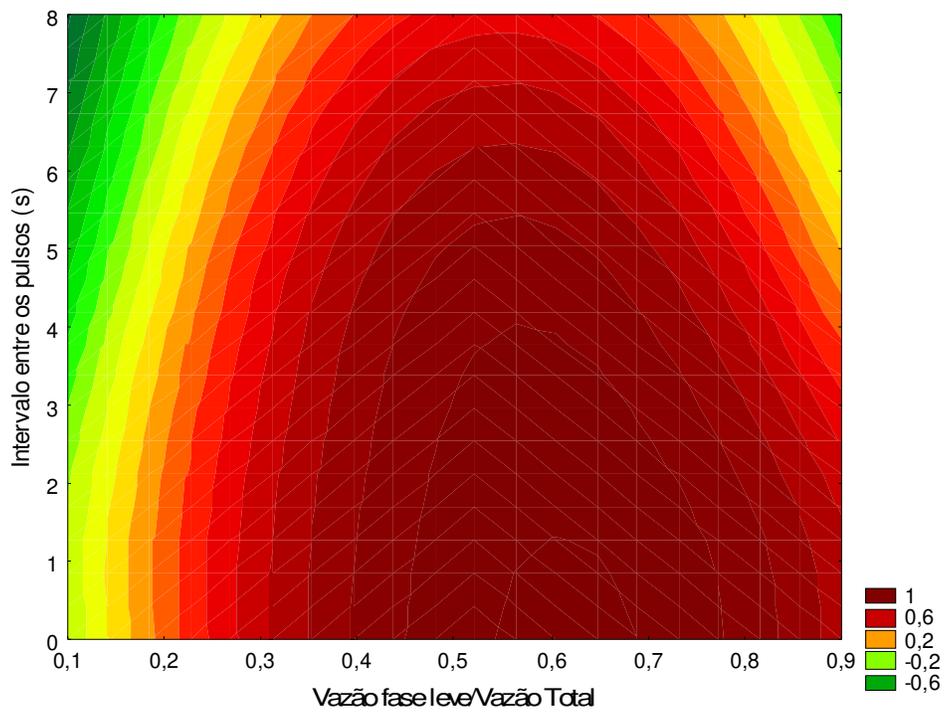


Figura 5.9 – Curvas de nível para a função desejabilidade global.

5.3.2 Modelos para Predição dos dados experimentais

Os modelos polinomiais usados até agora apresentaram um ajuste relativamente baixo dos dados experimentais, principalmente por não possuírem termos de terceira ordem e nem de interação de segunda ordem, que representam mal as não linearidades do sistema, por isto optou-se para ajuste de um modelo polinomial do tipo:

$$y = c_1 + c_2 \cdot x_1 + c_3 \cdot x_1^2 + c_4 \cdot x_1^3 + c_5 \cdot x_2 + c_6 \cdot x_2^2 + c_7 \cdot x_2^3 + c_8 \cdot x_1^2 + c_9 \cdot x_1 \cdot x_2 + c_{10} \cdot x_1^2 \cdot x_2^2,$$

para cada uma das variáveis estudadas. As entradas estão codificadas nos níveis usados anteriormente.

Esse novo modelo é necessário porque a região de estudo é bastante ampla, e temos mudanças no tipo de operação, o que causa alterações bruscas no rendimento que não podem ser expressas por equações de segunda ordem. Por isso os modelos anteriores de segunda ordem apresentaram um ajuste baixo.

Para ajuste dos parâmetros do modelo usou-se o algoritmo de Gauss-Newton com modificações propostas por Levenberg-Marquardt para melhor convergência global (Bates;Watts, 1988).

O resultado de ajuste dos parâmetros do modelo apresenta-se nas Tabelas 5.12 (Fator de Purificação) e 5.13 (Produtividade). O erro padrão foi usado para determinar quais os parâmetros do modelo são significativos (erro padrão < coeficiente).

Tabela 5.12 – Coeficientes de regressão para o modelo para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Fator de Purificação (modelo polinomial).

Fator	Coef.Regressão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	
Média	4,2483	0,2449	3,7265	4,7701
X ₁	0,6573	0,5475	-0,5095	1,8241
X ₁ ²	-1,1894	0,2121	-1,6413	-0,7375
X ₁ ³	-0,3581	0,3463	-1,0961	0,3798
X ₂	2,3126	0,5475	1,1459	3,4794
X ₂ ²	-0,3472	0,2121	-0,7991	0,1047
X ₂ ³	-0,9077	0,3463	-1,6456	-0,1698
X ₁ *X ₂	-0,1388	0,2449	-0,6606	0,3830
X ₁ ² *X ₂ ²	1,5433	0,3463	0,8054	2,2812

(X₁)Vleve/Vtotal (X₂)Intervalo Pulsos

Ajuste do modelo para o Fator de Purificação:

$$FP=4,2483+0,6573 X_1-1,1894 X_1^2 + 2,3126 X_2 -0,3472 X_2^2-0,9077X_2^3+1,5433 X_1^2 X_2^2,$$

para usar-se os valores das variáveis reais (decodificar): $X_1 = \left(\frac{x-0,5}{0,2} \right)$ e $X_2 = \left(\frac{x-4}{-2} \right)$,

onde x = valor da variável real.

$$R^2 = 83,37\%$$

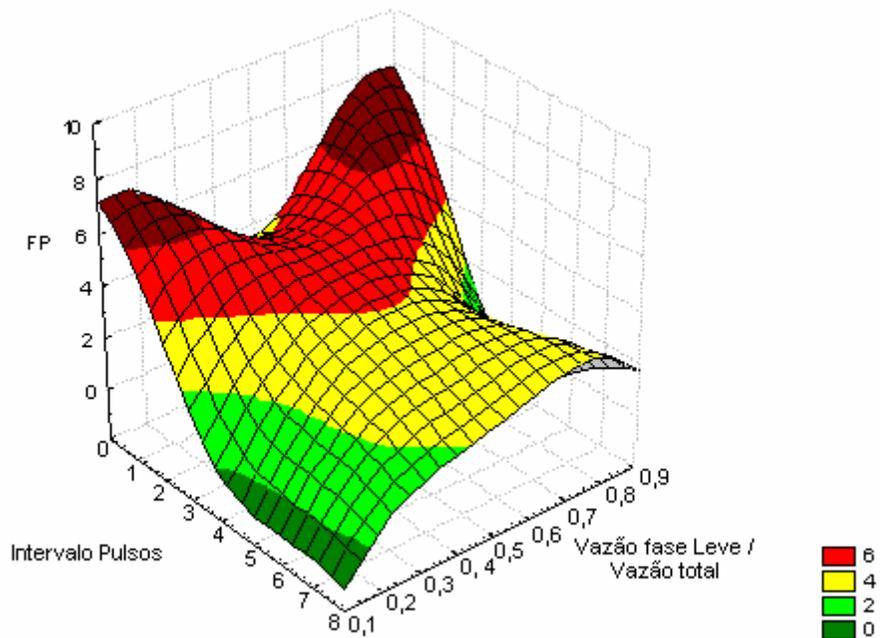


Figura 5.10 – Gráfico dos dados experimentais do Fator de Purificação.

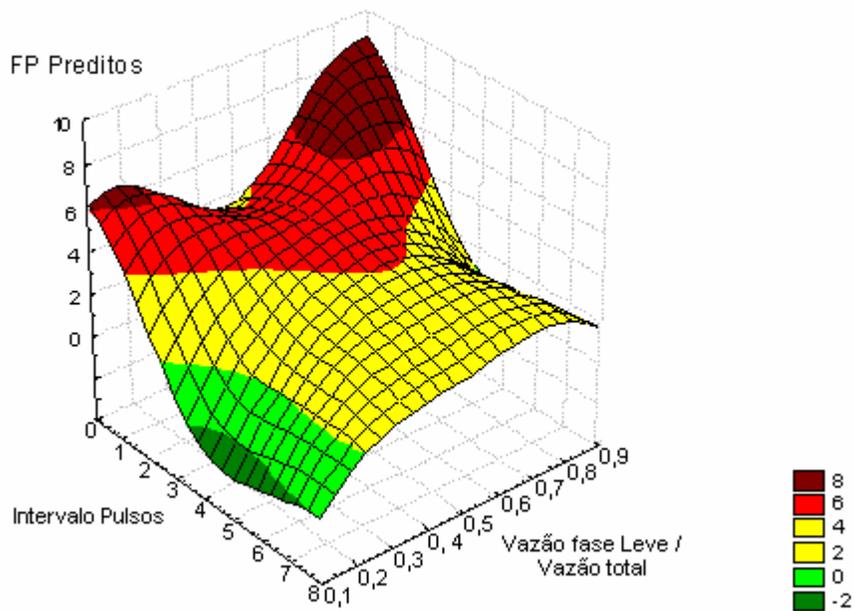


Figura 5.11 – Gráfico dos dados preditos pelo modelo do Fator de Purificação.

Tabela 5.13 - Coeficientes de regressão para o modelo para extração da bromelina em operação contínua para a resposta Produtividade (modelo polinomial).

Fator	Coef. Regressão	Erro Padrão	Intervalo de Confiança	
Média	1,0723	0,0299	1,0086	1,1361
X_1	0,0202	0,0669	-0,1224	0,1628
X_1^2	-0,1149	0,0259	-0,1701	-0,0597
X_1^3	0,1251	0,0423	0,0349	0,2153
X_2	0,1182	0,0669	-0,0244	0,2608
X_2^2	0,0583	0,0259	0,0030	0,1135
X_2^3	-0,0545	0,0423	-0,1447	0,0357
$X_1 * X_2$	0,0300	0,0299	-0,0338	0,0938
$X_1^2 * X_2^2$	-0,1333	0,0423	-0,2235	-0,0431

(X_1)Vleve/Vtotal (X_2)Intervalo Pulsos

Ajuste do modelo para a Produtividade:

$$\text{Produtividade} = 1,0723 - 0,1149X_1^2 + 0,1251X_1^3 + 0,1182X_2 - 0,0583X_2^2 - 0,0545X_2^3 - 0,1333X_1^2 X_2^2,$$

para usar-se os valores das variáveis reais (decodificar): $X_1 = \left(\frac{x-0,5}{0,2} \right)$ e $X_2 = \left(\frac{x-4}{-2} \right)$, onde

x = valor da variável real.

$$R^2 = 90,69\%$$

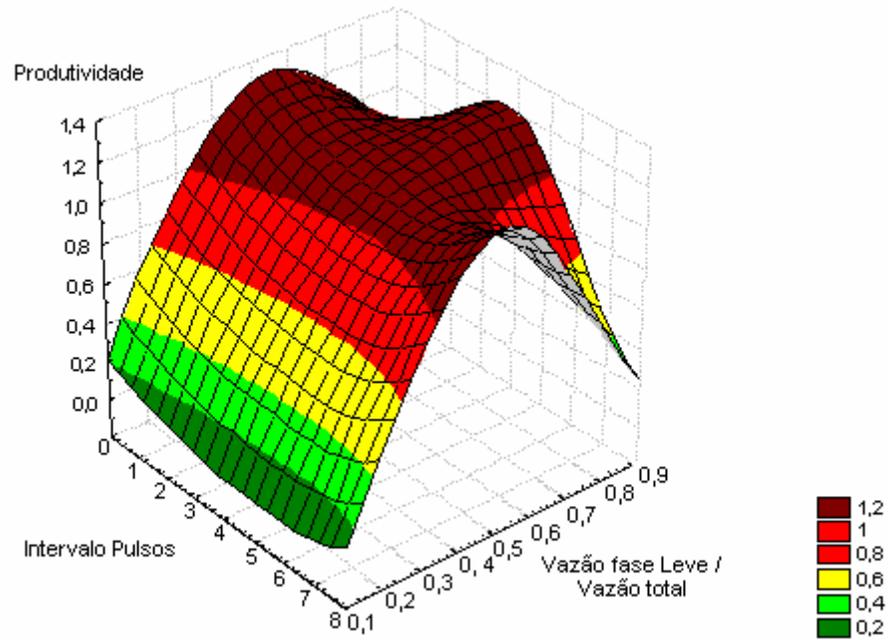


Figura 5.12 – Gráfico dos dados experimentais da Produtividade.

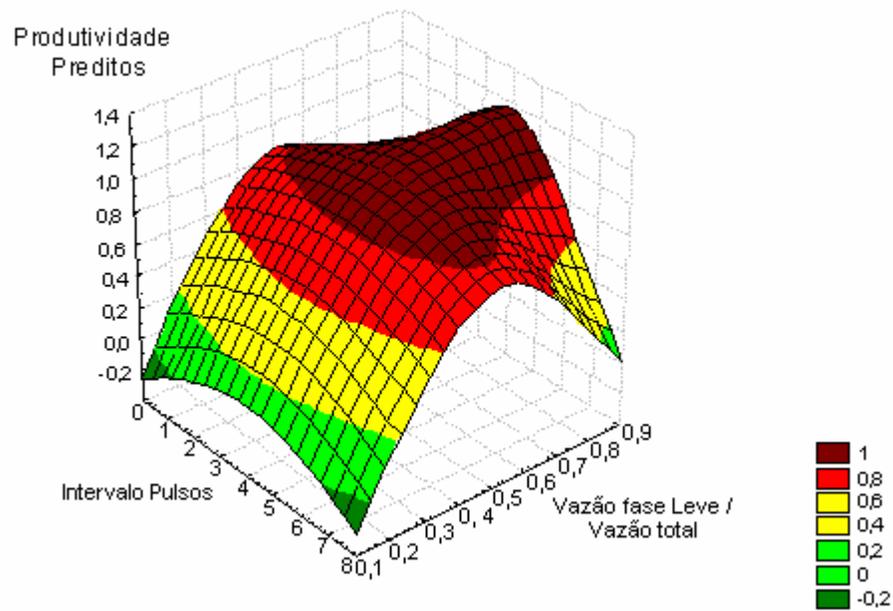


Figura 5.13 – Gráfico dos dados preditos pelo modelo da Produtividade.

Como podemos verificar pelo ajuste dos modelos, R^2 83,37% para o fator de purificação e R^2 90,69% para a produtividade, estes valores são próximos aos valores máximos que poderia ser explicável (83,72% e 91,71%), devido ao erro experimental. O ajuste pode ser melhor visualizado através das superfícies de respostas (Figuras 5.11 e 5.13) onde observa-se a semelhança com as superfícies obtidas com os dados experimentais (Figuras 5.10 e 5.12). Com isto pode-se afirmar que estes modelos atingiram o objetivo de ajuste dos dados experimentais.

5.3.3 Validação dos modelos

Para a validação dos modelos estatísticos e polinomiais, um experimento no ponto ótimo indicado pela otimização das respostas (Figura 5.7) - Vazão fase leve/Vazão Total de 0,6697 e intervalo entre os pulsos de 1s - foi repetido para analisar quais modelos se ajustam melhor aos dados experimentais. Na Tabela 5.14 apresenta os valores experimentais do fator de purificação e produtividade para o ponto ótimo e os valores dos modelos, juntamente com o erro de cada modelo.

Tabela 5.14 – Validação dos modelos de extração da bromelina em operação contínua.

	Validação	Valores preditos modelos		Erro	
		Estatístico	Polinomial	Estatístico	Polinomial
FP	5,67	5,12	5,86	-0,55	0,19
Produtividade	0,78	0,92	0,75	0,14	-0,03

Como observa-se pelos valores dos erros da Tabela 5.14 o modelo polinomial tem um maior ajuste, como foi indicado pelos valores de regressão, servindo ao objetivo de modelo de predição. Os modelos estatísticos apesar do baixo ajuste indicam com razoável precisão a região de ótimo.

5.3.4 Estudo da hidrodinâmica do processo de Extração:

A coluna começa a operação nas condições vazão fase leve/vazão total 0,5 e intervalo entre os pulsos 4 s, são então aplicados pulsos na entrada das variáveis no tempo 20 min de acordo com a especificação do planejamento usado até alcançar novo estado estacionário. A extração líquido-líquido tem comportamento não linear, e varia ao longo do tempo. Este comportamento é demonstrado pelos gráficos a seguir.

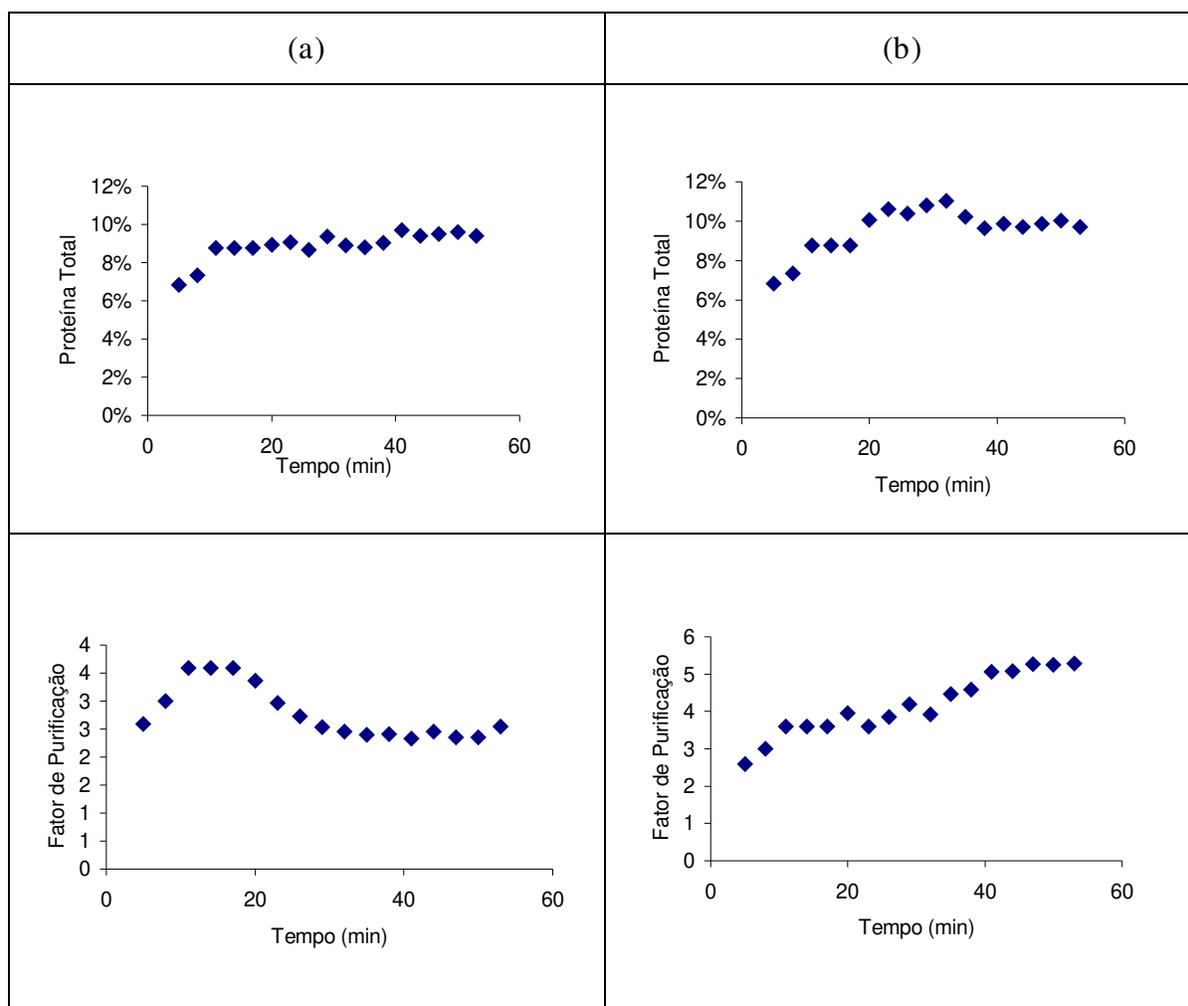


Figura 5.14 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de câmpulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando o intervalo dos pulsos para 7 s (a) e para 1 s (b).

Como observa-se na figura 5.14 o aumento do intervalo entre os pulsos (a) leva a uma redução do fator de purificação, pois aumenta o tamanho das gotas resultando num menor fator de purificação, isto pode ser notado pelo aumento da fração de retenção de 0,38 para 0,5. O rendimento em proteína total não alterou-se.

A diminuição do intervalo entre os pulsos (aumento da frequência) (b) resulta num aumento do fator de purificação e de proteína total. Este fenômeno é observado porque o aumento na frequência faz diminuir o tamanho das gotas e aumenta a transferência de massa no sistema, como observado pela fração de retenção que diminui (0,38-0,26), mostrando que o tamanho das gotas diminuiu.

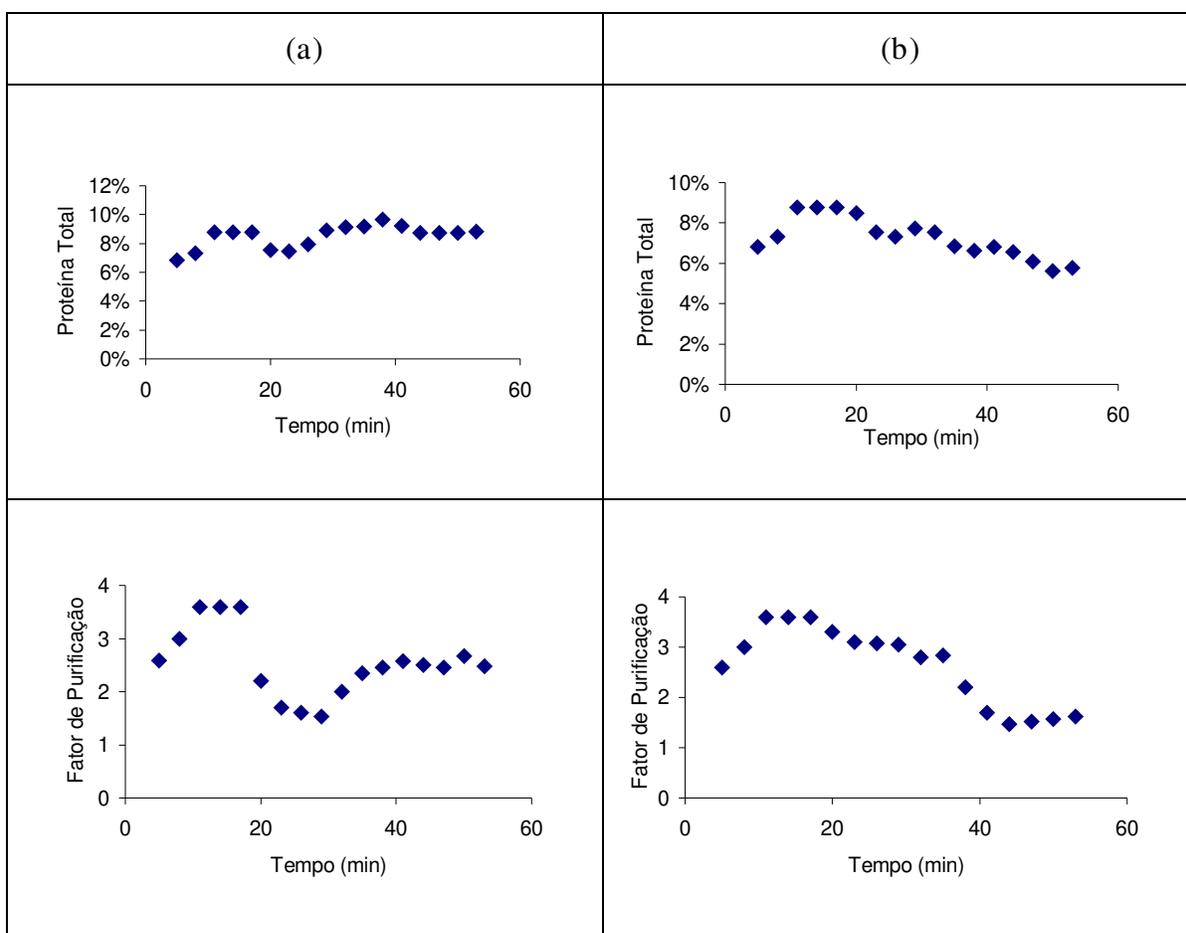


Figura 5.15 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando Vazão fase leve/Vazão total para 0,217 (a) e para 0,782 (b).

A diminuição da razão Vazão fase leve/Vazão total praticamente não altera o rendimento em proteína total (Figura 5.15(a)), mas diminui significativamente o fator de purificação. O resultado esperado seria um aumento ou pelo menos uma estabilização destes valores, o que não aconteceu devido à coluna entrar na condição de operação de inundação onde o rendimento cai bruscamente.

O aumento da razão Vazão fase leve/Vazão total (Figura 5.15(b)) para 0,782 leva a uma diminuição do rendimento em proteína total e no fator de purificação. Este efeito é devido a diminuição da vazão de caldo de abacaxi em relação à vazão de solução micelar. A quantidade de bromelina necessária para ocupar todas as micelas é insuficiente causando a diminuição do rendimento.

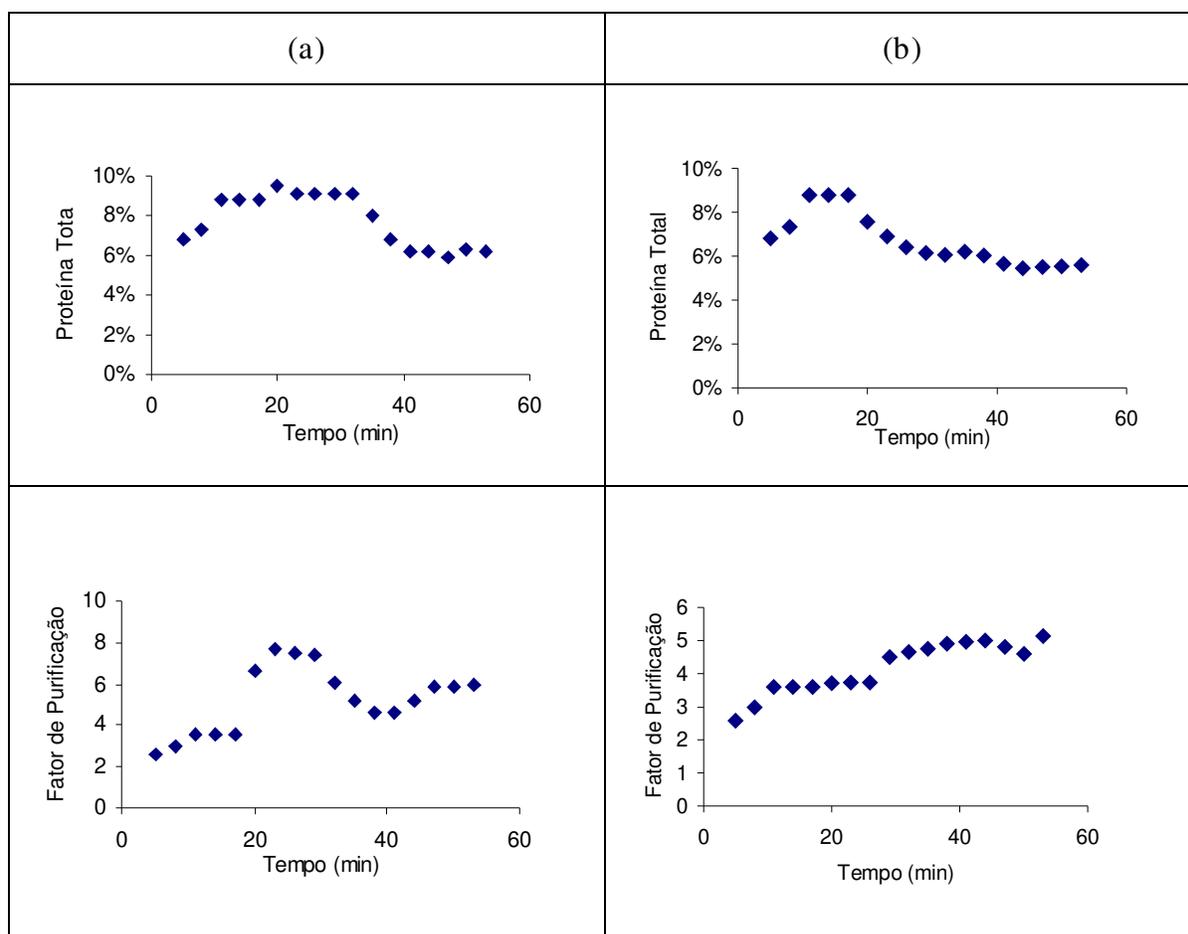


Figura 5.16 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,7 e o intervalo dos

pulsos para 2 s (a) e alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,7 e o intervalo dos pulsos para 6 s (b).

Neste caso já temos a interação entre duas variáveis, o aumento da razão Vazão fase leve/Vazão total para 0,7 faz reduzir o rendimento em proteína total, em compensação com a diminuição do intervalo entre os pulsos (Figura 5.16 (a)) (aumento da frequência) temos uma redução no tamanho das gotas formadas no interior da coluna aumentando a transferência de massa.

Nota-se o efeito do aumento do intervalo entre os pulsos (diminuição da frequência) na Figuras 5.16 (a) e (b) na transferência de massa e conseqüentemente no fator de purificação, que diminuem significativamente.

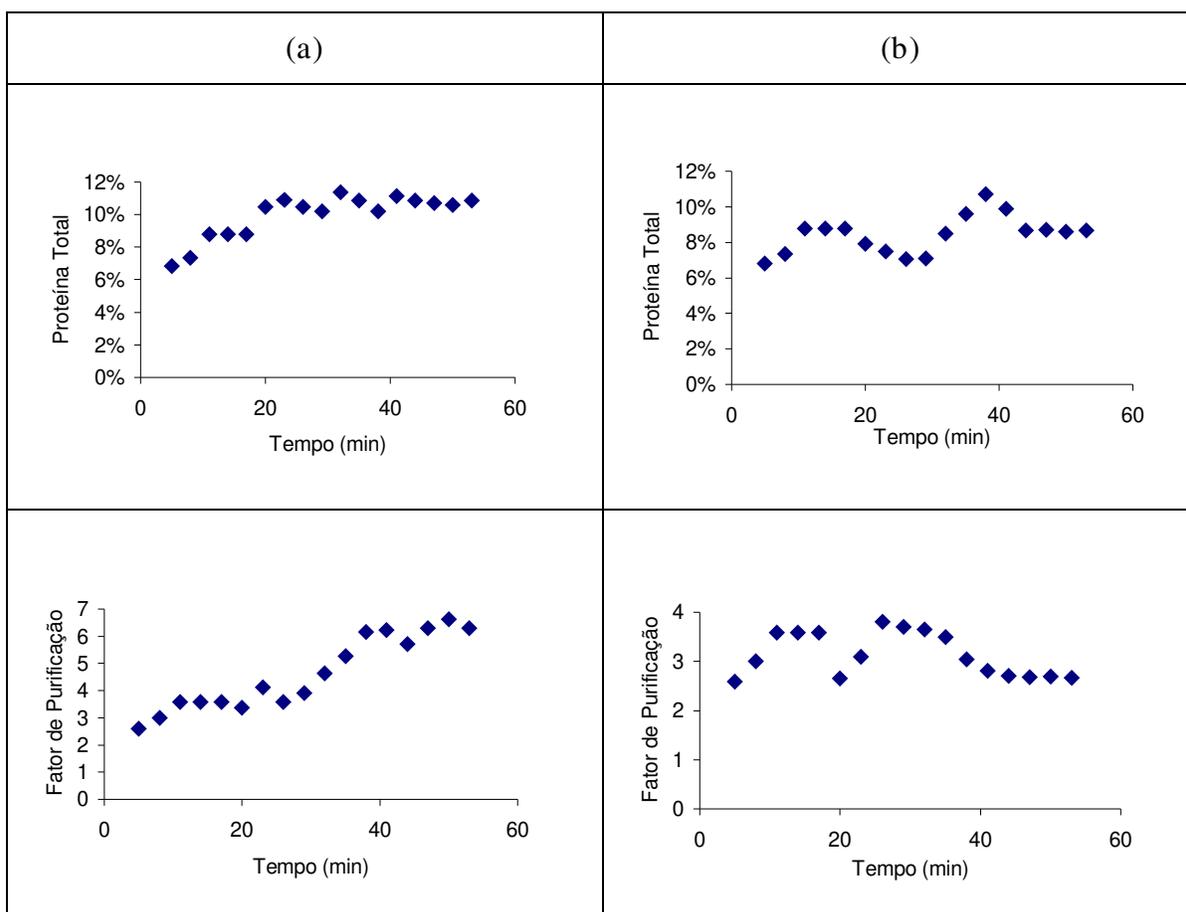


Figura 5.17 - Rendimento em proteína total e fator de purificação durante a operação da micro-coluna de campânulas pulsantes para extração da bromelina. Pulso aplicado na entrada no tempo 20 min alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,3 e o intervalo dos

pulsos para 2 s (a) e alterando a Vazão fase leve/Vazão total para 0,3 e o intervalo dos pulsos para 6 s (b).

Neste caso (Figura 5.17 (a)) houve um aumento no rendimento de proteína total devido a diminuição da razão Vazão fase leve/Vazão total para 0,3, ou seja, maior quantidade de enzima para entrar nas micelas, aliado a um menor quantidade de micelas. A diminuição do intervalo entre os pulsos levou a uma maior transferência de massa e conseqüentemente um maior fator de purificação.

Na Figura 5.17 (b) observa-se claramente o efeito do aumento do intervalo entre os pulsos comparado com o caso anterior (a), o aumento do tamanho das gotas (diminuição da fração de retenção) e redução do fator de purificação.

5.4 Modelagem dinâmica da coluna de extração via redes neurais.

A dinâmica das colunas de extração pode ser investigada com suficiente exatidão usando uma simples aproximação baseada nas redes neurais. Este modelo de conexão tem a habilidade de aprender procedimentos complexos do sistema físico.

Para escolher a arquitetura de uma RNA depende do que deve ser executado. Neste caso a RNA deve prever o rendimento de proteína total e o fator de purificação na saída da coluna (fase dispersa) pelo período que coluna estiver em regime transiente até alcançar novo estado estacionário.

O número de experimentos a serem executados envolve essencialmente variações na vazão fase leve/vazão total e no intervalo entre os pulsos na entrada e variações na saída do rendimento de proteína total e o fator de purificação no intervalo de 3 min, para formar o banco de dados da rede neural.

Para representar a dinâmica de operação da coluna escolheu-se as entradas que são representadas pelos passados e presentes valores da razão vazão fase leve/vazão total e no intervalo entre os pulsos, e as saídas o valor presente do rendimento de proteína total e o fator de purificação (Figura 5.18). Poderia-se escolher os valores passados e presentes da saída, mas para o uso prático deste modelo não seria possível, pois as análises que levam a estes

valores de saída (proteína total e atividade proteolítica) demoram aproximadamente 40 min o que inviabilizaria seu uso.

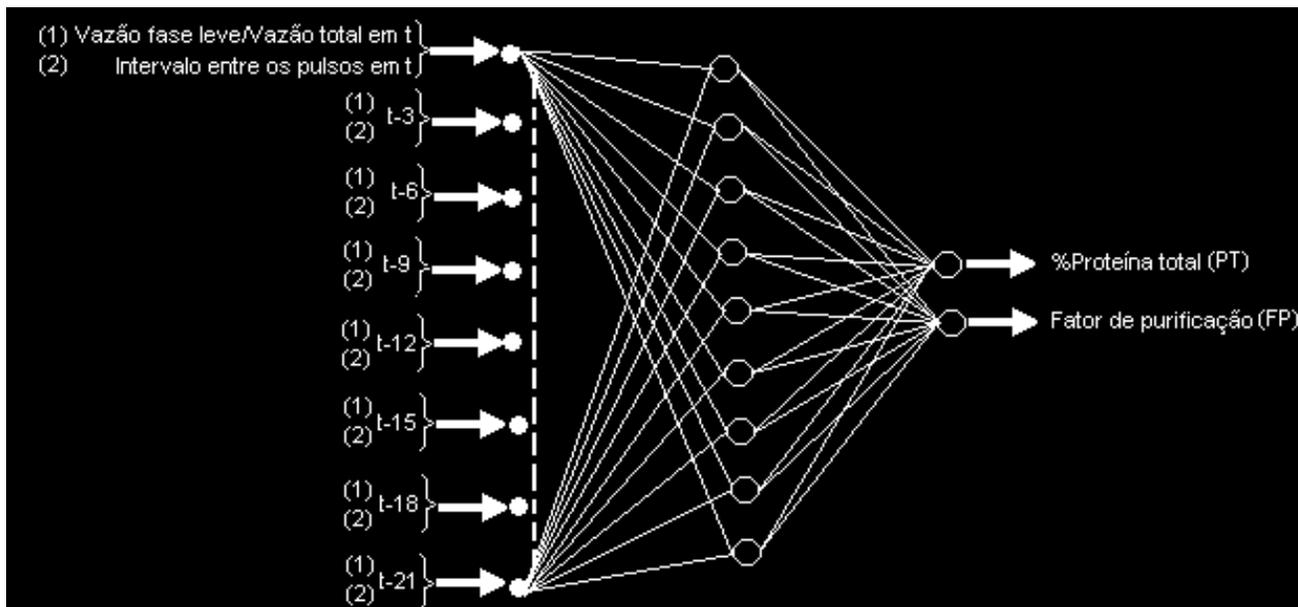


Figura 5.18 - Representação da rede neural usada para a modelagem dos dados para extração da bromelina.

O banco de dados experimentais é composto por um conjunto de 272 vetores entrada/saída que foram separados em dois conjuntos. O primeiro conjunto de dados, chamado de dados de treinamento, com 204 diferentes dados de entrada/saída padrão foram usados para calcular o erro e para processar os pesos.

O segundo conjunto, chamado conjunto de teste com 68 dados, é usado para determinar os pesos ótimos o qual dá um mínimo de erro na base de teste. As faixas de entrada/saída de valores para a rede neural corresponde as diferentes condições de operação são apresentados nas Tabelas 5.15 e 5.16.

Tabela 5.15 – Variáveis de entrada usadas no modelo neural e intervalos.

Entrada	Valor mínimo	Valor máximo
Vazão fase leve/Vazão total	0,217	0,782
Intervalo entre os pulsos	1.s	7.s

Tabela 5.16 – Variáveis de saída usadas no modelo neural e intervalos.

Saída	Valor mínimo	Valor máximo
% Proteína Total	4,79	12,08
Fator de Purificação	0,89	7,64

5.4.1 Normalização

Os dados foram normalizados entre a faixa de 0,1 e 0,9 ao invés de 0 e 1 para evitar que a matriz tenha muitos dados próximo de zero o que tornaria a matriz esparsa e de difícil solução.

5.4.2 Função de Ativação

Usou-se a função de ativação sigmoidal devido a faixa de normalização que é a mesma desta função, e por poder representar qualquer função contínua.

5.4.3 Análise do Treinamento

Os critérios de análise usados para os treinamentos foram: ajuste dos dados experimentais e os preditos pelo modelo (R) e a média quadrática do erro (MQE) para cada variável.

O melhor projeto é definido como aquele que minimiza o erro de predição (menor média quadrática do erro (MQE) e maior ajuste dos dados preditos pelo modelo e os dados experimentais - R) para o conjunto de dados que não foi treinado (conjunto de teste).

5.4.4 Seleção do tempo Retroativo (valores passados)

Para verificar-se o tempo retroativo necessário para representar o sistema as redes foram treinadas com vários tempos retroativos até o tempo em que o erro no conjunto de teste se manter constante.

Para verificação do tempo retroativo usou-se o algoritmo Regularização Bayesiana com excesso de neurônios, porque neste algoritmo quando o número de neurônios é suficiente, os parâmetros da rede (como as somas quadráticas dos erros e dos pesos e o número efetivo de parâmetros) tornam-se constantes mesmo aumentando o número de neurônios, então se a rede tiver um número grande de neurônios ela sempre irá representar satisfatoriamente a função usando apenas a quantidade necessária de neurônios. As funções de ativação usadas foram sigmoidal.

O resultado da seleção encontra-se na Tabela 5.17, como observa-se na tabela a MQE no teste fica constante a partir do tempo de atraso 21 min, mostrando que este é o tempo necessário para representar a dinâmica do processo.

Tabela 5.17 – Treinamento da rede para seleção do tempo de retardo para representação da dinâmica do processo de extração da bromelina.

Número neurônios na entrada	Tempo Retroativo	SQE	Número Efetivo de parâmetros	PT - MQE treinamento $\times 10^{-5}$	FP - MQE treinamento	PT - MQE teste $\times 10^{-5}$	FP - MQE teste
10	t-12	0,97	76	1,94	0,171	3,09	0,215
12	t-15	0,73	92	1,42	0,133	1,76	0,165
14	t-18	0,58	107	1,12	0,106	1,51	0,162
16	t-21	0,43	123	0,746	0,0863	1,40	0,154
18	t-24	0,33	138	0,456	0,0742	1,22	0,157

Nas Figuras 5.19 e 5.20 estão graficados estes valores onde podemos verificar que após o tempo retroativo de 21 min (correspondente a 16 neurônios na entrada) o erro no conjunto de teste permanece constante e o erro no conjunto de treinamento continua diminuindo. Conclui-se então que o número de neurônios na camada de entrada é 16.

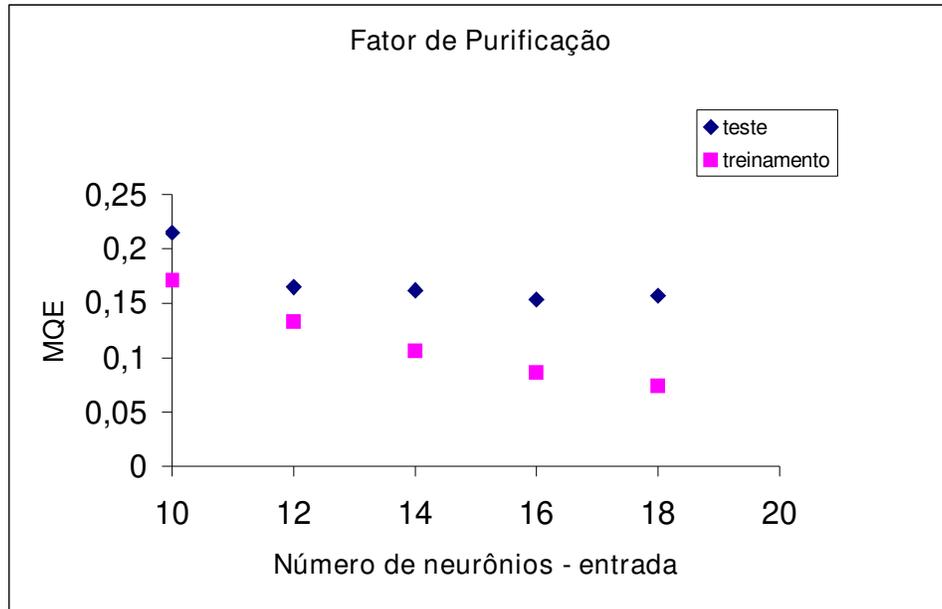


Figura 5.19 – Média quadrática do erro versus número de neurônios na entrada para a variável Fator de Purificação.

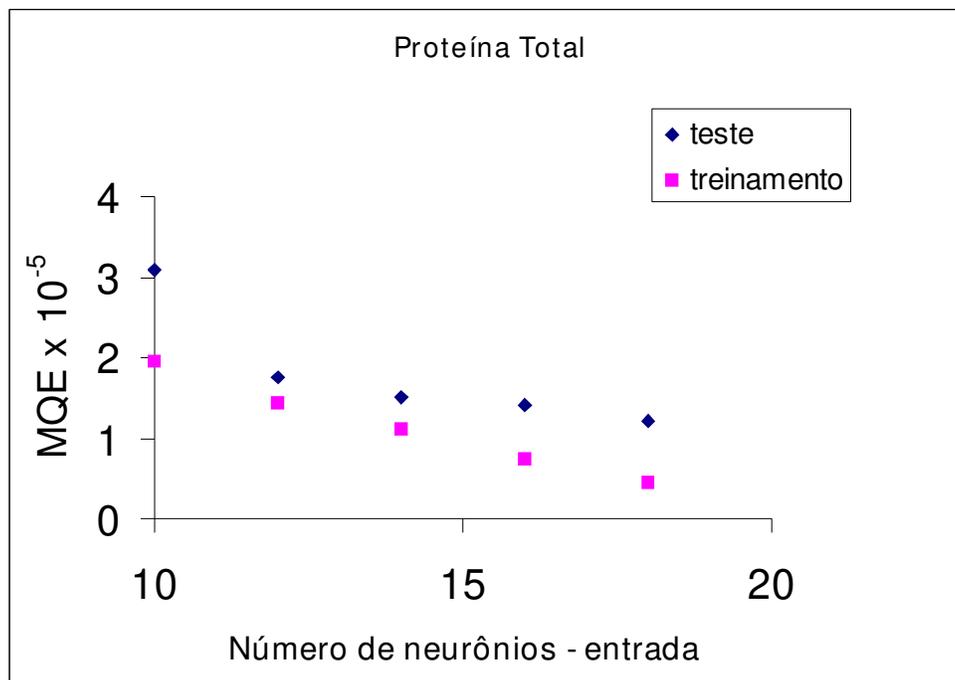


Figura 5.20 – Média quadrática do erro versus número de neurônios na entrada para a variável Proteína total.

5.4.5 Treinamento da Rede Neural

Com o objetivo de encontrar a melhor topologia, treinou-se a rede com o algoritmo Regularização Bayesiana, variando-se o número de neurônios da camada intermediária para encontrar o melhor modelo. Os dados destes treinamentos encontram-se na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 – Treinamento da rede neural variando-se o número de neurônios na camada intermediária.

Número de Neurônios Intermediária	SQE	Número Efetivo de parâmetros	PT - MQE treinamento $\times 10^{-6}$	FP - MQE treinamento	PT - MQE teste $\times 10^{-5}$	FP - MQE teste
6	0,48	104	8,31	0,0973	1,55	0,176
7	0,44	114	7,93	0,0868	1,55	0,161
8	0,43	119	7,56	0,0873	1,44	0,157
9	0,43	122	7,56	0,0861	1,43	0,155
10	0,44	122	7,80	0,0859	1,49	0,152

O indicativo que o número de neurônios é suficiente para este algoritmo é quando os parâmetros da rede (como as somas quadráticas dos erros e o número efetivo de parâmetros) tornam-se constantes mesmo aumentando o número de neurônios. Observando-se este critério concluímos que o melhor desempenho da rede neural depois do treinamento e teste foi com uma rede com nove neurônios na camada intermediária. A topologia final da rede neural é então 16-9-2, com funções de ativação sigmoidal.

A Figura 5.21 mostra a variação dos parâmetros da rede durante o treinamento.

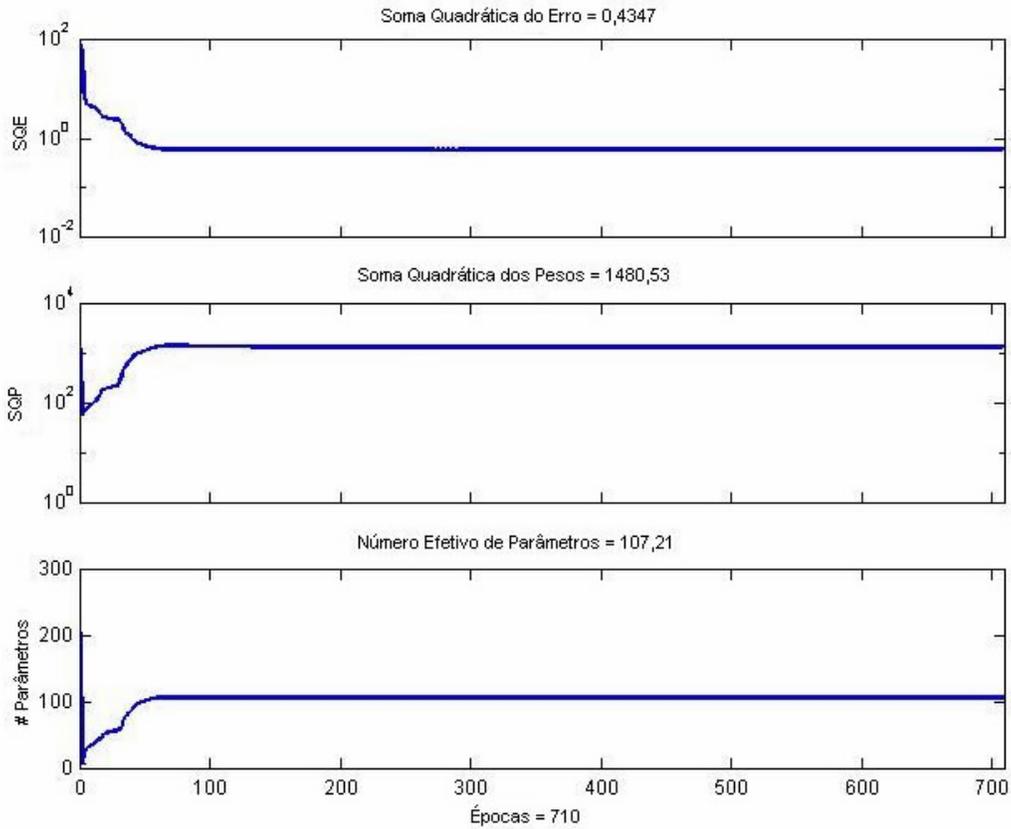


Figura 5.21 – Parâmetros da rede durante o treinamento.

A Figura 5.22 mostra o ajuste dos dados para o conjunto de treinamento.

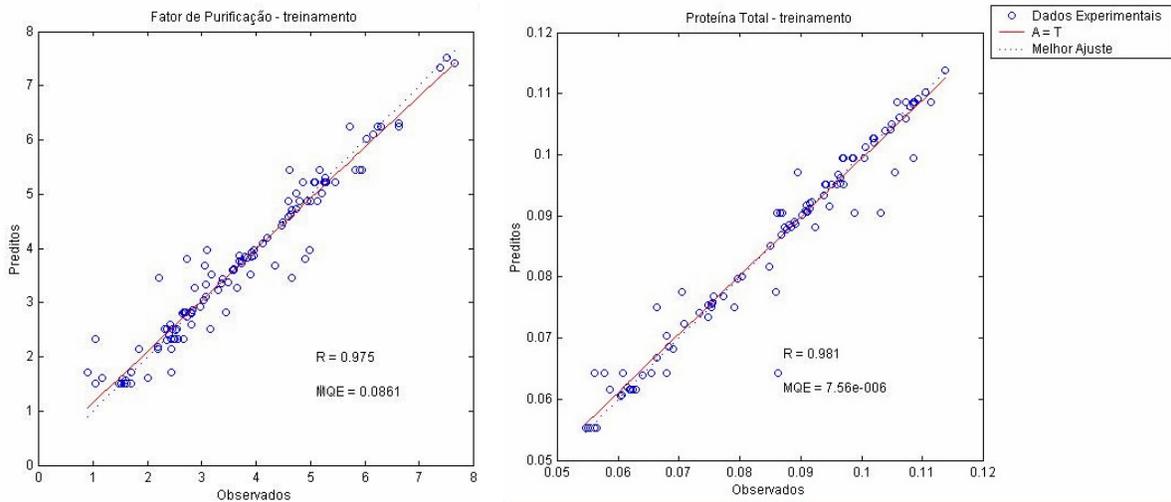


Figura 5.22 – Dados preditos pela rede versus os dados experimentais observados durante o treinamento para as variáveis de saída.

Para confirmar o ajuste da rede neural foram usados os dados de teste, a Figura 5.23 mostra o ajuste destes dados.

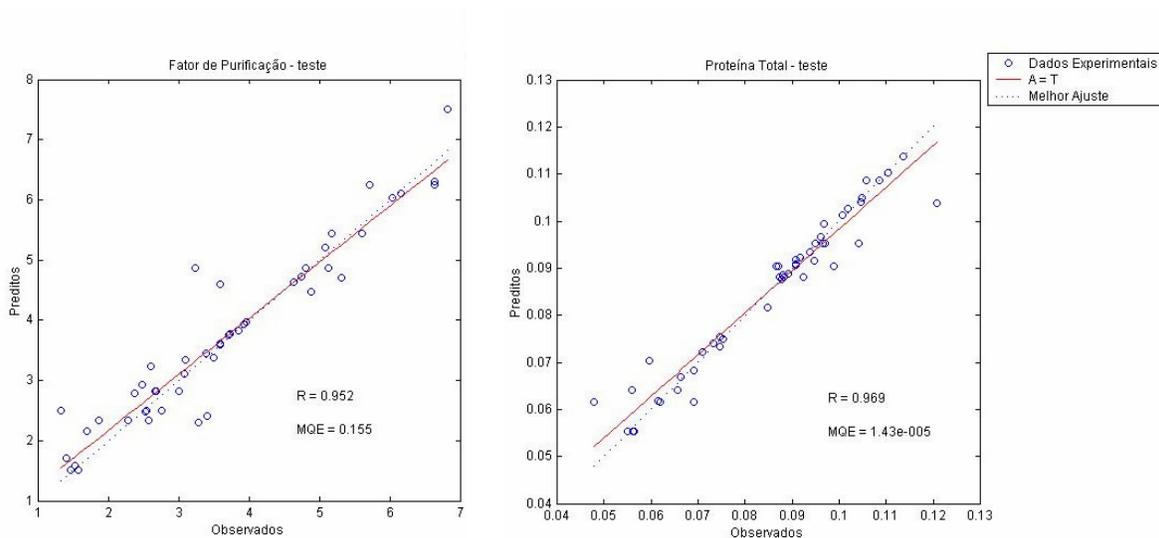


Figura 5.23 – Dados preditos pela rede versus os dados experimentais observados para o conjunto de teste para as variáveis de saída.

Devido o ajuste da rede neural com o conjunto de teste podemos afirmar que a capacidade de prever é muito boa apesar da ampla faixa de operação. Notou-se que o desempenho da rede neural é bom com respeito à Proteína Total e o Fator de Purificação em toda a faixa de valores desejada. Isto é muito importante na descrição de operação dinâmica da coluna.

A rede neural descreve especialmente as variações súbitas nas variáveis de saída, que estavam presentes em várias condições de operação. Os resultados aqui apresentados mostram que o modelo de rede neural teve sucesso para a predição dos valores de saída para a coluna de extração líquido-líquido, que é um sistema não linear e com tempo variante.

6 Conclusões

Este trabalho teve como objetivo a extração da bromelina por micela reversa em operação contínua, a otimização das variáveis estudadas e a modelagem do processo.

A extração por micelas reversas se mostrou uma operação promissora levando a um fator de purificação de 3,29 em operação batelada. Em operação contínua os valores dos pontos ótimos para as variáveis resposta encontrados foram: fator de purificação de 5,02 e Produtividade de 1,28 mg/min. E as condições operacionais que levaram ao ótimo destas respostas foram: Vazão Fase Leve/Vazão Total de 0,67 e intervalo entre os pulsos de 1s.

Entre os modelos polinomiais usados para a representação do sistema, o que obteve o maior ajuste foi o polinômio com termos de terceira ordem e de interações de segunda ordem. Este modelo obteve o maior ajuste devido ao comportamento não linear do sistema que em algumas condições de operação muda de tipo de operação levando a uma queda brusca do rendimento.

Para representar a dinâmica de operação da coluna de extração usou-se uma simples aproximação baseada nas redes neurais. A topologia final da rede neural foi 16-9-2, com funções de ativação sigmoideal. Observou-se que o desempenho da rede neural é bom com respeito à Proteína Total e o Fator de Purificação em toda a faixa de valores desejada.

Após realizado o trabalho, pode-se concluir que a extração da bromelina por micelas reversas em operação contínua é promissora, obtendo-se um fator de purificação de 5. Os modelos de segunda ordem para a extração apresentam um ajuste baixo devido a não linearidade do processo e os modelos polinomiais obtiveram um bom ajuste. As redes neurais conseguiram representar a dinâmica do processo de extração em toda a faixa de operação.

7 Bibliografia:

- Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. *Selective separation and purification of two lipases from Chromobacterium viscosum using AOT reversed micelles*. Biotechnology and Bioengineering, v.38, p.1302-1307, 1991.
- Aires-Barros, M.R.; Taipa, M.A.; Cabral, J.M.S. *Isolation and purification of lipases*. In: Wooley, P. Petersen, S.B. (eds). *Lipases: Their Structure, Biochemistry and application*. Cambridge University Press, G.B., p 234-270, 1994.
- Albery, W.J.; Choudhery, R.A.; Atay, N.Z.; Robinson, B.H. *Rotating diffusion cell studies of microemulsion kinetics*. J. Chem. Society Faraday Trans., v. 183, p. 2407-2419, 1987.
- Arroyo-Reyna, A.; Hernández-Arana, A.; *The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model*. Biochimica and Biophysica Acta, v. 1248, p. 123-128, 1995.
- Baldini, V.L.S.; Iaderoza, M.; Ferreira, E.A.H; Sales, A.M.; Draetta, I.S.; Giacomelli, E.J. *Ocorrência da Bromelina e cultivares do abacaxizeiro*. Colet. ITAL, v. 23, n. 1p. 44-55, Campinas, 1993.
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. *Otimização e planejamento de experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 291p.
- Bates, Douglas, and Watts, Donald, "*Nonlinear Regression Analysis and its Applications*", Wiley, 1988, p. 271-272.
- Bertevello, L.C., *Estudo do Processo de Recuperação e Separação de Bromelina Utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas em Micro-Coluna de Extração*. Tese de Doutorado da Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- Bogdan, S., Gosak D.; Vasié-Racki, D., "*Mathematical Modeling of Liquid-Liquid Equilibria in Aqueous Polymer Solutions Containing Neutral Proteinase and Oxitetracycline using Artificial Neural Network*", Computers Chem. Eng. Vol 19, S791-S796, 1995.

- Bordi, F.; Cametti, C. *Water droplet charging process in water-in-oil microemulsions: an electrical conductivity study*. Colloid and Polymer Science, n.276, p. 1044-1049, 1998.
- Box, G.E.P., Hunter, G.W., Hunter, J.S. *Statistics for experimenters - an introduction to design, data analysis, and model building..* New York: John Wiley & Sons, 1978, 653p.
- Brandani, V., Di Giacomo, G., Spera, L. *Extraction of α -amylase protein by reverse micelles: II effect of pH and ionic strength*. Process Biochemistry, v.29, p.363-367, 1994.
- Brandani, V., Di Giacomo, G., Spera, L. *Recovery α -amylase extracted by reversed micelles*. Process Biochemistry, v.31, n.2, p.125-128, 1996.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. *Reversed micelles in liquid-liquid extraction*. In: Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. (eds.). *Recovery Processes for Biological Materials*. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p.247-271.
- Calado, V.; Montgomery, D.C.; *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. E-Papers Serviços Editoriais. Rio de Janeiro, 260p, 2003.
- Carlson, A.; Nagarajan, R.; *Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition*. Biotech. Progress, v. 8, p. 85-90, 1992.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Aires-Barros, M.R., Cabral, J. M. S., Tambourgi, E. B. *Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc reactor*. Biotechnology Techniques, v.8, p.413-418, 1994.
- Castro, M.J.M.; Cabral, J.M.S. *Reversed micelles in biotechnological processes*. Biotech. Adv., v.6, p.151-167, 1988.
- César, A.C.W., *Otimização dos parâmetros de extração líquido-líquido em duas fases aquosas na recuperação da Bromelina presente no abacaxi*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2000.

- César, A.C.W., Silva, R. e Lucarini, A.C. *Recuperação das Enzimas Proteolíticas Presentes nas Casca e Talo do Abacaxi*. RIC, 01, 47-54, São Carlos, 1999.
- César, A.C.W.; “*Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi*”. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2005.
- Chang, P.S.; Rhee, J.S. *Characteristics of Chromobacterium vicosum lipase-characterized glycerolysis of triglycerides in AOT-Isooctane reversed micelles*. Biocatalysis, n. 4, p. 253-335, 1990.
- Chang, Q.; Chen, J.; *Reversed micellar extraction of trypsin: effect of solvent on the protein transfer and activity recovery*. Biotech. Bioeng., v. 46, p. 172-174, 1995.
- Chang, Q.; Liu, H; Chen, J.; *Extraction of lysozyme, α -chymotrypsin and pepsin into reverse micelles formed using an anionic surfactant, isooctane and water*. Enzyme Microb. Technol., n. 16, p. 970-973, 1994.
- Chen Y.J., Xu G.Y., Yuan S.L., Sun, H.Y.; “*Molecular dynamics simulations of AOT at isooctane/Water interface.*” Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects 273(1-3):174-178, 2006.
- Cortez E.V., Pessoa A., Felipe M.D.D., Roberto L.C., Vitolo M.; “*Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reverse micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from Candida guilliermondii homogenate.*” Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 807(1): 47-54, 2004.
- Creagh, A.L.; Prausnitz, J.M.; Blanch, H.W. *Structural and catalytic properties of enzymes in reverse micelles*. Enzyme Microb. Technol., n. 5, p. 383-392, 1993.
- Cybenko, G., “*Aproximations by superpositions of a sigmoidal function*”, Math. Control Signal Systems, 2,303 (1989).
- Dahuron, L.; Cussler, E.L.; *Protein Extractions with hollow fibers*. AIChE Journal, v. 34, p. 130-136, 1988.

- Dekker, M.; Van't Riet, K.; Baltussen, J.W.A.; Bisjsterboch, B.H.; Laane, C. *Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles*. Chem. Eng. Journal, 33, B27-B33, 1986.
- Dungan, S.R.; Bausch, T.; Hatton, T.A.; Plucinski, P.; Nitsch, W. *Interfacial transport process in the reversed micellar extraction of proteins*. J. Colloid Interface Sci, v. 145, p. 33-50, 1991.
- El-Gharbawi, M.; Whitaker, J.R. *Fractionation and partial characterization of the proteolytic enzymes of stem bromelain*. Biochemistry, v. 2, n. 3, p. 476-481, 1963.
- Farouq S.M., "Neural network model-based predictive control of liquid-liquid extraction contactors." Chemical Engineering Science 60 : 239-253, 2005.
- Ferreira F.LP., Taqueda M.E., Converti A., Vitolo M., Pessoa A.; "Purification of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by liquid-liquid cationic reversed micelles extraction." Biotechnology Progress 21(3): 868-874, 2005.
- Ferreira F.LP., Taqueda M.E., Vitolo M., Converti A., Pessoa A.; "Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles." Journal of Biotechnology 116(4): 411-416, 2005.
- Fischer, G. A., *Modelagem matemática da extração do citocromo b5 via redes neurais*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2002.
- Foresee, F. D., and M. T. Hagan, "Gauss-Newton approximation to Bayesian regularization," Proceedings of the 1997 International Joint Conference on Neural Networks, pages 1930-1935, 1997.
- Fossum, K., *Proteolytic enzymes and biological inhibitors-I. Comparasion between the Kunitz Method and agar Gel Casein precipitating reaction for determination of the activity of some Commercial proteolytic enzymes and inhibitors*. Acta Path. Microbiol. Scand., seção B: 78, p. 350-362, 1970.
- Giles, A.E.; Aldrich C.; Van Deventer, J.S.J., "Modeling of rare earth solvent extraction with artificial neural nets", Hydrometallurgy 43, 241-255, 1996.

- Göklen, K.E.; Hatton, T.A. *Liquid-liquid extraction of low molecular weight proteins by selective solubilization in reversed micelles*. Separation Sci. Technol, v.22, p 831-841, 1987.
- Göklen, K.E.; Hatton, T.A. *Liquid-liquid extraction of protein using reverse micelles*. In: Proceedings, ISEC'86, Munich, v. 3, p. 587-595, 1986.
- Göklen, K.E.; Hatton, T.A. *Protein extraction using reverse micelles*. Biotechnol. Prog., n. 1, p. 69-74, 1985.
- Goto, M., Ono, T., Nakashio, F., Hatton, T.A. *Design of surfactants suitable for protein extraction by reversed micelles*. Biotechnology and Bioengineering, v.54, n.1, p.26-32, 1997.
- Hagan, M.T., Menhaj, M.B., "Training Feedforward Networks with the Marquardt Algorithm", IEEE Transactions on Neural Networks, 5(6), 989(1994).
- Hale L.P., Greer P.K., Trinh C.T., James C.L.; "Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations". International Immunopharmacology 5, 783–793, 2005.
- Han, D.; Rhee, J.S. *Characteristics of lipase catalysed hydrolysis of olive oil in AOT-Isooctane reverse micelles*. Biotechnol. Bioeng., v. 28, p. 1250-1256, 1986.
- Hanson, C., *Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*. New York. Pergamon Press, 1971.
- Hasmann F.A., Cortez D.V., Junior A.P., Roberto I.C.; "Optimization of beta-xylosidase recovery by reversed micelles using response surface methodology." Electronic Journal of Biotechnology 6(2): 153-160, 2003.
- Hasmann, F.A., *Extração líquido-líquido de β -xilosidade por micelas reversas*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Fenquil, Lorena, 2000.
- Hatton, T.A. *Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles*. In: Ordered media in chemical separations ACS Symp. Series, v. 342, p. 170-183, Hinze, W.L. e Armstrong, D.W. (Eds.), 1987.
- Haykin, S., "Neural Networks: a comprehensive foundation", 2nd ed., Prentice Hall, Inc., New Jersey, 1998.

- Hentsch, M.; Menoud, P.; Steiner, I.; Flaschel, E.; Renken, A. *Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process*. Biotechnology Techniques, v.6, nA, p.359-354, 1992.
- Huang, S.Y.; Lee, V-C. *Separation and purification of horseradish peroxidase from Armoracia rusticana root using reversed micellar extraction*. Bioseparation, v.4, p.1-5, 1994.
- Jolival, C., Minier, M., Renon, H. *Extraction of cytochrome C in sodium dodecylbenzenesulfonate microemulsions*. Biotechnology Progress, v.9, p. 456-461, 1993.
- Kamyshny A., Trofimova D., Magdassi S., Levashov A.; "Native and modified glucose oxidase in reversed micelles." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 24(3-4): 177-183, 2002.
- Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S.; *Recovery processes for biological materials*. J. Wiley, London, 1993.
- Kilikian, B.V.; Bastazin, M.R.; Ninami, N.M.; Gonçalves; E.M.R.; Junior, A.P. *Liquid-Liquid Extraction by Reversed Micelles in Biotechnological Process*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.17, n.1, p.29-38, 2000.
- Krei, G.A, Hustedt, H. *Extraction of enzymes by reverse micelles*. Chemical Engineering Science, v.47, n.1, p.99-111, 1992.
- Krei, G.A, Meyer, U., Borner, B., Hustedt, H. *Extraction of α -amylase using BDBAC reversed micelles*. Bioseparation, v.5, p.175-183, 1995.
- Kumar, A.; Hartland, S., *Prediction of Dispersed Phase Holdup in Pulsed Perforated Extraction Columns*, Chem. Eng. Process, 23, 41-59, 1988.
- Kunitz, M.; "Isolation of a Crystalline Protein Compound of Trypsin and of Soybean Trypsin-Inhibitor". J. Gen. Physiol. 30 (4): 311-320 1947.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. Biotech. Bioeng., v. 30, p. 81-87, 1987.

- Leser, M.E.; Mrkoci, K; Luisi, L.P. *Reverse micelles in protein separation: the use of silica for the back transfer process*. Biotech. Bioeng., v. 41, p. 482-489, 1993.
- Leser, M.E.; Wei, G.; Luisi, L.P.; Maestro, M. *Application of reverse micelles for the extraction of proteins*. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 153, p. 629-635, 1992.
- Li G., Norman W.L.; "New hybrid neural network model for prediction of phase equilibrium in two-phase extraction system." Ind. Eng. Chem. Res., 42: 112-119, 2002.
- Liu, D.J.; Ma, J.M.; Cheng, H.M.; Zhao, Z.G. *Investigation on the conductivity and microstructure of AOT non-ionic surfactants water n-heptane mixed reverse micelles*. Colloids and Surfaces, n. 135, p. 157-164, 1998.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265.
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H. *Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v.947, p.209-246, 1988.
- Luisi, P.L.; Bonner, F.J.; Pellegrini, A.; Wiget, P.; Wolf, R. *Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization*. Helv. Chim. Acta, v. 62, p. 740-752, 1979.
- Luisi, P.L.; Magid, L.J. *Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions*. CRC Crit. Rev. Biochem., v. 20, p. 409-474, 1986.
- Lundgren, J.S.; Watkins, A.N.; Bright, F.V.; *Effects of water loading on fluorescein/anti-fluorescein antibody system in aerosol-OT reverse micelles formed n-heptane*. Applied Spectroscopy, n.52, p.96-100, 1998.
- MacKay, D.J.C., "Bayesian Interpolation", Neural Computation, vol4, pp.415-447, 1992.
- Mandal, D.; Datta, A.; Pal, S.C.; Bhattacharyya, K. *Solvation dynamics of 4-aminophthalimide in water-in-oil microemulsion of Triton X-100 in mixed solvents*. Journal of Phys. Chem. B., v. 45, n. 102, p. 9070-9073, 1998.

- Marcozzi, G.; Correa, N.; Luisi, P.L.; Caselli, M. *Protein extraction by reversed micelles: a study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity*. *Biotech. Bioeng.*, v. 378, p. 1239-1246, 1991.
- Martinek, K.; Klyachko, N.L.; Kabanov, A.V.; Khmelnitsky, Y.L. and Levashov, A.V. *Micelar enzymology: its relation to membranology*. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 981, p. 161-172, 1989.
- Martinek, K.; Levashov, A.V.; Klyachko, N.L.; Khmelnitsky, Y.L. and Berezin, L.V. *Micelar enzymology*. *Euro. J. Biochem*, v. 155, p. 453-468, 1986.
- Matzke, S.F.; Creagh, A.L.; Haynes, A.C.; Prausnitz, J.M.; Blanch, H.W. *Mechanisms of protein solubilization in reverse micelles*. *Biotech. Bioeng.*, v. 40, p. 91-102, 1992.
- Meyer, U. *Extraktion von Enzymen Mittels Inverser Mizellen*. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, 1992. 58p. (Tese de Graduação)
- Monteiro T.I.R.C., Porto T.S., Carneiro-Leão A.M.A., Silva M.P.C., Carneiro-da-Cunha M.G.; “*Reversed micellar extraction of na extracellular protease from Nocardiosis sp fermentation broth.*” *Biochemical Engineering Journal* 24(1): 87-90, 2005.
- Murachi, T. Bromelain enzymes. In: Lorand, L. *Methods in Enzymology*, v.XLV, p. 475-85, New York, Academic Press, 1976.
- Nishii Y. Kishi Y., Ito M., Morita Y., Kanoh A., Shintani M., Kinugasa T., Nii S., Takahashi K.; “*Effect of cation species on equilibrium of reversed micellar extraction of lysozyme.*” *Separation and Purification Technology* 37(2): 161-167, 2004.
- Nishiki, T.; Muto, A.; Kataoka, T.; Kato, D. *Back extraction of proteins from reversed micellar to aqueous phase: partitioning behaviour and enrichment*. *Chemical Engineering Journal and Biochemical Engineering Journal*, v. 59, p. 297-301, 1995.
- Nitin, W.F.; Luisi, P.L. *Immobilized enzymes in reverse micelles: studies with gel entrapped trypsin and α -chymotrypsin AOT reverse micelles*. *Biotech. Bioeng.*, v. 33, p. 1277-1282, 1989.

- Pacheco R., Karmali A., Matos-Lopes M.L., Serralheiro M.L.; “*Amidase encapsulated in Ttab reversed micelles for the study of transamidation reactions.*” *Biocatalysis and Biotransformation* 23(6): 407-414, 2005.
- Paradkar, V.M.; Dordick, J.S. *Mechanisms of extraction of chymotrypsin into isooctane at very low concentrations of Aerosol-OT in absence or reverse micelles.* *Biotech. Bioeng.*, v.43, p. 529-540, 1994.
- Park Y.K., *Produção de Enzimas Industriais de Origem Vegetal.* *Biotecnologia Industrial* V3, São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 2001.
- Patel, M.T., Nagarajan, R., Kilara, A. *Interactive influence and optimization of reaction parameters in the hydrolysis of olive and coconut triacylglycerols by C. cy/indracea and R. javanicus lipases in reverse micellar media.* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.59, p.109-124, 1996.
- Porto T.S., Monteiro T.I.R., Moreira K. A., Lima J.L., Silva M.P.C., Porto A.L.F., Carneiro-da-Cunha M.G.; “*Liquid-liquid extraction of na extracelular alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and reversed micelles Systems.*” *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21(5): 655-6559, 2005.
- Puchkaev A.V., Vlasov A.P., Metelitz D.I.; “*Stability of glucose 6-phosphate dehydrogenase complexed its substrate or cofactor in aqueous and micellar environment.*” *Applied Biochemistry and Microbiology* 38(1): 36-44, 2002.
- Quantrille, T.E., Liu, Y.A.,”*Artificial Inteligence in Chemical Engineering*”, Academic Press, Inc., 1991.
- Rabelo, A.P.B., *Estudo e Desenvolvimento de uma Micro-Coluna de Campânulas Pulsantes para a Purificação de Proteína.*, Tese de Doutorado da Faculdade Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- Regalado, C., Asenjo, J.A., Pyle, D.L. *Studus on the purification of peroxidase from horseradish roots using reversed micelles.* *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, p.332-339, 1996.

- Regalado, C.; Asenjo, J.A.; Pyle, D.L. *Protein extraction by reversed micelles: studies on the recovery of horseradish peroxidase*. Biotech. Bioeng., v. 44, p 674-681, 1994.
- Rodrigues, E.M.G. *Extração líquido-líquido de Xilanase por Micela Reversa*, Lorena, FAENQUIL, 1997 (Dissertação de Mestrado).
- Rowan, A.D.; Buttle, D.J. and Barrett, A.J. *The cysteine proteinases of the pineapple plant*. Biochemical Journal, v.266, n.3, p. 869-75, 1990.
- Ruckenstein, E.; Karpe, P. *On the enzymatic superactivity in ionic reverse micelles*. Journal of Colloid and Interface Sci., v.139, n.2, p. 408-436, 1990.
- Seoud, O.A, Sanctis, D.S., Palma, E.J. *Tensoativos: Química e aplicações em cosméticos e detergentes*. São Paulo: ABQ, 1999. (Apostila do Curso de Tensoativos)
- Shipovskov S., Trofimova D., Saprykin E., Christenson A., Ruzas T., Levashov A.V., Ferapontova E.E.; “*Spraying enzymes in microemulsions of AOT in nonpolar organic solvents for fabrication of enzyme electrodes.*” Analytical Chemistry 77(21): 7074-7079, 2005.
- Shukla A., Neubert R.H.H.; “*Investigation of w/o microemulsion droplets by contrast variation scattering.*” Pramana-Journal of Physics 65(6): 1097-1108, 2005.
- Suh, H. J.; Lee, H.Y. and Yang, H.C. *Purification and characterization of Bromelain isolated from pineapple*. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, v.35, n.4, p.300-7, 1992.
- Testard F., Zemb T.; “*Interpretation of phase diagrams: topological and thermodynamical constraints.*” Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects 205(1-2): 3-13, 2002.
- Volpe, P.L.O.; Silva Filho, E.A. *Calorimetric study of SDS micelle formation in water and in NaCl solution at 298 K*. Termochimica Acta, n. 257, p.59-66, 1995.
- Walter, H.E., “*Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates*”. In: Bergmeyer. H.U. Ed., Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 270–277, 1984.

- Yang Z. Robb D.A.; *"Tyrosinase activity in reversed micelles."* Biocatalysis and Biotransformation 23(6): 423-430, 2005.
- Yao C.Y., Tang S.K., He Z.M., Deng X.; *"Kinetics of lipase-catalysed hydrolysis of olive oil in AOT/isooctane reversed micelles."* Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 35(4-6): 108-112, 2005.
- Yao C.Y., Tang S.K., Zhang J.H., Yu Y.T.; *"Kinetics of lipase deactivation in AOT/isooctane reversed micelles."* Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 18(4-6): 279-284, 2002.
- Zamarro, M.T., Domingo, M.J., Ortega, F., Estrada, P.; *"Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate / iso-octane reverse micelles."* Biotechnology and Applied Biochemistry, v.23, p.117-125, 1996.
- Zellner M, Winkler W, Hayden H, Diestinger M, Eliassen M, Gesslbauer B, Miller I, Chang M, Kungl A, Roth E, Oehler R; *"Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets"* Electrophoresis (12): 2481-2489 Jun 2005.
- Zhang Q.J., Sawatzky R.P., Wallace E.D., London M.J., Stanley S.J.; *"Artificial neural network modelling of oil sands extraction process."* Journal of Environmental Engineering and Science 3: S99-S110, 2004.
- Zheng W.J., Wang D., Huang X.R., Qu Y.B., Gao P.J.; *"Effects of normal alcohols on the catalytic activity of lignin peroxidase in reversed micelles."* Acta Chimica Sinica 63(21): 2009-2012, 2005.

APÊNDICE A

Descrição do método para determinação de proteínas totais - Método de Lowry (1951)

Reagentes:

Solução I: sulfato de cobre penta hidratado 1% (p/v) em água deionizada

Solução II: tartarato de sódio e potássio 2% (p/v) em água deionizada

Solução III: carbonato de sódio 2% (p/v) dissolvido em solução de hidróxido de sódio 0,1N

Solução IV: SDS 1% (p/v) em água deionizada

Solução de Folin Ciocalteu: diluir 1:1 em água deionizada para obtenção de concentração final de 1N.

Misture: 1 mL da sol. I, 1 mL da sol. II, 10 mL de sol. IV e 88mL da sol. III

Procedimento:

Em tubos de ensaio limpos, secos adicionou-se 200 µL da amostra + 2 mL da solução fresca, agitou-se o tubo por 5 segundos em vórtice.

Deixou-se em repouso por 10 minutos, adicionou-se então 200 µL de solução de folin, agitou-se os tubos por 5 segundos em vórtice, deixou-se em repouso por 30 minutos. Fez-se as leituras em espectrofotômetro a 578 nm. Utilizou-se como padrão BSA.

APÊNDICE B

Descrição do método para a determinação da atividade proteolítica – Caseína .

A determinação da atividade proteolítica pode ser realizada conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984), como está descrito a seguir:

Reagentes:

1. NaOH 1 M: Dissolver 4 g de NaOH em 100 mL de água (destilada ou deionizada).
2. Tampão fosfato 1 M, pH 7,5, dissolver:
 - a. 34 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água.
 - b. 43,5 g de K_2HPO_4 ou 57 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de água.

Juntar (b) com (a) e ajustar o pH para 7,5.

3. Ácido clorídrico, HCl 1 M: Adicionar 9,8 mL de HCl (a pelo menos 32%) em 72 mL de água.
4. Preparo do substrato tamponado.

4.1 Solução tamponada de caseína (2% m/v; fosfato 0,1 M, pH 7,5):

Suspender 2 g de caseína com cerca de 5 mL de água em um frasco volumétrico, adicionar NaOH (1), cerca de 30 mL de água e mexer bem com agitador magnético até que a caseína esteja completamente dissolvida. Adicionar 5 mL de tampão fosfato (2) para clarear a solução. Ajustar o pH 7,5 com HCl (3) e diluir para 100 mL com água. Solução estável por 1 semana.

5. HCl 0,05 mol/L: Diluir 1 mL da solução (3) com 19 mL de água.
6. Solução estoque de tirosina (5 mmol/L): dissolver 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl (5) - S_0 . Diluir para 3 (P_0), 2 (P_1), 1 (P_2), 0,5 (P_3) e 0,25 (P_4) mM com a solução (5). Homogeneizar a solução antes de diluir.

7. Ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L: Dissolver 4,9 g de TCA em 100 mL de água (ou diluir 30 mL de TCA 15% para 90 mL).
8. NaOH 0,5 mol/L: Diluir 50 mL da solução (1) em 50 mL de água.

Procedimento

Pipetar em tubos de centrífuga separados: 2,5 mL de solução de substrato (4.1) nos tubos T e B₃, 2,5 mL de solução de HCl (5) em B₁ e B₂ e 2,5 mL de cada solução padrão de tirosina (6) (Padrões - P₀, P₁, P₂, P₃, P₄).

Deixar em banho por 3 a 5 minutos em temperatura de 37°C.

Adicionar 0,2 mL da amostra (enzima) aos tubos T e B₁, e 0,2 mL de HCl 0,05 M (5) aos demais.

Misturar e deixar incubando por 10 minutos a 37°C.

Ao fim do tempo adicionar 5 mL de TCA (7a).

Misturar e adicionar 0,2 mL de amostra ao branco.

Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.

Remover o precipitado por filtração ou centrifugação por 20 minutos a 2300 g.

Medida da Atividade

Ler a variação de absorbância a 280 nm (no filtrado ou sobrenadante).

- Absorbância da amostra: A_T
- Absorbância do branco B₁: A_{B1}
- Absorbância do branco B₃: A_{B3}
- Através de A_T - A_{B1} - A_{B3}, encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir}, produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37°C.

O resultado final, em atividade enzimática, é dado por:

$$\text{Atividade} = 0,02 \cdot C_{\text{tir}} \quad (\mu\text{mol}/\text{min})$$