



UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO

MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE UM PROCESSO INOVATIVO
PARA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DEXTRANA: VERIFICAÇÃO DA
APLICABILIDADE DO SISTEMA PARA PROCESSOS INDUSTRIAIS**

Sueli Rodrigues

Setembro de 2000

Campinas –SP

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de
Mestrado em Engenharia Química.

orientador (a)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE UM PROCESSO INOVATIVO PARA
SÍNTESE ENZIMÁTICA DE DEXTRANA: VERIFICAÇÃO DA
APLICABILIDADE DO SISTEMA PARA PROCESSOS INDUSTRIAIS

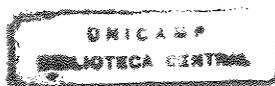
Autora: Sueli Rodrigues

Orientadora: Liliane Maria Ferrareso Lona

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

Setembro de 2000

Campinas –SP



17/09/2000

UNIDADE 30
N.º CHAMADA:
T/Unicomp
R618m
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 43258
PROC. 16-278/00
C D
PREC. R\$ 1,00
DATA 19/12/00
N.º CPD _____



CM-00153431-7

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

R618m Rodrigues, Sueli
Modelagem e simulação de um processo inovativo
para síntese enzimática de dextrana: verificação da
aplicabilidade do sistema pra processos industriais /
Sueli Rodrigues.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadora: Liliane Maria Ferrareso Lona
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Modelos matemáticos. 2. Simulação
(Computadores digitais). 3. Adsorção. 4. Bioreatores.
I. Lona, Liliane Maria Ferrareso. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

Dedico esta tese aos meus pais que sempre deram todo apoio e incentivo à minha formação profissional.

"Não desças os degraus do sonho para não despertar os monstros. Não subas aos sótãos, onde os deuses, por trás das suas máscaras, ocultam o próprio enigma. Não desças, não subas, fica. O mistério está é na tua vida! É um sonho louco este nosso mundo..."

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que fazem ou fizeram parte de minha vida, os quais direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

À professora Liliane pela excelente orientação dada a este projeto, pela sua dedicação, atenção e amizade.

À FAPESP pela credibilidade e incentivo financeiro, o que viabilizou a realização desta tese.

Ao assessor da FAPESP, e aos Professores César Santana e Francisco Maugeri, pelas informações, análises, comentários e sugestões, que em muito contribuíram para a elaboração da tese.

A todos os professores do Departamento de Processos Químicos pelo apoio dispensado durante o curso de mestrado.

Aos colegas do laboratório Fabiano e Pauline pela amizade e momentos de lazer.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química, em especial a Eunir, secretária do departamento pela atenção e ajudada dada no tocante a burocracia interna da faculdade.

Ao meu pai pela força e incentivo ao meu desenvolvimento pessoal e profissional, e aos demais colegas da pós-graduação pela amizade.

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	xvii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Alguns Conceitos Biotecnológicos	4
2.1.1 Biopolímeros Extracelulares	4
2.1.2 Características Reológicas de Soluções de Polissacarídeos	5
2.1.3 Projeto de Reatores Microbiológicos	7
2.1.4 Recuperação de Polissacarídeos	10
2.1.5 Proteínas	12
2.2 Adsorção	17
2.2.1 Introdução	17
2.2.2 Influência da Temperatura	21
2.2.3 A Isoterma de Adsorção de Langmuir	22
2.2.4 O calor de Adsorção	27
2.2.5 Adsorção de Proteínas	28
2.2.6 Adsorção em Tanque Agitado	29
2.3. Cinética Enzimática	30
2.3.1 Introdução	30
2.3.2 Cinética Enzimática	32
2.4. Síntese de Dextrana	36
2.4.1 Introdução	36
2.4.2 Produção de Dextrana	38
2.4.3 Síntese da Enzima	42
2.4.4 Síntese de Dextrana in vitro	45
2.4.5 Ação da Dextrana-sacarase Sobre a Sacarose em Condições Industriais	49
2.4.6 Purificação Enzimática e Imobilização	52
2.5. Redes Neurais	54
2.5.1 Introdução	54
2.5.2 Unidades de Processamento	55
2.5.3 Conexão entre as Unidades	55
2.5.4 Ativação e Regras de Saída	56
2.5.5 Topologia	57
2.5.6 Treinamento da Rede	57
2.5.7 Modificação dos Padrões de Conectividade	58
2.5.8 Terminologia	58

2.5.9 Regra de Aprendizagem e Teorema de Convergência	59
2.5.10 Regra Delta	60
2.5.11 Backpropagation	61
2.5.12 Deficiências da Backpropagation	62

CAPÍTULO 3

MODELO MATEMÁTICO

63

3.1 Introdução	63
3.2 Modelagem do Reator Duplo Estágio	64
3.2 Modelagem do Reator Triplo Estágio	66
3.4 Resultados	69

CAPÍTULO 4

MODELAGEM CONSIDERANDO AS RESISTÊNCIAS À TRANSFERÊNCIA DE MASSA

92

4.1 Introdução	92
4.2 Desenvolvimento do Modelo de Adsorção	92
4.3 Modelagem do Sistema Duplo estágio Incluindo a Resistência à Transferência de Massa no Filme Líquido	97
4.4 Modelagem do Sistema Duplo estágio Incluindo a Resistência a Transferência de Massa no Filme Líquido e Difusão nos poros	99
4.5 Resultados	100

CAPÍTULO 5

MODELAGEM CONSIDERANDO O TAMPÃO DE DESSORÇÃO

105

5.1 Introdução	105
5.2 Modelagem Matemática para o Reator Triplo Estágio Considerando o balanço de NaCl	106
5.3 Resultados e Discussões	108

CAPÍTULO 6

MODELO HÍBRIDO COM REDES NEURAIIS

115

6.1 Introdução	115
6.2 Topologia da Rede	116
6.3 Modelagem Híbrida	117
6.4 Treinamento da Rede	118
6.5 Resultados e Discussões	119

CAPÍTULO 7

VERIFICAÇÃO DA APLICABILIDADE DO SISTEMA PARA PROCESSOS INDUSTRIAIS

123

7.1 Introdução	123
7.2 Simulações	125
7.3 Verificação da Aplicabilidade do Sistema para Processos Industriais	130
7.4 Estimativa Econômica	134

7.5 Considerações finais	137
CAPÍTULO 8	
CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS	138
8.1 Conclusão	138
8.2 Trabalhos Futuros	140
CAPÍTULO 9	
BIBLIOGRAFIA	142
APÊNDICE 1	
MODELAGEM SIMPLIFICADA	147
APÊNDICE 2	
RESOLUÇÃO DO MODELO DE ADSORÇÃO DE HORTSMANN E CHASE	151
APÊNDICE 3	
ADSORÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE EM DEAE-CELULOSE	155
APÊNDICE 4	
TREINAMENTO DA REDE	159
APÊNDICE 5	
CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO ESTACIONÁRIO	161

A, b, c = constantes empíricas

C_{subs} = concentração de substrato (g/l)

C_1 = concentração de enzima livre no estágio 1 (g/l)

C_2 = concentração de enzima livre no estágio 2 (g/l)

C_3 = concentração de enzima livre no estágio 3 (g/l)

C_b = concentração de enzima livre no seio da solução (g/l)

C_{bi} = concentração da enzima livre na superfície da resina (g/l)

C_{bi1} = concentração de enzima no primeiro ponto de colocação ortogonal (ponto mais próximo à parede) (g/l)

C_{bi2} = concentração de enzima no segundo ponto de colocação ortogonal (ponto mais próximo ao centro) (g/l)

$C_{\text{cofatores}}$ = concentração de cofatores (g/l)

C_i = concentração da enzima na fase líquida no interior dos poros

C_{inib} = concentração de inibidores (g/l)

C_o = concentração inicial de enzima no estágio de dessorção (g/l)

D = diâmetro da partícula (m)

D_{AB} = difusividade de A em B (m^2/s)

D_{ef} = difusividade efetiva (m^2/s)

E_1 = concentração salina no tanque 1 de dessorção (mol/l)

E_2 = concentração salina no tanque 2 (mol/l)

E_3 = concentração salina no tanque 3 (mol/l)

E_o = concentração salina na corrente de alimentação do estágio de dessorção (mol/l)

E_{o1} = concentração inicial de sal no estágio de dessorção (mol/l)

F_1 = vazão de alimentação do estágio 1 (l/h)

F_2 = vazão de alimentação de tampão no estágio 2 (l/h)

F_3 = vazão de alimentação de tampão no estágio 3 (l/h)

F_R = vazão de reciclo (l/h)

g = constante gravitacional (m/s^2)

k_1 = constante cinética no sentido da adsorção (l/g h)

k_2 = constante cinética no sentido de dessorção (h^{-1})

k_3 = constante cinética do processo de dessorção (h^{-1})

k_f = coeficiente de transferência de massa (m/s)

K_m = constante de Michaelis-Menten (g/l)

M_A = peso molecular da enzima (dáltons)

N_{Nu} = número de Nusselt

N_{Pr} = número de Prandtl

N_{Re} = número de Reynolds

N_{Vi} = viscosidade aparente/ viscosidade aparente à temperatura da parede

q_1 = concentração de enzima adsorvida no estágio 1 (g/l res)

q_2 = concentração de enzima adsorvida no estágio 2 (g/l res)

q_3 = concentração de enzima adsorvida no estágio 3 (g/l res)

q_i = concentração de enzima adsorvida (g/l res)

q_m = capacidade máxima de adsorção de enzima na resina (g/l res)

r = ponto interno de colocação em relação ao raio (m)

R = raio da partícula (m)

r_{reac} = taxa da reação enzimática (g/l h)

S_1 = concentração de substrato no estágio 1 (g/l)

S_2 = concentração de substrato no estágio 2 (g/l)

S_3 = concentração de substrato no estágio 3 (g/l)

S_0 = concentração inicial de substrato no estágio de dessorção (g/l)

t e r = variáveis temporal e espacial

T = temperatura ($^{\circ}$ C)

t = tempo (min)

TQ1 = tanque perfeitamente agitado onde ocorre a dessorção da enzima (estágio de dessorção)

TQ2 = tanque perfeitamente agitado onde ocorre a adsorção da enzima (estágio de adsorção)

TQ3 = tanque perfeitamente agitado onde ocorre a adsorção da enzima (estágio de adsorção)

V_1 = volume de líquido no estágio 1 (l)

V_2 = volume de líquido no estágio 2 (l)

V_3 = volume de líquido no estágio 3 (l)

x = ponto de colocação adimensional

Letras Gregas

ρ = densidade da solução (kg/m^3)

ε = fração líquida do sistema

μ = viscosidade da solução (kg/m s)

v = volume de sólidos utilizado para adsorver a enzima (l)

$\Delta\rho$ = diferença de densidade entre a partícula e a fase contínua (kg/m^3)

τ = tempo adimensional

τ = tortuosidade

ε_p = porosidade da partícula

RODRIGUES, Sueli. *Modelagem e Simulação de um Processo Inovativo para Síntese Enzimática de Dextrana: Verificação da aplicabilidade do sistema para processos industriais.*

A dextrana é polissacrídeo obtido a partir da sacarose, matéria prima barata e abundante no mercado Brasileiro. Sua aplicação depende fortemente de seu peso molecular, o qual pode variar de alguns milhares a milhões de daltons. A enzima utilizada para obtenção de dextrana é exógena e estável nas condições ótimas de síntese, o que torna a síntese enzimática viável. Entretanto a dextrana é tradicionalmente obtida por fermentação devido ao alto custo da enzima.

O objetivo deste trabalho é o estudo da viabilidade da utilização de um sistema contínuo para obtenção de dextrana através da síntese enzimática, em escala industrial. O sistema proposto é baseado no processo CARE onde ocorre adsorção e dessorção da enzima, sendo a mesma continuamente reciclada no processo e reutilizada. Essa prática permite o reaproveitamento da enzima e conseqüentemente a redução dos custos.

A adsorção e dessorção da enzima ocorre em tanques perfeitamente agitados, sendo que a reação enzimática ocorre com a enzima livre no estágio de dessorção. O processo CARE é constituído de dois tanques agitados e foi proposto para purificação de proteínas. A proteína é adsorvida no primeiro estágio, onde ocorre a separação dos produtos indesejados, sendo posteriormente dessorvida no segundo estágio e recuperada.

O sistema proposto neste trabalho é constituído de três tanques agitados, sendo dois deles destinados a adsorção da enzima e um deles a dessorção e reação enzimática. Com a modelagem do sistema foram realizadas diversas simulações. Os resultados obtidos com o sistema triplo estágio, proposto neste trabalho, foram comparados com os obtidos com a utilização de um modelo duplo estágio. Um modelo mais realístico que leva em conta as resistências à transferência de massa na modelagem do sistema duplo estágio também foi desenvolvido. Foi também considerada a presença do tampão de dessorção na modelagem do sistema.

Foi realizado um estudo da viabilidade da utilização de redes neurais para determinação da taxa de reação enzimática. Para isso foi realizada uma modelagem híbrida do sistema duplo estágio. O estudo da viabilidade da aplicação do sistema em processos industriais foi baseado em dados experimentais de rendimentos em escala industrial. Esse procedimento aproxima os resultados obtidos por simulação das condições reais de síntese.

A síntese enzimática é uma alternativa interessante, pois apresenta uma maior facilidade de controle do processo além de um maior rendimento. Os resultados obtidos levam a conclusão da viabilidade de aplicação do sistema proposto em escala industrial, tendo sido inclusive realizada uma estimativa do possível faturamento com a comercialização dos produtos.

PALAVRAS CHAVE: Modelagem, Simulação, Síntese Enzimática, Dextrana, Adsorção de Proteínas

RODRIGUES, Sueli. *Modelagem e Simulação de um Processo Inovativo para Síntese Enzimática de Dextrana: Verificação da aplicabilidade do sistema para processos industriais.*

Dextran is a polysaccharide obtained from sucrose, a common and cheap raw material in Brazil. Its application depends on its molecular weight, that presents a large range. There are dextrans of molecular weight from thousands to millions of daltons. The enzymatic synthesis of dextran is possible because the enzyme used to obtain dextran is stable under large conditions, although the tradition process for dextran production is the fermentative one.

The goal of this work is to study the viability of dextran enzymatic synthesis using a continuous system. The proposed system is based on the CARE process where the adsorption and desorption of the enzyme are carried out in stirred tanks and the enzyme is recycled. In this way, the enzyme can be recovered and the production costs are reduced.

The enzymatic reaction is carried out in the desorption tank with the desorbed enzyme. The CARE process was proposed protein purification. The system consists on two stirred tanks where the protein is adsorbed in the first tank and desorbed and recovered in the second tank.

In this work a system is proposed which consists on three stirred tanks. In two of them the enzyme is adsorbed and in the another one the enzyme is desorbed and the enzymatic reaction takes place. The results obtained throughout the simulations using the three tanks system, proposed in this work, was compared to the ones obtained with a two tanks. A more realistic model, that takes in account the mass transfer resistances related to enzyme was also developed. The buffers flow rates were also considered in the system modeling.

A hybrid model with neural networks was developed to predict the behavior of the two tanks system, in which the enzymatic reaction rate was obtained through neural network. Based on experimental yields obtained under industrial conditions, the viability of the proposed system was verified for industrial applications.

KEY WORDS: Modeling, Simulation, Enzymatic Synthesis, Dextran, Protein adsorption

A dextrana é um polissacarídeo de glicose, cuja utilização está altamente relacionada com seu peso molecular. Dextranas de alto peso molecular são empregadas na extração de petróleo; as de médio peso molecular na indústria alimentícia como espessantes e estabilizantes, enquanto que a dextrana de baixo peso molecular é utilizada na indústria farmacêutica, como matéria prima para medicamentos, tendo sido utilizada como expansor de plasma sanguíneo na segunda guerra mundial, sendo um produto potencial para a fabricação de sangue artificial. Embora seja um produto de grande aplicabilidade, a produção mundial de dextrana ainda é modesta, devido ao seu alto custo. No caso da dextrana clínica, seu custo é ainda mais elevado, pois a mesma é obtida através da hidrólise de dextrana de alto peso molecular. A dextrana consumida no Brasil é totalmente importada. A carência em tecnologia para fabricação de bioprodutos é um problema que não se restringe somente ao Brasil, mas à América Latina como um todo.

A dextrana é obtida a partir da sacarose, matéria prima abundante e de baixo custo no Brasil. A enzima utilizada na síntese de dextrana é estável nas condições ótimas do processo, o que viabiliza a obtenção de dextrana via reação enzimática.

Este trabalho visa a modelagem e simulação de um processo inovativo para síntese enzimática de dextrana. O modelo do reator é baseado no processo CARE, proposto inicialmente por Pungor et al. (1987) para a purificação de proteínas. O sistema CARE é constituído de dois tanques agitados contendo em seu interior uma resina adsorvedora. No primeiro estágio a proteína é adsorvida, sendo separada dos produtos indesejados. No segundo estágio, ocorre a recuperação da enzima no sistema já purificada através da dessorção da mesma.

O processo CARE têm sido bastante estudado ultimamente. Rodrigues et al. (1992) modelaram e simularam o processo para purificação de proteínas. Uma modificação do processo original para síntese enzimática de dextrana com reciclo de enzima, foi proposto por Souza (1993), entretanto o sistema apresentou baixa produtividade e alta perda enzimática. Com a finalidade de elevar a retenção enzimática e aumentar a produtividade,

este trabalho propõe uma configuração alternativa ao sistema CARE modificado proposto por Souza (1993). O sistema proposto é constituído de três tanques agitados onde em dois deles, a enzima é adsorvida usando um tampão apropriado e no outro, ocorre a dessorção da enzima e a reação enzimática, conforme figura a seguir:

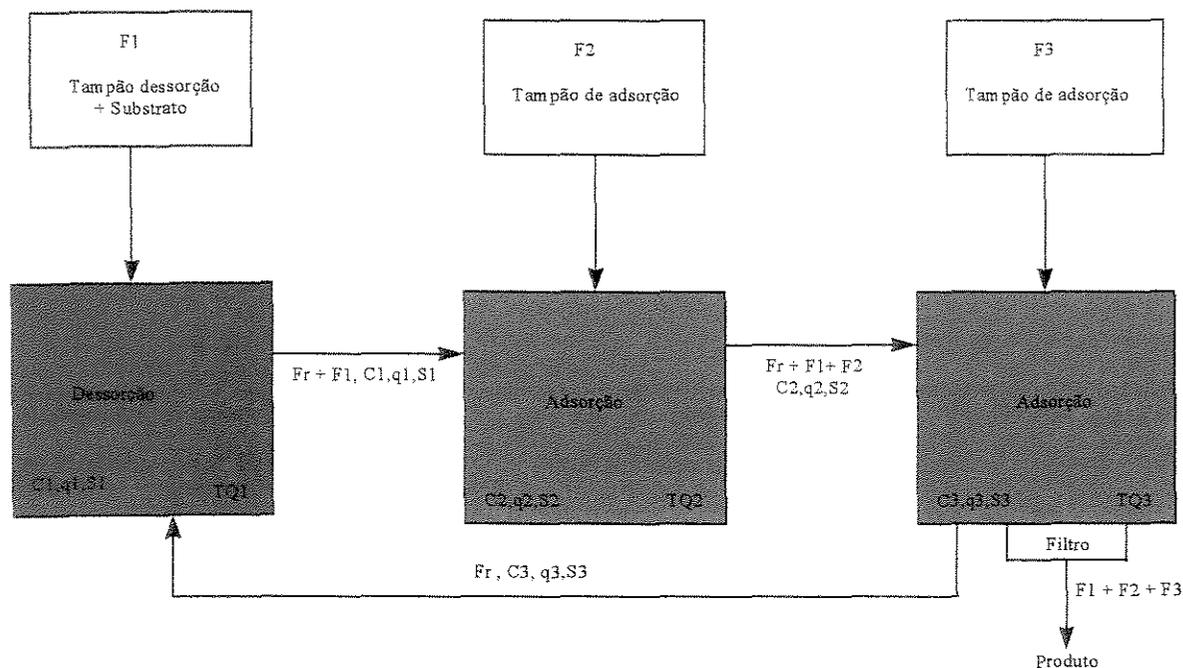


Figura 1 - Reator triplo estágio para produção de dextrana.

Como no processo CARE original, os tanques são considerados reator tanque agitado de mistura perfeita. Na modelagem, vários parâmetros, tais como parâmetros cinéticos e operacionais, são levados em consideração. A síntese enzimática de dextrana é viável devido ao fato da enzima utilizada (dextrana-sacarase) ser exógena e apresentar alta estabilidade nas condições ótimas de síntese.

A modelagem inicial proposta para síntese de dextrana utilizando um reator duplo estágio, proposta por Souza (1993), não leva em consideração as limitação à transferência de massa e a difusão no interior da resina adsorvente. Entretanto estudos conduzidos por (Hortsmann e Chase, 1989), evidenciam a influência destas resistências à transferência de massa na cinética de adsorção. O desenvolvimento de métodos matemáticos para resolução de equações diferenciais parciais, tais como colocação ortogonal (Yao e Tien, 1992), permitem a inclusão destes fenômenos no modelo original.

Curralero et al. (1998), ainda estudando o processo de síntese enzimática de dextrana, utilizando o sistema proposto por Souza (1993), determinaram experimentalmente a influência do tampão de dessorção no comportamento dos sistema. Segundo os autores, o fator limitante para a otimização do processo proposto é o tempo de residência no estágio de adsorção, o qual não pode ser elevado sem perda de produtividade. Sendo assim no presente trabalho, é adicionado um estágio intermediário de adsorção no modelo original. A inclusão desse estágio visa minimizar a perda enzimática, constatada por Souza (1993), sem que haja uma queda significativa na produtividade, conforme reportado em Curralero et al. (1998).

A utilização de redes neurais em Engenharia Química vem se destacando ultimamente. Uma rede neural é nada mais que um algoritmo matemático baseado na estrutura neurológica humana, e por isso é conhecida como uma técnica de inteligência artificial. A rede tem a capacidade de, mediante treinamento adequado, encontrar valores próximos àqueles utilizados para seu treinamento. Dessa forma, foi desenvolvido um modelo híbrido, onde é utilizada uma rede neural para predição da taxa de reação enzimática no estágio de dessorção. A rede utilizada tem caráter genérico, podendo ser utilizada para outros processos mediante treinamento adequado.

A viabilidade da utilização do processo proposto em escala industrial, é determinada através de simulações com o modelo do sistema. Não somente a rede neural tem caráter genérico mas também o tem, o modelo determinístico, que poderá ser utilizado para simulações de outras sínteses enzimáticas com base no processo CARE.

2.1- Alguns Conceitos Biotecnológicos

2.1.1 - Biopolímeros Extracelulares

Biopolímeros extracelulares têm encontrado grande aplicação em diversas áreas tais como indústria alimentícia, onde são utilizados como estabilizantes, espessantes e emulsificantes, e na indústria farmacêutica, onde são utilizados como veículos para drogas e agentes complexantes para produção de medicamentos. Gomas xantânicas e dextranas, são polissacarídeos extracelulares, solúveis em água e bastante conhecidos, sendo também de grande interesse comercial. Polissacarídeos são polímeros de carboidratos, cujas unidades são ligadas entre si pelo grupo hemiacetal hidroxil do C_1 da molécula de carboidrato, segundo reação genérica a seguir:



Onde:

G = unidade de carboidrato

X = produto não polimérico (pirofosfato ou oligossacarídeo)

Enzima = transglicosidase

Os polissacarídeos podem ser classificados em:

- extra-celulares

- intracelular
- componente estrutural da célula

Quanto a natureza química, os mesmos podem ser classificados em:

homopolissacarídeo: contém apenas um tipo de açúcar (único monômero)

heteropolissacarídeo: contém mais de um tipo de açúcar (mais de um monômero)

Exopolissacarídeos são polissacarídeos que podem ser sintetizados fora da célula. A maioria é ainda pouco conhecida, sendo a estrutura e propriedades físicas de muitos ainda desconhecidas. Vale ressaltar também que a maioria dos polissacarídeos são sintetizados no interior da célula, sendo que a maioria dos exopolissacarídeos são um metabólito secundário obtido quando o microorganismo se encontra em um meio com excesso de sua fonte de carbono. A atividade metabólica está relacionada com a taxa de crescimento e meio de cultura, sendo temperatura, pH e concentração de substrato e nutrientes fatores importantes. A dextrana é um dos poucos polissacarídeos exocelulares que pode ser obtido via síntese enzimática sem alteração de suas características.

Vários microorganismos podem sintetizar polissacarídeos, dentre eles podemos citar bactérias, fungos e algas.

2.1.2 - Características reológicas de soluções de polissacarídeos

Existe poucas informações sobre as características reológicas das soluções de polissacarídeos. Sabe-se que as mesmas afetam a transferência de massa, homogeneidade da mistura, potência de agitação requerida, separação e recuperação do produto final, além do *scale-up* do processo. De uma forma geral, os meios de cultura para a produção de polissacarídeos apresentam baixa viscosidade no início, sendo a mesma elevada gradativamente durante a fermentação, atingido seu valor máximo no final do processo. Em fermentações prolongadas, pode ocorrer decréscimo da viscosidade devido a autólise (degradação parcial pela enzima). Estes meios são caracterizados, em sua maioria, como

fluidos Newtonianos no início, passando para não-Newtonianos, com comportamento pseudo-plástico ($n < 1$) e seguem a lei da potência a medida que o peso molecular é elevado e, no caso da ocorrência de autólise, o comportamento apresentado no final da fermentação é Newtoniano (Velijokovic e Lazié,1988). Uma solução de polissacarídeo apresenta viscosidade com ordem de grandeza de 2 a 4 vezes maior que a da água. Os principais fatores que determinam as características reológicas do meio de cultura são morfologia e concentração da biomassa, produção de material extracelular pelo microorganismo sendo utilizado, e no caso da dextrana, deve-se levar em consideração a concentração, estrutura, peso molecular e distribuição do peso molecular do produto (Velijokov e Lazié,1988).

A viscosidade do meio depende, dentre outros fatores, da concentração de células, sendo esta um parâmetro que pode ser utilizado para controlar o crescimento celular em sistemas onde os demais efeitos são pequenos. No caso de fungos, seus micélios contribuem bastante para o aumento da viscosidade do meio. Outro fator que pode alterar a viscosidade do meio de cultura é a adição de sais, tais como KCl e borax, além do pH. Algumas culturas, tais como cultura para produção de xantana, podem apresentar comportamento tixotrópico devido a presença de forças viscoelásticas.

O conhecimento das propriedades reológicas do meio tem importância no projeto de reatores no tocante a potência de agitação requerida, bem como obtenção de mistura homogênea. Vale também lembrar que a presença de célula no meio de cultura trata-se de um fator limitante para agitação. Encontrar uma boa relação mistura homogênea/ agitação é tarefa árdua já que grandes densidades de potência podem levar o rompimento das células e inutilização do meio de cultura.

A escassez de informações sobre o comportamento reológico de soluções de polissacarídeos pode ser atribuída à dificuldade de medição das características reológicas dos meios de cultura. Uma forma bastante utilizada para realização de tais medidas é através do relacionamento entre o torque da turbina e velocidade rotacional. Devido às próprias características do meio, a utilização de viscosímetros convencionais, tais como viscosímetro de cilindros concêntricos, se torna impraticável, pois ocorre perda da homogeneidade, devido à decantação das células, separação centrífuga devido à rotação do cilindro e distorção das células ao passar pelo orifício.

2.1.3 - Projeto de reatores microbiológicos

A maioria dos bioprodutos são atualmente produzidos via fermentação, sendo a síntese enzimática limitada principalmente devido às características do produto de interesse, dentre outros fatores, tais como: custo de produção e rendimento. O projeto de biorreatores é voltado para uma máxima produtividade com menor custo operacional possível. No caso de reações aeróbicas, a taxa de transferência e difusão de oxigênio é um fator bastante importante, sendo a mesma praticamente constante em soluções de baixo peso molecular. Em se tratando de um meio de cultura, a remoção de calor também tem um papel essencial. Estes dois fatores são entretanto, fortemente influenciados pela agitação e propriedades do meio (reologia). Embora não haja uma grande quantidade de material publicado referente às características reológicas de soluções de polissacarídeos, muitas informações a respeito de fluidos não-Newtonianos podem ser aproveitadas, segundo Margaritis e Zajic (1978). Os principais tipos de agitação utilizados em bioreatores são: mecânica, aeração, agitação a ar e filme líquido

Cálculos de *scale-up* reportados em Margaritis e Zajic (1978), assumindo o mecanismo de transporte de massa como sendo de movimentação da massa reagente, conduziram a diversos erros, pois a hipótese de mistura perfeita não é válida para meios de cultura de alta viscosidade contendo células. Sendo assim, o *scale-up* deve ser realizado levando-se em consideração a hipótese de similaridade dinâmica, mantendo-se o número de Reynolds e a razão entre as dimensões do agitador e do fermentador constantes. Estudos realizados em diferentes sistemas resultaram em padrões de mistura em vasos de diferentes tamanhos, a seguir:

$Re > 1,5$: o movimento *bulk* constitui o mecanismo de transferência de massa predominante

$Re < 1,5$: a mistura é controlada pela difusão e o número de Schmidt deve ser levado em consideração nos cálculos.

Irving e Saxton (1967), citado em Margaritis e Zajic (1978), efetuaram uma revisão bibliográfica a respeito de tanques de mistura perfeita e apontaram as seguintes características para sistemas de alta viscosidade:

- a densidade de potência deve ser alta
- a separação entre as paredes do vaso e o agitador deve ser pequena, pois quanto maior a viscosidade, menor é o volume de fluido deslocado a cada rotação do agitador, sendo esta mantida constante.

O tamanho do agitador tem uma forte influência na agitação obtida. Sabe-se que a uma dada velocidade de agitação, quanto maior for o agitador melhor será a mistura e no caso de tanques aerados, melhor será a distribuição de oxigênio. Agitadores pequenos causam turbulência localizada. No caso de reatores aerados, uma alta densidade de potência é necessária tanto para líquidos de baixa viscosidade como para líquidos de alta viscosidade. No primeiro caso, as bolhas de O_2 coalescem sendo necessária uma alta densidade de potência para manter as bolhas pequenas, no segundo caso uma alta taxa de cisalhamento é necessária para promover a formação de pequenas bolhas.

Steel e Maxon (1962), citado em Margaritis e Zajic (1978), propuseram um agitador múltiplo de polias, o qual é utilizado industrialmente embora não existam muitos dados sobre o mesmo. Apesar de várias características serem conhecidas, determinar o consumo ideal de potência para fluidos não-Newtonianos é difícil já que a viscosidade aparente muda com a velocidade de agitação. Margaritis e Zajic (1978) propuseram um método que correlaciona o consumo de potência de fluidos não-Newtonianos com o de fluidos Newtonianos através do número de potência e do número de Reynolds. A descrição do método pode ser encontrada em Margaritis e Zajic (1978).

Quanto ao consumo de energia, a força inferida ao sistema influi na transferência de calor e massa, bem como na homogeneidade do líquido. O aumento da pseudo plasticidade do meio pode resultar em um decréscimo do coeficiente de transferência de massa, devido ao decréscimo do coeficiente de arraste e do número de Sherwood. Culturas com baixa agitação, a qual pode ser obtida através de aeração, seguem o regime de Taylor. Neste caso, o tamanho e distribuição das bolhas são governados pelo balanço entre a turbulência do

líquido, forças interfaciais e forças de coalescência das bolhas. As principais consequências do aumento da viscosidade do meio são:

- diminuição do número de Reynolds
- aumento da taxa de coalescência
- decréscimo da área interfacial gás e líquido

Outro fator importante no projeto de bioreatores é a transferência de calor. No caso de vasos agitados, a viscosidade aparente é calculada em função da velocidade do *impeller* e da tensão de cisalhamento média. Já no caso de vasos aerados, utiliza-se o número de Reynolds modificado. Este dado é importante para o cálculo da taxa de transferência de calor. Para vasos não aerados, mecanicamente agitados, contendo fluidos não-Newtonianos as correlações propostas para a predição do coeficiente de transferência de calor apresentam a seguinte forma típica:

$$N_{NU} = AN_{Re}^a N_{Pr}^b N_{\mu}^c$$

No caso da síntese *in vitro* (síntese na ausência de microorganismo), a viscosidade não é um dos maiores problemas. A ausência de células, e consequentemente de produtos metabólicos, além de um melhor controle do processo, influenciam na viscosidade do meio. No caso de reatores do tipo tanque agitado, contendo sólidos em suspensão e etapas de adsorção/dessorção, a otimização e *scale-up* de tais processos requer que as características de transferência de massa e o equilíbrio sejam completamente compreendidos. A análise da adsorção é complicada em tais sistemas porque o equilíbrio é descrito por uma isoterma não-linear e as matrizes usadas na fabricação de adsorventes altamente seletivos são frequentemente materiais porosos. Araújo (1996), utilizou um modelo considerando que a adsorção de uma proteína da solução *bulk* na interface do adsorvente envolve um número de passos discretos. Esses passos, todos contribuindo com uma resistência à transferência de massa, incluem transferência do seio do líquido para a superfície externa da partícula (resistência à difusão na película de filme líquido), movimento por difusão nos poros da partícula (difusão nos poros ou resistência à difusão nas partículas) e a interação química

efetiva nos sítios de ligação (resistência à reação na superfície). Modelos matemáticos de adsorção bioespecífica em tanques agitados que incluem as contribuições de todos esses termos têm sido recentemente apresentados em outros trabalhos. Tais modelos apresentam necessariamente um número de parâmetros descrevendo as resistências à transferência de massa, o que pode dificultar suas aplicações na análise da adsorção.

É possível simplificar a solução matemática assumindo-se, quando possível, que uma das resistências para transferência de massa é dominante podendo as demais serem desprezadas. Dados experimentais sobre sistemas de adsorção de proteínas são raros, mas indicam que a resistência dominante varia com o sistema de adsorção em questão. O trabalho de Araújo (1996) inclui o desenvolvimento de um modelo que descreve a adsorção de proteínas para adsorventes porosos em tanques agitados.

Deve-se ter em mente que a difusão ocorre devido ao movimento *browniano* das partículas em solução, o qual ocorre devido ao movimento irregular das partículas suspensas na dispersão pelas moléculas do líquido. Observa-se que quanto menor a partícula, mais rápido é o seu movimento.

2.1.4 - Recuperação de polissacarídeos:

Após a produção, o polissacarídeo deve ser isolado e purificado. Este procedimento é realizado com base em processos de extração de produtos naturais. Como a seguir:

- extração ácida
- extração básica
- centrifugação
- ultrafiltração
- precipitação
- secagem
- eletrólise

- precipitação alcoólica

Outras etapas extras podem estar envolvidas no processo tais como:

- remoção das células
- destruição da enzima
- modificação química ou enzimática do polímero

Uma das técnicas de isolamento mais utilizada é a precipitação do produto de interesse, a qual é geralmente obtida utilizando-se solventes orgânicos de alta volatilidade, sendo fatores determinantes na escolha dos mesmos, a toxicidade e a facilidade de purificação do produto após a precipitação, fator que engloba, dentre outros, o custo do solvente e de sua recuperação. Outro tipo de precipitação é a obtida por alteração do pH. Vale ressaltar que o tipo de precipitação e as condições mecânicas da mesma podem afetar a natureza do precipitado e que em alguns casos, a adição de íons metálicos pode colaborar no processo. Dentre os solventes normalmente utilizados estão metanol, etanol, acetona e isopropanol. A proporção de solvente utilizado depende do produto a ser precipitado. A remoção das células normalmente é obtida por centrifugação e pode ser realizada antes ou após a precipitação.

A secagem dos polissacarídeos pode ser realizada em secadores batelada ou contínuos, podendo ser realizada sob vácuo, com a utilização de ar forçado ou até mesmo gás inerte impregnado com solvente quando se fizer necessária. Durante a operação, as seguintes características devem ser observadas:

- alteração da cor
- degradação do produto
- solubilização do produto

Estas características podem indicar algo de errado acontecendo no processo, devendo este ser alterado. Sabe-se que a secagem rápida do biopolímero pode causar endurecimento do mesmo, fazendo-se necessária uma etapa posterior de moagem, na qual o calor promovido pelo atrito entre as peças do moinho e o produto pode causar escurecimento e degradação do produto. Quanto a armazenagem do produto final, sabe-se que polissacarídeos são produtos altamente higroscópicos, o que pode acelerar a degradação dos mesmos durante a estocagem.

Além das etapas ordinárias já citadas, em alguns casos etapas adicionais visando a melhoria ou modificação do produto final podem ser necessárias. Dentre os diversos procedimentos existentes temos a remoção de material insolúvel, que visa a melhoria da estética tornando o produto mais atrativo, além de em alguns casos melhorar sua manipulação e a remoção de enzima e/ou células residuais, cuja presença pode levar a degradação do polímero durante a estocagem. As principais técnicas utilizadas nestas etapas adicionais são diluição seguida de filtração, centrifugação ou floculação, e no caso da remoção de células pode-se realizar a digestão alcalina das mesmas.

2.1.5 - Proteínas:

As proteínas são moléculas orgânicas constituídas a partir de aminoácidos. Podem ser constituídas apenas de aminoácidos bem como possuir outros grupos em suas cadeias, tais como fosfolípidios e carboidratos. As proteínas são classificadas de acordo com suas funções biológicas. Dentre os diversos grupos de proteínas estão as enzimas, que nada mais são que catalisadores biológicos, que fazem parte tanto de reações bioquímicas em organismos vivos, como podem ser utilizadas para a síntese *in vitro* de produtos biotecnológicos. Quanto a sua estrutura, enzimas são constituídas de proteínas, que são compostos heteropoliméricos constituídos geralmente por no mínimo 20 aminoácidos. Para que seja considerado proteína, um polímero de aminoácidos deve atingir um peso molecular mínimo arbitrário de 6.000 e ter um limite superior de 1.000.000 daltons (1 dalton = 1 unidade de massa atômica = $1,66 \times 10^{-24}$ g), sendo que todo aminoácido proteico é oticamente ativo.

Os aminoácidos são entidades químicas de baixo peso molecular (75 - 204 daltons) que possuem pelo menos um grupamento amina e outro carboxila, são todos anfólitos, isto é, íons de função iônica dupla e oposta. Uma manifestação dessa característica é o comportamento das proteínas em solução, o qual pode ser tanto como cátions quanto como ânions, sendo assim capazes de migrar tanto para um eletrodo negativo (cátodo) quanto para um eletrodo positivo (ânodo), dependendo do pH da solução. Esta propriedade é também utilizada em uma técnica de separação denominada eletroforese. Há ainda um valor de pH (ponto isoelétrico) no qual não haverá migração, devido a igualdade entre as cargas negativas e positivas existentes na solução.

Cada aminoácido é distinguido pela cadeia lateral característica que pode ser não polar (hidrofóbica), polar carregada (hidrofílica) ou polar descarregada. As ligações estabelecidas entre os aminoácidos são ligações amídicas covalentes, também chamadas peptídicas neste caso particular, pois os peptídeos são resultantes da condensação de dois ou mais aminoácidos através do sistema α -aminocarboxila. Um polipeptídeo pode ser chamado especificamente de di-, tri-, tetra-, ... n -peptídeo onde n é o número de aminoácidos (também chamados de resíduos) e $n-1$ o número de ligações peptídicas. Desde que os peptídeos são normalmente heteropolímeros abertos, cada um terá um grupamento α -amina e um α -carboxila livres.

As proteínas são formadas a partir da ligação entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro, com a liberação de uma molécula de água. Este tipo de ligação é denominado ligação peptídica, a qual é esquematizada a seguir:

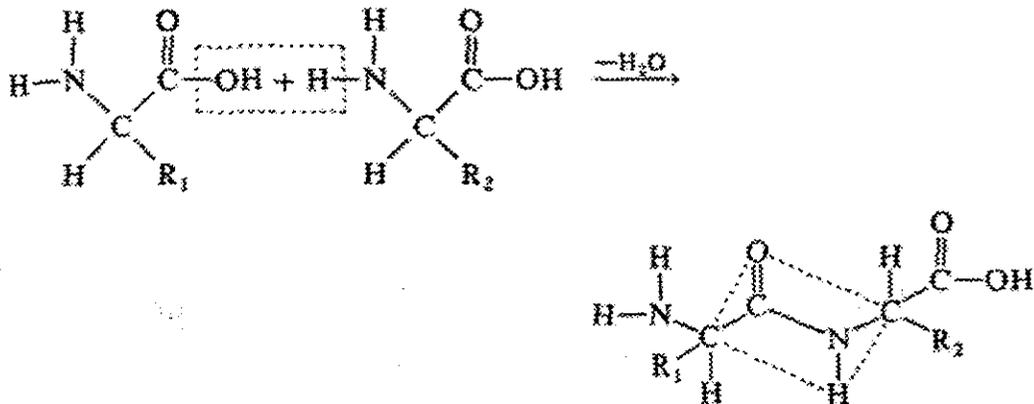


Figura 2.1 - Esquema de uma ligação peptídica.

Em sistemas biológicos, as proteínas apresentam os seguintes tipos de interação:

Ligação covalente: ocorre entre os átomos de hidrogênio, oxigênio, carbono, fósforo e enxofre.

Ligações eletrostáticas: grupos - COO⁻; NH³⁺

Pontes de hidrogênio: ocorre entre átomos fortemente eletronegativos (oxigênio e enxofre) e o hidrogênio ligado a outro átomo eletronegativo

Interações dipolo-dipolo: ocorre entre as cadeias laterais, geralmente no interior das estruturas entre resíduos hidrofóbicos próximos

Interações de Van der Waals: ocorre entre todos os átomos e é resultado da distribuição assimétrica de elétrons nos átomos

Interações hidrofóbicas: são resultantes da associação de cadeias de hidrocarbonetos em meio aquoso

As propriedades físico-químicas e químicas das proteínas começam com as propriedades da ligação peptídica. As proteínas são estruturadas em diversos níveis. Sendo o mais baixo denominado estrutura primária, a qual é caracterizada pela sequência específica dos aminoácidos que compõem um determinado polipeptídeo. Sendo assim, o simples conhecimento de quais e quantos aminoácidos integram um polipeptídeo, não é informação suficiente para definir sua estrutura primária; é necessário ainda conhecer a ordem na qual eles estão ligados covalentemente através das ligações peptídicas. A estrutura primária é a mais estável de uma proteína. Temos ainda a estrutura secundária, caracterizada pelo modo em que as cadeias se dispõem espacialmente, o qual pode formar hélices, folhas ou esferóides compactos, com ligações de hidrogênio unindo cadeias diferentes a diferentes partes da mesma cadeia. O que determina o tipo de estrutura secundária a ser assumida por um polipeptídeo é sua própria estrutura primária, isto é, o tipo, o número e a distribuição dos aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica.

A estrutura terciária das proteínas provém do enrolamento da cadeia polipeptídica no espaço, o qual pode ser em torno de si mesma ou com outras cadeias semelhantes. Com isso a proteína ganha estabilidade e reduz o volume ocupado no espaço. Dessa nova

conformação adquirida resultam as proteínas de forma esférica, chamadas globulares, e as de forma cilíndrica, chamadas fibrosas. A estrutura terciária é predeterminada por uma série de ligações e interações, tais como pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações de Van der Waals e interações eletrostáticas.

A conformação tridimensional adotada por uma macromolécula em solução obedece tanto aos tipos de interação e ligações permissíveis entre seus diversos grupos, quanto ao efeito que o solvente exerce sobre a proteína. Os resíduos, tanto os polares quanto os apolares, os quais em última instância ficam orientados em direção à superfície da estrutura terciária, têm ainda a possibilidade de estabelecer posteriores interações de caráter permanente ou transitório com outras proteínas. Essas novas interações dão origem à estrutura quaternária, ou seja, a formação de dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc, que possuem especial importância no funcionamento de enzimas e proteínas transportadoras. A natureza dessas interações é exatamente a mesma das que determinam a estrutura terciária.

A compreensão da estrutura das proteínas é de extrema importância, visto que a mesma determina suas características físico-químicas e, portanto, suas propriedades funcionais. Denominam-se propriedades funcionais quaisquer funções que uma classe de compostos possa desempenhar numa determinada aplicação tecnológica. Assim, as proteínas podem ser usadas como emulsificantes, espessantes, espumantes, geleificantes, etc. As proteínas funcionam também no metabolismo, na estocagem, no transporte, na mobilidade, e na defesa de seres humanos e animais. As diferenças nas propriedades físicas, químicas e funcionais das proteínas provêm a base para sua separação bem como para sua classificação.

As proteínas são altamente sensíveis a mudanças no meio. Desvios de condições fisiológicas, ou do meio reacional, quando se fala em síntese *in vitro*, podem afetar a conformação da proteína e causar sua desnaturação. Os principais fatores que podem alterar a atividade de uma proteína são: pH, temperatura, força iônica, solventes orgânicos, adsorção, dentre outros.

A desnaturação é um processo gradativo, que ocorre em vários estágios separados por barreiras, dando-se primeiro as alterações físico-químicas e depois as químicas. Devido a associação íntima entre a proteína e seu solvente ou, genericamente falando, entre a

macromolécula e seu microambiente, não é possível restringir a ocorrência da desnaturação à estrutura terciária unicamente.

Considerando-se que a estrutura terciária de uma proteína é o resultado de um número relativamente grande de interações físico-químicas e, em alguns casos, de ligações químicas, não seria possível definir de uma forma sintética e precisa qualquer alteração na estrutura superior da macromolécula. Devido a este fato, emprega-se o termo desnaturação para denotar qualquer alteração, ou alterações, nas estruturas quaternária, terciária ou secundária das macromoléculas. A desnaturação pode ser causada por meios mecânicos, físico-químicos e químicos.

De forma geral, mecanicamente podem-se imprimir alterações na estrutura quaternária e até na estrutura terciária, mas raramente atinge-se a estrutura secundária. A proteína constituinte do fio de cabelo sofre desnaturação quando este é esticado. A desnaturação da clara do ovo (albumina) é efetuada simplesmente pela agitação com um garfo ou batedeira. As desnaturações mecânicas são na maioria das vezes irreversíveis.

Meios físico-químicos de desnaturação são aqueles nos quais as ligações físico-químicas são perturbadas. Isso causa comprometimento das estruturas quaternária, terciária e até secundária das proteínas. Este tipo de desnaturação pode ocorrer devido aos seguintes fatores: calor, o tipo de solvente utilizado e pH fora do normal, sendo a desnaturação por calor mais acentuada quanto maior o peso molecular da proteína. Além dos processos de desnaturação por adição de calor, a subtração de calor até o congelamento também costuma desnaturar irreversivelmente algumas proteínas.

Mudanças de solvente, de força iônica e o acréscimo de substâncias que quebram as pontes de hidrogênio estruturais ou as interações de Van der Waals causam desnaturação tanto reversível quanto irreversível, dependendo do tipo de proteína e da severidade do tratamento.

Alterações do pH do meio, desde que não sejam extremas em torno do pH natural, causam desnaturação reversível nas estruturas terciárias da maioria das proteínas. Para melhor entender a precipitação e a desnaturação ocasionadas pelas mudanças no pH, é conveniente que se tenha antes uma visão global da solubilidade das proteínas em meio aquoso em função do pH. O fenômeno da solubilidade de uma proteína deve ser visualizado como a capacidade de um número substancial de grupos polares localizados na

superfície da mesma se solvatar na água através de pontes de hidrogênio. O número de grupos polares inevitavelmente dependerá das estruturas primária, secundária, etc que em última instância, determinarão também a densidade e a forma da macromolécula. A capacidade de solvatação, porém, dependerá do pH e da força iônica do solvente.

A desnaturação ocasionada por meios químicos envolve quebra ou formação de ligações covalentes e é geralmente irreversível. A irreversibilidade não significa necessariamente a deterioração das propriedades funcionais da proteína e sim apenas sua modificação. A adsorção de proteínas em superfícies pode também afetar a atividade da proteína. As proteínas adsorvem em praticamente todas as superfícies, incluindo metais, plásticos e especialmente vidro. O próximo item aborda o processo de adsorção de forma mais detalhada.

2.2- Adsorção

2.2.1 - Introdução

A habilidade de sólidos porosos adsorverem reversivelmente grandes volumes de vapor foi reconhecida no século 18, mas a aplicação prática desta propriedade em processos industriais de separação e purificação é relativamente recente. O exemplo mais comum de tal processo é o uso de uma coluna adsorvente empacotada com um adsorvente hidrofílico para a remoção da umidade de fluxos de gás ou de líquidos. Tais processos são convenientemente classificados como processos de purificação uma vez que os componentes que são adsorvidos estão presentes em baixas concentrações, têm pouco ou nenhum valor econômico, e frequentemente não são recuperados. Atualmente muitos processos que fazem uso da adsorção visam a recuperação do adsorbato e até mesmo a separação e transporte do mesmo para outro meio, onde este é então dessorvido. Esta última aplicação é a base do projeto do sistema contínuo duplo estágio (processo CARE) proposto por Pungor et al. (1987). Os primeiros processos de adsorção usavam carvão ativado ou sílica gel como adsorvente, entretanto o potencial de adsorção de processos industriais tem

sido aumentado pelo desenvolvimento de peneiras moleculares adsorventes, especialmente as zeólitas sintéticas.

A adsorção é um fenômeno no qual certos componentes de uma fase gasosa ou líquida são seletivamente transferidos para a superfície de um sólido. Pode ser compreendida como a concentração preferencial de uma determinada espécie na interface de duas fases. O sólido é então denominado adsorvente e os componentes adsorvidos, adsorbato. Termodinamicamente, a adsorção pode ser vista como um caso em que o adsorbato apresenta uma menor energia livre de Gibbs na superfície do adsorvente do que na solução. Enquanto está buscando atingir o equilíbrio, o adsorbato desloca-se para a superfície do adsorvente de forma a atingir um estado de energia menor (de acordo com a 2ª lei da termodinâmica). Ao se discutir os fundamentos da adsorção é útil distinguir entre adsorção física, envolvendo forças de interações moleculares fracas, e quimiossorção, a qual envolve essencialmente a formação de uma ligação química entre o adsorbato e a superfície do adsorvente. Desta forma, o fenômeno de adsorção envolvendo superfícies sólidas pode ser classificado em duas categorias principais:

Adsorção física: é originária de forças intermoleculares, envolvendo, portanto, dipolos permanentes, dipolos induzidos e interações quádruplas entre o adsorvente e a espécie química a ser adsorvida (o adsorbato); há também forças de atração e repulsão eletrostáticas, a quais podem envolver forças de Van der Waals ou outras forças de valência de caráter secundário.

Adsorção química (quimiossorção): envolve a interação química, com transferência simultânea de elétrons, entre o adsorvente e o adsorbato; desta forma, as espécies adsorvidas estão ligadas à superfície através de forças de valência, que são as mesmas responsáveis por ligar os átomos em uma molécula. Na adsorção de eletrólitos, o mecanismo importante é a atração eletrostática, a qual é muito dependente do pH e da força iônica; portanto, a adsorção de ácidos e bases em adsorventes não polares (carvão ativado) pode depender fortemente do pH.

A classificação do processo em adsorção química ou física depende da variação de entalpia de adsorção (ou calor de adsorção). Adsorção física tem variação de entalpia bem menor que o fenômeno de adsorção química (a variação de entalpia para adsorção física é da ordem do calor de liquefação do adsorbato, enquanto que na adsorção química ela é significativamente maior). Esta variação de entalpia é determinada experimentalmente. Outro critério para a classificação do processo é a taxa de dessorção. Para adsorção física, a dessorção é rápida (o processo de adsorção é altamente reversível), enquanto que para a adsorção química isso geralmente não ocorre, sendo, na maioria das vezes, a dessorção uma outra reação química, podendo inclusive em alguns casos não ocorrer dessorção sem degeneração do adsorvente. A adsorção química pode ser ativada (apresenta energia de ativação finita) ou não (apresenta energia de ativação próxima de zero).

Processos de adsorção têm a capacidade de promover separações que, para as quais a utilização de outras técnicas de separação tais como: destilação, absorção e sistemas à base de membranas, dentre outras, seriam inviáveis. Sua importância tem aumentado nos processos de aplicação ambiental e na área bioquímica, estimulando avanços nas técnicas utilizadas e em pesquisa de novos materiais. A seleção do adsorvente é de grande importância para a eficiência do processo. O desenvolvimento de novos adsorventes, vem ao encontro da crescente necessidade de implantação e otimização de processos que se utilizam desta técnica. As principais características de um adsorvente são:

Capacidade: é a quantidade de adsorbato que é adsorvido por unidade de massa ou volume de adsorvente. Esta é geralmente a característica mais importante e afeta fortemente os custos, pois a quantidade de adsorvente requerido e a quantidade de adsorbato retido estão diretamente relacionadas a sua capacidade. Para um dado adsorvente, a capacidade depende da concentração da fase fluida, temperatura e condição inicial do adsorvente, além da área disponível e características de afinidade. Os dados de capacidade de adsorção são determinados a temperaturas fixas, através da construção de gráficos conhecidos como isotermas. Uma isoterma é o gráfico que mostra a capacidade de um adsorvente em função da concentração de adsorbato no meio, para uma dada temperatura. A capacidade também pode ser expressa por índices tais como área superficial e porosidade dentre outros.

Seletividade: é a razão entre a capacidade de um adsorvente para um dado componente e sua capacidade por outro, em uma dada concentração no fluido. Esta razão geralmente se aproxima de um valor constante quando a variação de concentração tende a zero. Seletividade em adsorção é algo semelhante à volatilidade relativa em destilação: quanto menor o valor, maior o equipamento requerido, ou seja, maior a quantidade de adsorvente necessária. Uma situação ideal é encontrada quando um dos componentes, de uma alimentação de dois componentes, não é muito adsorvido, o que indica boa seletividade.

Regenerabilidade: é essencial para processos cíclicos, onde o adsorvente precisa operar em ciclos sequenciais com performance uniforme. Isto significa que cada componente do adsorbato deve ser adsorvido de forma relativamente fraca, ou seja, ter mais afinidade física do que química. O calor de adsorção provém da quantidade de energia requerida para a regeneração. A regeneração pode ser otimizada alterando-se a temperatura ou a pressão, ou promovendo alterações químicas, tais como eluição ou extração supercrítica. Em certos casos, a combinação dessas técnicas é empregada. Esta propriedade determina a fração da capacidade que é recuperada durante a regeneração, muitas vezes chamada de capacidade de trabalho. A regeneração de um adsorvente nada mais é que a dessorção do adsorbato, a qual é realizada em condições favoráveis a este fenômeno.

Compatibilidade: esta propriedade está relacionada com os tipos de ataque, químico ou físico, que podem reduzir a vida útil do adsorvente. As partículas de adsorvente devem ser inertes, tanto aos componentes quanto aos regenerantes presentes no meio ao qual o mesmo está submetido. O meio associado às condições do processo, tais como vazões, temperatura, pressão e vibração do equipamento, no caso de colunas empacotadas, não devem ser favoráveis à desintegração das partículas de adsorvente.

Custo: trata-se de um fator altamente variável, dependendo não somente do fornecedor mas também do período de compra. Este último fator é mais relevante quando se fala de adsorventes naturais, tais como carvão de côco, pois este tipo de produto depende de

condições ambientais tais como safra; e carvão ativado, o qual é normalmente obtido na decomposição térmica de materiais carbonáceos de origem animal (sangue, carne, ossos), ou de origem vegetal (madeira, milho, arroz). O principal pré-requisito para o processo de separação ser economicamente viável é a utilização de um adsorvente com seletividade, capacidade e vida útil alta. Os preços podem variar numa faixa de \$0.50 a \$50 por lb. (fonte: Chemical Engineering / November 1995)

No estudo e compreensão do fenômeno da adsorção, o conhecimento detalhado e preciso das propriedades físico-químicas do material adsorvente é essencial. As propriedades físicas do adsorvente relacionadas à sua eficiência dependem, dentre outros fatores, da forma em que o mesmo está sendo utilizado, que pode ser pó (utilizado em geral para o adsorbato na fase líquida) ou na forma granular (utilizado para o adsorbato na fase gasosa).

2.2.2 - Influência da temperatura

Na adsorção física, a quantidade adsorvida sempre decresce monotonicamente quando a temperatura é aumentada; desta forma, muitos processos de adsorção física não ocorrem a temperaturas muito superiores ao ponto de ebulição normal na pressão de operação do sistema. Já os processos de quimiossorção frequentemente podem ser desenvolvidos a temperaturas acima do ponto de ebulição, ou mesmo superiores a temperatura crítica do material. É possível que as adsorções física e química ocorram simultaneamente em uma dada superfície. Este fato dificulta uma generalização no que diz respeito ao efeito da temperatura na quantidade de material adsorvido, sendo que diferentes comportamentos podem ser constatados para distintos sistemas adsorvente-adsorbato.

A baixas temperaturas, a adsorção física é o processo dominante, sendo insignificante a quimiossorção. Tem-se que a quantidade de material fisicamente adsorvido decresce com a elevação da temperatura; já a quantidade de material adsorvido via quimiossorção aumenta a medida que se eleva a temperatura, até se tornar constante.

2.2.3 - A isoterma de adsorção de Langmuir

Sabe-se que a capacidade de um determinado adsorvente para um certo adsorbato é controlada pelo equilíbrio de fases. Os gráficos da quantidade de material adsorvido por unidade de volume, a uma temperatura constante, são chamados isotermas de adsorção. Estas isotermas são uma expressão funcional para a variação da adsorção com a concentração de adsorbato na solução, à temperatura constante.

Esses gráficos são divididos em cinco categorias principais de acordo com a figura 2.2:

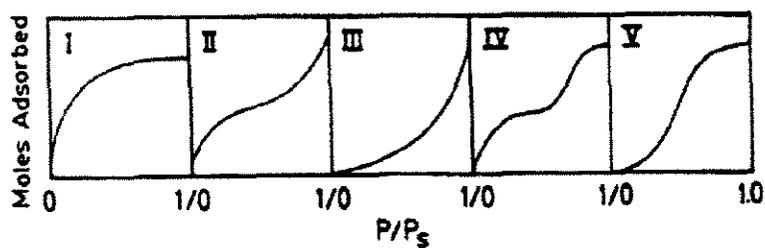


Figura 2.2 Classificação das isotermas segundo Braunauner (Ruthven, 1984).

As isotermas para adsorventes microporosos verdadeiros, nos quais o tamanho do poro não é muito maior que o diâmetro molecular da molécula de adsorbato, é normalmente do tipo I. Isto ocorre porque com tais adsorventes existe uma situação limite definida que corresponde ao completo preenchimento dos microporos. Ocasionalmente, se os efeitos da atração intermolecular forem grandes, uma isoterma do tipo V é observada. Uma isoterma do tipo IV, sugere a formação de duas camadas superficiais: em uma superfície plana ou na parede de um poro muito mais largo que o diâmetro do adsorbato. Isotermas dos tipos II e III, são geralmente observadas apenas com adsorventes nos quais existe uma grande faixa de tamanho de poros. Em tais sistemas existe uma contínua progressão da adsorção em monocamada para a adsorção em multicamada, e então para condensação capilar.

Virtualmente, todos os tratamentos teóricos do fenômeno de adsorção são baseados ou podem ser rapidamente relacionados a análise desenvolvida por Langmuir. A isoterma de Langmuir corresponde a um tipo de adsorção altamente idealizada. O modelo foi proposto inicialmente para gases assumindo as seguintes hipóteses :

- Moléculas da fase gasosa são adsorvidas em pontos discretos de ataque na superfície do adsorvente, ou seja, nos sítios de adsorção; cada sítio pode acomodar somente uma molécula adsorvida. A energia de uma espécie adsorvida é a mesma em qualquer local, e independe da presença ou ausência de moléculas adsorvidas nas proximidades. Esta hipótese implica em que as forças entre moléculas adsorvidas adjacentes sejam tão pequenas que possam ser negligenciadas, e que a probabilidade de adsorção em um sítio vazio é independente do fato do sítio adjacente estar ocupado ou não.
- A quantidade máxima de adsorção possível é aquela correspondente a monocamada.
- A adsorção é localizada e ocorre pela colisão entre moléculas da fase gasosa com sítios vazios.
- A taxa de dessorção depende somente da quantidade de material presente na superfície do adsorvente.

Para o processo de adsorção física, a hipótese mais pobre é a terceira, enquanto que, para a quimiossorção, é a segunda. Há uma significativa quantidade de dados experimentais que contradizem estas hipóteses. A figura 2.3 apresenta alguns exemplos de isotermas de Langmuir:

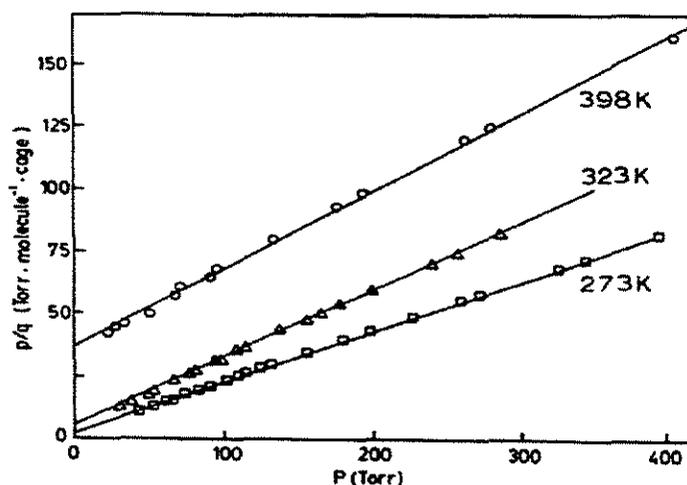


Figura 2.3 Isothermas de Langmuir para equilíbrio de propano em zeólita 5A (Ruthven,1984)

A aproximação cinética para a derivação da equação de Langmuir assume que uma taxa de adsorção na superfície é proporcional ao produto da pressão parcial do adsorbato em fase gasosa e a fração da superfície vazia. Se a fração da superfície coberta pelo gás adsorvido A é denominada θ_A , a fração da superfície vazia é dada por $1 - \theta_A$, se nenhuma outra espécie estiver adsorvida. Se a pressão parcial de A na fase gasosa for P_A , a taxa de adsorção é dada por :

$$r_{\text{adsorção}} = kP_A(1-\theta_A) \quad (2.2)$$

onde k pode ser chamado de pseudo constante da taxa para o processo de adsorção. A taxa de desorção depende somente do número de moléculas que estão adsorvidas, portanto :

$$r_{\text{desorção}} = k'\theta_A \quad (2.3)$$

onde k' pode ser chamado de pseudo constante da taxa para o processo de desorção. No equilíbrio, as taxas de adsorção e de desorção são iguais:

$$kP_A(1-\theta_A) = k'\theta_A \quad (2.4)$$

A fração de sítios ocupados pela espécie A é :

$$\theta_A = \frac{kP_A}{k' + kP_A} \quad (2.5)$$

Dividindo ambos os termos por k' tem-se :

$$\theta_A = \frac{KP_A}{1 + KP_A} \quad (2.6)$$

onde $K = k/k'$

A fração de sítios ocupados é também igual a razão do volume de gás adsorvido, em relação ao que seria adsorvido em uma monocamada.

$$\theta_A = \frac{V}{V_m} \quad (2.7)$$

Ambos os volumes são medidos em condições padrão ou a uma temperatura e uma pressão de referência constantes. As duas últimas equações combinadas proporcionam a seguinte expressão :

$$V = \frac{V_m KP_A}{1 + KP_A} \quad (2.8)$$

Construindo-se o gráfico de $V \times P_A$, obtém-se uma curva igual a isoterma de adsorção do tipo I. A baixos valores de P_A , o termo KP_A é pequeno comparado com a unidade e a quantia adsorvida será linear com a pressão. A altas pressões, esse termo será grande comparado com a unidade, e a superfície estará praticamente repleta da substância adsorvida. Nesse caso, V será próximo de V_m .

Linearizando a equação acima apresentada de modo a obter o valor de V_m , obtém-se a seguinte expressão:

$$\frac{P_A}{V} = \frac{1}{V_m K} + \frac{P_A}{V_m} \quad (2.9)$$

Grafica-se, então, $P_A/V \times P_A$, proporcionando uma reta cujo coeficiente angular é igual a $1/V_m$. Sabendo o volume correspondente a monocamada, pode-se determinar o número de moles adsorvidos. Com o número de moles multiplicado pela área coberta pela molécula adsorvida, obtém-se a área superficial total do catalisador.

A partir da expressão da isoterma de Langmuir:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{Kd + C} \quad (2.10)$$

é possível se obter uma forma linearizada com um simples rearranjo dos termos, resultando em:

$$\frac{C^*}{q^*} = \frac{1}{q_m} C^* + \frac{Kd}{q_m} \quad (2.11)$$

onde: q^* representa a quantidade adsorvida por volume de adsorvente (mg/ml), q_m é o valor de saturação da monocamada, C^* é a quantidade de enzima livre (mg/ml) e Kd é a constante de equilíbrio (g/l). Desta forma, dados de C^*/q^* versus C^* para uma dada temperatura resultam em uma reta.

2.2.4 - O calor de adsorção

De acordo com o modelo ideal de Langmuir, o calor de adsorção deveria ser independente da superfície coberta pelo adsorbato, mas este requisito é raramente satisfeito em sistemas reais, porque os efeitos da heterogeneidade da superfície e as interações adsorvente - adsorbato são geralmente significantes. Sob estas condições, existe uma relação simples entre a energia potencial média (ϕ) e o calor de adsorção, a qual deve ser descrita da seguinte forma:

Energia interna para 1 mol de adsorbato na fase vapor = U_g

Entalpia molar de adsorbato na fase vapor = $U_g + RT$

Entalpia parcial molar da fase adsorvida = $U_s + \phi$

Calor isotérmico de adsorção = $-\Delta H_0 = U_g - U_s + RT - \phi$

$U_g - U_s$ é a diferença em energia cinética entre a molécula de adsorbato na fase gasosa e no estado adsorvido e como tal depende da natureza da fase adsorvida.

Para um adsorvente não polar não existem contribuições de dipolo na energia de adsorção. Se a pequena contribuição da energia de polarização for negligenciada, o potencial, e portanto o calor de adsorção, podem ser calculados somando-se as contribuições de dispersão e repulsão de cada átomo no adsorvente.

2.2.5 - Adsorção de Proteínas

O tratamento e entendimento da adsorção de proteínas requer uma grande familiaridade com modernos conceitos sobre a estrutura e função das proteínas. Proteínas são macromoléculas biológicas construídas para funções únicas e específicas, sendo portanto, denominadas enzimas em reações bioquímicas. Enzimas nada mais são que poliamidas de alto peso molecular produzidas pela co-polimerização específica de cerca de 20 aminoácidos diferentes. Para uma análise completa da adsorção, a sequência de aminoácidos e as estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas devem ser conhecidas. A solubilidade geral característica da proteína, incluindo seu comportamento em diferentes meios de força iônica e pH, seu comportamento em soluções de uréia, em soluções contendo pequenas quantidades de metanol, etanol ou glicerol e informações relacionadas a soluções características são dados importantes na interpretação e predição das interações nas interfaces.

Com base no fenômeno de adsorção, desenvolveram-se várias técnicas de separação de proteínas, as quais são genericamente denominadas cromatografia. Cromatografia é um exemplo de um método de separação altamente seletivo. Para isso, uma fase sólida que adsorverá especificamente a proteína de interesse, é criada pela imobilização de um componente conhecido para interagir com a proteína na matriz sólida. O líquido contendo o componente a ser purificado, ou separado, é posto em contato com o adsorvente (uma resina trocadora de íons, por exemplo), valendo-se do fato de que a adsorção é suficientemente específica e somente a proteína de interesse será adsorvida. Todos os componentes não-adsorvidos no líquido são removidos por um procedimento de lavagem. Finalmente a proteína desejada é retirada do adsorvente, através do contato com uma fase líquida, que diminui a força da interação entre adsorbato (proteína) e adsorvente (resina). Tipicamente esses estágios são executados com adsorventes empacotados em um leito, entretanto podem ser utilizados em processos envolvendo tanques agitados ou leitos fluidizados.

No caso de adsorção em tanques agitados, o contato entre a resina e o adsorvente é promovido de forma a se atingir um estágio de equilíbrio (Araújo, 1996). Este sistema de

adsorção, é tradicionalmente utilizado para obtenção de dados referentes a cinética de adsorção, pois possibilita a realização de ensaios com monitoramento contínuo da concentração de adsorbato no seio do líquido.

Dentre os vários tipos de cromatografia utilizadas para separação de proteínas podemos destacar a cromatografia por afinidade. Tal técnica é baseada nas interações de proteínas e outros componentes da amostra da fase líquida (móvel) com um suporte sólido estacionário de propriedades químicas definidas. Tais interações correspondem exatamente ao processo de adsorção de superfícies. Tais superfícies (ou suportes) podem ser das mais variadas, de acordo com o material das resina utilizada.

Outro tipo de cromatografia que também encontra grande aplicação na separação de proteínas é a cromatografia de troca iônica, a qual trata-se de um método de separação baseado nas diferenças de carga das moléculas sobre condições definidas de pH e força iônica. Neste tipo de cromatografia, a proteína é adsorvida através de interações eletrostáticas entre as cargas do adsorvente e da proteína.

O adsorvente deve ser ativado antes do uso. Isso significa balancear as cargas através de contra íons, tais como cloretos, ou íons metálicos. Isso é feito através do tratamento com soluções específicas para cada resina em questão. O processo de adsorção se dá da seguinte forma: a proteína desloca o contra íon, tomando seu lugar na resina trocadora. A região do adsorvente se torna eletricamente neutra, sendo o saldo de carga da proteína de mesmo sinal que o contra íon. Deste fenômeno resulta o nome resina trocadora de íons.

2.2.6 - Adsorção em tanque agitado

Araújo (1996), estudou a adsorção de albumina de soro bovino em tanques agitados. Em seu trabalho foi proposto um modelo matemático para o balanço de massa, que considera não somente os dados da cinética de adsorção, obtidos experimentalmente através do modelo de Langmuir, mas também o transporte de massa no filme líquido e a difusão no interior dos poros da resina. A resolução do modelo permite a obtenção de valores

otimizados do coeficiente de transferência de massa no filme líquido e da difusividade efetiva no interior do sólido, os quais são função da concentração inicial de proteína. A comparação entre as curvas obtidas pelo modelo e as experimentais demonstram boa concordância, podendo o mesmo ser considerado adequado.

2.3 - Cinética Enzimática

2.3.1 - Introdução

Reações enzimáticas são aquelas onde a transformação do substrato (reagente) em produtos é catalisada por uma enzima. Geralmente as enzimas são catalisadores altamente específicos, ou seja catalisam uma só reação química ou conjunto de reações intimamente relacionadas. As enzimas são classificadas de acordo com a especificidade, ou melhor, de acordo com o tipo de reação que catalisam em:

Oxiredutases: reações onde ocorre a transferência de elétrons

Transferases: reações de transferência de grupos entre as moléculas diferentes do substrato

Hidrolases: reações de hidrólise Liases: reações onde ocorre a adição de grupos às ligações duplas ou o inverso

Isomerases: reações onde ocorre transferência de grupos dentro das moléculas, produzindo formas isométricas

Ligase: reações de formação de ligações C- C, C-S, C-O e C-N, por condensação (acopladas a clivagem ATP)

Outra classificação é a classificação trivial, que nada mais é que um nome curto de fácil memorização e utilização tal como: álcool desidrogenase. Há ainda a classificação sistemática onde há a identificação do substrato, tipo de reação envolvida e o sufixo “ase”,

tais como: álcool NAD⁺ oxidoreductase, e a classificação numérica que é a identificação exata da enzima visando evitar ambiguidades, sendo portanto a mais indicada para publicações e trabalhos científicos.

As reações enzimáticas são iniciadas pela ligação entre o substrato e o sítio ativo da enzima. De acordo com a reação genérica a seguir:



As enzimas são, entretanto, moléculas muito maiores que o substrato, sendo necessárias poucas moléculas de enzima para catalisar milhares de moléculas de substrato. A ligação entre enzima e o substrato ocorre em uma pequena região da enzima denominada sítio ativo.

O sítio ativo de uma proteína ocupa apenas uma pequena parte do volume total da proteína, possui conformação tridimensional tratando-se de uma fenda na estrutura da molécula. A especificidade da ligação depende do arranjo precisamente definido dos átomos no sítio ativo. Com base na especificidade da ligação enzima-substrato, os seguintes modelos de arranjo foram propostos:

Modelo Chave-fechadura: o sítio ativo é sempre complementar ao substrato em tamanho, forma e natureza química

Modelo de ajuste induzido: o sítio ativo tem forma complementar ao substrato somente após a ligação

Hipótese dos três pontos de ligação: ocorre um direcionamento da ligação que ocorre em pontos únicos e característicos da enzima

Mecanismo da distorção: a ligação com a enzima provoca a distorção de certas ligações do substrato

As reações enzimáticas, ao contrário de reações químicas, ocorrem em condições suaves de temperatura e pH. A especificidade enzimática pode ser dividida em quatro grupos principais:

Absoluta: a enzima atua somente sobre um substrato

Grupal: a enzima atua sobre um determinado grupo funcional e portanto irá atuar em qualquer substrato que o possua

Estereo-específica: em se tratando de substratos com isomeria ótica, a enzima atua apenas em um dos dois isômeros.

Estero-espacial: a enzima atua em uma região específica da molécula

Devido a possibilidade de alteração em sua estrutura, de acordo com o meio em que se encontra, a atividade enzimática é função, dentre outros fatores, do pH e temperatura do meio reacional.

2.3.2- Cinética enzimática

Cinética enzimática é o ramo da enzimologia que estuda os fatores que afetam a velocidade das reações enzimáticas tais como concentração enzimática, concentração de ligantes (substrato, inibidores, e ativadores), pH, força iônica e temperatura. O estudo da cinética enzimática de uma determinada reação envolve o estudo do mecanismo cinético da reação, do modo pelo qual a enzima é regulada *in vivo*, da identidade dos sítios ativos da enzima e de sua estrutura, do modelo de reação e sua validação a partir de dados experimentais, além da inibição pelo substrato. A reação enzimática genérica é dada pela equação (2.12), a qual pode ser simplificada assumindo que no início da reação, a concentração de produtos é baixa e portanto, o produto não reverte para o substrato inicial, ou seja *EP*, pode ser eliminado da reação que é dada pela equação a seguir:



Para se deduzir a equação da velocidade de uma reação enzimática, assume-se que o equilíbrio entre E , S e ES é rápido quando comparado com a velocidade com que EP se transforma em P . Sendo assim, a etapa de formação do complexo enzimático é rápida e a de formação de produto lenta, sendo esta última a limitante do processo. Dessa forma, a velocidade da reação será dada por:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = -\frac{dS}{dt} \quad (2.14)$$

A quantidade de enzima total $[E_0]$ é dividida entre enzima livre $[E]$ e enzima ligada ao substrato $[ES]$:

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2.15)$$

Dividindo a equação (2.14) por $[E_0]$ tem-se :

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES]} \quad (2.16)$$

No equilíbrio temos K_s (constante de dissociação do complexo enzima-sustrato) dado por:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (2.17)$$

Substituindo a equação (2.17) na equação (2.16) e multiplicando por $1/k_2$ tem-se:

$$\frac{v}{[E_0]k_2} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S}} \quad (2.18)$$

Se: $v = k_2[ES]$; então $k_2[ES] = V_{max}$

Onde:

V_{max} é a velocidade máxima atingida quando toda a enzima estiver na forma complexada (ES). Substituindo na equação (2.18) e rearranjando tem-se:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (2.19)$$

A equação (2.19) é denominada equação de Michaelis-Menten e é largamente utilizada para descrever a cinética enzimática de diversas reações. Utilizando a hipótese do pseudo estado estacionário, no qual a concentração inicial do substrato é muito maior que a da enzima ($[S_0] \gg \gg \gg [E_0]$), a etapa de formação de produto é irreversível ($k_2 \gg 0$ e $d[ES]/dt = 0$) após um breve tempo inicial. A velocidade da reação é dada por:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] \quad (2.20)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.21)$$

As equações (2.20) e (2.21) são resolvidas numericamente. Se $d[ES]/dt = 0$, a equação (2.21) fica:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.22)$$

Definindo a constante de Michaelis-Menten :

$$Km = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.23)$$

e substituindo na equação (2.22) tem-se:

$$[ES] = \frac{[S][E]}{Km} \quad (2.24)$$

Substituindo na equação da velocidade tem-se:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{Km + [S]} \quad (2.25)$$

Quando $[S] = Km$, temos que $v = 0.5 V_{max}$.

A constante de Michaelis-Menten varia na faixa de 10^{-1} a 10^{-7} M, depende do substrato, do pH, da força iônica e da temperatura do meio. Para o limite, onde $k_1 \gg \gg k_2$, $Km = K_s$, que é a constante de dissociação do complexo ES . Neste caso, a dissociação do complexo ES para E e S , é muito mais rápida que a formação de E e P . Os parâmetros Km e V_{max} da equação de Michaelis-Menten são estimados graficamente utilizando-se de gráficos

de $1/v$ vs $1/S$, e ajustando-se a curva obtida à equação linear de Michaelis-Menten, a seguir:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.26)$$

Reações enzimáticas são essencialmente diferentes de reações químicas convencionais, podendo ser afetadas pela presença de outras substâncias no meio reacional, tais como inibidores e podendo ser ainda afetadas pela concentração do substrato, parâmetro que pode ativar ou inibir uma dada reação. Sendo assim, pode-se dizer que reações enzimáticas são altamente específicas.

2.4. Síntese de Dextrana

2.4.1 - Introdução

A dextrana, carboidrato de fórmula empírica ($C_6H_{10}O_5$) com rotação ótica positiva, foi descoberta em 1874 por Scheibler como o agente causador do espessamento de xaropes de cana e beterraba. Entretanto em 1864 Pasteur já havia descoberto que este espessamento era causado por uma bactéria denominada *Leuconostoc mesenteróides* (Alsop, 1983). Mais tarde, foi verificado que a dextrana se tratava de uma substância com propriedades não muito bem definidas. Isso se deve ao fato de existir uma ampla variedade de dextranas, as quais podem ser pouco ou altamente ramificadas. A faixa de peso molecular deste produto é também bastante ampla, variando de 4000 daltons até dextranas com peso molecular superior a 2×10^6 daltons. Atualmente denomina-se dextrana uma larga classe de polissacarídeos, obtidos por fermentação ou síntese enzimática, cujo monômero é α -D-glucanopiranosil com a maior parte das ligações do tipo α 1-6. Embora existam outras

bactérias capazes de sintetizar dextrana, tais como *Acetobacter* e *Streptococcus*, a maioria dos estudos publicados se referem ao *Leuconostoc mesenteróides* ou *Leuconostoc dextranicum*, sendo que o *Leuconostoc mesenteróides* NRRL B 512 F produz dextrana com 95 % de ligações α -1,6 e 5 % de ligações 1,3- α -D-glucanopirosídicas, sendo o mais utilizado industrialmente para a produção de dextrana.

As aplicações da dextrana estão altamente relacionadas com seu peso molecular, podendo ser utilizada como estabilizante e espessante de alimentos, expansor de plasma sanguíneo, película protetora de sementes, defloculante, estruturas cirúrgicas, veículo para medicamentos e peneiras moleculares, dentre outras aplicações. A dextrana de baixo peso molecular, ou clínica (peso molecular na faixa de 40.000-70.000), é largamente utilizada na indústria farmacêutica como matéria prima de medicamentos e expansor de plasma sanguíneo, tendo sido utilizada na segunda guerra mundial como substituto do plasma sanguíneo. Comercialmente, a dextrana farmacêutica é denominada Dextrana 40 e Dextrana 70, sendo seus pesos moleculares rigorosamente controlados pelos órgãos de vigilância sanitária. As principais características da dextrana clínica são sua alta resistência ao calor (resistência à esterilização) e armazenagem, independência do sangue receptor, baixo índice de efeitos colaterais e transmissão de doenças, além da propriedade química de se ligar a íons metálicos (propriedade relacionada com as ligações α -1,3), proteínas e até mesmo à hemoglobina, formando compostos de interesse medicinal tais como dextrano-sulfato (anticoagulante semelhante a heparina) e ferro-dextrana (utilizada no tratamento de anemia em animais e humanos). Outra aplicação medicinal relevante é o tratamento contra AIDS (Busso e Resnick, 1990). Sendo assim, a dextrana clínica pode ser uma alternativa para a obtenção de sangue artificial (Alsop, 1983), dentre outros usos ainda não identificados. A Dextrana 40 provoca expansão sanguínea menor que a Dextrana 70, sendo esta última utilizada para manter o volume de sangue e a pressão arterial em vítimas de queimaduras graves. Já a dextrana de peso molecular médio (100.000-25.000.000 daltons) é utilizada na indústria alimentícia como agente geleificante, espessante e estabilizante de alimentos e indústria química, onde é empregada na obtenção de peneiras moleculares, tendo grande aplicabilidade na obtenção de colunas cromatográficas (DEAE-SEPHADEX), na produção de soda e de alumínio. Há ainda a dextrana de alto peso molecular (superior a 25 milhões de daltons), a qual é empregada na extração de petróleo com alta viscosidade, fazendo parte da

lama de perfuração sendo também empregada na recuperação secundária de petróleo. Devido às suas particularidades, em muitos casos, a dextrana não pode ser substituída por polissacarídeos semelhantes, garantindo assim sua aplicabilidade industrial.

Apesar do grande número de artigos publicados sobre dextrana, a aplicação prática deste polissacarídeo ainda é limitada devido ao seu elevado custo de produção.

A dextrana produzida via *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F é solúvel em água, metil sulfóxido e etilenoglicol, apresentando atividade ótica positiva (+ 200°) em solução aquosa na faixa de 3 a 10 % e baixa viscosidade intrínseca. Soluções a concentrações inferiores a 5% apresentam comportamento Newtoniano (Currello, 1993).

2.4.2 - Produção de Dextrana

A produção de enzimática de polissacarídeos é de grande interesse comercial, não somente devido a obtenção de um produto final mais puro e homogêneo, mas também devido a um melhor controle do processo para obtenção do produto desejado, além de não depender de condições climáticas e outros fatores ambientais que interferem na síntese natural destes produtos. Segundo DeBelder (1987), citado em Currello (1993), a produção mundial de dextrana gira em torno de 500 toneladas por ano. Tradicionalmente a produção industrial de dextrana é realizada via processo fermentativo. O tipo de dextrana obtida depende do microorganismo empregado, sendo a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* a mais empregada atualmente. Utilizando sacarose como fonte de carbono, o microorganismo primeiramente produz a enzima dextrana-sacarase, a qual é responsável pela conversão de sacarose em dextrana. Além do processo fermentativo, pode-se obter dextrana via síntese enzimática, utilizando a enzima livre ou imobilizada. A dextrana de interesse comercial pode ser nativa (alto peso molecular) ou clínica (baixo peso molecular), sendo esta última geralmente obtida a partir da hidrólise ácida da dextrana nativa utilizando-se HCl, H₂SO₄ ou dextranases, dentre outras técnicas tais como ultra-som (Currello, 1993). Seja qual for a técnica de hidrólise empregada, trata-se de um processo de elevado custo.

A produção de dextrana por fermentação batelada, não requer um nível de controle do processo muito elevado, sendo a temperatura a única variável controlada. O tempo total

do processo é variável, a viscosidade aumenta gradativamente devido ao aumento do peso molecular da dextrana, e o pH final atinge valores entre 4.5 e 4.8 devido a formação de metabólitos ácidos pelo microorganismo. Segundo Jeanes, et al. (1948), citados em Curralero (1993), a aeração é desfavorável à síntese de dextrana. A síntese de dextrana via processo fermentativo é constituída de três etapas básicas:

- crescimento celular
- produção enzimática
- produção de dextrana

As etapas posteriores à fermentação são:

- hidrólise, a qual pode ser ácida, enzimática ou ultrassônica
- fracionamento por solvente
- isolamento sólido (*spray drier*)
- preparação em dosagens farmacêuticas (no caso da dextrana clínica)

O crescimento celular é realizado em meio tamponado, sendo 7 o pH ótimo para esta etapa. Já o pH ótimo para a produção enzimática se encontra na faixa de 6.0 a 6.9, enquanto que o pH ótimo para reação enzimática (síntese de dextrana) é de 5.2. Durante a etapa de crescimento celular, devem ser adicionados nutrientes (minerais) e o controle do processo não é muito importante. O controle do pH durante a produção da enzima e reação enzimática é fundamental para se obter o rendimento desejado e evitar a desnaturação da enzima. O processo total dura em média 36 horas e a remoção da dextrana do caldo de fermentação é realizada via precipitação. A figura a seguir mostra a alteração dos parâmetros durante a fermentação:

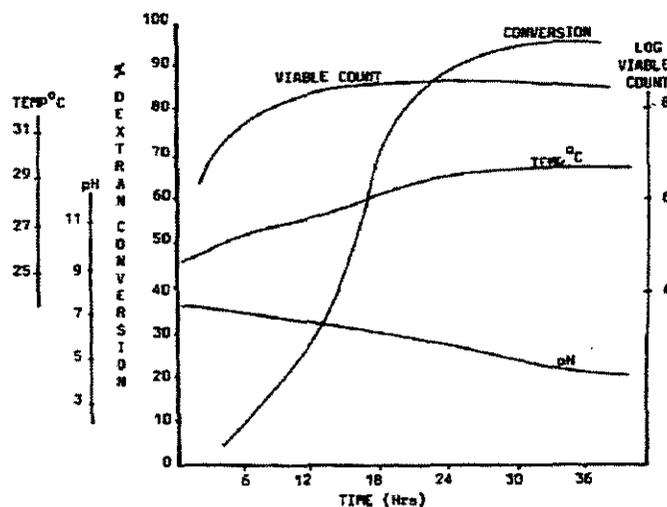


Figura 2.4 - Alterações dos parâmetros durante uma fermentação convencional para produção de dextrana - (Aslop,1983)

A figura 2.4 apresenta as alterações do pH , temperatura e taxa de conversão para uma fermentação em escala industrial a 17 % de sacarose. Nota-se que durante o crescimento celular há pouca produção da enzima, após este período a enzima é produzida e atinge-se a taxa de conversão de 90 %, num período de 20 horas. A reação é exotérmica e devido a produção de ácidos o pH cai. Em termos de peso molecular, o rendimento pode ser dividido em dextrana de alto peso molecular e baixo peso molecular. Aslop (1983), cita em seu trabalho vários estudos de rendimento do processo, incluindo uma curva de custo. Da análise dos resultados destes estudos, verifica-se que o melhor rendimento em termos de quantidade de dextrana produzida é encontrado para uma concentração de 17.9 % de sacarose, enquanto que o menor custo operacional é encontrado em uma concentração de 12,5 %, em se tratando de dextrana de alto peso molecular. Um dos fatores preponderantes no custo de produção da dextrana é a etapa de precipitação, que consome uma alta quantidade de solvente, o qual é posteriormente recuperado via destilação (operação de alto custo). Já no caso da produção de dextrana de baixo peso molecular, há ainda a etapa de hidrólise, para a qual é também atribuído um alto custo operacional. Várias melhorias para produção de dextrana tem sido propostas desde que esta se tornou um produto de interesse

comercial, sendo uma das mais promissoras a síntese do polissacarídeo em um meio livre de células (síntese *in vitro*), já que a enzima pode ser isolada e armazenada sem perder a estabilidade.

A obtenção de dextrana via síntese enzimática apresenta várias vantagens em relação ao processo fermentativo, apesar de requerer um nível de controle do processo mais elevado. Dentre essas vantagens estão a possibilidade de controle do peso molecular, etapa de purificação mais simples, pois não há presença de células nem metabólitos secundários no meio reacional, menor gradiente de viscosidade, mesmo para a produção de dextrana nativa, além de maior rendimento. A síntese enzimática torna-se viável no caso da produção de dextrana devido ao fato de a dextrana-sacarase ser uma enzima exógena e com alta estabilidade nas condições de processo. Outros fatores relevantes são a possibilidade de maximizar a obtenção da enzima (processo fermentativo), já que há diferenças no tocante a pH e temperatura ótimos para síntese da enzima e da dextrana, além da possibilidade de obtenção de frutose, que é um açúcar de alto valor comercial, como produto secundário.

A atividade enzimática é um fator importante para controlar a síntese. Várias definições de atividade enzimática têm sido propostas, sendo atualmente a mais aceita industrialmente a dada por Jeanes (1965), citado em Alsop (1983), que é a unidade de dextrana-sacarase (DSU) definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana em 1 hora (obtendo-se 0.52 mg de frutose), sob as condições de teste.

Segundo Kepsell (1952), citado em Alsop (1983), a adição de oligossacarídeos ou mesmo de dextrana de baixo peso molecular na síntese enzimática de dextrana, promoveria a formação de uma maior quantidade de dextrana de baixo peso molecular (dextrana clínica). Alguns resultados experimentais utilizando maltose como acceptor para obtenção de dextrana de baixo peso molecular para síntese de ferro-dextrana podem ser encontrados no trabalho de Currello (1993). Embora existam vários trabalhos publicados nesta área, há ainda controvérsias sobre a forma de adição da enzima no meio reacional, sendo que atualmente os processos de produção de dextrana são fermentativos (Alsop, 1983). Algumas observações devem ser ressaltadas, como por exemplo: o aumento da quantidade de enzima não está diretamente relacionado com o aumento na quantidade de dextrana produzida.

2.4.3 - Síntese da Enzima

A enzima dextrana-sacarase (1,6- α -D-glucan-6- α -glucanosil transferase, EC. 2.4.1.5) é obtida a partir do microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* via processo fermentativo. A dextrana-sacarase é uma enzima indutiva, cujo o único indutor conhecido é a sacarose. O microorganismo utiliza sacarose como fonte de carbono, e embora possa crescer em outros meios, tais como frutose e maltose, não há formação de dextrana-sacarase nestas culturas. Fatores como pH e temperatura são muito importantes na síntese enzimática. Um estudo realizado por Tuschya (1952), citado em Alsop (1983), mostra que a 23 ° C os melhores rendimentos foram encontrados para pH = 6.7. É importante ressaltar que mesmo em pH 6.7 ocorre rápida desnaturação da enzima para valores de temperatura superiores a 25 ° C. O ajuste de pH é realizado com solução de NaOH. Estudos utilizando NH₄OH mostraram queda na produtividade. Um dos principais fatores de otimização do processo é o controle da concentração de sacarose, o qual é monitorado por HPLC, para evitar que uma queda no nível de sacarose, atingindo o valor zero, provoque uma queda irreversível no rendimento. Com base nestes dados, foi proposta a síntese da enzima via batelada alimentada, onde sacarose em solução de NaOH é adicionada ao meio, visando a maximização da concentração da enzima e minimização da produção de dextrana. Conforme Currello (1993) a obtenção de dextrana-sacarase utilizando este processo, sendo a separação das células do caldo de fermentação realizada através de centrifugação, resultou em um caldo de fermentação com alta atividade enzimática, entretanto o mesmo apresentava também elevada concentração de açúcares redutores e dextrana de baixo peso molecular, o que inviabilizou sua utilização direta na síntese *in vitro* de dextrana. Devido a alta instabilidade da enzima em pH 6.7, o procedimento adotado durante a fermentação é a diminuição deste valor para pH 5.2 com ácido fosfórico após 8 horas, valor no qual a enzima é estável, além de ser o valor ótimo para a atividade enzimática. Com este procedimento, o açúcar residual é convertido em dextrana de baixo peso molecular, a qual contribui para manter a estabilidade da enzima durante a estocagem.

Bazán (1993) realizou um estudo da síntese enzimática da dextrana clínica (peso molecular de 40.000 daltons), no qual os parâmetros que influem na síntese, tais como concentração de sacarose, temperatura, concentração enzimática e de aceptores, foram

estudados. A baixas concentrações de sacarose (10 %) a maior parte da dextrana obtida é dextrana nativa (alto peso molecular), e a altas concentrações obtém-se dextrana clínica e uma grande quantidade de frutose, glicose e outros oligossacarídeos. A dextrana é removida do meio por precipitação alcoólica utilizando-se etanol. A remoção da dextrana nativa por precipitação é obtida com solução de etanol a 38 % (v/v), já para dextrana clínica a separação ocorre com etanol a 51 % (v/v), sendo que os oligossacarídeos são precipitados com etanol a 90 % (v/v). Os rendimentos obtidos via síntese enzimática, tanto para dextrana nativa como para dextrana clínica, são superiores aos obtidos via fermentação, porque não há consumo de substrato para crescimento celular. No processo enzimático, o rendimento teórico é de 100 %, em termos de sacarose total, entretanto na prática este valor não é atingido.

O trabalho de Bazán (1993) engloba a síntese da enzima (dextrana-sacarase) via processo fermentativo e a síntese de dextrana clínica. Para a obtenção de dextrana-sacarase foram realizados vários ensaios, variando-se a concentração de substrato no meio. O processo utilizado foi o de batelada alimentada, sendo a sacarose e o NaOH adicionados em uma única solução, o que segundo Monsan e Lopez (1981) é mais adequado que a alimentação dos mesmos em soluções separadas, já que a demanda de sacarose está associada ao pH e ao crescimento celular.

A enzima foi obtida em reator termostaticado. Devido a baixa estabilidade da mesma no meio fermentativo, a alimentação de substrato foi cortada após sete horas de operação para favorecer a produção da enzima e diminuir a concentração de açúcares residuais. Foi notada uma queda da atividade enzimática no final do processo, o que era esperado devido a instabilidade da enzima. Os ensaios para obtenção da enzima foram realizados na faixa de temperatura de 27-29 ° C, pH = 6.7, sendo este reduzido com HCl para 5.2 no final do processo, e concentrações de sacarose de 80, 160 e 200 g/l. Foram obtidas como condições ótimas concentração de substrato igual a 160 g/l e temperatura de 27° C. Nestas condições, obteve-se atividade enzimática de 106 UDS/ml e concentração de açúcares residuais de 6.54 g/l. Vale ressaltar que a utilização de uma concentração elevada de substrato leva a obtenção de um caldo de fermentação altamente viscoso, o que impede a separação da enzima realizada por ultrafiltração. A dextransacarase é uma enzima que se agrega facilmente, portanto a mesma não pode ser isolada do caldo de fermentação por precipitação

convencional sem comprometer a batelada. Outra forma de separação da enzima é por cromatografia de permeação em gel.

Processos convencionais de produção enzimática não utilizam aeração, e embora existam alguns trabalhos publicados sobre o assunto, este tópico será omitido por ser de menor importância para o trabalho em questão. Em relação a fonte de carbono, é indicada a utilização de uma baixa concentração de sacarose, visando obter maiores rendimentos (Alsop, 1983). Como já mencionado, a produção de ácidos metabólicos pelo microorganismo causa decréscimo no valor do pH, o qual deve ser controlado pela adição de álcali. Sabe-se também que em qualquer processo envolvendo microorganismos, não somente o substrato é um insumo importante, mas também os nutrientes. Como nutrientes é adicionado nitrogênio, na forma de xarope de milho, ou levedura e fosfato (KH_2PO_4), bem como íons metálicos tais como magnésio, sódio e manganês. Segundo Kabolli (1980), citado em Alsop (1983), a estabilidade da enzima purificada pode ser melhorada pela adição de Ca^{+2} , o que também aumenta a atividade enzimática. Segundo Lawford (1979), também citado em Alsop (1983), a incubação na ausência de Ca^{+2} pode causar a desnaturação irreversível. A adição de CaCl_2 em concentrações na faixa de 0.001% a 0.1 % podem dobrar a produção da enzima, entretanto concentrações acima de 0.1 % podem levar à morte do microorganismo.

A enzima, como mencionado anteriormente, é bastante sensível ao pH e deve ser estocada à baixa temperatura. Segundo Robyt e Walseth (1978), citado em Currello (1993), a enzima purificada em solução perde estabilidade quando estocada a 4 ° C, sendo assim, o uso de estabilizantes tais como dextrana de baixo peso molecular ou polietileno-glicol, metil-celulose e até mesmo detergentes neutros se faz necessário. Souza (1993) cita em seu trabalho que a estocagem da enzima liofilizada a temperaturas inferiores a 5 ° C, mantém sua atividade por 5 anos. Tsumuraya (1976), citado em Bazán (1993), realizou estudos sob a influência de metais pesados na atividade enzimática. O resultado deste estudo demonstra que a maioria dos metais testados, mesmo em baixas concentrações, leva a desnaturação da enzima, a qual na maioria dos casos é irreversível. Quanto a estabilidade térmica, estudos realizados por Kaboli e Reilly (1980), citado em Bazán (1993), demonstram que a enzima é fortemente degradada em temperaturas superiores a 30 ° C, e tem sua atividade máxima em pH=5.2, tanto para enzima livre como imobilizada.

2.4.4 - Síntese de dextran *in vitro*

Dentre as vantagens da síntese de dextrana *in vitro* estão a possibilidade de se utilizar processo contínuo e com maior facilidade de otimização. Além disso, a síntese *in vitro* de dextrana não necessita de enzimas secundárias, como ocorre na maioria das reações bioquímicas, bem como a enzima dextrana-sacarase não necessita de cofatores e intermediários fosforilados, sendo a energia necessária para a condensação das unidades glicosídicas proveniente da hidrólise da sacarose. A dextrana pode ser sintetizada na faixa de 3 a 37 ° C, entretanto de acordo com Rodrigues (1989), a máxima atividade enzimática ocorre a 30 ° C e pH = 5.2. Já a energia de ativação não está ainda bem definida sendo encontrados na literatura valores de 5 a 11 kcal/mol, na faixa de temperatura de 15 a 30 ° C (Souza, 1993). Mesmo assim, a síntese enzimática de dextrana é alvo de interesse comercial, já que não seriam necessárias as etapas de crescimento celular e produção da enzima, o que implica em aumento do tempo total do processo e do consumo de matéria prima (sacarose) Além do mais, a possibilidade de recuperação da enzima, pode tornar a síntese *in vitro* uma alternativa economicamente viável.

Roby (1979), citado em Alsop (1983), menciona que as propriedades da dextrana sintetizada *in vitro* são as mesmas que a obtida via processo fermentativo. Vários mecanismos foram propostos para explicar a síntese de dextrana a partir de sacarose. Para se propor um mecanismo, deve-se levar em consideração o ciclo de crescimento da cadeia (múltipla ou única), o processo de início da polimerização (com ou sem uso de iniciadores), como ocorre o crescimento da cadeia (terminação reduzida ou não reduzida da molécula), como ocorre a terminação da cadeia e como são formadas as ramificações (ligações 1, 3). A reação geral da síntese de dextrana é dada pela equação a seguir:



A reação é essencialmente irreversível e dentre os vários mecanismos que têm sido propostos para a mesma, o mais aceito é o de inserção proposto por Stay (1943), citado em Alsop (1983), onde ocorre o crescimento em cadeia única conforme equações a seguir:



Onde:

S = sacarose

EP_n = complexo enzima polímero

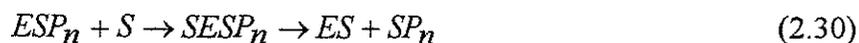
X = frutose

Neste mecanismo, a enzima permanece combinada à cadeia crescente, sendo o mesmo concordante com medidas experimentais. Outro mecanismo proposto é o crescimento em cadeia múltipla, no qual a cadeia se dissocia e há a formação de oligossacarídeos e dextrana de baixo peso molecular. Entretanto este mecanismo não encontra respaldo em medidas experimentais. Segundo o mecanismo de inserção, a dextrana-sacarase age transferindo o grupo glicosil do doador (sacarose) para o grupo aceptor (cadeia polimérica de dextrana). Se houver falha na identificação do grupo aceptor pela enzima, sendo identificada, por exemplo a água, ocorre hidrólise (invertase). Sendo assim, a enzima teria dois tipos de atividade, hidrolítica e de glicosiltransferase. A primeira etapa (atividade hidrolítica) seria a quebra da ligação glicose-frutose (constituintes da sacarose), originando o grupo D-glicosil. A seguir, o grupo glicosil é transferido para cadeia de polissacarídeo (glicosiltransferase). A enzima teria também dois grupos ativos, um doador e outro receptor. Duas moléculas de sacarose se ligam uma a cada um dos grupos citados. O grupo glicosil da sacarose, ligada ao sítio doador, é então transferido para o grupo receptor, liberando uma molécula de frutose. Dessa forma, ocorrem transferências sucessivas de grupos D-glico-piranosil da sacarose para o final não redutor da cadeia ligada ao sítio receptor. Esta transferência origina as ligações α -1,6. A síntese é encerrada pela dissociação ou inativação do complexo enzima-dextranosil, que se dá devido a atividade de aceptores naturais, tais como glicose e frutose em concentrações suficientes para concorrer

com a sacarose pelo sítio ativo, liberando a dextrana. Segundo Alsop (1983) há teorias quanto a utilização de iniciadores, que suportam o complexo enzima-sacarose como tal, embora haja evidências de que os mesmos não sejam necessários.

Quanto a direção de crescimento da cadeia, o trabalho de Sidebotham (1974), citado em Alsop (1983), menciona a existência de várias teorias a respeito do mesmo, que pode se dar na extremidade não reduzida, reduzida ou em ambas, bem como há possibilidade de não haver direção definida. Experimentos realizados por Robyt e Walseth (1978), utilizando traçadores (C^{14}) e técnicas cromatográficas de análise, demonstram que o crescimento ocorre na extremidade reduzida da cadeia. O mecanismo proposto por Robyt et al. (1974), citados em Alsop (1983), consiste na formação de complexo enzimático covalente de glicose e dextrana, sendo a glicose insertada entre a enzima a dextrana por ataque nucleofílico do grupo C_6-OH da glicose ao C_1 da dextrana, formando uma ligação α -1, 6 -glicosídica. Desta forma, há a formação de um grupo nucleofílico que ataca a sacarose formando um grupo glicosil.

Quanto a terminação da cadeia, o mecanismo mais aceito é o mecanismo acceptor, conforme citado anteriormente, no qual os açúcares de baixo peso molecular se ligam à extremidade crescente da cadeia cessando a transferência dos grupos glicosídicos. Esta técnica é também proposta para o controle do tamanho da cadeia, viabilizando a produção de dextrana de baixo peso molecular através da adição de aceptores tais como maltose e isomaltose dentre outros. Estes aceptores promovem a quebra entre a cadeia crescente e a enzima segundo reação a seguir:



Este mecanismo pode também explicar porque com o aumento da concentração de sacarose, o peso molecular da dextrana obtida é menor. Os aceptores podem ser classificados em:

- fracos (sacarose)
- moderadamente fortes (α -metilglicosídeo)

- fortes (frutose e sorbitol)

O mesmo mecanismo pode explicar a diminuição da quantidade de dextrana de alto peso molecular obtida por Curralero (1993) a altas concentrações de sacarose. Robyt e Walsth (1978), investigaram a reação destes aceptores utilizando C^{14} como traçador dos aceptores. Neste experimento, foram utilizados como aceptores glicose, frutose e maltose, sendo obtidos produtos de alto e baixo peso molecular para reação. A redução e hidrólise ácida dos aceptores demonstrou que todos os aceptores eram incorporados na extremidade reduzida da cadeia. Isto demonstra que o mecanismo de reação dos aceptores ocorre sem a presença de sacarose. Nesta reação ocorre não somente a terminação da cadeia mas também a produção de oligossacarídeos, conforme quadro a seguir:

Quadro 2.1 - Relação acceptor oligossacarídeo produzido - (Alsop,1983)

Acceptor	Oligossacarídeo
Glicose	Isomaltose
Frutose	Leucrose
Maltose	Panose

Quando a reação ocorre na presença de sacarose, há competição entre a reação de polimerização da sacarose e dos aceptores, entretanto a estrutura dos produtos dos aceptores e sua localização na cadeia é a mesma na presença ou ausência de sacarose. O mecanismo proposto para incorporação do acceptor na cadeia da dextrana é o mesmo proposto por Robyt e Walseth (1978), para o crescimento da mesma, ou seja ataque nucleofílico do grupo glicosil e dextranglicosil do complexo enzimático formando oligossacarídeos e dextrana. Na presença de sacarose e do complexo enzima/dextrana/glicosil, o estado dinâmico dos oligossacarídeos permite a formação de outros complexos com a enzima, produzindo uma série de oligossarídeos e dextranas de baixo peso molecular. A mistura de produtos obtidos depende da cinética das reações e da força dos aceptores, bem como e suas concentrações.

As ramificações da cadeia de dextrana são constituídas de ligações 1,3. O estudo de Bovey (1959) e Bailey (1957), citados em Alsop (1983), atribui as ramificações encontradas na dextrana a uma enzima secundária denominada alternansacarase, a qual é termicamente mais estável que dextrana-sacarase, entretanto só é obtida na presença de íons magnésio. Até pouco tempo atrás não era possível separar a dextrana ramificada da não ramificada. Um estudo utilizando *Leuconostoc mesenteroides* B1355, mostrou ser possível a obtenção de dextranas separáveis com características físicas diferentes denominadas 'L' e 'S', sendo a dextrana 'L' um produto típico com 95 % das ligações 1, 6 e a dextrana 'S' um produto com ligações alternadas 1,6 e 1,3, segundo Jeanes (1970), citado em Alsop (1983). O mecanismo proposto para a formação de ramificações é análogo ao mecanismo de reação do acceptor, proposto por Robyt e Walseth (1978), previamente apresentado. Neste caso, a dextrana livre em solução se liga à cadeia em crescimento através do ataque nucleofílico de seu C₃ ao C₁ na extremidade redutora da cadeia, liberando a dextrana do complexo. Este mecanismo foi confirmado por experimentos laboratoriais, entretanto não foram realizados testes em escala industrial.

2.4.5 - Ação da dextrana-sacarase sobre a sacarose em condições industriais

Testes de produção *in vitro* de dextrana em escala industrial foram efetuados a pH 5.2. A enzima utilizada foi obtida previamente por fermentação, segundo procedimento descrito anteriormente, com adição de sacarose a um taxa de 20g/l/h. Notou-se o aparecimento de uma pequena quantidade de frutose e leucrose no meio reacional, entretanto o efeito destes carboidratos como aceptores foram ignorados no experimento em questão (Alsop,1983). O desenvolvimento de técnicas analíticas, tais como cromatografia líquida dentre outras, permitiu o estudo do efeito de vários parâmetros na conversão de sacarose em dextrana em escala industrial, tendo sido encontrado como parâmetro mais importante de controle do rendimento e peso molecular a concentração de sacarose. A tabela a seguir apresenta os rendimentos dos carboidratos envolvidos na síntese de dextrana a várias concentrações de sacarose:

Tabela 2.1 - Rendimentos das frações de carboidratos obtidos na síntese in vitro de dextrana variando-se a concentração de sacarose (g / 100 g de sacarose)-(Alsop,1983).

Sacarose (% W/ V)	Mono sacarídeos	Di sacarídeos	Dextrana Total	Dextrana alto PM	Dextrana baixo PM
2	52.2	1.9	45.9	45.9	0
4	50.0	4.4	45.6	45.6	0
5	51.3	4.3	44.4	44.4	0
10	51.2	6.8	42.0	39	3.0
15	55.5	9.4	35.3	25.3	10.0
20	56.9	11.2	31.9	17.9	14.0

Analisando a tabela 2.1, observa-se que quanto maior a concentração de sacarose, maior a quantidade de dextrana de baixo peso molecular obtida, sendo o maior rendimento obtido para a concentração de 20 %. A concentração de leucrose (principal monossacarídeo) aumenta com o aumento da quantidade de dextrana de baixo peso molecular produzida. A quantidade de dextrana de baixo peso molecular bem como de oligossacarídeos aumentam consideravelmente para concentrações de sacarose acima de 10 %.

Bazán (1993) realizou uma série de ensaios em escala laboratorial para produção de dextrana clínica via reação enzimática variando parâmetros como R ($[\text{acceptor}]/[\text{sacarose}]$), concentração de sacarose, e temperatura. Ensaios preliminares foram realizados utilizando-se maltose como acceptor, sendo posteriormente realizados ensaios mais conclusivos utilizando dextrana de baixo peso molecular (4676 daltons) como acceptor.

Através da análise dos efeitos dos parâmetros estudados por Bazán (1993), realizada através do estudo de superfície de resposta, verificou-se que a concentração de sacarose é a variável que mais influencia o processo, sendo que altas concentrações favorecem a produção da dextrana clínica. Já a relação R , tem influência semelhante na concentração de sacarose, porém em menor grau, sendo observado que o aumento de R favorece o rendimento. A temperatura é a variável de menor influência, embora tenha sido notado que a diminuição da mesma favorece a formação de dextrana clínica.

Zafar e Barker (1988) realizaram um estudo de síntese enzimática utilizando um reator cromatográfico, no qual resultados obtidos experimentalmente foram comparados com resultados obtidos em simulações do sistema proposto, tendo como objetivo prever o comportamento do reator com base em parâmetros básicos, tais como constante de Michaelis-Menten e coeficientes de distribuição. A idéia da utilização do reator cromatográfico é baseada na diferença de afinidade entre os componentes da fase estacionária e fase móvel, possibilitando assim a separação do produto, reduzindo com isto os custos de purificação. O modelo proposto por Zafar e Barker (1988) considera a dispersão axial infinita, sendo o reator aproximado a um tanque agitado. O sistema proposto nada mais é que uma coluna preenchida com resina, onde dextrana-sacarase é alimentada continuamente e pulsos de sacarose são injetados no sistema. A medida da eficiência do reator revelou um consumo maior de enzima que o obtido em processos convencionais. Os cromatogramas obtidos apresentam picos de sacarose e dextrana muito próximos, o que compromete a aplicabilidade do processo. Entretanto estes fatos podem ser alterados pela troca da resina. Quanto a simulação, a utilização de picos baixos de sacarose apresenta resultados concordantes com os experimentais, entretanto desvios são observados para picos elevados de sacarose. Neste caso, correções são feitas no modelo, que assume que a sacarose é injetada no sistema em solução de dextrana-sacarase de mesma concentração que a eluída continuamente pela coluna.

Souza (1993) propôs a síntese enzimática de dextrana utilizando o processo CARE, tendo obtido experimentalmente as isotermas de adsorção da enzima em DEAE- Celulose e os parâmetros da equação de Langmuir. A DEAE Celulose foi escolhida dentre três resinas testadas, pois esta se mostrou a mais adequada para adsorção da enzima. Os resultados obtidos em simulação com o modelo proposto mostraram grande perda de enzima, o que foi atribuído ao fato do sistema não atingir o estado estacionário. O modelo de Souza (1993) considera a reação de adsorção de 2ª e a de dessorção de 1ª ordem, sendo a etapa de adsorção muito mais lenta que a de dessorção. Um segundo estudo, do mesmo processo realizado por Currello (1998), engloba a análise das variáveis que mais afetam o processo, além do efeito do tampão de dessorção. Uma análise de superfície de resposta dos dados obtidos envolvendo os parâmetros rendimento de dextrana, concentração dos constituintes do tampão de dessorção, concentração de sacarose e quantidade de enzima retida, além de

produtividade levam a conclusão que o tempo de residência no reator de adsorção tem influência significativa sobre todas as respostas, principalmente sobre a produtividade, variável sobre a qual o aumento do tempo de residência no estágio de adsorção tem efeito negativo. A retenção enzimática, entretanto, é favorecida pelo aumento do tempo de residência no estágio de adsorção. Estes efeitos dificultam a otimização do processo, já que a variável em questão tem efeito contrário entre estas duas respostas, as quais são de grande interesse. Com as respostas analisadas foram obtidos modelos quadráticos para produtividade, rendimento e retenção da enzima.

2.4.6 - Purificação enzimática e Imobilização

A síntese enzimática pode ser realizada utilizando a enzima na forma livre e na forma imobilizada. Monsan e Lopez (1981) realizaram um estudo comparativo entre estes dois tipos de síntese, sob as mesmas condições. Foram notadas limitações difusionais durante a reação enzimática, as quais são fortemente dependentes do suporte utilizado. Foi observada também a tendência de formação de dextrana de alto peso molecular, devido a ligação de unidades de glicose às cadeias pré-existentes. A síntese de dextrana clínica foi obtida utilizando-se maltose como acceptor, sendo a distribuição do peso molecular obtida nesta última, menos dispersa que a obtida quando a dextrana clínica é obtida via hidrólise de dextrana nativa.

Segundo Monsan e Lopez (1981), quanto menor a superfície específica melhor é a imobilização da enzima, devido a importância da difusão interna. Vale também ressaltar que a síntese *in vitro*, utilizando-se enzima livre, segue a cinética de Michaelis-Menten, enquanto que para a síntese com enzima imobilizada devem ser considerados os desvios deste modelo, que ocorrem devido ao aumento da viscosidade durante a síntese. Esse fato também dificulta a recuperação do suporte após a síntese. Entretanto, o aumento da viscosidade não é observado na presença de aceptores, pois neste caso a dextrana sintetizada é de baixo peso molecular. Sendo assim, a síntese de dextrana clínica com enzima imobilizada é uma alternativa viável e interessante, embora existam poucos trabalhos publicados referentes a este processo. As condições ótimas de síntese (temperatura e pH) não são influenciadas pela

imobilização. O maior problema encontrado é o aumento da viscosidade no interior dos poros, o que favorece o crescimento da cadeia. A resistência difusional devida a esse mecanismo é similar àquela apresentada em sínteses com inibição pelo produto. Quanto a síntese de dextrana clínica, a utilização de enzima imobilizada, ou livre com aceptores (maltose por exemplo) são similares no tocante às condições de síntese, entretanto a síntese com enzima imobilizada permite a utilização de um processo contínuo, além de permitir a produção simultânea de açúcares de alto poder adoçante e grande valor agregado tais como frutose.

Estudos realizados por Kaboli e Reilly (1980), citados em Bazán (1993), levam a conclusão de que a atividade enzimática é reduzida com a imobilização, sendo o melhor suporte encontrado, a sílica. Quanto mais porosa a sílica, menor é fixação da enzima, sendo a dextrana-sacarase uma enzima de difícil imobilização a qual é facilitada pela adição de maltose. Alsop (1983) realizou testes em escala piloto obtendo consumo de 100 % do substrato utilizado na produção de dextrana. Entretanto o autor não revela as condições de teste ou mesmo o suporte utilizado. Quanto às propriedades da enzima, foram notadas apenas pequenas variações quanto a estabilidade.

2.5 - Redes Neurais

2.5.1 - Introdução

Redes neurais são modelos computacionais com capacidade de aprender ou adaptar-se. São baseadas no sistema neurológico humano e sua operação é baseada em processamento paralelo, derivado do modelo paralelo distribuído (PDP). Em uma rede artificial, as unidades (neurônios) de processamento simples se comunicam entre si enviando sinais através de um grande número de pesos (conexões). Para cada célula (neurônio) é atribuída uma ativação (*output*). Para cada conexão é atribuído um peso, o qual determina o efeito do sinal da unidade j (*input*) na unidade i (*output*) através de uma regra de propagação. A figura a seguir apresenta a estrutura de uma rede neural:

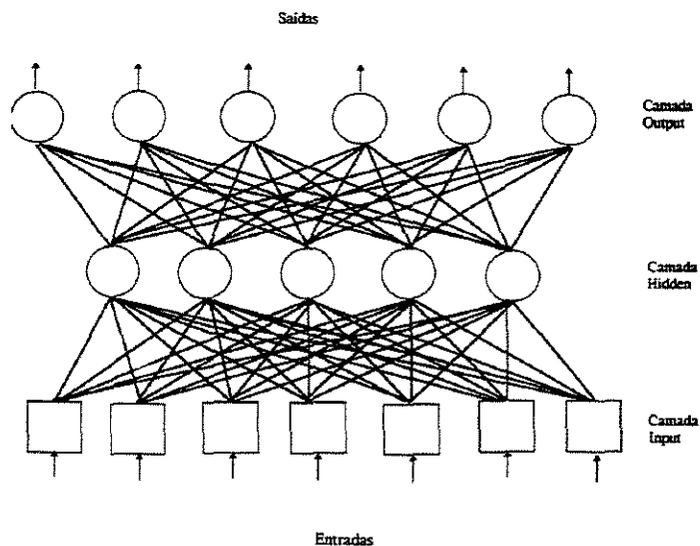


Figura 2.5 – Estrutura de uma rede neural.

A rede apresentada na figura 2.5 é composta de três camadas de neurônios: *input*, *hidden* e *output*. Quando estas camadas são conectadas na forma *feed-forward* as informações são passadas do *input* para a *hidden* e daí para o *output*. A rede apresentada na

figura 2.5 possui apenas uma camada *hidden*, entretanto pode-se trabalhar com redes com duas ou mais camadas *hidden*.

2.5.2 - Unidades de processamento:

Os neurônios ou unidades de processamento têm como função transformar o *input* em *output* (calculado). Existem três tipos básicos de unidades de processamento:

camada input: recebe os dados externos

camada output: envia os dados para fora do sistema

camada intermediária (hidden): recebe e envia dados internos ao sistema

As várias unidades trabalham simultaneamente e durante a operação, as mesmas podem ser atualizadas sincronicamente (atualização simultânea de todas as unidades) ou anasincronicamente (cada unidade é atualizada a um dado tempo t).

2.5.3 - Conexão entre as unidades:

Cada unidade fornece uma contribuição ao *input* da unidade a qual está conectada, gerando um *output*. O *input* total é dado pela somatória dos *outputs* individuais mais um termo externo denominado *bias*, conforme equação a seguir:

$$i_i(t) = \sum_j w_{ij}(t)a_j(t) + \theta_i(t) \quad (2.31)$$

com

$w_{ij} > 0$ (excitação)

$w_{ij} < 0$ (inibição)

Onde:

i, j = a unidade a que se refere (i, j)

i_i = *input* de um conjunto de neurônios

a_j = valores de ativação do elemento i da rede dado o vetor *input*

w_{ij} = peso da conexão da unidade j para i

θ_i = *input bias* *o(off set)* da unidade i

2.5.4 - Ativação e regras de saída

A função F_i fornece o efeito da ativação no *input* total da unidade, produzindo um novo valor de ativação $a_i(t+1)$ para a unidade i dado por:

$$a_i(t+1) = F_i(a_i(t), i_i(t)) \quad (2.32)$$

Freqüentemente a ativação é uma função não decrescente do *input* total da unidade dado por:

$$a_i(t+1) = F_i(i_i(t)) = F_i\left(\sum_j w_j(t)a_j(t) + \theta_i(t)\right) \quad (2.33)$$

Normalmente a função F_i é dada por uma função sigmoidal (forma de S) como apresentado a seguir:

$$F(i_i) = \frac{1}{1 + e^{-i_i}} = a_i \quad (2.34)$$

Em alguns casos o *output* pode ser uma função estatística. Neste caso a ativação é determinada por uma função probabilística dada por:

$$p(a_i \leftarrow 1) = \frac{1}{1 + e^{-i_i/T}} \quad (2.35)$$

Onde:

T = parâmetro que determina a inclinação da função probabilidade

2.5.5 - Topologia

A topologia da rede determina o número de neurônios em cada uma das camadas (*input*, *hidden* ou *output*). O número de neurônios na camada *input* está relacionado com os dados de entrada da rede, ou seja informações fornecidas para a rede. O número de neurônios na camada *output* está relacionado com a saída da rede, ou seja dados preditos pela rede. Já o número de neurônios na camada *hidden*, bem como o número de camadas *hidden*, é determinado durante o treinamento da rede.

2.5.6 - Treinamento da rede

O treinamento da rede consiste em configurar a rede para um dado conjunto de dados de entrada com a finalidade de obter a saída (*output*) desejada. Para treinar a rede podem ser utilizados conhecimentos prévios ou alguma regra de aprendizagem. A rede é treinada através do ajuste de pesos das conexões entre as unidades de acordo com uma regra de modificação. O treinamento, ou aprendizagem da rede pode ser de dois tipos:

Supervisionado ou associativo: tanto o *input* quanto o *output* são fornecidos

Não supervisionado (auto-organizado): a unidade de *output* é treinada para responder aos *inputs*, isto pode ser feito estatisticamente.

2.5.7 - Modificação dos padrões de conectividade

O modelo básico de ajuste de pesos é o Modelo de Hebbian (*Hebbin Learning Rule*), o qual utiliza duas unidades i e j simultaneamente ativas. Se i recebe o *input* de j temos:

$$\Delta w_{ij} = \gamma a_i a_j \quad (2.36)$$

Onde:

γ = taxa de aprendizagem da rede (constante positiva)

Outra regra bastante utilizada que leva em conta a diferença entre a ativação real e a desejada é a de Widrow -Hoff dada por:

$$\Delta w_{ij} = \gamma (d_i - a_i) a_j \quad (2.37)$$

Onde:

d_i = *ith* elemento do output desejado para rede

2.5.8 - Terminologia

output vs ativação: *output* é igual a ativação (a saída de um neurônio é igual a ativação)

bias, off set, threshold: são termos constantes e independentes do conjunto de entrada da rede, geralmente são implementados com pesos de valor unitário.

número de camadas: a rede pode ter duas ou mais camadas, para redes *feed-forward* a camada *input* não é computada

aprendizagem vs armazenagem: métodos de aprendizagem são baseados na minimização do erro, enquanto métodos de armazenagem se referem a determinação dos parâmetros (pesos da rede).

2.5.9 - Regra de aprendizagem e teorema de convergência

O treinamento da rede é realizado como descrito a seguir:

- 1) atribua pesos para as conexões randomicamente
- 2) selecione um vetor *input* \underline{x} dentre as amostras disponíveis para treinamento
- 3) se o *output* fornecido pela rede for diferente do desejado, o método fornecerá uma resposta incorreta, e os pesos devem ser modificados de acordo com a regra Delta:
- 4) Volte para o passo 2

O procedimento é muito similar à regra de Hebb, a diferença é que quando a rede responde corretamente não são feitas modificações nos pesos. Além das modificações nos pesos, deve-se também modificar o limitante θ , o qual é considerado uma conexão w_0 entre neurônio *output* e um neurônio nulo sempre em atividade: $\phi_0 = 1$.

Teorema da convergência: se existe um grupo de conexões de peso w^* , o qual é capaz de executar a transformação T , onde os dados de *input* são transformados corretamente em *output*, a regra de aprendizagem da rede irá convergir para uma solução (a qual pode ser ou não a mesma que w^*) em um número finito de passos para quaisquer que sejam os pesos iniciais.

2.5.10 - Regra delta

Trata-se de uma generalização do método de aprendizagem, utilizando-se o método dos mínimos quadrados. A técnica pode ser estendida a *inputs* e *outputs* contínuos. A regra tem sido aplicada principalmente para *outputs* puramente lineares. Para uma rede com um *output*, o mesmo é dado por:

$$a = \sum_j w_j x_j + \theta \quad (2.38)$$

Onde:

x_j = padrão do vetor *input*

θ = *bias* da unidade

A função erro (mínimos quadrados) é dada por:

$$E = \sum_p E^p = 1/2 \sum_p (d^p - a^p)^2 \quad (2.39)$$

Onde:

E^p = erro do *output* da rede, dado o vetor *input* p

E = somatória dos erros

d^p = *output* desejado dado o *input* p

a^p = valores de ativação da rede dado o *input* p

O método encontra o valor dos pesos que minimiza a função erro utilizando o método do gradiente descendente. Este método realiza alterações nos pesos proporcionalmente à negativa da derivada do erro no padrão corrente, para cada peso.

2.5.11 - Backpropagation

Os métodos que utilizam *backpropagation* consistem na generalização do erro. Os erros da camada intermediária são determinados pela retropropagação dos erros da camada *output*. Este método é utilizado para sistemas multicamadas de funções não lineares.

Trabalhando com backpropagation

- 1) apresentação do *input* e propagação do mesmo através da rede para cálculo do *output* para cada unidade
- 2) passagem de volta através da rede (*backpropagation*) propagando o erro e ajustando os valores dos pesos

O sinal de erro para a camada intermediária, é determinado recursivamente em termos do sinal de erro das unidades diretamente conectadas, e o peso destas unidades.

O procedimento de aprendizagem requer que a alteração no peso seja proporcional a $\frac{\partial E^p}{\partial w}$, sendo a taxa de aprendizagem a constante de proporcionalidade γ . A taxa de aprendizagem deve ser a maior possível. Para evitar oscilação e a alteração de peso, deve-se levar em consideração a alteração anterior de peso. Isto é feito pela adição de um termo de momento.

A não utilização do método dos momentos faz com que o processo seja mais demorado. Taxas muitas altas podem não convergir para o mínimo devido à oscilação na rede. A ordem de apresentação do *input* para a rede é importante e pode ser utilizado o método de permuta e transformações tais como séries de Fourier.

2.5.12 -Deficiências e aplicações da *backpropagation*

Uma das principais deficiências do método é o fato de o treinamento ser lento e demorado, o que em alguns casos pode ser atribuído a utilização de taxas de aprendizagem e momentos inadequados. Muitos algoritmos possuem adaptações que permitem otimizar a taxa de aprendizagem. As principais falhas oriundas do método são: encontro de um mínimo local e paralisação da rede, definidas a seguir:

Paralisação da rede: pode ocorrer devido a ajustes de pesos com valores elevados . Isso faz com que o *input* total para a camada intermediária (*hidden*), ou para a camada *output* assumam valores muito altos (positivos ou negativos). Devido ao fato de a função de ativação ser sigmoideal, a unidade terá uma ativação muito próxima de 1 ou de zero, sendo assim os ajustes podem se tornar muito próximos de zero e o treinamento se torna virtual.

Mínimo Local: a superfície de erro de uma rede complexa é cheia de irregularidades (poços e morros). Devido ao gradiente descendente, a informação pode ficar presa em mínimo local quando há mínimos “mais profundos“ nas vizinhanças. Métodos probabilísticos podem evitar os mínimos locais, entretanto são mais lentos. Outra forma de contornar este problema é o aumento do número de camadas intermediárias.

Aplicações da backpropagation

O método de *backpropagation* pode ser aplicado, a princípio a qualquer sistema multicamada. Algumas aplicações específicas, tais como conversão da escrita em fala e classificação de sinais sonoros, são citadas na literatura.

Na Engenharia Química, pode ser utilizada para predição do comportamento de qualquer sistema e ou unidade principalmente quando há dificuldades na modelagem determinística ou quando o tempo de processamento para a simulação do processo é elevado.

3.1 Introdução

O processo CARE (*Continuous Affinity Recycle-Extraction*) foi proposto originalmente por Pungor et al. (1987) como um processo alternativo para separação e purificação de proteínas. Desde então, o processo CARE tem sido objeto de estudo visando várias aplicações, dentre elas destaca-se a síntese enzimática de bioprodutos.

Uma modelagem para este processo, é apresentada no trabalho de Rodrigues et al. (1992), para purificação de proteínas, apresentando o balanço de massa para a proteína livre e adsorvida. As equações apresentadas por Rodrigues et al. (1992) não apresentam termos referentes a transferência de massa no filme líquido ou a difusão no interior dos poros da resina adsorvente. Segundo os autores foi utilizado o modelo de adsorção proposto por Chase (1984), no qual estes parâmetros estão englobados pela constante cinética de dessorção. No caso de síntese de bioprodutos, além da cinética de adsorção deve ser levado em conta a reação enzimática.

Posteriormente, Souza (1993) estudou o mesmo sistema para a síntese enzimática de dextrana. A figura a seguir apresenta um esquema do processo CARE para síntese de dextrana:

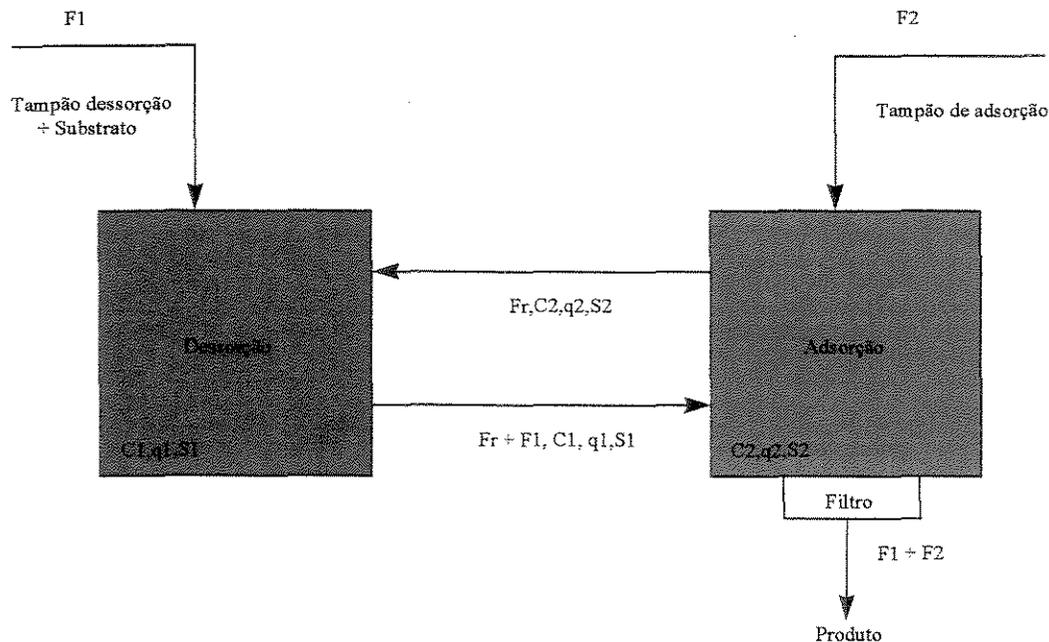


Figura 3.1 - Esquema de um reator duplo estágio para síntese de dextrana baseado no processo CARE.

3.2 – Modelagem do o reator duplo estágio

No sistema proposto por Souza (1993), o primeiro estágio do sistema é o tanque de dessorção. O estágio de dessorção recebe alimentação contínua de substrato e do tampão de dessorção. Já o segundo estágio é o tanque de adsorção. Este estágio recebe alimentação do tampão de adsorção e tem a função de manter a enzima no sistema. O processo opera continuamente, sendo a enzima adsorvida no estágio 2 e dessorvida no estágio 1, onde ocorre a reação enzimática com a enzima livre em solução.

Uma corrente de refluxo promove o transporte de um tanque ao outro, sendo o produto continuamente removido no estágio de adsorção e a enzima reciclada no sistema. Souza (1993) apresenta um modelo matemático para o sistema apresentado na figura 3.1, sendo o mesmo baseado no modelo proposto por Rodrigues et al. (1992). A modelagem matemática proposta por Souza (1993) considera ambos os tanques reatores perfeitamente agitados e de volume constante. Sendo assim, a vazão efluente do sistema será igual a soma das vazões de alimentação do mesmo. Quanto a cinética enzimática para a síntese de dextrana, a mesma segue o modelo de Michaelis-Menten. Já em relação a adsorção da

enzima, a mesma segue o modelo de Langmuir, sendo a adsorção uma reação de segunda ordem e a dessorção uma reação de primeira ordem.

Como não há remoção de sólido no sistema, a fração líquida é constante. O modelo proposto por Souza (1993) não considera as resistências à transferência de massa no modelo de adsorção ou a influência dos tampões de adsorção e dessorção. Inicialmente foi desenvolvido um modelo para o sistema duplo estágio, baseado no trabalho de Souza (1993). A modelagem do reator duplo estágio é apresentada a seguir:

3.2.1- Balanço de massa para o tanque 1 (dessorção)

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R C_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (3.1)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad (3.2)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (3.3)$$

3.2.2 - Balanço de massa para o tanque 2 (adsorção)

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_r C_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_2} + [k_2 q_2 - k_1 C_2 (q_m - q_2)] \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (3.4)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 q_1}{V_2} - \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_2} + [k_1 C_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2] \quad (3.5)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 S_1}{V_2} - \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_2} - \frac{K C_2 S_2}{K_m + S_2} \quad (3.6)$$

Para as equações do modelo são válidas as seguintes relações:

$$\varepsilon = \frac{\text{volume de liquido}}{\text{volume total}} \quad 1 - \varepsilon = \frac{\text{volume de solidos}}{\text{volume total}} \quad \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} = \frac{\text{volume de solidos}}{\text{volume de liquido}}$$

3.3 - Modelagem do reator triplo estágio

Souza (1993) realizou diversas simulações utilizando o modelo apresentado no item 3.2. De acordo com os resultados obtidos, um dos maiores problemas do processo proposto é a alta taxa de perda enzimática, o que poderia ser minimizado pelo aumento do tempo de residência no estágio de adsorção. Entretanto, o ajuste entre os tempos de residência nos dois estágios é difícil, pois a obtenção de um alto consumo de substrato no tanque de dessorção implica em baixo tempo de residência no estágio de adsorção, o que prejudica a retenção enzimática (Currello et al., 1998).

Maugeri et al. (1997), ainda para separação de bioprodutos, propuseram uma alteração no processo CARE adicionando ao sistema um estágio de lavagem, ficando o sistema então com três tanques agitados.

Visando o aumento do tempo de residência na etapa de adsorção, neste trabalho é proposto um sistema onde um estágio intermediário de adsorção é adicionado ao modelo duplo estágio proposto por Souza (1993). O sistema proposto pode ser visualizado na figura a seguir:

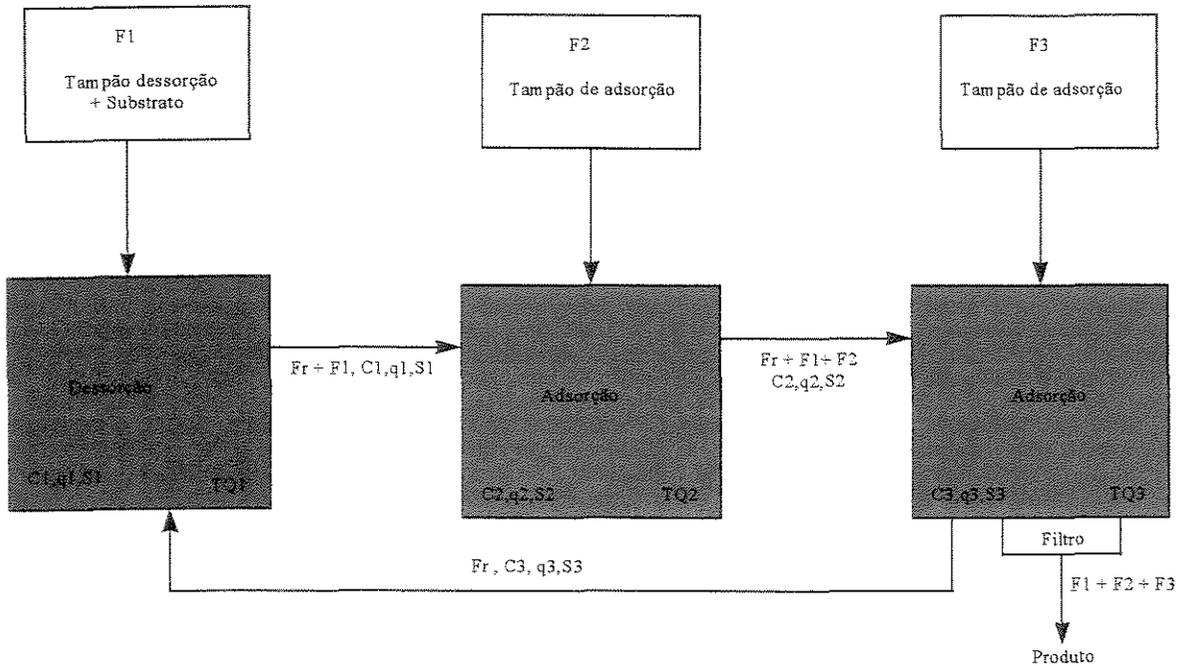


Figura 3.2 - Esquema de um reator triplo estágio para síntese de dextrana

A modelagem do sistema apresentado na figura 3.2 é apresentada a seguir:

3.3.1 - Balanço de massa para o tanque 1 (dessorção)

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_3 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R C_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (3.7)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_R q_3 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad (3.8)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_R S_3 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (3.9)$$

3.3.2 - Balanço de massa para o tanque 2 (adsorção)

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_r C_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_2} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} [k_2 q_2 - k_1 C_2 (q_m - q_2)] \quad (3.10)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 q_1}{V_2} - \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) q_2}{V_2} + [k_1 C_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2] \quad (3.11)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 S_1}{V_2} - \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_2} - \frac{K C_2 S_2}{K_m + S_2} \quad (3.12)$$

3.3.3 - Balanço de massa para o tanque 3 (adsorção)

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{F_r C_2 \varepsilon}{V_3} + \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_3} - \frac{(F_1 + F_2 + F_3) C_3}{V_3} - \frac{F_R C_3 \varepsilon}{V_3} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} [k_2 q_3 - k_1 C_3 (q_m - q_3)] \quad (3.13)$$

$$\frac{dq_3}{dt} = \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_3} + \frac{(F_1 + F_2) q_2}{V_3} - \frac{F_R q_3 \varepsilon}{V_3} + [k_1 C_3 (q_m - q_3) - k_2 q_3] \quad (3.14)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_3} + \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_3} - \frac{F_R S_3 \varepsilon}{V_3} - \frac{(F_1 + F_2 + F_3) S_3}{V_3} - \frac{K C_3 S_3}{K_m + S_3} \quad (3.15)$$

3.4 – Resultados

Os modelos apresentados nos itens 3.2 e 3.3 foram resolvidos numericamente utilizando-se o método de Runge Kutta de 4ª ordem. Devido ao fato do sistema de equações ser rígido foi necessário um ajuste do passo integração, tendo sido encontrado um valor bastante pequeno (1×10^{-5}). Para a simulação dos reatores duplo e triplo estágio foram utilizadas as seguintes constantes:

Tabela 3.1 – Constantes utilizadas para simulação dos reatores duplo e triplo estágio

$q_m = 519,751 \text{ g l}^{-1}$	$k_1 = 7,11 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$K = 186,98 \text{ h}^{-1}$
$K_d = 0,4975 \text{ g l}^{-1}$	$k_2 = 3,54 \text{ h}^{-1}$	$T = 25 \text{ }^\circ \text{C}$
$K_m = 5,12 \text{ g l}^{-1}$	$k_3 = 1000 \text{ h}^{-1}$	$\text{pH} = 5,2$

As constantes acima foram extraídas do trabalho de Souza (1993), no qual os valores das constantes cinéticas de adsorção foram obtidos a partir do ajuste do modelo de adsorção (Langmuir) aos dados experimentais, e o valor da constante de dessorção (k_3) foi definido com base no trabalho de Rodrigues et al. (1992), sendo considerada dessorção instantânea.

A temperatura e o pH são considerados constantes na síntese enzimática de dextrana, visto ser o reator isotérmico, além de apresentar um pH e temperatura ótimos do ponto de vista cinético (reação enzimática). Os valores de pH e temperatura apresentados na tabela 3.1 são os valores ótimos para a reação em estudo.

3.4.1 - Sistema duplo estágio

Primeiramente, foi realizado um estudo paramétrico com o modelo duplo estágio, a fim de verificar a influência de cada uma das vazões e da fração líquida sobre o sistema. Com este estudo foi notado que as simulações reportadas por Souza (1993) e Currello (1998) foram realizadas utilizando-se o modelo simplificado (apêndice 1). Com este

modelo, ou seja considerando a adimensionalidade das vazões, as vazões de alimentação nos dois tanques são necessariamente iguais. O estudo paramétrico realizado com o modelo não simplificado mostrou que a utilização de vazões de alimentação diferentes, nos estágios de dessorção e adsorção para o sistema duplo estágio, leva a uma maior retenção enzimática, com aumento significativo do consumo de substrato em relação ao obtido quando se utilizam vazões iguais.

Outra variável que em muito influencia a retenção enzimática é a vazão de refluxo. Observou-se que quanto maior a vazão de refluxo, maior é a quantidade de enzima retida no sistema. Além das variáveis já mencionadas, há ainda a fração líquida do sistema. Verificou-se que quanto menor a fração líquida, ou seja, quanto maior a quantidade de resina no sistema, maior é a quantidade de enzima retida. Entretanto, a fração líquida não pode ser muito baixa, pois o modelo proposto baseia-se na hipótese de os tanques serem perfeitamente agitados. Com valores muito baixos de fração líquida, não se pode assegurar a validade desta hipótese. Para ilustrar as observações resultantes do estudo paramétrico efetuado com o modelo duplo estágio, foram realizadas as simulações apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Condições operacionais para o reator duplo estágio

Sim	ϵ	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_R (l/h)	C_0 (g/l)
Sim1	0,5	100	100	50	0,3
Sim2	0,5	100	100	100	0,3
Sim3	0,5	100	70	250	0,3
Sim4	0,6	100	70	250	0,3
Sim5	0,8	100	70	250	0,3

Diversas simulações foram feitas para se chegar na faixa de vazões apresentada na tabela 3.3. Sendo assim, os dados apresentados na tabela 3.2 constituem algumas das condições operacionais utilizadas para simular o reator duplo estágio. Nestas simulações, o volume de ambos os tanques foi considerado igual e sendo o volume total (volume de sólido + volume de líquido) de cada um dos tanques de 1000 litros. A utilização de um volume de 1000 litros para cada um dos tanques visa aproximar o sistema às condições operacionais industriais do processo, visto que uma das propostas deste trabalho é o estudo da viabilidade técnica da produção industrial de dextrana. As concentrações iniciais de

enzima adsorvida são nulas para ambos os tanques. A concentração inicial de enzima livre no tanque de dessorção é dada pela variável C_0 (tabela 3.2) e é nula no tanque de adsorção. A concentração inicial de substrato, no tanque 1, é igual a concentração de substrato na corrente de alimentação, e é nula no tanque de adsorção. O valor da concentração inicial de substrato é de 25 g/l (tanque 1) e a fração líquida do sistema é constante.

Com os resultados obtidos por simulação, foram confeccionados gráficos comparativos entre as diversas condições de operação. Estes gráficos são apresentados nas figuras 3.3; 3.4 e 3.5:

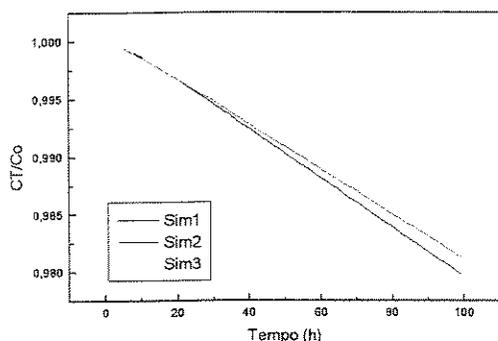


Figura 3.3 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima retida no sistema (reator duplo estágio).

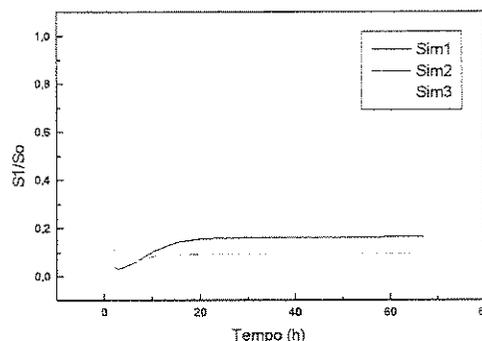


Figura 3.4 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no tanque de dessorção (reator duplo estágio).

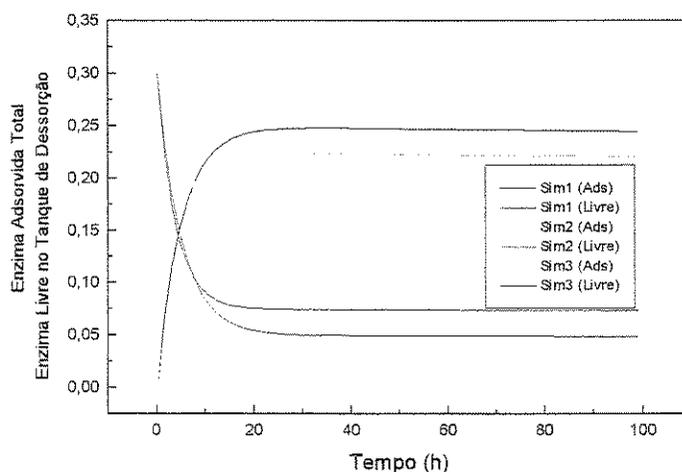


Figura 3.5 – Concentração de enzima total adsorvida no sistema e concentração de enzima livre no tanque de dessorção.

De acordo com os gráficos apresentados nas figuras 3.3 e 3.4 pode-se notar que a diminuição da vazão da alimentação no tanque 2, associada ao aumento da vazão de reciclo, favorecem não só a retenção enzimática no sistema mas também o consumo de substrato. A figura 3.5 apresenta os perfis de enzima livre e adsorvida em cada um dos tanques.

Observando o perfil de concentração de enzima livre no tanque de dessorção e de enzima adsorvida no sistema (figura 3.5), tendo em vista a hipótese de dessorção instantânea, pode-se considerar que toda a enzima contida no tanque de dessorção está livre (não adsorvida). Observa-se, como já era esperado, uma diminuição gradual de enzima livre no tanque de dessorção, bem como um aumento gradual de enzima adsorvida no tanque de adsorção. A condição operacional ótima do sistema visa alto rendimento, fator diretamente associado a uma elevada concentração de enzima livre no tanque de dessorção e uma alta retenção enzimática, o que implica em uma menor concentração de enzima adsorvida no tanque de adsorção, devido a concentração mais elevada no tanque de dessorção.

A comparação entre os gráficos 3.3, 3.4 e 3.5 permite verificar que a melhor condição operacional, dentre as três primeiras simulações com as condições operacionais apresentadas na tabela 3.2, é aquela referente a simulação de número 3. Com as condições operacionais da simulação de número 3, obtemos uma alta retenção enzimática e alto consumo de substrato. Voltando a análise do gráfico 3.5, observamos que as curvas referentes a concentração de enzima livre no tanque de dessorção e de enzima adsorvida no tanque de adsorção apresentam valores mais próximos entre si nas simulações 3 e 2, que o obtido com simulação 1. Dessa forma, em uma primeira análise pode-se dizer que quanto mais próximas estiverem as concentrações de enzima livre, no tanque de dessorção, e de enzima adsorvida, no tanque de adsorção, melhor será o desempenho do sistema em estudo. As simulações de número 4 e 5 visam a verificação da influência da fração líquida do sistema nos perfis de concentração do mesmo. As figuras 3.6 e 3.7 apresentam os mesmos gráficos comparativos apresentados nas figuras 3.3 e 3.4, incluindo a variação da fração líquida do sistema.

A análise dos gráficos apresentados nas figuras 3.6 e 3.7 leva a conclusão de que o aumento da fração líquida do sistema provoca um aumento na perda enzimática, devido ao aumento da quantidade de enzima livre nos tanques. Dessa forma, o consumo de substrato

no tanque de dessorção aumenta. Entretanto o aumento da perda enzimática pode inviabilizar economicamente o uso do sistema, devido ao alto custo da mesma.

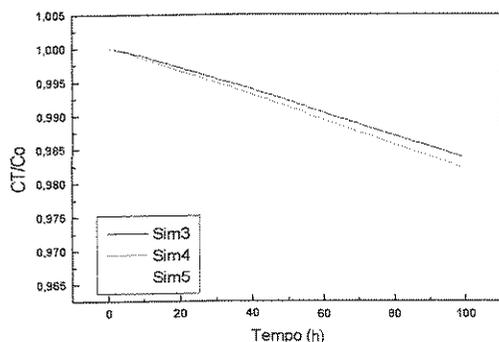


Figura 3.6 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima retida no sistema (reator duplo estágio).

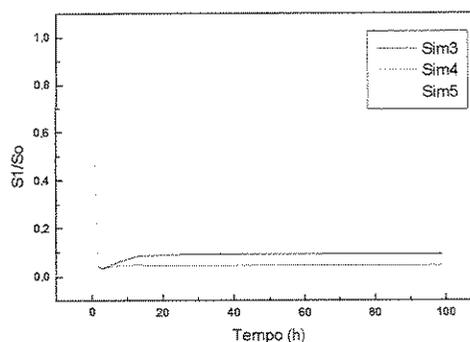


Figura 3.7 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no tanque de dessorção (reator duplo estágio).

3.4.2 Sistema triplo estágio

De forma semelhante ao estudo paramétrico realizado para o modelo duplo estágio, foi realizado também um estudo paramétrico para o modelo triplo estágio. O volume total de cada um dos tanques é novamente de 1000 litros. As condições iniciais para o tanque de dessorção são as mesmas que as utilizadas no modelo duplo estágio. As condições operacionais utilizadas para simular o modelo triplo estágio são apresentadas na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Condições Operacionais para o reator triplo estágio

Sim	ϵ	F1 (l/h)	F2 (l/h)	F3 (l/h)	FR (l/h)	Co (g/l)
Sim6	0,5	80	100	0	150	0,3
Sim7	0,5	100	50	50	150	0,3
Sim8	0,5	100	100	0	180	0,3
Sim9	0,5	100	80	0	150	0,3
Sim10	0,5	100	80	0	250	0,3
Sim11	0,5	100	70	0	250	0,3
Sim12	0,6	100	70	0	250	0,3

Através de simulações com o modelo de reator triplo estágio, utilizando os dados operacionais da tabela 3.3, foi possível determinar a influência de cada uma das vazões na performance do mesmo, bem como comparar a performance do reator triplo estágio com o modelo duplo estágio. Na simulação de número 7, a vazão de alimentação do segundo estágio foi dividida entre os tanques 2 e 3. Os resultados das simulações efetuadas para o modelo triplo estágio são apresentados nas figuras a seguir:

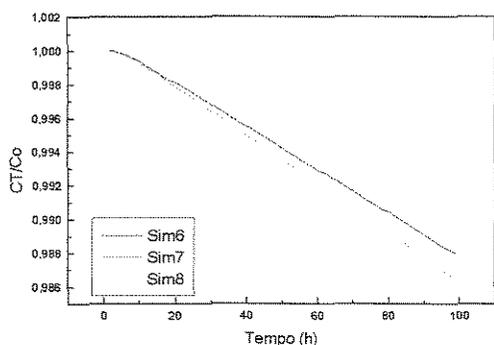


Figura 3.8 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima retida no sistema (reator triplo estágio).

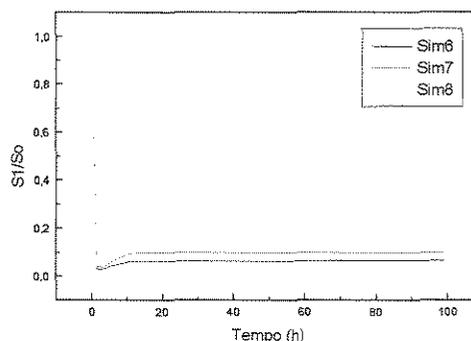


Figura 3.9 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no tanque de dessorção (reator triplo estágio).

A análise dos gráficos apresentados nas figuras 3.8 e 3.9 permite a verificação da influência das vazões de alimentação e refluxo, na performance do reator triplo estágio. Quanto maior a vazão de alimentação do tanque 1, maior é a perda enzimática. Através das curvas obtidas com simulações de números 7 e 8 verifica-se que o comportamento do sistema triplo estágio é muito semelhante ao obtido com o sistema duplo estágio. Nota-se pelo gráfico da figura 3.8 que a diminuição da vazão de alimentação do tanque 1 beneficia a retenção enzimática do sistema, bem como a divisão da corrente de alimentação para os tanques de adsorção (F_2 e F_3) em pouco influencia a performance do reator. Dessa forma, em termos operacionais é mais interessante utilizar um valor nulo para a alimentação do segundo estágio de adsorção, visto que esse procedimento implica em uma maior facilidade de controle do processo além de representar economia em termos de bombas e tubulações. Quanto menor a vazão de alimentação no estágio de dessorção, menor será a capacidade da planta, visto ser menor a quantidade de substrato alimentada no sistema.

As simulações de números 9 e 10 visam o estudo da influência da vazão de refluxo e da concentração de substrato na performance do sistema. Para a simulação 9 foi utilizada uma concentração de substrato 4 vezes maior que a utilizada na simulação 10, tendo sido mantida a concentração inicial de enzima no sistema. O resultado das simulações 9 e 10 são apresentados nas figuras a seguir:

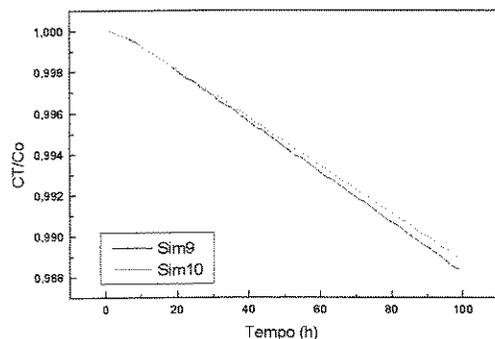


Figura 3.10 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima retida no sistema (reator triplo estágio).

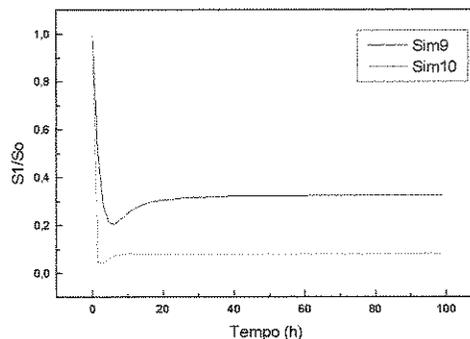


Figura 3.11 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no tanque de dessorção (reator triplo estágio).

Verifica-se, através das curvas apresentadas na figura 3.11, que o consumo de substrato na simulação de número 9 foi menor que o obtido na simulação 10. Já em relação a vazão de refluxo, o gráfico da figura 3.10 mostra que o aumento da mesma provoca uma pequena elevação na quantidade de enzima retida no sistema. Comparando-se os gráficos das figuras 3.3 e 3.10 nota-se que o sistema triplo estágio é menos sensível à vazão de refluxo que o sistema duplo estágio.

As simulações de números 11 e 12 visam verificar a influência da fração líquida do sistema no comportamento do reator triplo estágio.

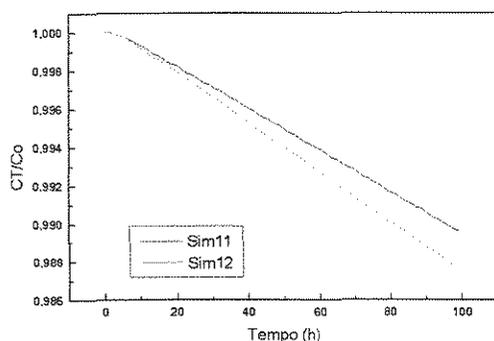


Figura 3.12 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima retida no sistema (reator triplo estágio).

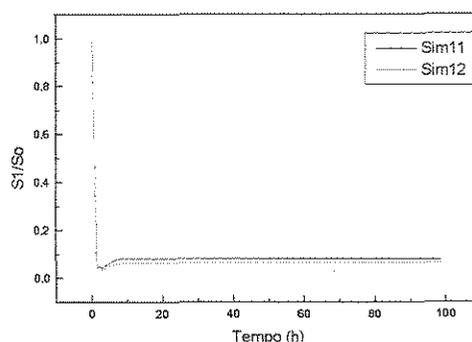


Figura 3.13 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no tanque de dessorção (reator triplo estágio).

Novamente, verifica-se através dos gráficos das figuras 3.12 e 3.13 que o aumento da porosidade do sistema (diminuição da quantidade de resina no sistema), eleva a perda enzimática, entretanto em pouco afeta o consumo de substrato no tanque de dessorção.

3.4.3 Comparação entre os sistemas duplo e triplo estágio

Com a finalidade de se verificar a influência do volume dos tanques no desempenho do sistema, as seguintes simulações foram realizadas:

Tabela 3.4 – Condições operacionais para o sistema duplo estágio

Sim	ε	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_R (l/h)	C_0 (g/l)	V_1 (l)	V_2 (l)
Sim13	0,5	100	70	250	0,3	500	500
Sim14	0,5	100	70	250	0,3	500	1000

Tabela 3.5 – Condições operacionais para os sistema triplo estágio

Sim	ε	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_3 (l/h)	F_R (l/h)	C_0 (g/l)	V_1 (l)	V_2 (l)	V_3 (l)
Sim15	0,5	100	70	0	250	0,3	500	500	500
Sim16	0,5	100	70	0	250	0,3	500	500	1000

Os resultados obtidos com as simulações de 13 a 16, bem como a comparação entre os modelos duplo e triplo estágio são apresentados nos gráficos a seguir:

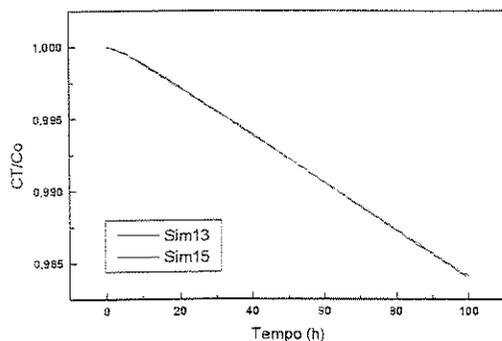


Figura 3.14 – Gráfico comparativo entre o modelo duplo e triplo estágio (enzima retida no sistema).

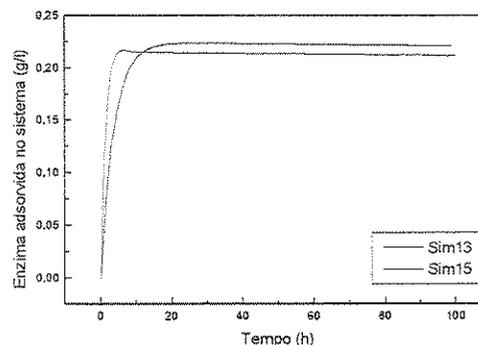


Figura 3.15 – Gráfico comparativo entre o modelo duplo e triplo estágio (enzima total adsorvida no sistema).

Através dos gráficos das figuras 3.14 e 3.15, verifica-se que a quantidade total de enzima adsorvida no sistema triplo estágio é menor que a quantidade total de enzima adsorvida no sistema duplo estágio. Já a quantidade de enzima retida no sistema para os dois modelos são praticamente idênticas. Vale ainda lembrar que a quantidade de enzima retida no sistema engloba não somente a enzima adsorvida, mas também a enzima livre no sistema. Entretanto, analisar somente a quantidade de enzima retida no sistema não é o suficiente para atestar a superioridade do sistema triplo estágio em relação ao duplo estágio, visto que o rendimento trata-se também de um fator importante do processo. Os gráficos a seguir apresentam os perfis de concentração de enzima livre e de consumo de substrato no tanque de dessorção para os sistemas duplo e triplo estágio:

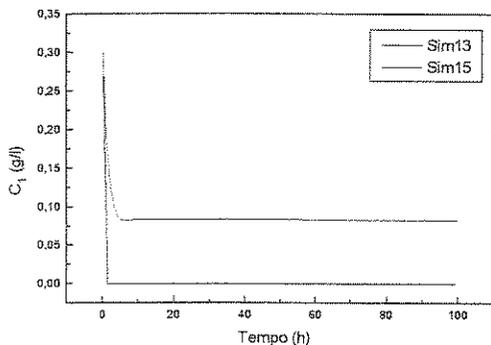


Figura 3.16 –Perfil de concentração de enzima livre no tanque de dessorção (sistema duplo e triplo estágio).

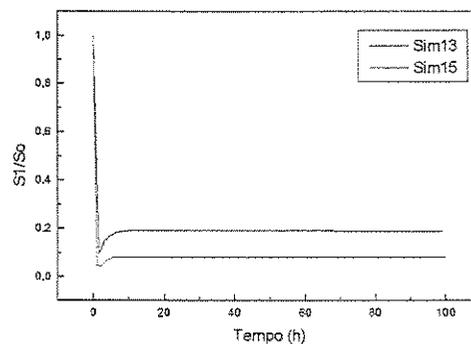


Figura 3.17- Perfil de consumo de substrato no tanque de dessorção (sistema duplo e triplo estágio).

Os gráficos apresentados na figuras 3.16 e 3.17 mostram que, apesar de apresentar menor quantidade de enzima adsorvida, o sistema triplo estágio apresenta maior quantidade de enzima livre no tanque de dessorção, o que acarreta maior consumo de substrato. Dessa forma, pode-se afirmar que o sistema triplo estágio é superior ao duplo estágio, não em termos de retenção enzimática no sistema, mas em termos de consumo de substrato. O sistema triplo estágio, referente a simulação 15, apresenta o dobro do volume destinado a adsorção que o sistema duplo estágio referente a simulação 13. Dessa forma, poderia se esperar que, dobrando o volume do tanque de adsorção no sistema duplo estágio fosse obtido, para este último, o mesmo desempenho do obtido com sistema triplo estágio. Os gráficos apresentados nas figuras 3.18 e 3.19 contradizem esta expectativa.

De acordo com os gráficos apresentados nas figuras 3.18 e 3.19, nota-se que a quantidade de enzima retida no sistema diminui para o sistema duplo estágio, quando se utiliza o mesmo volume para o estágio de adsorção do sistema triplo estágio. O mesmo acontece com a quantidade de enzima adsorvida.

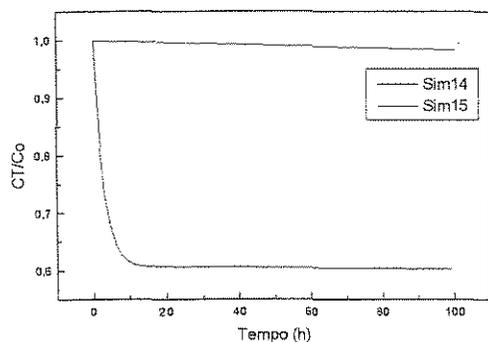


Figura 3.18 – Gráfico comparativo sistema duplo e triplo estágio (retenção enzimática).

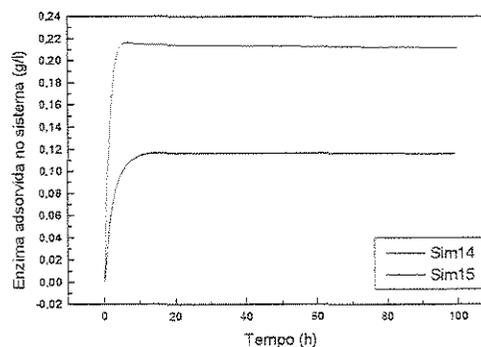


Figura 3.19- Gráfico comparativo sistema duplo e triplo estágio (enzima total adsorvida).

Os gráficos apresentados nas figuras 3.18 e 3.19 evidenciam que a quantidade de enzima retida no sistema, bem como a quantidade de enzima adsorvida no sistema não estão relacionadas apenas ao volume total do estágio de adsorção, mas também a configuração do sistema. Os gráficos a seguir apresentam o perfil de enzima livre e o consumo de substrato no estágio de dessorção:

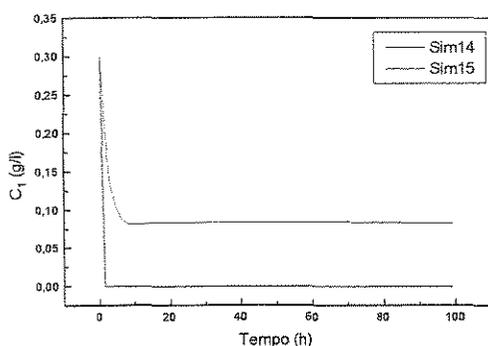


Figura 3.20 – Perfil de concentração de enzima livre no estágio de dessorção (sistema duplo e triplo estágio).

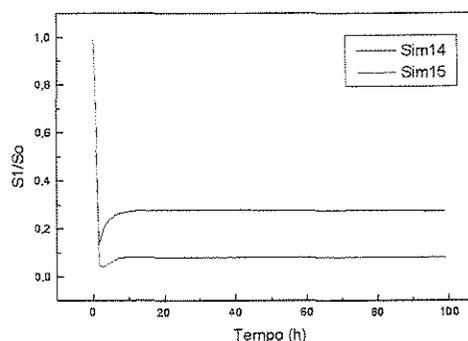


Figura 3.21 – Perfil do consumo de substrato (sistema duplo e triplo estágio).

Conforme pode ser visto nos gráficos das figuras 3.20 e 3.21, a quantidade de enzima livre no sistema duplo estágio é bem menor que a quantidade de enzima livre no

sistema triplo estágio, chegando a níveis muito próximos de zero. Conseqüentemente o consumo de substrato diminui. Os gráficos apresentados nas figuras de 3.18 a 3.21 mostram que a adição de um estágio extra de adsorção no sistema aumenta o consumo de substrato, ou seja aumenta o rendimento do processo. A simulação de número 16 visa a análise da performance do sistema triplo estágio quando se aumenta o volume do segundo estágio de adsorção. Os resultados são apresentados a seguir:

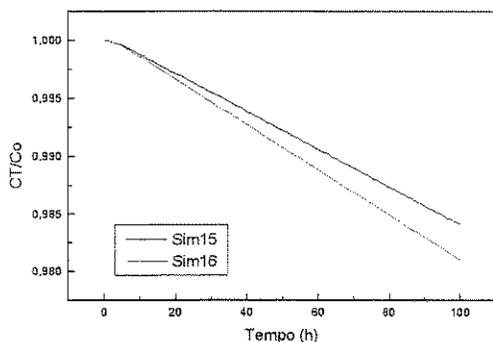


Figura 3.22 – Gráfico comparativo do sistema triplo estágio com volumes diferentes para os estágios de adsorção.

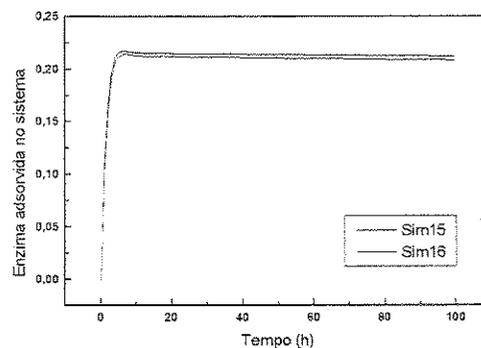


Figura 3.23 - Gráfico comparativo do sistema triplo estágio com volumes diferente para os estágios de adsorção.

Conforme os gráficos das figuras 3.22 e 3.23 o aumento de volume do segundo estágio de adsorção diminui a quantidade de enzima retida no sistema. Os gráficos a seguir apresentam o perfil de concentração de enzima livre e o consumo de substrato no estágio de dessorção:

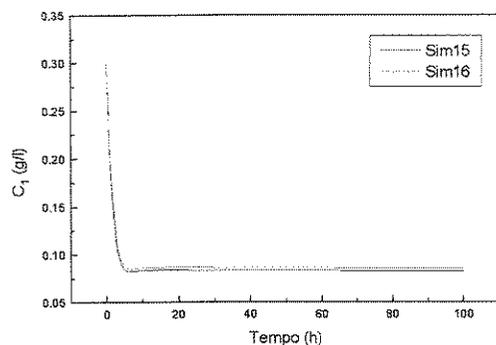


Figura 3.24 – Perfil de enzima livre no estágio de dessorção para o reator triplo estágio, com volumes diferentes para os estágios de adsorção.

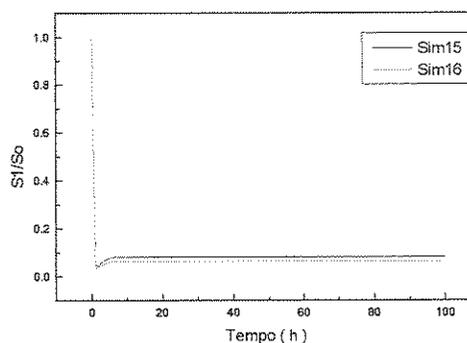


Figura 3.25 - Consumo de substrato no estágio de dessorção para reator triplo estágio, com volumes diferentes para o estágio de adsorção.

Como pode ser visto na figura 3.24 o perfil de enzima livre no estágio de dessorção é ligeiramente maior quando se utiliza um volume maior para o segundo estágio de adsorção. Conseqüentemente, o consumo de substrato será também ligeiramente maior, visto que a reação enzimática ocorre no estágio de dessorção.

3.4.4 - Estudo da influência das concentrações de substrato na corrente de alimentação e da concentração inicial de enzima no tanque de dessorção utilizando o modelo duplo estágio

A partir da simulação de número três (tabela 3.2), a que apresentou os melhores resultados para o sistema duplo estágio, foram estudadas a influência da concentração de substrato na corrente de alimentação e a concentração inicial de enzima no tanque de dessorção. As vazões de alimentação, fração líquida e volume do sistema permanecem inalterados em relação a simulação de número 3. Os valores de concentração inicial de sacarose no tanque de dessorção permanecem idênticos às concentrações da corrente de alimentação. A tabela 3.6 apresenta os valores de concentração inicial de enzima e substrato para o sistema duplo estágio.

Tabela 3.6 – Concentrações iniciais (modelo duplo estágio)

Sim	So (g/l)	Co (g/l)
Sim17	10	0,3
Sim18	50	0,3
Sim19	75	0,3
Sim20	25	0,10
Sim21	25	0,25
Sim22	25	0,50
Sim23	25	0,75

O gráfico da retenção enzimática obtido com as simulações de 17 a 19 corresponde àquele apresentado na figura 3.3, mais precisamente à curva obtida com a simulação de número 3. Este gráfico não é apresentado, pois as curvas obtidas para as simulações de 17 a 19 são coincidentes à curva obtida para a simulação 3, já que não foram alteradas as vazões e a concentração inicial de enzima. Os resultados obtidos com as simulações de 17 a 23 são apresentados a seguir:

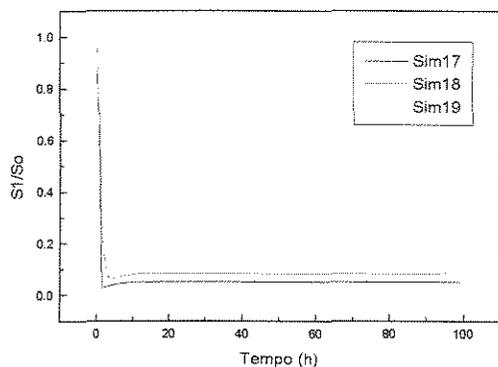


Figura 3.26- Gráfico comparativo do consumo de substrato (reator duplo estágio).

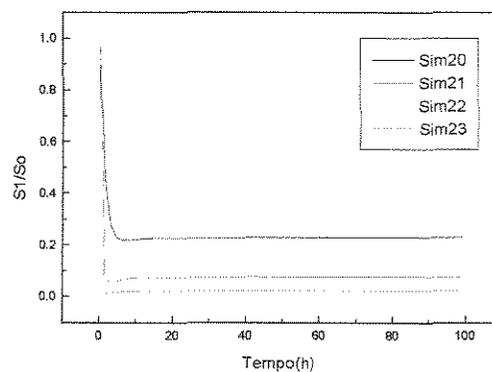


Figura 3.27 – Gráfico comparativo do consumo de substrato (reator duplo estágio).

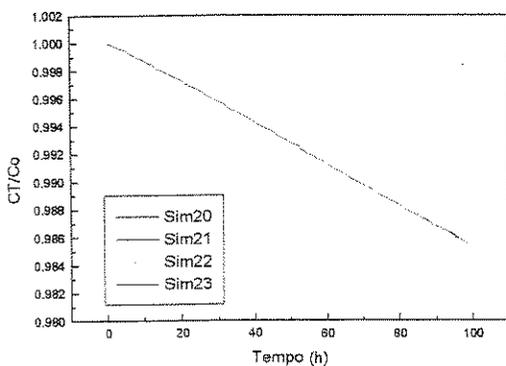


Figura 3.28 – Gráfico comparativo da quantidade total de enzima retida no sistema.

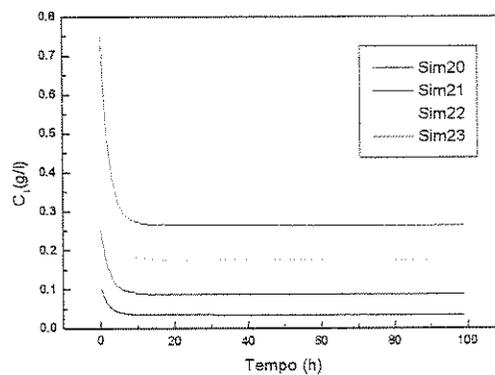


Figura 3.29 – Perfil da concentração de enzima livre no tanque de desorção (reator duplo estágio).

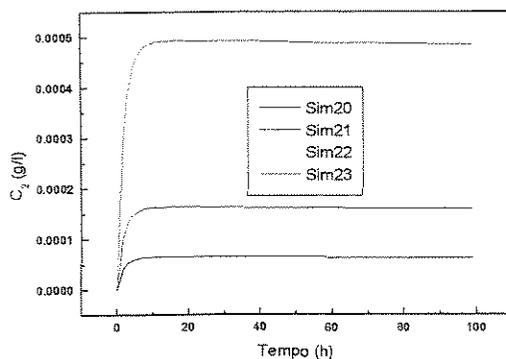


Figura 3.30 - Gráfico comparativo da concentração de enzima livre no tanque de adsorção.

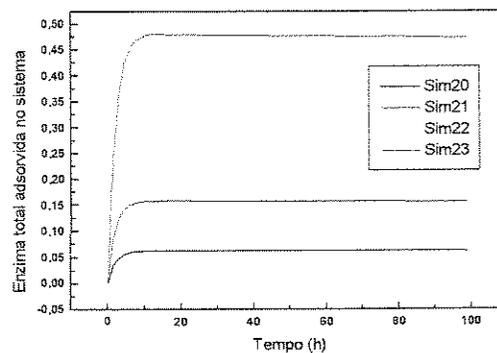


Figura 3.31 – Gráfico comparativo da quantidade total de enzima adsorvida no sistema.

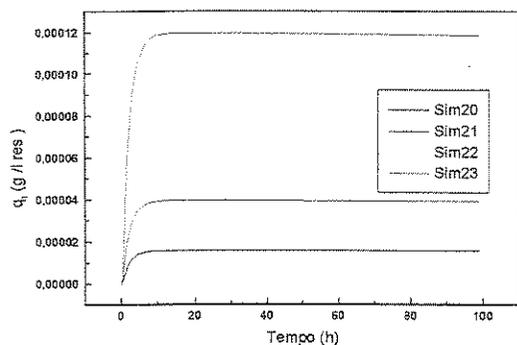


Figura 3.32 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima adsorvida no tanque de dessorção.

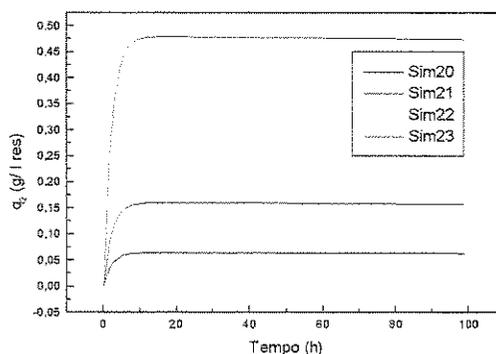


Figura 3.33 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima adsorvida no tanque de adsorção.

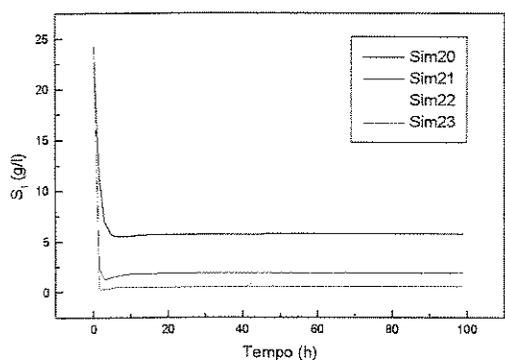


Figura 3.34 - Gráfico comparativo da concentração de substrato no tanque de adsorção.

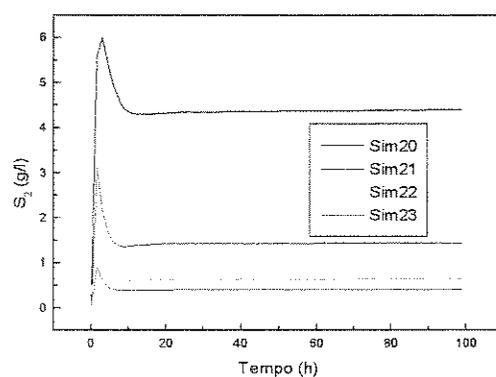


Figura 3.35 - Gráfico comparativo da concentração de substrato no tanque de dessorção.

Conforme pode ser observado pela figura 3.26, o aumento da concentração de substrato, na corrente de alimentação, diminui levemente o consumo de substrato. Já o aumento da concentração de enzima, para uma mesma concentração de substrato na corrente de alimentação, aumenta o consumo de substrato e diminui a perda de substrato não convertido, conforme pode ser observado nos gráficos das figura 3.27 e 3.35. Este comportamento é atribuído a uma maior quantidade de enzima livre no tanque de dessorção, como pode ser visto na figura 3.29. Já a figura 3.30 mostra que a quantidade de

enzima livre no tanque de adsorção também aumenta. Entretanto não se pode concluir que esse aumento implique em uma perda enzimática significativa, visto que para as curvas apresentadas no gráfico 3.28 são coincidentes e a quantidade de enzima livre no tanque de adsorção é muito pequena, conforme pode ser observado na figura 3.30.

Observa-se ainda a ocorrência de um ligeiro aumento na quantidade de enzima adsorvida no tanque de dessorção (figura 3.32). Já o aumento na quantidade de enzima adsorvida no estágio de adsorção é bem mais significativo (figura 3.33), o que evidencia que o aumento da concentração inicial de enzima não afeta muito a perda enzimática.

De acordo com os resultados apresentados nas figuras de 3.26 a 3.35, o aumento da quantidade de substrato na corrente de alimentação deve ser realizado paralelamente com o aumento da concentração inicial de enzima livre, para que não haja perda de matéria prima não consumida. Já o aumento da concentração de enzima livre aumenta o consumo de substrato. Os resultados apresentados nas figuras 3.29 e 3.35 mostram claramente que, para uma dada condição operacional ótima em termos de vazões de alimentação, existe uma concentração ótima de substrato na corrente de alimentação e uma concentração inicial ótima de enzima livre no sistema, para que seja obtido um alto consumo de substrato. A otimização do sistema, baseada na quantidade de dextrana produzida desejada, leva a determinação destes valores.

3.4.5 - Estudo da influência da concentrações de substrato na corrente de alimentação e da concentração inicial de enzima no tanque de dessorção utilizando o modelo triplo estágio:

Analogamente ao estudo realizado para o modelo duplo estágio, foi realizado um estudo para verificar a influência da concentração inicial de sacarose e enzima livre no comportamento do modelo triplo estágio. Neste estudo, as vazões de alimentação, fração líquida do sistema e volume dos tanques são idênticas às utilizadas na simulação de número 11, a que apresentou melhor desempenho para o modelo triplo estágio. Novamente, a concentração inicial de substrato é idêntica à concentração da corrente de alimentação. Os

valores das concentrações iniciais de enzima (C_o) e de substrato (S_o) são apresentados na tabela 3.7:

Tabela 3.7 – Concentrações iniciais (modelo triplo estágio)

Sim	S_o (g/l)	C_o (g/l)
Sim24	10	0,3
Sim25	50	0,3
Sim26	75	0,3
Sim27	25	0,10
Sim28	25	0,25
Sim29	25	0,50
Sim30	25	0,75

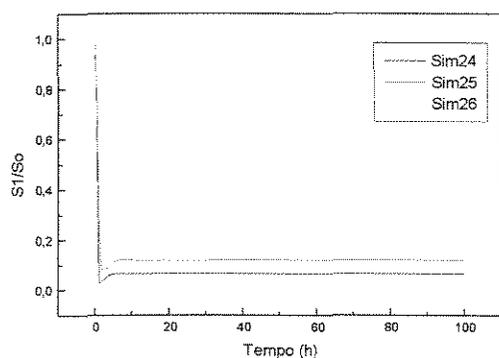


Figura 3.36 – Gráfico comparativo do consumo de substrato (modelo triplo estágio).

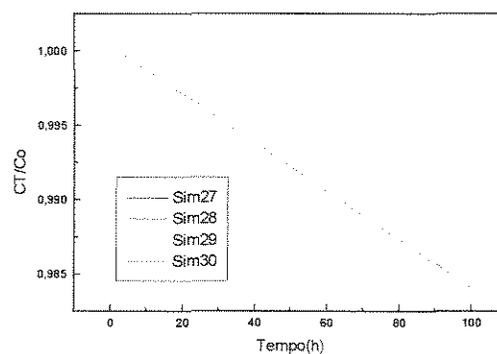


Figura 3.37 – Gráfico comparativo da quantidade total de enzima retida no sistema (modelo triplo estágio).

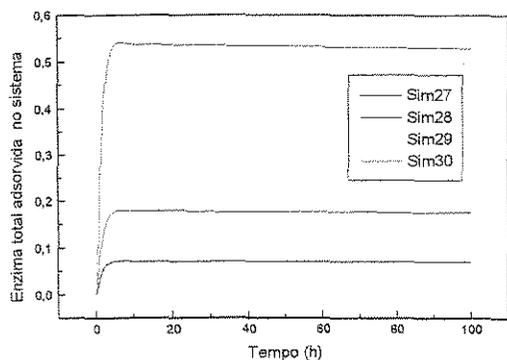


Figura 3.38 – Perfil da quantidade total de enzima adsorvida no sistema (modelo triplo estágio).

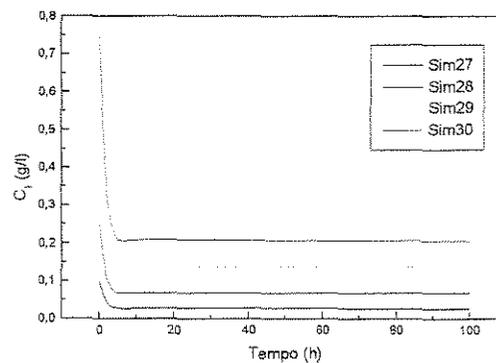


Figura 3.39 – Perfil da concentração de enzima livre no tanque de dessorção (modelo triplo estágio).

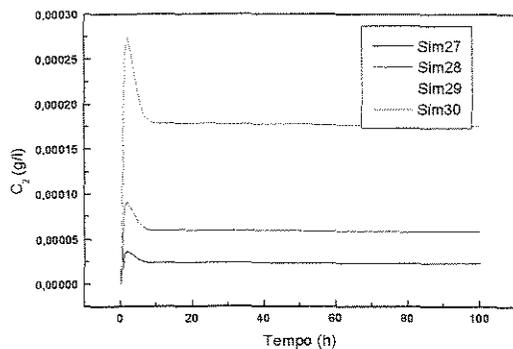


Figura 3.40 – Perfil da concentração de enzima livre no primeiro tanque de adsorção (modelo triplo estágio).

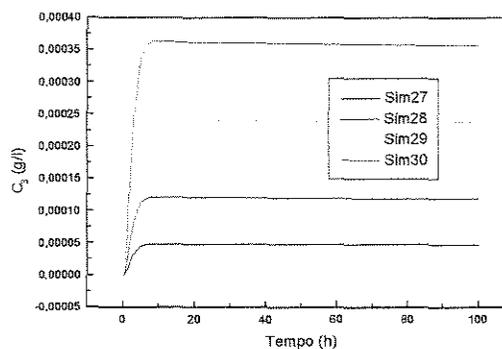


Figura 3.41 – Perfil da concentração de enzima livre no segundo tanque de adsorção (modelo triplo estágio).

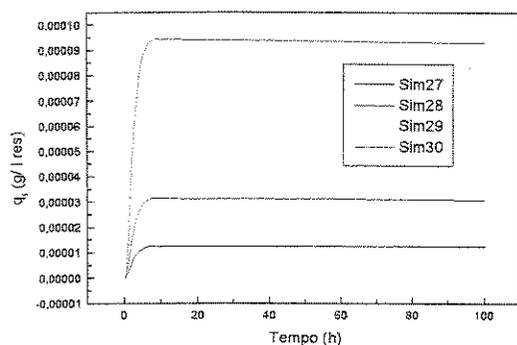


Figura 3.42 – Perfil da concentração de enzima adsorvida no tanque de dessorção (modelo triplo estágio).

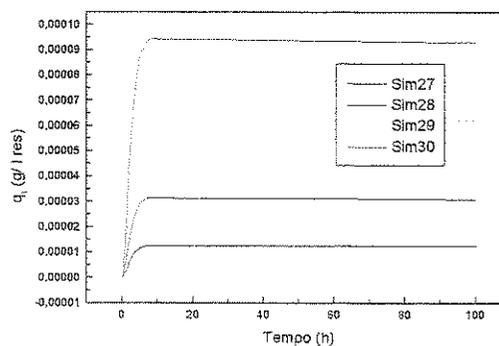


Figura 3.43 – Gráfico comparativo da concentração de enzima adsorvida no primeiro tanque de adsorção (modelo triplo estágio).

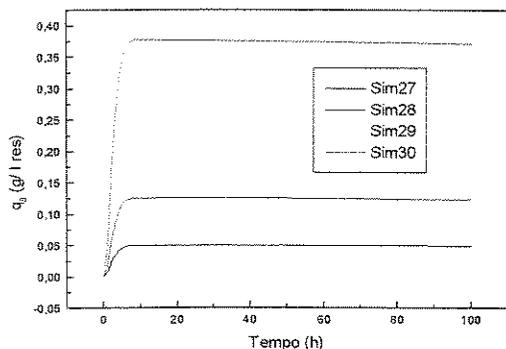


Figura 3.44 – Perfil de enzima adsorvida no segundo tanque de adsorção (modelo triplo estágio).

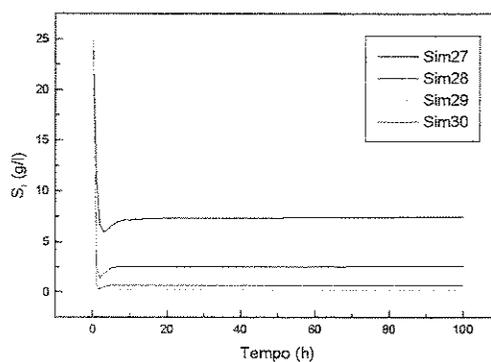


Figura 3.45 – Perfil da concentração de substrato no estágio de dessorção (modelo triplo estágio).

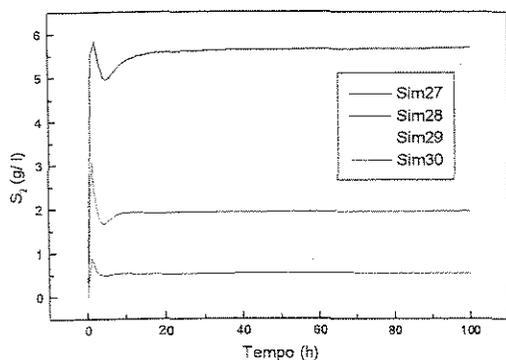


Figura 3.46 – Perfil da concentração de substrato no primeiro estágio de adsorção (modelo triplo estágio).

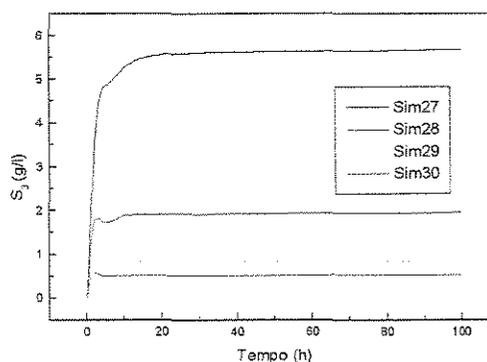


Figura 3.47 – Perfil da concentração de substrato no segundo estágio de adsorção (modelo triplo estágio).

As figuras de 3.36 a 3.47 apresentam os resultados das simulações da tabela 3.7. O gráfico apresentado na figura 3.36 apresenta comportamento semelhante ao apresentado na figura 3.26 para o modelo duplo estágio. Novamente, a elevação da concentração de substrato, mantendo-se a concentração enzimática, resulta em uma diminuição do consumo de substrato no sistema. Em relação ao estudo da concentração de enzima, observa-se novamente concordância com o modelo duplo estágio, visto as curvas que descrevem o perfil da quantidade de enzima retida no sistema serem coincidentes (figura 3.37) também para o modelo triplo estágio.

Observa-se através do gráfico apresentado nas figuras 3.38 e 3.39, que quanto maior a quantidade inicial de enzima no sistema, maior é a quantidade de enzima adsorvida e livre no sistema. Novamente, pode-se dizer que a elevação da concentração de enzima livre nos tanques de dessorção não influenciam, de forma significativa, a perda enzimática do sistema, devido ao fato de haver resina em quantidade suficiente para adsorver a enzima.

O consumo de substrato é maior com o aumento da concentração inicial de enzima, como pode ser visto nos gráficos de 3.45 a 3.47. De acordo com os resultados apresentados nas figuras de 3.38 a 3.47, a elevação da concentração de substrato não acompanhada de uma elevação da concentração inicial de enzima, aumenta a quantidade de substrato não consumido no processo.

Apesar de apresentar perfis semelhantes, nota-se através dos gráficos obtidos com o modelo duplo e triplo estágios, que há uma pequena diferença nos valores obtidos para cada um dos sistemas, embora tenham sido utilizadas as mesmas condições operacionais para ambas as simulações. A fim de verificar a amplitude dessa diferença, os resultados obtidos com cada um dos modelos são comparados a seguir:

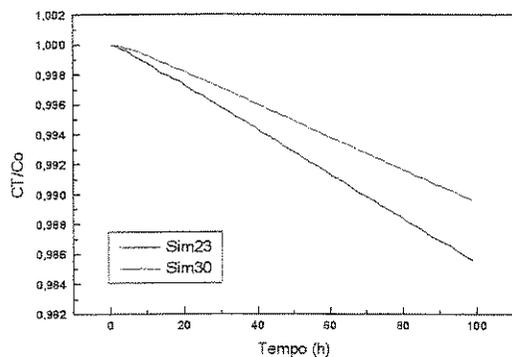


Figura 3.48 – Gráfico comparativo da retenção enzimática no sistema (modelos duplo e triplo estágio).

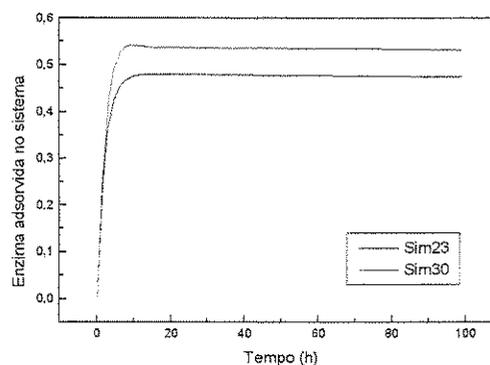


Figura 3.49 – Gráfico comparativo da quantidade total de enzima retida no sistema (modelo duplo e triplo estágio)

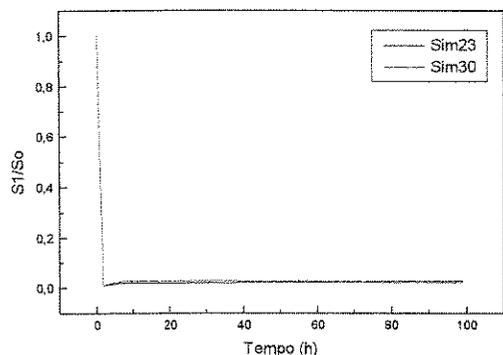


Figura 3.50 – Gráfico comparativo do consumo de substrato (modelos duplo e triplo estágio)

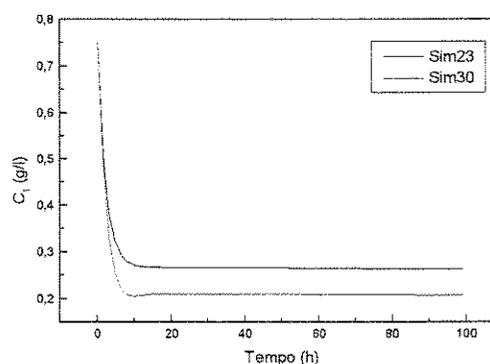


Figura 3.51 – Gráfico comparativo da concentração de enzima livre (modelos duplo e triplo estágio).

De acordo com os resultados apresentados na figura 3.50, o desempenho dos sistemas estudados, em termos de consumo de substrato são praticamente idênticos para

ambos os sistemas. As figuras 3.48 e 3.49 evidenciam a superioridade do modelo triplo, estágio no tocante a retenção enzimática. Embora a quantidade de enzima livre no estágio de dessorção seja menor para o modelo triplo estágio (figura 3.51), isso não prejudica o consumo de substrato.

Modelagem Considerando as Resistências à Transferência de Massa**4.1 - Introdução**

Além do processo CARE, a adsorção de macromoléculas em leitos fluidizados e tanques agitados também tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de novos processos de purificação e separação de bioprodutos. Hortsman e Chase (1989) apresentam um modelo para cinética de adsorção de proteínas, englobando a resistência a transferência de massa no filme líquido e a difusão no interior dos poros. O modelo apresentado é altamente concordante com resultados experimentais. Araújo (1996) aplicou este modelo para adsorção de albumina de soro bovino em resinas de troca iônica, em leito fluidizado e em tanque agitado, tendo sido obtidos bons resultados.

A modelagem proposta por Souza (1993) não considera as resistências à transferência de massa e a difusão no interior do sólido. Entretanto estas resistências podem influenciar bastante o comportamento do sistema. Com base nos estudos de Hortsman e Chase (1989) e de Araújo (1996), foram propostos dois outros modelos envolvendo em primeira instância a resistência de transferência de massa no filme líquido, sendo posteriormente inserida a difusão no interior dos poros.

4.2 – Desenvolvimento do Modelo de Adsorção

O modelo de adsorção considerando a resistência à transferência de massa no filme líquido e a difusão no interior do sólido proposto por Horstmann e Chase (1989) é baseado nas seguintes suposições:

- O adsorvente é feito de material poroso, onde o soluto deve se difundir no interior dos poros, com base na Difusividade Efetiva (D_{ef}), a qual é considerada independente da concentração.

- A transferência de massa para a superfície do adsorvente é limitada pela resistência a transferência de massa no filme líquido, a qual é caracterizada pela resistência de película (k_f)
- A reação de adsorção na superfície do adsorvente é descrita por uma reação irreversível de segunda ordem, sendo a mesma isotérmica e com equilíbrio representado pelo modelo de Langmuir
- As partículas de adsorvente são esféricas e de tamanho uniforme

Conforme estas hipóteses, é apresentado o balanço de massa proposto por Hortsman e Chase (1989):

4.2.1 - Balanço de massa sobre a partícula sólida

Difusão do soluto no interior dos poros do adsorvente

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{\partial q_i}{\partial t} \quad (4.1)$$

As condições iniciais são:

$$t = 0; C_i = 0$$

As condições de contorno são:

$$r = 0; \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (\text{no centro da partícula}) \quad (4.2)$$

$$r = R; \frac{\partial C_i}{\partial t} = \frac{k_f}{D_{ef} \varepsilon} (C_b - C_i) \quad (4.3)$$

De acordo com a equação (4.3), a transferência de massa no filme líquido depende não somente da concentração de enzima livre na fase líquida (C_b), mas também da concentração de enzima no interior dos poros do adsorvente, sendo esta dada por $C_i|_{r=R}$

4.2.2 - Cinética de adsorção sobre a superfície do adsorvente

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_1 C_i (q_m - q_i) - k_2 q_i \quad (4.4)$$

Considerando o equilíbrio entre a enzima livre e adsorvida no interior dos poros, e sendo a cinética de adsorção representada pelo modelo de Langmuir tem-se:

Equação de Langmuir:

$$q_i = \frac{q_m C_i}{K_d + C_i} \quad (4.5)$$

Onde:

$$K_d = \frac{k_2}{k_1} \quad (4.6)$$

Podemos expressar $\frac{\partial q_i}{\partial t}$ como:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{dq_i}{dC_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (4.7)$$

Onde:

$$\frac{dq_i}{dC_i} = \frac{q_m Kd}{(Kd + C_i)^2} \quad (4.8)$$

Substituindo na equação (4.7) temos:

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{q_m Kd}{(Kd + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (4.9)$$

Substituindo a equação (4.9) na equação (4.1) temos:

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{q_m Kd}{(Kd + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (4.10)$$

A equação (4.10) pode ser rescrita da seguinte forma:

$$[\varepsilon_p + f'(C_i)] \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) \quad (4.11)$$

Onde:

$$f'(C_i) = \frac{q_m Kd}{(Kd + C_i)^2} \quad (4.12)$$

Adimensionalizando as variáveis t e r na equação (4.11), temos:

$$[\varepsilon_p + f'(C_i)] \frac{\partial C_i}{\partial \tau} = \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + \frac{2}{x} \frac{\partial C_i}{\partial x} \right) \quad (4.13)$$

Onde:

$$\tau = \frac{D_{ef} t}{R^2} \quad \text{e} \quad x = \frac{r}{R}$$

Adimensionalizando-se também as variáveis t e r na condição inicial temos:

$$\tau = 0; C_i = 0 \quad x = 0; \frac{\partial C_i}{\partial x} = 0 \quad x = 1; Bi_m(C_b - C_i) = \frac{\partial C_i}{\partial \tau}$$

Onde:

$$Bi_m = \frac{k_f R}{D_{ef}} \quad (4.14)$$

4.2.3 - Balanço de massa na fase líquida para tanque agitado

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3vk_f}{RV_l} (C_b - C_i)|_{r=R} \quad (4.15)$$

A condição inicial para a equação (4.15) é:

$$t = 0; C_b = C_0$$

Adimensionalizando-se as variáveis r e t na equação (4.15), tem-se

$$\frac{dC_b}{d\tau} = -\frac{3vkf}{V_l}(C_b - C_i)|_{x=l} \quad (4.16)$$

As condições iniciais para equação (4.16) são:

$$\tau = 0; C_b = C_0$$

A difusão no interior dos poros de um sólido poroso, seja uma resina ou catalisador, depende de vários fatores dentre eles, o tamanho da enzima e o diâmetro médio dos poros. Sendo assim para o sistema em estudo será considerada primeiramente a resistência à transferência de massa no filme líquido, sendo posteriormente adicionada ao modelo a difusão no interior dos poros, como já mencionado anteriormente. A resina utilizada no sistema em estudo é a DEAE-Celulose. Trata-se de uma resina de troca iônica de porosidade mediana.

4.3 – Modelagem do Sistema Duplo Estágio, incluindo a resistência à transferência de massa no filme líquido.

Não sendo considerada a difusão no interior dos poros, a força motriz na equação (4.15), representada pelo termo $(C_b - C_i)|_{r=R}$, foi substituída pelo termo $\left(C_b - \frac{q_i Kd}{(qm - q_i)}\right)$, visto que pela equação de Langmuir temos: $C_i = \frac{q_i Kd}{(qm - q_i)}$. Souza (1993) determinou experimentalmente a isoterma de adsorção da dextranasacarase em DEAE-Celulose. Em seu trabalho a dessorção da enzima foi considerada instantânea. Sendo assim, a resistência à transferência de massa na fase líquida foi considerada somente no estágio de adsorção.

4.3.1 - Balanço de massa para o tanque 1 (dessorção)

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R C_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (4.17)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad (4.18)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (4.19)$$

4.3.2- Balanço de massa para o tanque 2 (adsorção)

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_r C_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{3k_f}{R} \left(C_2 - \frac{q_2 K d}{(q_m - q_2)} \right) \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (4.20)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 q_1}{V_2} - \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_2} + \frac{3k_f}{R} \left(C_2 - \frac{q_2 K d}{(q_m - q_2)} \right) \quad (4.21)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 S_1}{V_2} - \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_2} - \frac{K C_2 S_2}{K_m + S_2} \quad (4.22)$$

4.4 – Modelagem do Sistema Duplo Estágio, incluindo a resistência à transferência de massa no filme líquido e difusão nos poros.

Nesta modelagem, a equação (4.15) é mantida como apresentada, pois estamos considerando a difusão no interior do sólido. Sendo assim, além da equação (4.15) foi inserida no modelo a equação (4.10), que representa a variação de C_i no tempo para todos os raios. Novamente, devido ao fato da reação de dessorção ser instantânea, a resistência à transferência de massa na fase líquida bem como a difusão no interior da resina foram consideradas somente no estágio de adsorção.

4.4.1 - Balanço de massa para o tanque 1 (dessorção)

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R C_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (4.23)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad (4.24)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (4.25)$$

4.4.2- Balanço de massa para o tanque 2 (adsorção)

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_r C_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{3k_f}{R} (C_2 - C_i) \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (4.26)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{FRq_1\varepsilon}{V_2} + \frac{F_1q_1}{V_2} - \frac{FRq_2\varepsilon}{V_2} + \frac{3kf}{R}(C_2 - C_i) \quad (4.27)$$

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{q_m Kd}{(Kd + C_i)^2} \frac{\partial C_i}{\partial t} \quad (4.28)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{FRS_1\varepsilon}{V_2} + \frac{F_1S_1}{V_2} - \frac{FRS_2\varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2)S_2}{V_2} - \frac{KC_2S_2}{K_m + S_2} \quad (4.29)$$

4.5 - Resultados

O modelo apresentado no item 4.3 foi resolvido numericamente através do método de Runge Kutta 4ª ordem. Já o modelo apresentado no item 4.4 foi resolvido utilizando o método de colocação ortogonal para a equação 4.28 e o método de Runge Kutta 4ª ordem para as equações diferenciais ordinárias.

O método de colocação ortogonal é um método de resíduos ponderados, onde um polinômio interpolador é utilizado para representar a função em pontos discretos (pontos de colocação). Neste trabalho o polinômio foi utilizado o polinômio de Lagrange e dois pontos internos de colocação, quantidade que se mostrou suficientemente precisa.

Os valores de temperatura e pH são àqueles apresentados na tabela 3.3. Já os valores das constantes k_f e D_{ef} foram obtidos através do ajuste do perfil experimental obtido por Souza (1993) ao modelo de adsorção proposto por Hortmann e Chase (1989). Estes valores são $3,14 \times 10^{-2}$ m/h e $1,88 \times 10^{-5}$ m²/h respectivamente. Para este ajuste, apresentado no apêndice 2, foram consideradas as propriedades da água para representar a solução tampão, pois não foram encontrados, em nenhuma referência, os valores de viscosidade e densidade da solução utilizada por Souza (1993) para obter a curva de adsorção da dextrana-sacarase em DEAE-Celulose.

Outro parâmetro não encontrado foi a porosidade da resina, que normalmente é determinada experimentalmente. Neste caso, a única informação disponível era a

classificação da resina como sendo de porosidade mediana, segundo o fabricante (Sigma). Dessa forma, foi utilizado o valor de 0.75 para porosidade da resina. Já o raio da partícula ($R = 1.25 \times 10^{-4}$ m) foi encontrado no trabalho de Souza (1993), o qual apresenta uma análise granulométrica da resina. Apesar destas aproximações, os resultados obtidos através de simulações com os modelos que incluem a resistência à transferência de massa e difusão intraparticular permitem verificar, qualitativamente, o comportamento do sistema.

A simulação de número 3 para o modelo duplo estágio (Capítulo 3) foi novamente realizada, utilizando agora o modelo apresentado no item 4.3, onde somente a resistência à transferência de massa na fase líquida é considerada. Os gráficos a seguir apresentam os resultados obtidos:

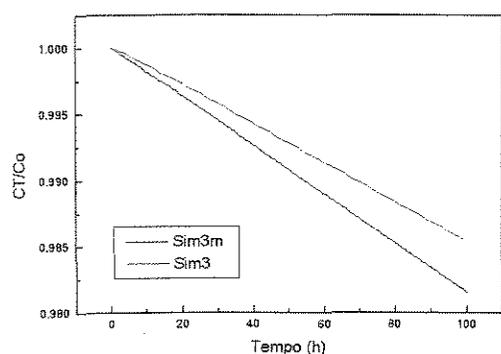


Figura 4.1 – Quantidade de enzima retida no sistema (reator duplo estágio considerando a transferência de massa na fase líquida no estágio de adsorção).

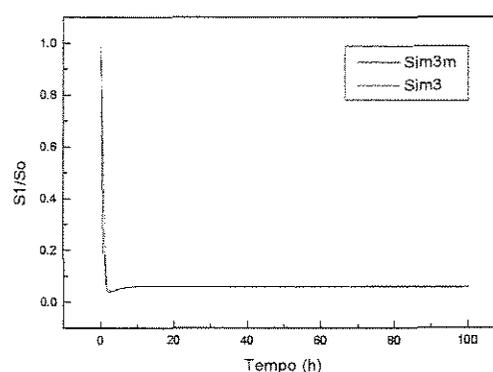


Figura 4.2 – Consumo de substrato no estágio de dessorção (reator duplo estágio considerando a resistência à transferência de massa no estágio de adsorção).

O índice *m* na legenda dos gráficos indica que o modelo utilizado considera a resistência à transferência de massa no filme líquido. Conforme pode ser observado nas figuras 4.1 e 4.2, quando a resistência à transferência de massa é levada em consideração a perda enzimática é ligeiramente superior à obtida quando esta transferência não é levada em consideração. Isso se deve a uma menor quantidade de enzima adsorvida, devido à difusão da mesma ser dificultada pela resistência de película no filme líquido. Quanto ao consumo de substrato, não se verifica nenhuma alteração, pois a quantidade de enzima livre no sistema é suficiente para consumir o substrato alimentado. Vale ressaltar que a curva

obtida para ambos os modelos não apresenta alterações, em ambos os casos a perda enzimática é linear no intervalo de tempo estudado.

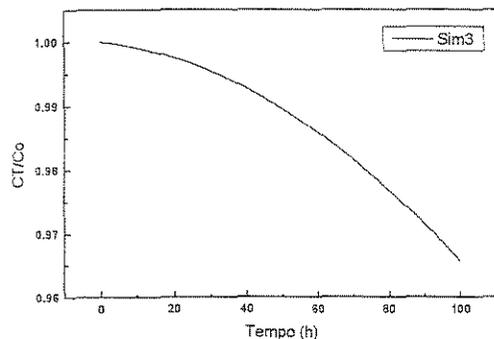


Figura 4.3 – Enzima total retida no sistema (reator duplo estágio considerando a resistência à transferência de massa na fase líquida e difusão no interior da resina).

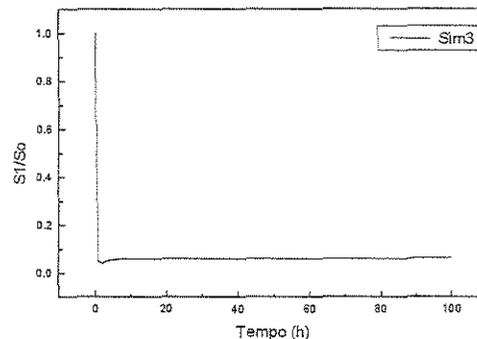


Figura 4.4 – Consumo de substrato no estágio de dessorção (reator duplo estágio considerando a resistência à transferência de massa na fase líquida e difusão no interior da resina).

Utilizando o modelo apresentado no item 4.4, onde são levadas em consideração tanto a resistência à transferência de massa na fase líquida como a difusão no interior da partícula, a simulação de número 3 para o reator duplo estágio foi novamente repetida. Os resultados são apresentados nas figuras 4.3 e 4.4.

Conforme pode ser observado na figura 4.3, a curva obtida utilizando-se o modelo de adsorção proposto por Hortsman e Chase (1989) é bastante diferente da obtida através do modelo original para o reator duplo estágio proposto por Souza (1993). Nota-se, através do gráfico apresentado na figura 4.3, que a queda da quantidade total de enzima retida no sistema é menor no início, tornando-se mais acentuada com o passar do tempo. O valor final obtido também é menor que o obtido para o modelo original (figura 3.3) sob as mesmas condições operacionais. Já para o consumo de substrato, o perfil se mantém igual ao obtido para o modelo original.

A diferença entre os perfis obtidos para a perda enzimática no sistema quando as resistências à transferência de massa são levadas ou não em consideração, se deve a

alteração da cinética de adsorção, que pode inclusive ter o tempo de necessário para se atingir o equilíbrio alterado em função dos parâmetros k_f e D_{ef} (apêndice 2).

A seguir é apresentado o gráfico com os perfis de enzima livre no estágio de dessorção e enzima total adsorvida no sistema para a simulação de número 3 utilizando o modelo apresentado no item 4.4:

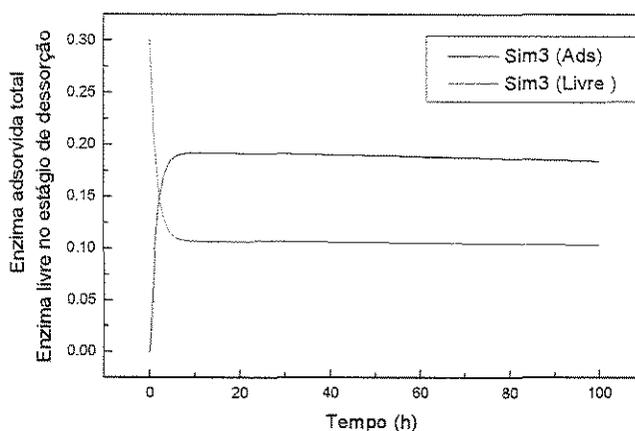


Figura 4.5 – Concentração total de enzima adsorvida e enzima livre no tanque de dessorção. Modelo duplo estágio considerando a resistência à transferência de massa e difusão da enzima no interior da resina.

Observa-se que o gráfico da figura 4.5 é semelhante àquele apresentado na figura 3.5 (as curvas representadas em ambos os gráficos possuem o mesmo tipo de perfil). Entretanto, os valores obtidos quando são consideradas as resistências à transferência são diferentes daqueles obtidos para o modelo original. Nota-se também que as curvas referentes a enzima total adsorvida no sistema e enzima livre se encontram mais próximas no gráfico da figura 4.5.

Apesar das constantes utilizadas nos modelos apresentados nos itens 4.3 e 4.4 serem aproximações, a utilização destes modelos permite estimar o comportamento do sistema quando se leva em consideração a resistência à transferência de massa no filme líquido e a difusão da enzima no interior da resina adsorvente.

Os gráficos apresentados nas figuras de 4.1 a 4.4 mostram que a inclusão de resistências à transferência de massa na modelagem do sistema altera não só os valores

relativos a retenção enzimática, mas também o perfil da quantidade de enzima retida no sistema.

Sendo o reciclo de enzima um fator econômico limitante para a viabilidade do processo, faz-se necessário um estudo experimental da adsorção da enzima que leve em consideração não somente as resistências à transferência de massa, mas também a presença de dextrana no meio. Esta consideração é importante devido ao fato de a dextrana ser um polissacarídeo, cujos efeitos da viscosidade de suas soluções podem interferir nos fenômenos de transferência de massa.

5.1 - Introdução

Os modelos apresentados no Capítulo 3 não consideram a influência dos tampões de adsorção e dessorção no comportamento do sistema. O reator estudado considera a adsorção e dessorção da enzima mediante a alimentação de tampões apropriados nos respectivos estágios de adsorção e dessorção.

Segundo Currello et al. (1998), a dessorção da enzima é promovida mediante a adição de tampão de NaCl no estágio de dessorção. A adsorção seria promovida mediante a diminuição da concentração de NaCl no estágio de adsorção, através da diluição com água pura (tampão de adsorção).

O estudo de Currello et al. (1998) implica na determinação experimental das isotermas de adsorção da dextrana-sacarase em DEAE-Celulose variando-se as concentrações salina do meio de 0 M a 0,50 M. Foi verificada que a presença de NaCl pouco interfere na constante k_1 mas tem grande influência nos valores de q_m e k_2 (constantes da equação de Langmuir), sendo válidas as seguintes equações para o cálculo de q_m e k_2 em função da concentração salina:

$$q_m = 18,7 \exp(-11,78[NaCl]^2 + 3,30[NaCl] + 5,02) \quad (5.1)$$

$$k_2 = 2,52 + \frac{6,18[NaCl]}{0,122 + [NaCl]} \quad (5.2)$$

Em seu trabalho, Souza (1993) apresenta dados experimentais para a adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose utilizando como tampão uma solução de acetado 0,2mM. Já o trabalho de Currello et al. (1998) considera a adsorção da enzima na resina

na presença de NaCl. Sendo assim, existem duas condições experimentais diferentes, o que leva a obtenção de valores diferentes para as constantes da equação de Langmuir, conforme pode ser visto na tabela 5.1:

Tabela 5.1 – Constantes da equação de Langmuir

Constantes	k_1 (l g/h)	k_2 (h ⁻¹)	q_m (g/l res)
Souza (1993) Tampão de Acetato 0.2 mM	7,11	3,54	519,751
Curralero et al. (1998) ausência de NaCl	2,22	3,84	2830
Curralero et al. (1998) [NaCl] = 0,10 M	2,22	5,00	3570
Curralero et al. (1998) [NaCl] = 0,25 M	2,22	7,55	3090
Curralero et al. (1998) [NaCl] = 0,50 M	2,22	8,33	810

5.2 - Modelagem matemática para o reator triplo estágio considerando balanço de NaCl

As mesmas hipóteses consideradas para o modelo descrito no Capítulo 3 são aqui consideradas, exceto que os valores de k_2 e q_m são dados em função da concentração de NaCl em cada um dos tanques (equações 5.1 e 5.2). A dessorção é novamente considerada instantânea ($k_3 = 1000$ h⁻¹). A alimentação de NaCl (tampão de dessorção) é realizada através da corrente de alimentação do primeiro estágio (F_1). Dada a superioridade do reator triplo estágio, o balanço de sal foi considerado somente para este sistema. As equações do modelo são apresentadas a seguir:

5.2.1 - Balanço de massa para o tanque 1 (dessorção)

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_{3\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_R C_{1\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_1 C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (5.3)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_R q_{3\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_R q_{1\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad (5.4)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_R S_{3\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_R S_{1\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (5.5)$$

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{F_1 E_0}{V_1} + \frac{F_R E_{3\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_1 E_1}{V_1} - \frac{F_R E_{1\varepsilon}}{V_1} \quad (5.6)$$

5.2.2 - Balanço de massa para a o tanque 2 (adsorção)

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_R C_{1\varepsilon}}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_{2\varepsilon}}{V_2} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} [k_2 q_2 - k_1 C_2 (q_m - q_2)] \quad (5.7)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_R q_{1\varepsilon}}{V_2} + \frac{F_1 q_1}{V_2} - \frac{F_R q_{2\varepsilon}}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) q_2}{V_2} + [k_1 C_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2] \quad (5.8)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_R S_{1\varepsilon}}{V_2} + \frac{F_1 S_1}{V_2} - \frac{F_R S_{2\varepsilon}}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_2} - \frac{K C_2 S_2}{K_m + S_2} \quad (5.9)$$

$$\frac{dE_2}{dt} = \frac{F_1 E_1}{V_2} + \frac{F_R E_1 \varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) E_2}{V_2} - \frac{F_R E_2}{V_2} \quad (5.10)$$

5.2.3 - Balanço de massa para o tanque 3 (adsorção)

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_3} + \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_3} - \frac{(F_1 + F_2 + F_3) C_3}{V_3} - \frac{F_R C_3 \varepsilon}{V_3} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} [k_2 q_3 - k_1 C_3 (q_m - q_3)] \quad (5.11)$$

$$\frac{dq_3}{dt} = \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_3} + \frac{(F_1 + F_2) q_2}{V_3} - \frac{F_R q_3 \varepsilon}{V_3} + [k_1 C_3 (q_m - q_3) - k_2 q_3] \quad (5.12)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_3} + \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_3} - \frac{F_R S_3 \varepsilon}{V_3} - \frac{(F_1 + F_2 + F_3) S_3}{V_3} - \frac{K C_3 S_3}{K_m + S_3} \quad (5.13)$$

$$\frac{dE_3}{dt} = \frac{(F_1 + F_2) E_2}{V_3} + \frac{F_R E_2}{V_3} - \frac{(F_1 + F_2 + F_3) E_3}{V_3} - \frac{F_R E_3 \varepsilon}{V_3} \quad (5.14)$$

5.3 - Resultados e Discussões

De acordo com as equações 5.1 e 5.2, os valores de q_m e k_2 não variam muito para concentrações acima de 0,50 M. Foi realizado um estudo preliminar do desempenho do sistema triplo estágio considerando os valores de q_m e k_2 constantes e correspondentes aos valores referentes à concentração salina de 0,50 M. Neste estudo, foi repetida a simulação de número 11, apresentada no Capítulo 3, sendo utilizados os valores para os parâmetros k_1 , k_2 e q_m obtidos por Currello et al. (1998) (apresentados na tabela 5.1 para a $[\text{NaCl}] = 0,5$ M). Para este estudo foi utilizado o modelo sem o balanço de sal apresentado no Capítulo 3.

Os resultados foram então comparados com os resultados obtidos para o sistema que usa os dados experimentais de Souza (1993). As condições operacionais são apresentadas na tabela 5.2 :

Tabela 5.2 – Condições operacionais para o sistema triplo estágio considerando os dados experimentais de Souza (1993) e Currelero et al .(1998).

Sim	ϵ	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_3 (l/h)	F_R (l/h)	S_0 (g/l)	C_0 (g/l)
Sim31*	0,5	100	70	0	250	25	0,3
Sim32**	0,5	100	70	0	250	25	0,3

*Dados experimentais de Souza (1993)

**Dados experimentais de Currelero et al. (1998)

Os resultados obtidos com as simulações da tabela 5.3 são apresentados a seguir:

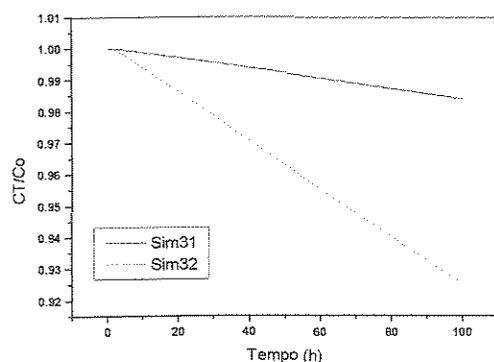


Figura 5.1 – Gráfico comparativo da retenção enzimática.

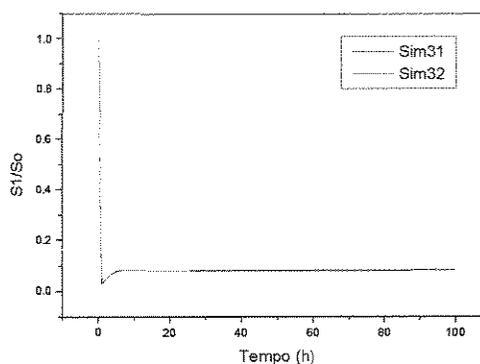


Figura 5.2 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no estágio de dessorção.

De acordo com os gráficos apresentados nas figuras 5.1 e 5.2, a presença de sal no sistema prejudica a retenção enzimática, mas não influencia o consumo de substrato. Os resultados apresentados nos gráficos das figuras 5.1 e 5.2 correspondem a condições drásticas onde a concentração salina seria constante de igual a 0,5M, nos três tanques.

Para promover a dessorção da enzima é necessária uma concentração mínima de sal em torno de 0,50 M. Entretanto a enzima sofre desativação na presença de NaCl, sendo que quanto maior a concentração salina maior é a desativação da enzima (Souza,1993). Dessa forma, é necessário um ajuste de vazões com a finalidade de se obter baixas concentrações

salinas nos tanques de adsorção, bem como evitar concentrações muito superiores a 0,5 M no tanque de dessorção. Com isso, pode-se aumentar a quantidade de enzima adsorvida nos estágios de adsorção, melhorando assim o desempenho do sistema, quando se utilizam os dados experimentais de Curralero et al. (1998).

Foi então realizado um ajuste da vazões de alimentação em cada um dos tanques para obtenção dos perfis salinos desejados. Novamente, o volume total (sólidos + líquido) dos tanques foi considerado constante, assumindo o valor de 1000 litros. A fração líquida do sistema foi considerada constante e igual a 0,5, visto ser o valor que apresentou melhor desempenho para o sistema. A tabela 5.3 apresenta as condições operacionais utilizadas para o ajuste de vazões do sistema triplo estágio, considerado a presença de solução salina no sistema:

Tabela 5.3 – Condições operacionais para determinação do perfil de NaCl (sistema triplo estágio)

Sim	F ₁ (l/h)	F ₂ (l/h)	F ₃ (l/h)	F _R (l/h)	E _{1o} (mo/l)	E _o (mol/l)
Sal1	100	70	0	250	0,50	0,50
Sal2	100	100	0	250	0,50	0,50
Sal3	100	100	100	250	0,50	0,50
Sal4	100	100	100	100	0,50	0,50
Sal5	100	100	0	250	0,50	0,75
Sal6	100	150	0	250	0,50	0,75

* para todas as simulações da tabela $\varepsilon = 0,5$

As figuras de 5.3 a 5.6 mostram os perfis salinos em cada um dos tanques obtidos com as simulações da tabela 5.3:

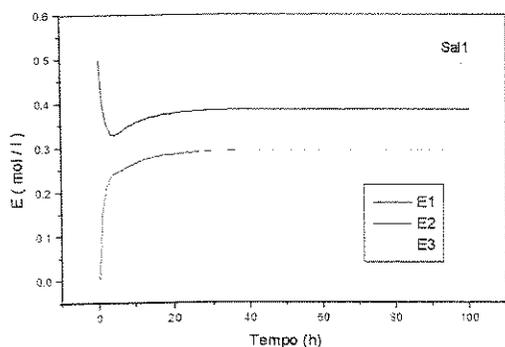


Figura 5.3 – Perfil da concentração salina nos tanques.

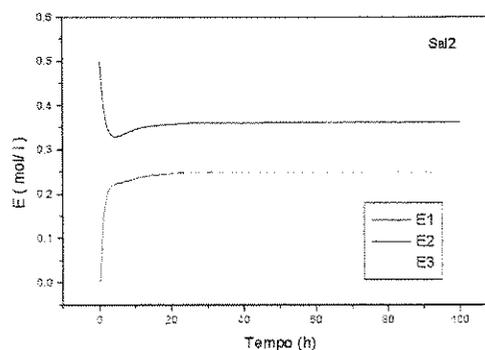


Figura 5.4 – Perfil da concentração salina nos tanques

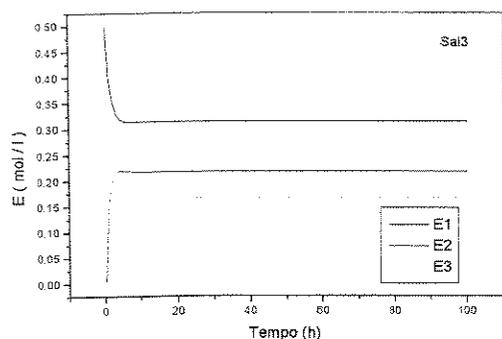


Figura 5.5 – Perfil da concentração salina nos tanques

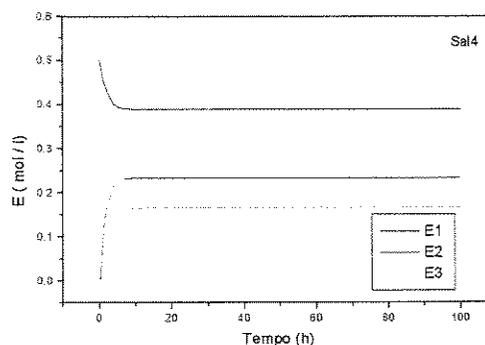


Figura 5.6 – Perfil da concentração salina nos tanques

Observa-se que o aumento da vazão de alimentação do segundo estágio (F_2) diminui a concentração salina nos estágios de adsorção, sem interferir na concentração salina do estágio de dessorção. Já o aumento da vazão de alimentação do terceiro estágio (tampão de adsorção) causa a diminuição da concentração salina no estágio de dessorção, o que não é interessante para o processo. Já a diminuição da vazão de reciclo, causa elevação da concentração salina em todos os tanques, como pode ser observado comparando-se as figuras 5.5 e 5.6. Sendo assim, é interessante aumentar a vazão do segundo estágio. Observa-se também que, com as condições operacionais utilizadas nas simulações apresentadas nas figuras de 5.3 a 5.6, não foi atingida a concentração mínima de sal necessária para a dessorção da enzima no primeiro estágio. Dessa forma, deve-se aumentar

a concentração salina na alimentação e realizar um ajuste adequado de F_2 , para obtenção de baixas concentrações nos estágios de adsorção.

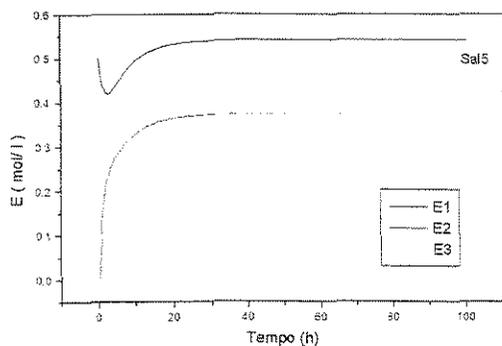


Figura 5.7 – Perfil da concentração salina nos tanques

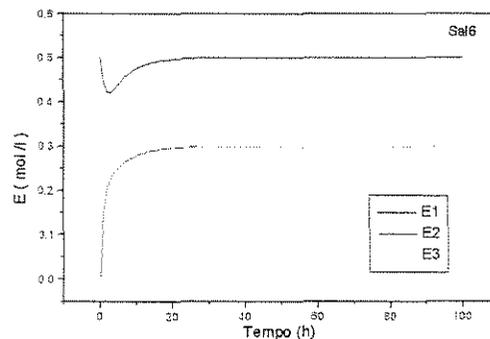


Figura 5.8 – Perfil da concentração salina nos tanques.

Observa-se nos gráficos apresentados nas figuras 5.7 e 5.8 que aumentando ainda mais a vazão de alimentação do segundo estágio (adsorção) ocorre a diminuição da concentração salina nos estágios de adsorção, mas também há influência na concentração salina do estágio de dessorção a qual diminui. Com o aumento da concentração salina na alimentação do estágio de dessorção foi possível chegar na concentração mínima de sal necessária para a dessorção. Pode ser também observada uma diminuição da concentração salina no estágio de dessorção no início do processo. Isso pode afetar o rendimento neste período e ocorre devido ao fluxo de sal para os demais tanques.

Não é interessante o aumento da vazão de alimentação no estágio de dessorção, pois isto causaria queda no consumo de substrato, devido a diminuição do tempo de residência no estágio de dessorção. Sendo assim, o melhor ajuste de vazões, tendo sido atingida a concentração mínima de sal requerida no estágio de dessorção, é o correspondente à simulação Sal6. Sendo assim foi verificado o comportamento do sistema para as condições operacionais relativas à simulação Sal6, utilizando o modelo apresentado na seção 5.2, onde as constantes k_2 e q_m são calculadas em função da concentração salina, através das equações 5.1 e 5.2.

Os resultados obtidos com os dados experimentais de Currelero et al. (1998) são novamente comparados aos obtidos utilizando-se os dados experimentais de Souza (1993),

para a condição operacional relativa a simulação Sal6 (tabela 5.2). As condições operacionais do sistema são apresentadas na tabela 5.4:

Tabela 5.4 – Condições operacionais para o modelo com balanço de sal utilizando-se os dados experimentais de Souza (1993) e Currelero et al (1998).

Sim	Condições operacionais	Co (g/l)	So (g/l)
Sim33 *	Sal6	0,3	25
Sim34**	Sal6	0,3	25

*Dados experimentais de Souza (1993)

**Dados experimentais de Currelero et al (1998)

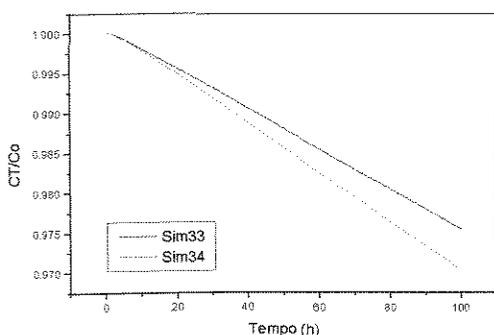


Figura 5.9 – Gráfico comparativo da retenção enzimática.

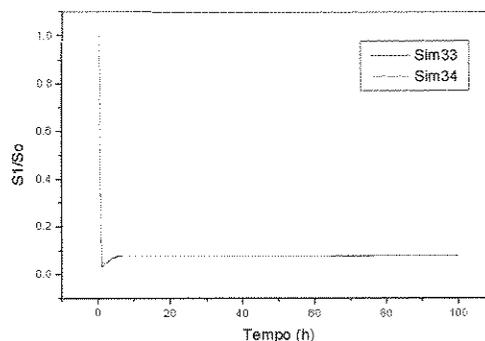


Figura 5.10 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no estágio de dessorção.

Conforme resultados apresentados nos gráficos 5.9 e 5.10, o ajuste de vazão permite uma condição operacional que minimiza a perda enzimática do sistema, quando se utilizam os dados experimentais de Currelero et al. (1998). Entretanto, observa-se valores de retenção enzimática ligeiramente inferiores àqueles obtidos quando são utilizados os dados experimentais de Souza (1993).

De acordo com os resultados apresentados, é possível um ajuste onde se obtenha alta retenção enzimática, mesmo considerando a presença de sal no sistema. O ajuste de

vazões permite a obtenção de uma retenção satisfatória de enzima, apesar de a presença de sal no sistema de influenciar a adsorção da enzima, conforme pode ser visto no apêndice 3.

Os dados experimentais de Currelero et al. (1998) são mais realísticos que os de Souza (1998), pois incluem a presença do tampão de dessorção. Embora o tampão de dessorção (NaCl) provoque uma diminuição na quantidade de enzima adsorvida, é possível um ajuste de vazões onde a retenção enzimática seja satisfatória, sem prejuízo do consumo de substrato.

6.1 – Introdução

O emprego de redes neurais, na predição de parâmetros envolvidos em processos de síntese, tem se desenvolvido recentemente. A determinação de parâmetros através de redes neurais é de grande valia, pois permite a partir de um dado conjunto de dados experimentais obter a predição de valores, mediante treinamento da rede. A obtenção de taxas de reações enzimáticas envolve um número maior de parâmetros do que a determinação de taxas de reações químicas, pois além dos parâmetros usualmente utilizados para determinação de taxas de reações químicas outros fatores influenciam na referida taxa.

Redes neurais são métodos matemáticos baseados na estrutura neurológica do cérebro. Trata-se portanto de uma técnica de inteligência artificial, cuja característica é “aprender” a lógica existente em um determinado conjunto de dados e com isso predizer valores diferentes daqueles utilizados para o treinamento da rede.

A utilização de redes neurais em modelos híbridos para processos químicos é prática bastante comum em Engenharia Química. Modelos híbridos são constituídos de um modelo determinístico e uma rede neural, cuja função é fornecer parâmetros importantes do processo utilizados no modelo determinístico. No caso de reações enzimáticas, muitos parâmetros podem influenciar a taxa de reação, tais como a inibição. Usualmente, a taxa de reação enzimática é obtida a partir do ajuste de dados experimentais a modelos conhecidos, tais como o modelo de Michaelis-Menten.

Por ser baseada em um conjunto de dados de treinamento específico, uma rede neural só tem validade para condições nas mesmas faixas de operação utilizadas para a obtenção dos dados experimentais. Visto que a maioria dos processos químicos possuem condições operacionais bem determinadas, esse fato não inviabiliza a utilização de redes neurais em modelos híbridos. O treinamento da rede é a parte mais trabalhosa, pois tanto a topologia da rede como também o ajuste de seus pesos, através do treinamento, são fatores fortemente dependentes do conjunto de dados utilizados. Entretanto, uma vez treinada uma

rede para uma determinada aplicação, a mesma pode ser acoplada a controladores ou instalada em uma calculadora (do tipo HP) possibilitando a tomada de decisão através de medidas diretas na linha de produção.

6.2 – Topologia da Rede

Reações enzimáticas são, em geral, mais complexas que reações químicas, pois sofrem influência não somente de fatores tais como pH, temperatura, concentração de reagentes e catalisador e demais fatores considerados para cinética de reações químicas, mas também da presença de cofatores e inibidores. No caso de inibidores, uma reação enzimática pode ser inibida tanto pelo substrato quanto pelo produto. Dessa forma, uma rede neural para obtenção de uma taxa de reação enzimática genérica, deve englobar estes fatores em sua topologia. A figura 1 apresenta a topologia de uma rede com a finalidade descrita acima:

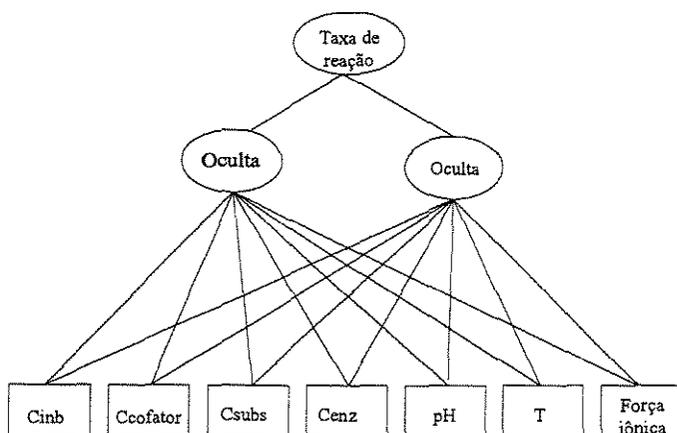


Figura 6.1 - Topologia de uma rede neural genérica para determinação da taxa de reação enzimática.

A rede apresentada na figura 6.1 é constituída de sete neurônios na camada de entrada, dois na camada oculta e 1 na camada de saída, que é a taxa de reação enzimática a ser obtida através da rede. O número de neurônios na camada oculta pode ser alterado, pois constitui um dos fatores a serem otimizados na topologia da rede. No caso da síntese enzimática de dextrana, a reação ocorre sem a necessidade de cofatores e portanto o neurônio referente a esta variável foi suprimido da rede, assim como os neurônios referentes a concentração de inibidores, ao pH, à força iônica e à temperatura, que são

constantes na condição ótima de síntese, sendo estes parâmetros fixos e bem definidos. Sendo assim, a rede utilizada neste trabalho tem a seguinte topologia:

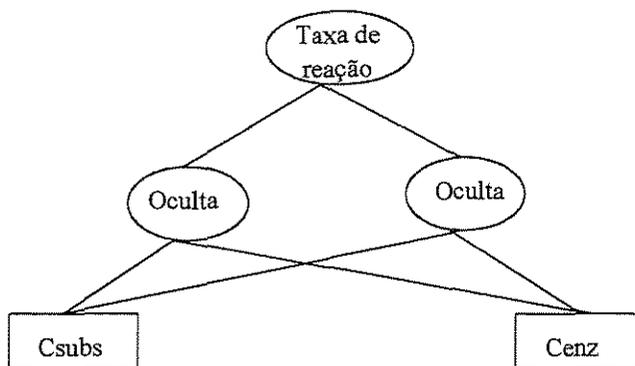


Figura 6.2. Topologia da rede utilizada par predição da taxa de reação enzimática para síntese de dextrana.

6.3 – Modelagem Híbrida

A modelagem híbrida foi realizada com o intuito de estudar a viabilidade da utilização de redes neurais para determinação da taxa de reação enzimática. Sendo assim a modelagem híbrida foi aplicada ao sistema duplo estágio.

No modelo híbrido, a taxa de reação enzimática é determinada via rede neural. A rede é utilizada somente para determinação da taxa de reação no estágio de dessorção visto que a reação enzimática é praticamente desprezível no estágio de adsorção, devido à baixa concentração de enzima livre neste estágio.

6.3.1 – Balanço de massa para o tanque 1 (dessorção)

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_{2\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_R C_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (6.1)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{FRq_2\varepsilon}{V_1} - \frac{FRq_1\varepsilon}{V_1} - \frac{F_1q_1}{V_1} - k_3q_1 \quad (6.2)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1S_0}{V_1} + \frac{FRS_2\varepsilon}{V_1} - \frac{FRS_1\varepsilon}{V_1} - \frac{F_1S_1}{V_1} - r_{reac} \quad (6.3)$$

6.3.2 - Balanço de massa para a o tanque 2 (adsorção)

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_r C_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_2} + [k_2 q_2 - k_1 C_2 (q_m - q_2)] \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (6.4)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{FRq_1\varepsilon}{V_2} + \frac{F_1q_1}{V_2} - \frac{FRq_2\varepsilon}{V_2} + [k_1C_2(q_m - q_2) - k_2q_2] \quad (6.5)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{FRS_1\varepsilon}{V_2} + \frac{F_1S_1}{V_2} - \frac{FRS_2\varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2)S_2}{V_2} - \frac{KC_2S_2}{K_m + S_2} \quad (6.6)$$

6.4 – Treinamento da rede

O treinamento da rede consiste em apresentar à mesma os pares de treinamento (*input/output*), tendo sido determinado um erro máximo admitido, já que o funcionamento de uma rede neural é baseado na minimização do erro através de um método de otimização, que na rede utilizada é o método do gradiente descendente. Durante o treinamento, ocorre a seleção dos pesos (conexões) que minimizam a soma dos quadrados dos erros entre a predição da rede e o *output* desejado, especificado pelos pares de treinamento. O treinamento da rede é iniciado com atribuição randômica de pesos de valores baixos. Deve-se evitar a inicialização da rede com pesos iguais, pois este procedimento pode resultar em não convergência no caso de redes que requerem pesos desiguais (Rumelhart e

McClelland 1989). Com o treinamento, o vetor contendo os dados de entrada (*input*) se propaga através da rede para gerar a saída predita pela rede (*output*). Durante o treinamento, é arbitrada uma taxa de aprendizagem da rede, que é equivalente ao tamanho do passo, podendo também ser utilizado um termo de momento para acelerar a convergência da rede.

A velocidade de aprendizagem, bem como a qualidade do treinamento dependem não só da topologia da rede, mas também do erro máximo admitido e do conjunto de dados de treinamento apresentado à mesma. O conjunto de dados de treinamento da rede devem ser sempre normalizados entre 0 e 1, tanto os de *input* quanto os de *output*. A seguir é apresentado o algoritmo de treinamento da rede e o esquema de treinamento:

6.4.1 - Algoritmo de treinamento da rede:

- 1) Cálculo das saídas da camada *hidden*
- 2) Cálculo das saídas da camada *input*
- 3) Cálculo de δ (sinal de erro) e atualização de θ (erro) na camada *output*
- 4) Atualização das conexões (pesos) entre as camadas *output* e *hidden*
- 5) Cálculo de δ (sinal de erro) e atualização de θ (erro) na camada *hidden*
- 6) Atualização das conexões (pesos) entre as camadas *input* e *hidden*
- 7) Realização do teste de convergência (Erro < Erro máximo admitido)

6.5 – Resultados e Discussões

Foi utilizada para a determinação da taxa de reação enzimática uma rede *backpropagation*. Os dados utilizados para treinamento da rede foram obtidos via simulação. O ideal seria a utilização de dados experimentais. Entretanto o treinamento de uma rede neural requer um conjunto muito grande de pares de treinamento, no caso da

reação enzimática em estudo (síntese de dextrana) estes dados seriam a taxa de reação (neurônio de saída) e a concentração de enzima e substrato (neurônios de entrada).

Só um estudo de viabilidade entretanto, não necessita de dados experimentais. Não temos dados experimentais em quantidade suficiente para o treinamento da rede. Para a síntese enzimática de dextrana, os únicos dados experimentais encontrados para a taxa de reação enzimática foram a constante de Michalis–Menthen (K_m) e a constante cinética de reação (K). Dessa forma, o treinamento da rede só foi possível utilizando-se os dados obtidos a partir da equação de Michaelis-Menthen.

Para o treinamento da rede foi utilizado um conjunto de 225 pares. O treinamento da rede engloba, dentre outros fatores, a determinação do número de neurônios na camada intermediária. Outro fator importante para a utilização de uma rede neural em um modelo híbrido é o treinamento da mesma dentro da faixa de validade para o sistema em estudo.

A topologia da rede utilizada no modelo apresentado no item 6.3 é aquela apresentada na figura 6.2. Após o treinamento, a rede foi testada utilizando-se um conjunto de 12 pares de teste, diferentes dos utilizados para o treinamento. Os gráficos a seguir apresentam os resultados obtidos com o teste da rede:

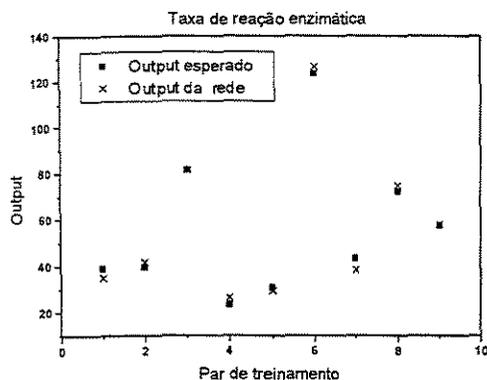


Figura 6.3 - Gráfico comparativo entre a saída esperada e a fornecida pela rede para taxa de reação enzimática.

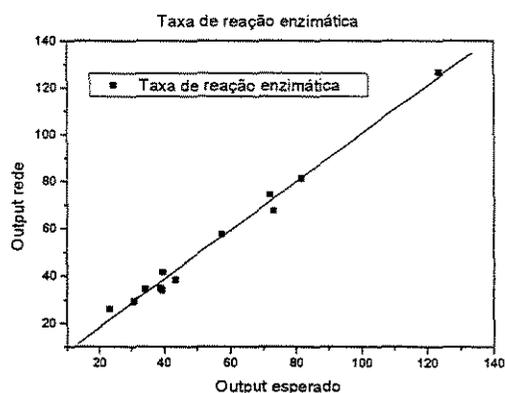


Figura 6.4 - Gráfico de dispersão entre a saída esperada e a fornecida pela rede para taxa de reação enzimática

Pelos gráficos apresentados nas figuras 6.3 e 6.2, observa-se que a resposta da rede é satisfatória, podendo ser utilizada no modelo híbrido. Dessa forma, as simulações de

número 3 e 4, apresentadas no Capítulo 3, foram repetidas utilizando o modelo híbrido para o reator duplo estágio. A simulação de número 3 foi escolhida por ser a que apresentou o melhor desempenho do sistema. Já simulação de número 4 foi escolhida para verificar a validade da rede alterando-se uma das condições do sistema, no caso a fração líquida. Com relação à cinética de adsorção, foram utilizados os dados experimentais obtidos por Souza (1993). A tabela 6.1 apresenta as condições operacionais para o modelo híbrido:

Tabela 6.1 – Condições operacionais para o modelo híbrido

Sim	ε	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_R (l/h)	C_0 (g/l)
Hib3	0.5	100	70	250	0.3
Hib4	0.6	100	70	250	0.3

As figuras de 6.5 a 6.8 apresentam os resultados obtidos com o modelo híbrido comparados com o modelo determinístico.

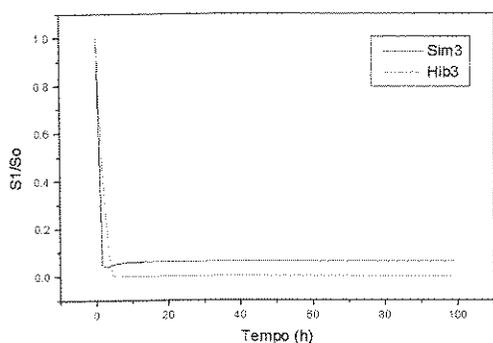


Figura 6.7 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no estágio de dessorção (modelo determinístico e modelo híbrido).

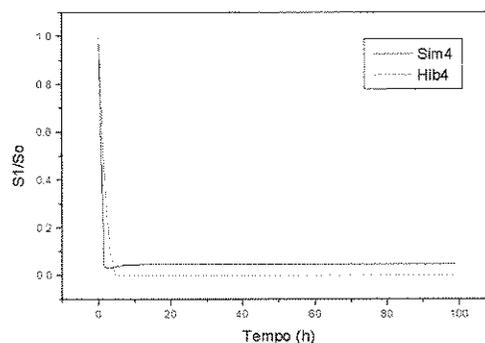


Figura 6.8 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no estágio de dessorção (modelo determinístico e modelo híbrido).

De acordo com os gráficos das figuras 6.7 e 6.8, os resultados obtidos com a utilização do modelo híbrido são próximos aos resultados obtidos com o modelo

determinístico. Pode-se dizer que a utilização de uma rede neural para obtenção da taxa de reação enzimática é viável.

O principal problema encontrado para a utilização do modelo híbrido, neste caso específico, é a necessidade de um número muito grande de pares de treinamento. No caso de reações enzimáticas de cinética conhecida como a síntese de dextrana, existem poucos dados experimentais, e os mesmos são reportados em termos das constantes da equação do modelo (no caso da dextrana Michaelis-Menten).

Em relação a cinética de adsorção da enzima, esta não foi considerada na modelagem híbrida. Sendo assim, os perfis de enzima livre e adsorvida são determinados através de equações e não da rede, tal qual é realizado no modelo determinístico, sendo portanto obtidos perfis idênticos.

7.1 - Introdução

Apesar das inúmeras vantagens da síntese enzimática de dextrana, quase a totalidade da dextrana produzida atualmente é obtida por fermentação, tendo sido encontrado apenas um produto obtido através de síntese enzimática (Dextrana 1500 - Sigma-Aldrich). A principal restrição à utilização da síntese enzimática é o alto custo da enzima. Dessa forma, sistemas onde a recuperação da enzima seja possível são alternativas interessantes. Entretanto, quando se pensa em processos industriais, além da recuperação da enzima, deve-se levar em consideração a alta produtividade e o rendimento do processo.

Os estudos realizados com o reator triplo estágio evidenciam a superioridade do mesmo em relação ao reator duplo estágio proposto por Souza (1993). Foi observado que quanto maior a quantidade de enzima presente no sistema, maior é quantidade de substrato consumido no estágio de dessorção (Capítulo 3). Entretanto, quando se trata de uma reação enzimática, o aumento da quantidade de enzima não está diretamente relacionado a um aumento na quantidade de dextrana produzida. Em condições industriais deve-se garantir uma atividade enzimática suficiente para a conversão desejada de substrato.

Diversos estudos experimentais evidenciam que o aumento da concentração de substrato, bem como o uso de aceptores favorecem a formação de dextrana de baixo peso molecular. Dessa forma, a otimização de qualquer processo de síntese de dextrana não está relacionada somente com a quantidade de dextrana produzida, mas também com o peso molecular desejado.

A maior parte da dextrana obtida por fermentação é dextrana de alto peso molecular (nativa). Quanto a dextrana de baixo peso molecular (clínica), esta é tradicionalmente obtida através da hidrólise da dextrana nativa, o que eleva seu custo de produção. Sendo assim, a síntese enzimática constitui uma alternativa à síntese de dextrana clínica, devido a facilidade de controle do sistema.

Testes de produção *in vitro* de dextrana em escala industrial foram efetuados a pH 5.2 em solução de dextrana-sacarase de 10 U.D.S/ ml (Alsop,1993). Os rendimentos desses testes em termos de dextrana total clínica e nativa, além de produtos secundários (mono e di-sacarídeos) são apresentados na tabela a seguir:

Tabela 7.1 - Rendimentos das frações de carboidratos (g / 100 g de sacarose) obtidos na síntese *in vitro* de dextrana variando-se a concentração de sacarose (Alsop,1983).

Sacarose (% W/ V)	Mono sacarídeos	Di sacarídeos	Dextrana Total	Dextrana alto PM	Dextrana baixo PM
2	52.2	1.9	45.9	45.9	0
4	50.0	4.4	45.6	45.6	0
5	51.3	4.3	44.4	44.4	0
10	51.2	6.8	42.0	39	3.0
15	55.5	9.4	35.3	25.3	10.0
20	56.9	11.2	31.9	17.9	14.0

A tabela 7.1 apresenta os rendimentos experimentais obtidos para a conversão total do substrato, ou seja toda a sacarose é convertida em algum produto (segundo a tabela 7.1). O que garante a conversão total do substrato é atividade enzimática, a qual é determinada experimentalmente e depende não somente da concentração da enzima utilizada, mas também de suas condições de armazenagem e do meio em que a mesma está sendo utilizada tais como: concentração salina, presença de determinados íons e pH, dentre outros fatores. Embora não se saiba qual o sistema utilizado, para a obtenção dos rendimentos apresentados na tabela 7.1, seu uso como base de cálculo permite aproximar as estimativas realizadas neste capítulo das condições reais de síntese em escala industrial.

O processo estudado neste trabalho é uma síntese enzimática, a qual apresenta algumas características peculiares, tais como quantidade de dextrana produzida e peso molecular dependente das condições de síntese e não somente da cinética enzimática (equação de Michaelis-Menten). Dessa forma, o estudo da viabilidade da aplicação do sistema proposto em escala industrial, através de simulações do processo, deve ser embasado em dados experimentais, tais como os apresentados na tabela 7.1.

Sob o ponto de vista econômico, a síntese enzimática de dextrana é mais interessante para a obtenção de dextrana clínica, visto que há a possibilidade da eliminação da etapa de hidrólise. Sendo assim, foi considerada, para fins de verificação da

aplicabilidade do processo em escala industrial, as condições apresentadas na tabela 7.1 para uma concentração de 20 % de substrato na corrente de alimentação, visto ser a que apresenta maiores rendimentos em termos de dextrana clínica.

7.2 - Simulações

Para verificar a aplicabilidade da utilização do processo CARE modificado para síntese enzimática de dextrana, foi considerado o reator triplo estágio dada sua superioridade em relação ao modelo duplo estágio. O volume dos tanques e fração líquida do sistema são constantes, sendo a fração líquida do sistema igual a 0,5 e o volume total (volume de sólidos + líquido) de cada um dos tanques igual a 1000 litros. Os dados experimentais relativos a adsorção da enzima utilizados foram os obtidos por Curralero et al. (1998), por serem mais completos que os apresentados por Souza (1993), visto que consideram a presença do tampão de dessorção.

Considerando a concentração de 20 % de sacarose (tabela 7.1) e o modelo matemático apresentado no Capítulo 5, serão consideradas, num primeiro momento, as seguintes condições operacionais para o sistema:

Tabela 7.2 Condições operacionais para o sistema triplo estágio utilizando os dados experimentais de Curralero et al. (1998)

Sim	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_3 (l/h)	F_R (l/h)	E_0 (mol/l)	E_{01} (mol/l)	C_0 (g/l)	S_0 (g/l)
Sim35	100	150	0	250	0,50	0,75	1.0	200
Sim35	100	150	0	250	0,50	0,75	1.5	200
Sim36	100	150	0	250	0,50	0,75	2.0	200

As condições operacionais apresentadas na tabela 7.2 referem-se àquelas necessárias para se garantir a concentração mínima de 0,5 M de NaCl no estágio de dessorção, com baixas concentrações de sal nos estágios de adsorção, conforme apresentado no Capítulo 5. Entretanto, devido ao aumento significativo da concentração de substrato na alimentação serem utilizadas em valores bem superiores as utilizadas até agora nos capítulos anteriores, são utilizadas concentrações mais elevadas de enzima, com a

finalidade de se verificar a quantidade de enzima necessária para a obtenção de um alto consumo de substrato.

Os resultados obtidos com as simulações da tabela 7.2 são apresentados a seguir:

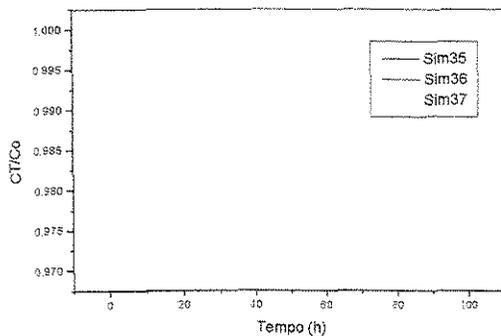


Figura – 7.1 – Gráfico comparativo da quantidade de enzima retida no sistema.

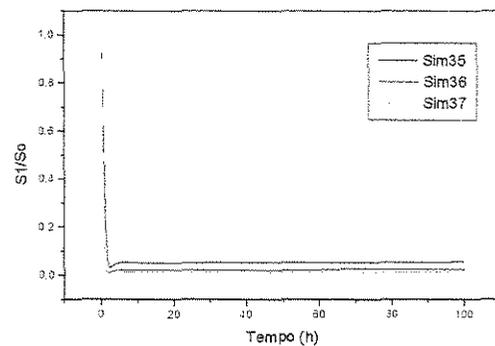


Figura 7.2 – Gráfico comparativo do consumo de substrato no tanque de dessorção.

As vazões de alimentação utilizadas nas simulações da tabela 7.2 são idênticas à simulação Sal6 (Capítulo5), sendo estas as que apresentaram melhor desempenho para o processo. Dessa forma, pode-se assegurar que as concentrações de sal em cada um dos tanques estão dentro das faixas desejadas. As curvas coincidentes obtidas no gráfico apresentado na figura 7.1 se devem ao fato da vazões serem iguais para as três simulações consideradas (a retenção enzimática em termos percentuais é fortemente dependente das vazões de alimentação). Observa-se que apesar do aumento da quantidade inicial de enzima no sistema, não há muita diferença no consumo de substrato no tanque de dessorção. Uma análise dos perfis da concentração de substrato em cada um dos tanques, conduz a melhores conclusões.

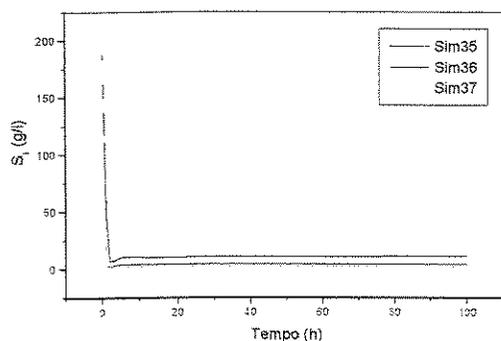


Figura 7.3 – Perfil de substrato no tanque de dessorção.

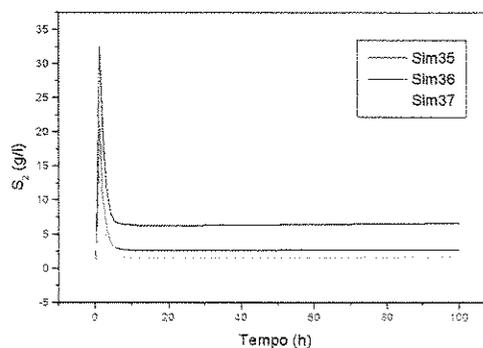


Figura 7.4 – Perfil de substrato no primeiro estágio de adsorção.

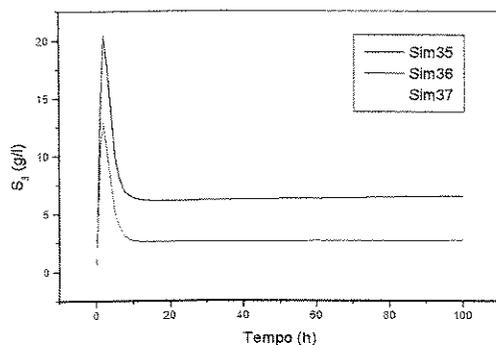


Figura 7.5 – Perfil de substrato no segundo estágio de adsorção.

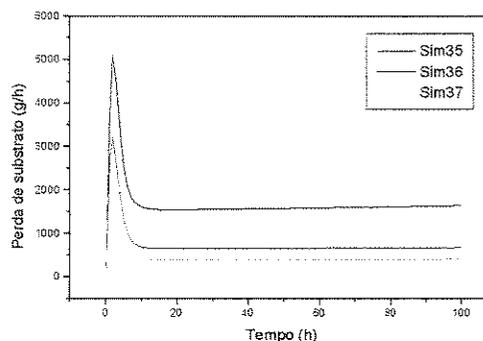


Figura 7.6 – Perfil da perda de substrato pelo sistema.

Observa-se através dos gráficos das figuras de 7.3 a 7.5 que a quantidade de substrato no tanque I diminui rapidamente, enquanto que há um pico na concentração de substrato nos demais tanques. A ocorrência disso se deve ao fato de que, no início da operação, o substrato não consumido no tanque de dessorção é transferido para os estágios de adsorção. Essa transferência causa uma elevação brusca na concentração de substrato nos estágios de adsorção, a qual se estabiliza com o passar do tempo, pois o sistema tende a um estado estacionário.

A figura 7.6 apresenta o perfil da perda de substrato não consumido, obtida pelo produto da vazão efluente do sistema ($F_1+F_2+F_3$) e a concentração de substrato no último estágio (S_3). Observa-se que, quanto menor a concentração inicial de enzima, maior é a

perda de substrato não consumido. Os gráficos a seguir apresentam os perfis de enzima livre e adsorvida em cada um dos estágios, bem como o perfil da perda enzimática:

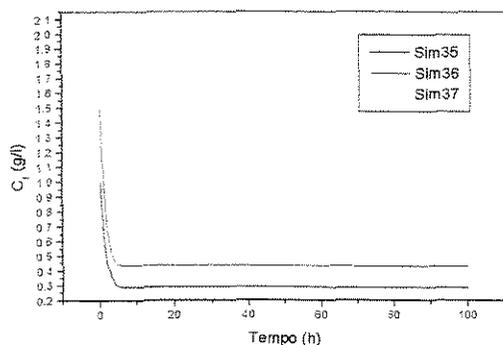


Figura 7.7 – Perfil de enzima livre no estágio de dessorção.

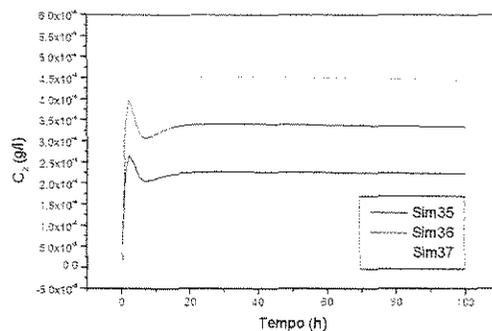


Figura 7.8 – Perfil de enzima livre primeiro estágio de adsorção.

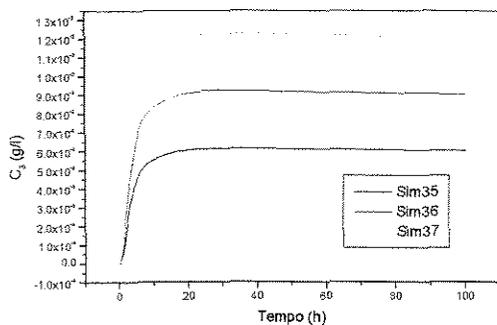


Figura 7.9 – Perfil de enzima livre no segundo estágio de adsorção.

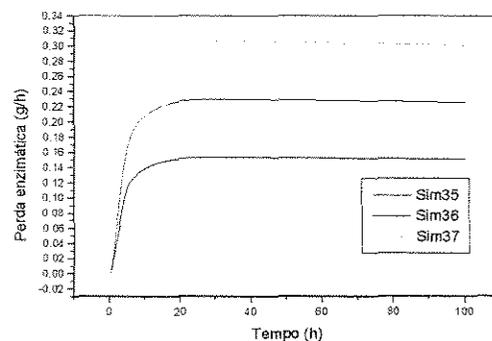


Figura 7.10- Perfil da perda enzimática no sistema.

Observa-se, na figura 7.7, uma queda brusca da concentração de enzima livre no tanque de dessorção. Entretanto, o pico presente nos perfis de enzima livre é menor que o obtido para o substrato no primeiro estágio de adsorção, e não aparece no segundo estágio de adsorção. Isto se deve ao fato de a enzima não somente estar sendo transferida do estágio de dessorção para os estágios de adsorção, mas também sendo adsorvida nos tanques de adsorção.

A concentração de enzima livre nos estágios de adsorção é muito pequena se comparada a concentração de enzima livre no estágio de dessorção. Observa-se também que quanto maior a quantidade inicial de enzima no sistema, maior é a concentração de enzima livre no sistema e maior a perda enzimática, dada pelo produto da vazão efluente do sistema ($F_1+F_2+F_3$) e a concentração de enzima livre no último estágio de adsorção (C_3).

De acordo com os resultados obtidos, quanto maior a concentração inicial de enzima livre maior é consumo de substrato e maior será também a perda enzimática do sistema. Entretanto, é difícil estabelecer uma concentração de enzima suficiente para a conversão total do substrato, tal qual apresentada na tabela 7.1, visto que essa conversão depende da atividade enzimática, a qual é uma medida experimental e deve ser realizada para cada lote de enzima utilizado na síntese, a fim de verificar a concentração necessária para se atingir uma dada atividade enzimática.

Os rendimentos apresentados na tabela 7.1 foram obtidos para uma atividade enzimática de 10 UDS/ ml. Souza (1993) apresenta uma tabela da atividade enzimática da dextrana-sacarase em função da concentração de enzima (medidas experimentais). Embora as condições de síntese não sejam a mesma utilizada nas medições de Souza (1993), a mesma pode ser utilizada para estimar a concentração de enzima necessária para a obtenção dos rendimentos apresentados na tabela 7.1. A tabela 7.3 apresenta os dados obtidos por Souza (1993) para a determinação da isoterma de adsorção da dextrana-sacarase em DEAE-Celulose.

Tabela 7.3 – Atividade enzimática da enzima dextrana-sacarase (Souza,1993)

UDS/ ml	Co (g/l)	UDS/ ml	Co (g/l)
3	0,1485	12	0,6129
4	0,2047	13	0,7859
7	0,4229	16	0,8566
8	0,4082	20	1,0707
9	0,5436	22	1,7778
10	0,5106	25	1,3384
11	0,6652		

Observa-se através da tabela 7.3, que não há uma linearidade entre a concentração de enzima e a atividade enzimática e evidenciando ainda mais a dificuldade em se determinar uma concentração em unidades clássicas de concentração, tais como razão massa/volume), para se obter os rendimentos apresentados na tabela 7.1. Usando a tabela

7.3 como guia, observa-se que a concentração enzimática para uma atividade de 10 UDS/ml obtida por Souza (1993), está em torno de 0,5 g/l. Embora essa concentração deva necessariamente ser determinada experimentalmente, o valor de 0,5 g/l será considerado como a concentração mínima de enzima livre necessária para a obtenção dos rendimentos apresentados na tabela 7.1.

7.3 – Verificação da aplicabilidade do sistema para processos industriais

O sistema em estudo é de difícil otimização devido ao elevado número de variáveis envolvidas. A otimização do sistema visa a obtenção de alto rendimento, alta produtividade e alta retenção enzimática. Todos esses fatores dependem fortemente das vazões de alimentação de cada um dos tanques. Dessa forma, dada uma condição inicial em termos de fração líquida do sistema, concentração inicial de substrato e concentração inicial de enzima, a otimização do mesmo pode ser realizada através do ajuste das vazões de alimentação.

Neste trabalho, uma otimização heurística foi realizada. As condições operacionais apresentadas na tabela 7.2, foram escolhidas dentre várias simulações, sendo que as mesmas apresentaram resultados satisfatórios em termos de consumo de substrato e retenção enzimática. O rendimento do processo, não é diretamente relacionado ao consumo de substrato, visto que de acordo com a tabela 7.1, nem todo substrato consumido é convertido em dextrana. Já em relação a produtividade, por se tratar de um processo contínuo, este fator depende da quantidade substrato convertido em dextrana, além da vazão efluente do sistema.

Por ser um sistema contínuo e sem alimentação de enzima, o estado estacionário é difícil de ser atingido, visto que há sempre uma perda enzimática e com o passar do tempo, um acúmulo de substrato. Pode-se dizer ainda que o sistema entra em estado pseudo-estacionário, visto que nas condições utilizados para as simulações, essas variações são quase imperceptíveis após um certo tempo, o qual pode ser convenientemente denominado *start up* do processo. De acordo com os resultados apresentados nas figuras 7.6 e 7.10, após 20 horas de operação, não são notadas mais variações bruscas na perda de substrato não convertido e na perda enzimática do sistema. A essas 20 horas iniciais será atribuída a

qualidade de *start up* do processo. Para fins de cálculo da taxa da perda enzimática e de substrato, será considerada o valor médio obtido no intervalo de tempo considerado nas simulações (100 h). Para as simulações da tabela 7.2, de acordo com os rendimentos da tabela 7.1 temos:

Tabela 7.4 – Rendimentos obtidos com reator triplo estágio com base nos dados experimentais apresentados na tabela 7.1

Sim	Alimentação de Substrato (kg/h)	Perda de substrato (kg/h)	Substrato consumido (kg/h)	Dextrana produzida (kg/h)
Sim35	50	2,08	47,91	15,29
Sim36	50	1,08	48,92	15,61
Sim37	50	0,73	49,27	15,72

De acordo com a tabela 7.1, nem todo o substrato consumido é convertido em dextrana. A tabela 7.4 apresenta os rendimentos em termos de dextrana total produzida com o sistema triplo estágio, proporcionais aos rendimentos experimentais reportados na tabela 7.1, considerando alimentação de substrato a 20 %. Observa-se que apesar da concentração inicial de enzima dobrar da simulação 35 para a 37, a diferença entre as respectivas taxas de produção de dextrana não é tão grande. Entretanto, deve-se considerar a atividade enzimática e não somente a concentração mássica de enzima livre.

A concentração mínima de 0,5 g/l de enzima livre no tanque de dessorção só é obtida com as condições operacionais da simulação de número 37. Dessa forma, esta simulação será considerada como base para a estimativa econômica do sistema, apresentada posteriormente. Entretanto, nesta seção, para fins de estudo comparativo da viabilidade técnica em termos de perda enzimática e de substrato não consumido, serão consideradas as simulações de número 35 a 37.

Todos os cálculos apresentados nesta seção foram realizados proporcionalmente aos rendimentos apresentados na tabela 7.1 (dados em g/ 100g de substrato consumido).

O substrato consumido, produz além da dextrana, monossacarídeos (basicamente frutose) e dissacarídeos (maltose e isomaltose). Além disso, a dextrana produzida pode ser dividida em dextrana de alto peso molecular (nativa) e de baixo peso molecular (clínica). A

tabela 7.5 apresenta as quantidades de monossacarídeos, dissacarídeos, dextrana nativa e clínica, bem como taxa de perda enzimática para as simulações da tabela 7.2:

Tabela 7.5 – Rendimentos obtidos com reator triplo estágio com base nos dados experimentais apresentados na tabela 7.1.

Sim	Mono sacarídeo (kg/h)	Di Sacarídeo (kg/h)	Dextrana Nativa (kg/h)	Dextrana Clínica (kg/h)	Perda enzimática (g/h)
Sim35	27,27	5,36	8,57	6,71	0,14
Sim36	27,84	5,47	8,75	6,85	0,23
Sim37	28,03	5,52	8,82	6,90	0,30

De acordo com as tabelas 7.4 e 7.5 há pouca diferença em termos das taxas obtidas para a produção de dextrana e produtos secundários (mono e di-sacarídeos). Entretanto, em um processo contínuo isso pode fazer diferença. Para calcular a produção anual de dextrana, serão considerados os dados das tabelas 7.4 e 7.5 considerando operação anual de 300 dias (7200 h). Mesmo em se tratando de um processo contínuo, deve haver paradas para limpeza e manutenção do sistema. O período de operação contínua foi estimado em sete dias, considerando este um intervalo suficiente para limpeza e esterilização dos equipamentos. Uma estimativa da produção anual de dextrana, consumo e perda de substrato, bem como a perda de enzima é apresentada na tabela 7.6:

Tabela 7.6 – Estimativa dos rendimentos anuais da síntese enzimática de dextrana com o reator triplo estágio.

Sim	Alimentação de Substrato (ton/ano)	Perda de substrato (ton/ano)	Substrato consumido (ton/ano)	Perda enzimática (kg/ano)	Dextrana* produzida (ton/ano)
Sim35	360	14,97	345	1,01	110
Sim36	360	7,78	352	1,66	112
Sim37	360	5,2	355	2,16	113

* dextrana total considerando dextrana de alto e baixo peso molecular

De acordo com os resultados apresentados na tabela 7.5, a perda enzimática e de substrato estimadas não são muito significativas, frente a quantidade dextrana produzida.

Esta perda gira em torno de 5 % do substrato alimentado. Entretanto os dados da tabela 7.6 só consideram as perdas inerentes a operação do sistema não sendo considerados o consumo de enzima e substrato na carga do reator quando ocorre uma parada do processo, seja para manutenção ou limpeza. Os resultados apresentados na tabela 7.6 são resultados da operação da planta em uma condição otimizada obtida através das simulações do processo. Na prática, espera-se a ocorrência de perdas maiores, visto que alguns fatores tais como problemas com o transporte hidráulico de entre os tanques e perdas decorrentes deste transporte não são previstas pelo modelo.

Considerando que a limpeza do sistema seja semanal (52 paradas por ano), a tabela 7.7 apresenta o consumo de substrato e enzima para carga do reator considerando uma concentração inicial de enzima de 2 g/l (sim37) e a possibilidade de recuperação de 80 % da enzima presente no sistema em cada parada.

Tabela 7.7. – Consumo anual de enzima e substrato para carga do reator, considerando o volume de líquido nos tanques de 500 l.

Produto	Quantidade por carga (kg)	Consumo anual (kg)
Dextrana-sacarase	1 kg	11.6 kg
Sacarose	100	5200

Comparando a tabela 7.7 com a 7.6 observa-se que o maior consumo de enzima se dá durante a carga do reator, enquanto que a perda anual de substrato no processo é igual ou superior à necessária para carregar o reator.

A produção mundial de dextrana gira em torno de 500 toneladas/ano (Currello, 1993). A estimativa de dextrana obtida através da simulação do sistema triplo estágio é de 100 toneladas/ano, isso representa 20 % da produção mundial de dextrana. Sendo assim, o reator triplo estágio é viável para síntese enzimática de dextrana em escala industrial, nas condições estudadas. Na prática a quantidade de dextrana obtida pode ser inferior ao estimado (20%) devido ao fato de o modelo não prever os todos os problemas operacionais do processo tais como: problemas com o transporte hidráulico. Ainda assim a capacidade da planta seria alta o viabiliza o processo.

As estimativas apresentadas podem variar também em função do intervalo de tempo entre uma parada e outra, e outros fatores não abordados no presente trabalho, tais como

concentração de enzima (g/l) necessária para a obtenção da atividade enzimática necessária para obtenção dos rendimentos apresentados na tabela 7.1, os quais foram utilizados como base de cálculo (medida experimental).

Um cálculo preciso para o consumo de substrato e perda enzimática é difícil visto, o mesmo ser fortemente dependente de dados experimentais não disponíveis tais como intervalo de tempo considerado para regeneração da resina, desativação da enzima devido a presença de tampões (dessorção, adsorção e tampões para o ajuste de pH), possibilidade real de recuperação da enzima em cada parada do sistema, além outros problemas decorrentes da operação do sistema tais como transporte hidráulico. Dadas essas considerações, os consumos de enzima e substrato, bem como a quantidade de dextrana produzida sofreriam variações, cujo cálculo preciso é impossível com as informações disponíveis em literatura aberta.

Em termos de consumo enzimático, pode-se dizer que o processo consome em torno de 13 kg/ ano, enquanto que o consumo de substrato (sacarose) é algo em torno de 365 ton/ano (quantidades estimadas com base nas tabelas 7.6 e 7.7). Entretanto, além da dextrana há a produção de monossacarídeos e dissacarídeos, sendo a frutose o principal monossacarídeo obtido. A frutose é um açúcar de alto valor adoçante e de grande aceitação no mercado, sendo portanto um subproduto interessante. De acordo com a tabela 7.4, a quantidade de frutose obtida juntamente com a síntese de dextrana é algo em torno de 190 ton/ano. Sob esse ponto de vista, aproximadamente 80 % da sacarose alimentada no sistema é convertida em produto comercial (dextrana e frutose), segundo os rendimentos apresentados na tabela 7.2.

7.4 – Estimativa Econômica

A estimativa econômica visa comparar o gasto com matéria prima e o possível faturamento com os produtos finais (dextrana e frutose). Não foram considerados nesta análise as etapas de purificação e separação dos produtos, bem como custos operacionais, ativação e reposição da resina, bem como custos referentes as soluções tampão e a enzima, (esta última não é comercializada para aplicações industriais).

As aplicações da dextrana são fortemente dependentes de seu peso molecular. O preço do produto final também varia de acordo com o peso molecular do produto. Para fins de cálculo, foi considerado um valor médio dentre 3 produtos comerciais, cuja faixa de peso molecular varia de 60.000 a 500.000, sendo estes produtos obtidos via fermentação. Foi considerada a produção estimada de 100 ton/ ano de dextrana total, conforme apresentado na seção anterior, sendo a mesma dividida em 57 ton/ ano de dextrana nativa e 43 ton/ano de dextrana clínica (considerando a proporção apresentada na tabela 7.1 para alimentação de substrato a 20 %).

Já em relação a enzima, a mesma é comercializada em termos de atividade enzimática em quantidades ínfimas destinadas a outras finalidades, que não o uso industrial. Dessa forma, é difícil incluir o custo da enzima nos cálculos de forma direta. Sendo assim em uma primeira análise o custo da enzima não será considerado, sendo posteriormente estimado um valor máximo para este custo. Quanto a sacarose, foi considerado açúcar comercial. Foi também considerado o custo da dextrana obtida via síntese enzimática, de peso molecular 1.500. A tabela 7.8 apresenta as respectivas cotações. Para fins de cálculo, será considerada dextrana clínica aquela obtida via síntese enzimática e nativa a obtida via processo fermentativo.

Tabela 7.8 –Custo de matérias prima e produtos (fonte: Sigma-Aldrich)

Produto	Cotação US\$	Preço US\$/ kg	Base de cálculo (ton/ ano)	Faturamento US\$ x 10 ⁶
Dextrana (obtida por fermentação)	1.11/g	1100	57	63.20
Dextrana (obtida via síntese enzimática)	4.32/g	4320	43	185.76
Frutose	24.3 /kg	24.3	190	5.62
Sacarose *	0.1060 / lb	0.23/ kg	365	0.085

*fonte: Indicadores econômicos do Jornal Folha de São Paulo (27/07/2000) .

De acordo com a tabela acima, um faturamento anual com a venda dos produtos obtidos com o reator triplo estágio pode ser estimado em torno de 60 milhões de dólares, com a média do preço de mercado da dextrana obtida por fermentação. Já com o preço da dextrana obtida via síntese enzimática, é da ordem de três vezes a média utilizada para a

dextrana obtida via fermentação. O faturamento anual possível, somente com este produto é da ordem de 180 milhões de dólares.

Quando comparado com o faturamento anual obtido com a venda dos produtos, pode-se dizer que o custo com substrato é desprezível. Embora não tenham sido considerados nesta análise o custo com tampões e resinas bem como custos operacionais e de manutenção, estes tendem a ser razoável frente ao faturamento possível com a comercialização de dextrana e frutose. O fator limitante na síntese enzimática de dextrana são os custos com a enzima

Foi encontrado para a dextrana-sacarase o custo de US\$ 6.70/ UDS. Segundo o fabricante (Sigma-Aldrich) a enzima é comercializada na forma liofilizada, com atividade mínima de 100 UDS/mg. Considerando um faturamento com a comercialização de dextrana e frutose entre 200 e 300 milhões de dólares/ ano, um lucro líquido em torno de 100 milhões de dólares/ ano seria possível desde que o gasto com enzima, operação da planta e tampões não ultrapassasse 150 milhões de dólares/ano. Fazendo uma projeção, com os custos citados temos:

Tabela 7.9 – Projeção considerando as estimativas do custo com enzima e demais custos não computados na tabela 7.8.

Descrição	US\$ x 10 ⁶
Faturamento com Dextrana de alto peso molecular (base de calculo dextrana obtida por fermentação tabela 7.8)	63.20
Faturamento com Dextrana de baixo peso molecular (base de calculo dextrna obtida via síntese enzimática tabela 7.8)	185,78
Faturamento com Frutose (tabela 7.8)	5.62
Custos com Sacarose (tabela 7.8)	0.085
Custo com enzima operação da planta e tampões (estimado)	150.0

Os dados considerados nesta análise são fortemente dependentes do custo com a enzima e do produto final obtido, para os quais não foram encontrados dados suficientes

para uma análise mais precisa. Outro fator que afeta o custo é o grau de pureza das matérias primas empregadas e etapas de purificação, não consideradas na análise.

7.5- Considerações finais

A estimativa econômica do processo estudado é difícil. A não existência de informações reais do processo, tais como especificação dos reagentes utilizados, dificulta o cálculo dos custos, que varia muito em função do reagente utilizado. Dessa forma, os cálculos apresentados neste Capítulo são estimativas, com base em dados de produção obtidos através de simulação. Outro fator importante é o fato de ter sido considerada a operação do sistema durante todo o ano. Os cálculos apresentados na seção anterior se referem a uma projeção possível de produção. Entretanto, o tempo de operação do sistema pode ser reduzido para alguns meses, semanas ou dias, de acordo com a produção desejada.

Dados industriais, ou até mesmo em escala piloto referentes ao sistema estudado, são fundamentais para a obtenção de um panorama mais realista e menos especulativo. Entretanto, levando-se em consideração a obtenção de um possível lucro anual em torno de 10 milhões de dólares (10 % do apresentado nos cálculos), já tornaria o processo viável, principalmente em se tratando da obtenção de dextrana clínica.

Embora a fatia do mercado considerada para cálculos anuais seja relativamente alta (20 % da produção mundial), acredita-se que a produção de dextrana esteja concentrada em poucas empresas, visto só terem sido encontrados dados de uma única empresa (Sigma – Aldrich). Considerando a produção mundial de 500 ton/ano em termos de dextrana obtida via fermentação (US\$ 1.11 /g, segundo tabela 7.8), tem-se um faturamento anual de 550 milhões de dólares/ano, o que torna a produção de dextrana clínica um investimento promissor, visto o mercado para este polissacarídeo ser modesto devido ao seu alto custo.

8.1 - Conclusão

Neste trabalho foi proposta a adição de um reator triplo estágio contínuo com reciclo de enzima para síntese enzimática de dextrana. O sistema é baseado no reator duplo estágio proposto por Souza (1993) e a adição de um estágio extra de adsorção visa aumentar a retenção enzimática. No reator triplo estágio estudado dois dos tanques são destinados a adsorção da enzima, enquanto o outro é destinado a dessorção e reação enzimática. Foi realizada a modelagem do sistema duplo e triplo estágio.

Diversas simulações foram realizadas com ambos os sistemas, tendo sido apresentadas somente aquelas que apresentaram melhores resultados. Um estudo paramétrico (não apresentado) utilizando uma ampla faixa de vazões de alimentação e de reciclo foi realizado para determinação da melhor faixa de vazão a ser utilizada para os sistemas em estudo.

Os resultados obtidos com as simulações do sistema duplo e triplo estágio foram então comparados entre si. Foi constatada a superioridade do sistema triplo estágio em relação ao sistema duplo estágio. Essa superioridade é evidenciada através do consumo de substrato. A quantidade de enzima adsorvida no sistema triplo estágio é ligeiramente superior à obtida com o sistema duplo estágio, entretanto, devido à consideração de dessorção instantânea, a quantidade de enzima livre no estágio de dessorção é maior para o sistema triplo estágio frente ao sistema duplo estágio, visto que a taxa de dessorção depende somente da quantidade de material adsorvido na superfície do adsorvente (hipótese do modelo de Langmuir).

Um outro modelo de adsorção, onde as resistências à transferência de massa são consideradas, foi utilizado na modelagem do reator duplo estágio. Essa consideração foi realizada com a finalidade de verificar o quanto a inclusão dessas resistências poderiam influir na performance do sistema. Foi então verificada queda na quantidade de enzima retida no sistema, quando somente a resistência à transferência de massa no filme líquido é considerada. Já quando não somente a resistência à transferência de massa no filme líquido

é considerada, mas também a difusão no interior da partícula, verificou-se queda na quantidade de enzima retida no sistema e alteração do perfil da quantidade total de enzima adsorvida no sistema.

Apesar de se tratar de uma estimativa qualitativa, visto não haver disponíveis dados experimentais importantes para o modelo de adsorção proposto e a resina utilizada não ser esférica, as alterações observadas no comportamento do sistema indicam a importância em se considerar essas resistências. Devido ao fato de o produto sintetizado ser um polissacarídeo, cuja viscosidade de suas soluções podem assumir valores de 2 a 4 vezes o valor da água, e dada as limitações difusionais impostas pelo aumento da viscosidade do meio, a consideração das resistências à transferência de massa podem assumir papel primordial no desempenho do sistema estudado. Entretanto, este tópico precisa ser melhor estudado.

A área de biotecnologia tem se desenvolvido recentemente, tendo sido descobertas novas enzimas e, até mesmo outras aplicações para enzimas já conhecidas. Sob esse ponto de vista, a utilização de redes neurais para determinação da taxa de reação enzimática pode encontrar aplicação prática, em reações cuja cinética não se ajuste a modelos conhecidos. Sendo assim, ainda para o reator duplo estágio foi utilizado um modelo híbrido, onde a taxa de reação enzimática é obtida através de uma rede neural. Foi constatada a viabilidade da utilização de uma rede neural para esta finalidade.

Devido a superioridade do modelo triplo estágio, este foi utilizado para o estudo da viabilidade do processo em escala industrial. Desde o início do trabalho, as simulações foram realizadas utilizando reatores de volume compatível com reatores industriais para síntese de bioprodutos. Esse procedimento reduziu significativamente o número de simulações realizadas. O estudo da viabilidade da utilização do sistema em escala industrial foi embasado em dados experimentais de rendimento, visto que nem todo substrato consumido é convertido em dextrana. De acordo com os resultados obtidos, pode-se considerar que o reator triplo estágio é uma opção viável para a síntese enzimática de dextrana em escala industrial, com a possibilidade de obtenção de frutose (produto secundário de grande aceitação comercial). Foi verificada a conversão de 80 % da sacarose alimentada no processo em produtos comerciais (dextrana e frutose). A comercialização de dextrana de baixo peso molecular obtida via síntese enzimática (Sigma –Aldrich) evidencia

a viabilidade da síntese enzimática em escala industrial, embora não seja conhecido o sistema ou condições operacionais para esta síntese.

8.2 - Trabalhos Futuros

O sistema estudado depende fortemente da cinética de adsorção. Devido a inexistência de dados relativos a dessorção da enzima, a mesma foi considerada instantânea neste trabalho. Entretanto Currello et al. (1998) consideram a taxa de dessorção como o inverso da taxa de adsorção. Dessa forma, faz-se necessária a determinação da isoterma de dessorção da enzima. Outra consideração quanto a cinética de adsorção é o fato de os dados experimentais disponíveis não considerarem a presença de dextrana. Dado o aumento da viscosidade, a presença de dextrana pode influenciar bastante a adsorção e dessorção da enzima.

Ainda em relação a cinética de adsorção, seria interessante considerar também a presença do tampão utilizado para o ajuste de pH, visto que a reação ocorre em pH 5.2 e o tampão utilizado para dessorção é um sal neutro (NaCl). Essa consideração inclusive pode refletir não somente na cinética de adsorção da enzima, mas também na estabilidade da mesma, pois sabe-se que a enzima é pouco estável para valores de pH superiores a 6.7.

Em relação a cinética enzimática, é importante considerar, para a mesma, a presença do tampão de dessorção no meio, pois sendo a dextrana tradicionalmente produzida por fermentação, os dados cinéticos disponíveis em literatura aberta são referentes às condições encontradas no caldo de fermentação.

A utilização de outras soluções tampão, seja para adsorção e dessorção ou para o ajuste de pH, bem como a utilização de outras resinas poderiam levar a outras condições de síntese, como por exemplo o uso de uma menor quantidade de resina, o que melhoraria o transporte hidráulico do sistema.

Para obtenção experimental das isotermas de adsorção da enzima, a resina utilizada (DEAE-Celulose) é previamente tratada. O sistema estudado envolve o ciclo da enzima através de seus estágios de adsorção e dessorção, dessa forma a determinação da regenerabilidade da resina, bem como o tempo que esta pode ser utilizada antes que seja

necessária uma reativação da mesma, são dados experimentais relevantes. A montagem do sistema em escala de bancada traria informações úteis a respeito das limitações relativas ao transporte hidráulico de sólidos.

De um modo geral, para trabalhos futuros, a obtenção de dados experimentais importantes, permitiriam a obtenção de resultados mais precisos a respeito do comportamento do sistema, suas limitações e aplicações práticas.

- ALSOP, L.**, *Industrial Production of Dextran*, Progress Ind. Microbiol., Vol 18, pp.1 - 44, 1983
- ARAÚJO, M. O D.**, *Adsorção de Albumina de Soro Bovino em Resinas Trocadoras de Íons*, Tese de Mestrado, FEQ, UNICAMP, 1996.
- BAZÁN, J.H.V.**, *Estudo da Produção Enzimática de Dextrana Clínica*, Dissertação de Mestrado, FEA, UNICAMP, 1993.
- BAILEY, J.O; OILS, D.F.**, *Biochemical Enegneering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw-Hill,New York , 1986.
- BHAT,N., McAVOY, Y.J.**, *Use of Neural Network for Dynamics Modeliing and Control of Process Systems*, Computer Chemical Engeneeribng, Vol. 14, nº 4/5, pp. 573- 583, 1990.
- BUSO,E .M.; RESNICK, L.**, *Antri-human Immunodeficiency Virus Effects of Dextrans Sulfate are Strain Dependent and Synergistic or Antagonic when Dextran Sulfate is Given in Combination with Dideoxynucleosides*, Antimicorb. Ag. And Chemoth, Vol 34, nº 10, pp. 1991 - 1995, 1990.
- CARRASCO,F.,CHORNET,E.,OVEREND,R.P.,COSTA,J.**, *Generalized Correlations for the Viscosity of Dextrans as a Function of Temperature, Concentration and Molecular Weight at Low Shear Rates*, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 37, nº 08, pp. 2027 - 2098, 1989.
- CHASE, H. A** , *Affinity Separations Utilising Immobilised Monoclonal Antibodies: A New Tool for the Biochemical Engineering*, Chemical Engineering Science, Vol. 39, nº 7/8, pp. 1009 - 1125, 1984b.
- COONEY, C.L, GORDON , N.F.; AFEYAN, N.B.**, *Mathematical Modelling of the Continuous Affinity Recycle Extration on Putrifaction Technique*, J. Chormatography, nº 478, pp. 1 - 19, 1989.

- CURRALERO, I. C., B.**, *Estudo da Produção de Dextrana de Baixo Peso Molecular por via Enzimática para Obtenção de Ferro-dextrana*, Dissertação de Mestrado - FEA - UNICAMP, 1993.
- CURRALERO, I.C.B; MATSUBARA,S.; RODRIGUES;M.I,MAUGERI,F.**, *Sistema bifásico para Síntese de Dextrana*, Anais XII COBEQ, Agosto de 1998.
- DRAEGER, N.M.; CHASE, H. A**, *Protein Adsorption in Liquid Fluidized Beds*, I. Chem. Symposium Series, nº 118 , pp. 161 - 172.
- FROMENT,G.F, e BISHOFF,K.B.**, *Chemical Reactor Analysis and Design*”,pp 144, 2nd Edition, Wiley & Sons, 1990.
- GEANKOPOLIS, C.J.**, *Transport Process and Unit Operations* , 2nd Edition , Allyn and Bacon , Boston, 1983.
- GORDON, N.F.; TSUJIMURA, COONEY, C.L.**, *Optimization and Simulation of Continuous Affinity - Recycle Extraction* , Bioseparation , Vol 1 , pp. 9 - 21, 1990.
- GUIMARÃES, P. R.B.; McGREAVY, C.**, *Flow of Information Through an Artificial Neural Network* , Computers. Chem. Eng., Vol. 19, pp. S741 - S 746, 1995.
- HERE**, *Studies in Enzymatic Synthesis of Dextrana From Sucrose*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 163, pp. 221 - 233, 1946.
- HIMMELBLAU, D.M.; HOSKINS, J.C.**, *Artificial Neural Network Models of Knowledge Representation in Chemical Engineering*, Comput. Chem. Eng., Vol. 12, nº 9/10, pp. 881 - 890, 1988.
- HIMMELBLAU, D.M; BISCHOFF, K.,B.**, *Process Analysis and Simulation Deterministic Systems*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, 1968.
- HORTSMANN, B.J.;CHASE, H.A**, *Modelling the Affinity Adsorption of Immunoglobulin G to Protein A Immobilised to Agarose Matrices*, Chem. Eng. Res. Des., Vol. 67, pp. 243 - 256, May 1989
- KIM, DOMAN and DAY, DONAL**, *A New Process for the Production of Clinical Dextran by Mixed Culture Fermentation of *Lypomices starkeyi* e *Leuconostoc mesenteroides**, Enzyme Microbiology Technology, Vol. 6, July , 1994.

- KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K.,** *Characterization of the Multiple and main Component of dextransucrase from Leuconostoc Mesenteroides NRRL B 512 F*, Biochemica et Biophysica Acta, Vol. 614, pp. 42 - 62, 1980.
- LONA BATISTA, L.M.F.,** *Desenvolvimento de Software usando Modelos Determinísticos e Redes Neurais para o Processo de Craqueamento Catalítico*, Tese de Doutorado, FEQ- UNICAMP, 1996.
- MACIEL FILHO, R., LONA BATISTA, L.M.F., MOZART FUSCO,** *A Fast Fluidized Bed reactor for Industrial FCC Regeneration*, Chemical Engineering Science, Vol. 51, No. 10, pp. 1807 - 1816, 1996.
- MARGARITIS, A e ZAJIC, J.E.,** *Biotechnology Review- Mixing, Mass Transfer and Scale-Up of Polyaccharide Fermentation*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XX, pp. 939 - 1001, 1978
- MARTINEZ - ESPÍNDOLA, J.P & LOPES- MUNGLIA, C. A ,** *On the Kinetics of Dextran - sucrose and Dextran Synthesis in Batch Reactor*, Biotechnology Letters, Vol. 7 (7), pp. 483 - 486, 1985.
- MAUGERI, F.; MARTINS, M.I.; DECHECHI, E.C., MACIEL FILHO, R.,** *Dynamic Modelling and Advanced Predictive Control of a Continuous Process of Enzyme Purification*, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 14, no 04, pp. 425 -430, 1997.
- MONSAN, P. and LOPEZ, A,** *On Production of Dextran by Free and Immobilized Dextransucrase*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIII, pp. 207- 2037, 1981
- MONSAN, P.; AURIOL, D.; ORIOL, E.; PAUL, F.,** *Acceptor Reaction of a High Purified Dextransucrase with Maltose and Oligosaccharides. Application to the Synthesis of Controlled - Molecular Weight Dextrans*, Carbohydrate Research, Vol. 149, pp. 433- 441, 1986.
- PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P.,** *Acceptor Reaction of a High Purified Dextransucrase with Maltose and Oligosaccharides Application to Dextran*

- Syntesis of Controlled Molecular Weight. Dextrans*, Carbohyd. Res, Vol. 143, 1986, pp. 433-4414.
- POLSON, A**, *J. Phys. Colloid. Chem.*,54:644, 1950.
- PUNGOR, E.; AFEYAN, N.B, GORDON, N.F.; COONEY,C.L**, *Continuous Affinty-Recycle Extratction: A Novel Protein Separation Technique*, Biotechnology, Vol 5, pp. 604 -608, 1987.
- ROBYT, J.F.; WALSETH, T.F.**, *The Mechanism of Acceptor Reactions of Leuconostoc mesenteroides B- 512F Dextranucrase*, Carbohyd. Res., Vol. 61, pp. 433-445, 1978.
- RODIGUES,M.I.**, *Contribuição ao Estudo da Utilização da Enzima Dextrana-sacarase no Modificação de Polissacarídeos*, Tese de Mestrado- FEA-UNICAMP,1989.
- RODRIGUES,M.I ; ZAROR, C.A ;MAUGERL,F.; ASENJO, J.A**, *Dynamic Modelling, Simulation of Continuous Adsorption Recycle Exatraction*, Chemical Engineering Science, Vol. 47, pp. 263 - 269, 1992.
- RUMELHART, D.; McCLELLAND, J.**, *Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microestruure of Cognition*, Vol 1, Cap. 8, MIT, Cambridge, Mass., 1989.
- RUTHVEN, D.M**, *Principles of Adsorption and Desorption Process*, John Wiley & Sons, 1984.
- RUTHVEN, D. M.; KARGER, J.**, *Diffusion in Zeolites and Other Microporous Solids*, John Wiley & Sons, 1992.
- SMAGT,P.P; KROSE, J. A**, *An Introduction to Neural Networks*, University of Amsterdam, Dep. Of Computer Systems, 1993.
- SOUZA, E.A**, *Modelagem e Simulação de um Reator Contínuo com Reciclo para Produção de Dextrana* , Dissertação de Mestrado - FEA - UNICAMP, 1993.
- TANRISEVEN, A, ROBYT. J.F.**, *Interpretation of Dextranucrase Inhibition at High Sucrose Concentrations*, Carbohyd. Res. , Vol. 245, pp. 97-104, 1993.
- VELIJKOV, B. V. & LAZIÉ, M.L.**, *Studies on Dextran Fermentation Broth Reology*, Enzyme Microbiology Techonology, Vol 10, November, pp. 686 - 688, 1988.

- YAO,C.;** **TIEN, C.**, *Approximation of Intraparticule Mass Transfer in Adsorption Processes - I - Linear Systems*, Chemical Engineering Science, Vol. 47, n° 2, pp. 457-464, 1992.
- YAO,C.;** **TIEN, C.**, *Approximation of Intraparticule Mass Transfer in Adsorption Processes - II - Non Linear Systems*, Chemical Engineering Science, Vol. 47, n° 2, pp. 465 - 473, 1992.
- ZAFAR, I. BARKER, P.E.**, *An Experimental and Computational Study of a Biochemical Polymerisation Reactor in a Cromatographic Reactor Separtor* , Chemical Engineering Science, Vol. 43, No. 9, pp.2369 - 2375, 1988.

Modelar processos e sistemas químicos consiste em encontrar as equações matemáticas que descrevem o sistema em estudo e a simulação permite a previsão do comportamento do sistema. Muitas vezes, as equações do modelo são complexas e envolvem um grande número de parâmetros e variáveis. Dessa forma, a adimensionalização ou a simplificação de modelos matemáticos é prática bastante comum, pois permite a redução do número de variáveis envolvidas simplificando, dessa forma, a solução matemática das mesmas. Em casos extremos, a solução do sistema de equações só é possível através da adimensionalização de variáveis.

Os modelos apresentados no Capítulo 3 poderiam ser simplificados através da adimensionalização das vazões. Entretanto para que o número de variáveis seja realmente reduzido as vazões de alimentação de cada um dos tanques deveriam ser iguais, como pode ser visto mais adiante. O estudo paramétrico evidência o fato dos sistemas em estudo (reator duplo e triplo estágio) serem muito sensíveis às vazões de alimentação, tendo sido obtido um melhor desempenho, tanto para o reator duplo como para o reator triplo estágio, quando se utiliza vazões de alimentação desiguais. A simplificação do modelo, com adimensionalização das vazões, reduz o número de variáveis e simplifica a otimização do sistema, entretanto esta prática pode implicar em algumas restrições. Sendo assim, as simulações apresentadas neste trabalho foram realizadas utilizando o modelo original sem simplificações.

Modelo Original

Como apresentado na seção 3.2 o modelo original é aqui reescrito.

Balanco de massa para o estágio de dessorção:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_R C_{2\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_R C_{1\varepsilon}}{V_1} - \frac{F_I C_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (1)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad (2)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad (3)$$

Balanco de massa para o estágio de adssorção

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_r C_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 C_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) C_2}{V_2} - \frac{F_R C_2 \varepsilon}{V_2} - [k_2 q_2 - k_1 C_2 (q_m - q_2)] \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (4)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_R q_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 q_1}{V_2} - \frac{F_R q_2 \varepsilon}{V_2} + [k_1 C_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2] \quad (5)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_R S_1 \varepsilon}{V_2} + \frac{F_1 S_1}{V_2} - \frac{F_R S_2 \varepsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_2} - \frac{K C_2 S_2}{K_m + S_2} \quad (6)$$

Modelo Simplificado

Souza (1993) simplificou o sistema de equações que constituem a modelagem do reator duplo estágio. Esta simplificação é realizada em termos da adimensionalização das vazões, através das variáveis ψ e γ , sendo utilizado para simplificar ainda mais o modelo a razão entre volume e vazão de alimentação através da variável τ (tempo de residência), sendo válidas portanto as seguintes relações:

$$\tau_1 = \frac{V_1}{F_1} \quad \tau_2 = \frac{V_2}{F_2} \quad \psi = \frac{F_R}{F_i} \quad \gamma = \frac{F_2}{F_1}$$

F_i = vazão de alimentação do estágio i

Balanco de massa para o estágio de dessorção:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{\psi\varepsilon(C_2 - C_1)}{\tau_1} - \frac{C_1}{\tau_1} + k_3q_1 \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (7)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{\psi\varepsilon(q_2 - q_1)}{\tau_1} - \frac{q_1}{\tau_1} - k_3q_1 \quad (8)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{(S_1 - S_2)}{\tau_1} + \frac{\psi\varepsilon(S_2 - S_1)}{\tau_1} - \frac{KC_1S_1}{K_m + S_1} \quad (9)$$

Balanco de massa para o estágio de adsorção:

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{\psi\varepsilon(C_1 - C_2)}{\tau_2} + \frac{(C_1 - C_2)}{\tau_2} - \frac{C_2}{\tau_2} - [k_2q_2 - k_1C_2(q_m - q_2)] - \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (10)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{\psi\varepsilon(q_1 - q_2)}{\tau_2} + \frac{q_1}{\tau_2} + [k_2q_2 - k_1C_2(q_m - q_2)] \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \quad (11)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{(S_1 - S_2)}{\tau_2} + \frac{\psi\varepsilon(S_1 - S_2)}{\tau_2} - \frac{S_2}{\gamma\tau_2} - \frac{KC_2S_2}{K_m + S_2} \quad (12)$$

Restrições do modelo simplificado.

Comparando-se as equações representativas do modelo simplificado e do modelo original, fica evidente que o modelo simplificado só tem validade quando a variável adimensional ψ for igual para os dois tanques. Sendo assim, as vazões de alimentação em

cada um dos estágios devem ser iguais e a variável adimensional γ deve ser atribuído valor unitário. Essa restrição torna a utilização do modelo simplificado limitado, pois a utilização de vazões de alimentação desiguais melhora o desempenho do sistema, conforme demonstrado no Capítulo 3. As mesmas observações são válidas para o sistema triplo estágio.

Resolução do Modelo de Adsorção de Horstmann e Chase

A adsorção da dextrana-sacarse em DEAE-Celulose segue o modelo de Langmuir. Com o intuito de estimar a influência dessas resistências no comportamento do sistema, foram utilizados dois modelos adicionais, um dos quais leva em consideração somente a resistência à transferência de massa no filme líquido, enquanto o outro considera também a difusão no interior da resina.

Foi utilizado o modelo de adsorção proposto por Horstmann e Chase (1989). Foram utilizados, para a estimativa da difusividade efetiva (D_{ef}) e do coeficiente de película (k_f), as propriedades da água. Esse procedimento se deve a inexistência de dados experimentais importantes para a utilização do modelo, tais como viscosidade e densidade da solução tampão, utilizada para obtenção das isothermas de adsorção. Para a estimativa dos parâmetros mencionados, foram utilizadas as seguintes correlações, apresentadas no trabalho de Horstmann e Chase (1989):

Correlação de Polson (1950) para difusividade

$$D_{AB} = 9,4 \times 10^{-5} \frac{T}{\mu(M_A)} \quad (1)$$

Correlação Geankopolis (1983) para estimativa do coeficiente de transferência de massa

$$k_f = \frac{2D_{AB}}{d} + 0.31 \left(\frac{\mu}{\rho D_{AB}} \right)^{-2/3} \left(\frac{\Delta \rho \mu g}{\rho^2} \right)^{1/3} \quad (2)$$

Onde:

$\Delta \rho$ = densidade diferencial entre a partícula e a fase líquida

d = diâmetro médio da partícula

g = constante gravitacional Com a estimativa de D_{AB} e a porosidade da resina é possível estimar D_{ef} através da relação $D_{ef} = \frac{\epsilon_p}{\tau} D_{AB}$ (Froment e Bischoff, 1990). Estimados os valores de D_{ef} e K_f , os valores corretos destes parâmetros são determinados através da solução do modelo de adsorção proposto por Hortsman e Chase (1989), apresentado no Capítulo 6. O valor correto para estes parâmetros é determinado através do ajuste da solução do modelo à curva experimental de adsorção da enzima na resina, tendo sido utilizado para isso os dados experimentais da adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose obtidas por Souza (1993).

A resolução do modelo foi realizada utilizando-se o método de colocação ortogonal, tendo sido utilizados dois pontos internos de colocação. O ajuste à curva de adsorção foi realizado através do método de tentativa e erro utilizando como valores iniciais as estimativas de D_{ef} e K_f

Os demais dados necessários, tais como diâmetro médio da resina e densidade foram da mesma forma extraídos do trabalho de Souza (1993). Já o peso molecular da enzima foi obtido junto ao fabricante (Sigma). A DEAE-Celulose utilizada é classificada como sendo de porosidade mediana (Souza, 1993), dessa forma foi utilizado o valor de 0.75 para a porosidade da resina (ϵ_p). Quanto a tortuosidade (τ) foi utilizado o valor típico de 3.0 (Forment e Bischoff, 1990). A tabela 1 apresenta os dados utilizados para resolver o modelo de adsorção proposto:

Tabela1 – Dados utilizados para o ajuste do modelo de adsorção.

$\rho_{resina} = 614 \text{ (kg/ m}^3\text{)}$	$\mu = 1.1 \times 10^{-3} \text{ (kg/ ms)}$
$\rho_{\text{água}} = 1000 \text{ (kg/ m}^3\text{)}$	$M_A = 65.000 \text{ daltons}$
$\Delta\rho = 386 \text{ (kg/ m}^3\text{)}$	$T = 298 \text{ K}$
$q_m = 519,751 \text{ (g/ l res)}$	$R = 2 \times 10^{-4} \text{ m}$
$K_d = 0,4795 \text{ (g/l)}$	

Com os parâmetros Def e K_f estimados, foi realizado o ajuste do modelo de adsorção aos dados experimentais de Souza (1993). Dessa forma, através do método de tentativa e erro foram obtidos os valores de Def e K_f que mais aproximam o modelo de adsorção à curva experimental. O gráfico de ajuste bem como o perfil da concentração de enzima no interior do sólido são apresentados nas figuras 1 e 2.

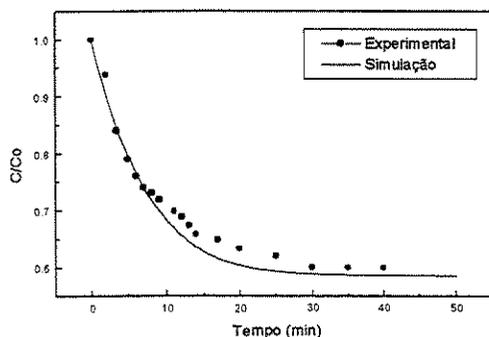


Figura 1. Cinética de adsorção da dextrana-sacarase em DEAE-Celulose: comparação entre a curva obtida por simulação e os dados experimentais.

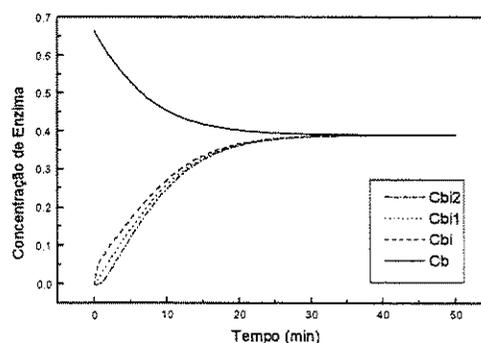


Figura 2. Perfis de concentração (g/l) obtidos através da simulação da cinética de adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose.

Conforme o gráfico apresentado na figura 1, os resultados obtidos via simulação são bastante concordantes àqueles obtidos experimentalmente. Um ajuste melhor poderia ser obtido se estivessem disponíveis uma maior quantidade de dados experimentais. Os valores de k_f e D_{ef} utilizados para obtenção dos dados acima são 8.74×10^{-6} m/s e 5.22×10^{-9} m²/s respectivamente. A figura 2 evidencia a ocorrência de difusão no interior da partícula.

Foram ainda realizadas simulações com valores diferentes de D_{ef} e K_f , com a finalidade de se verificar a influência destes parâmetros na cinética de adsorção da dextrana-sacarase em DEAE-Celulose. As figuras de 3 a 6 apresentam estes resultados.

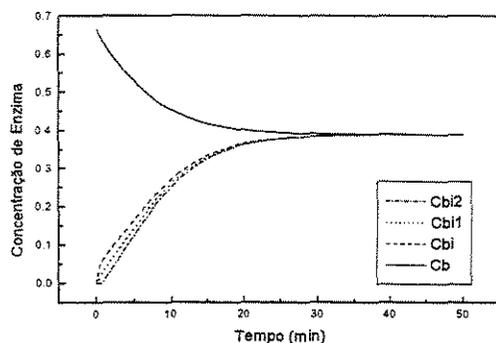


Figura 3 - Perfis de concentração (g/l) obtidos através da simulação da cinética de adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose utilizando um valor de D_{ef} 20% inferior ao utilizado para ajuste dos dados experimentais.

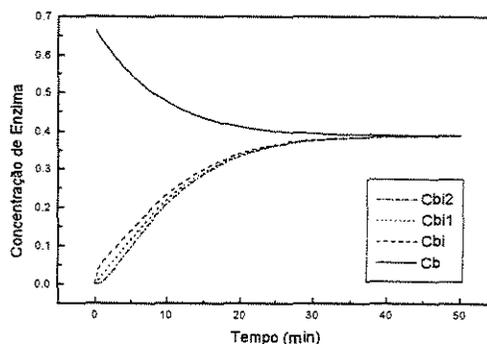


Figura 4 - Perfis de concentração (g/l) obtidos através da simulação da cinética de adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose utilizando um valor de k_f 20% inferior ao utilizado para ajuste dos dados experimentais.

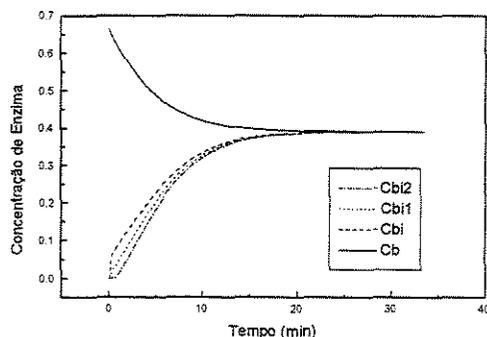


Figura 5 - Perfis de concentração (g/l) obtidos através da simulação da cinética de adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose utilizando um valor de D_{ef} 20% superior ao utilizado para ajuste dos dados experimentais.

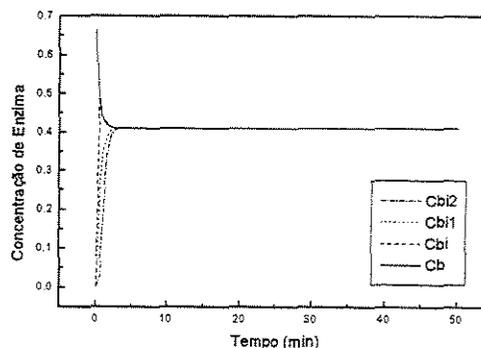


Figura 6 - Perfis de concentração (g/l) obtidos através da simulação da cinética de adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose utilizando um valor de k_f 20% superior ao utilizado para ajuste dos dados experimentais.

De acordo com os gráficos apresentados nas figuras de 3 a 6, a alteração de K_f e D_{ef} influi significativamente no tempo necessário para se atingir o equilíbrio de adsorção, tendo sido notada pouca alteração nos valores obtidos para as concentrações de enzima.

Adsorção da Dextrana-sacarase em DEAE-Celulose

Um dos pontos vitais da síntese enzimática de dextrana utilizando o processo CARE modificado é a adsorção da enzima. Souza (1993) realizou estudos sobre a adsorção da enzima em três tipos de resina (DEAE-Sephadex A-50; DEAE-Sephadex A-25 e DEAE – Celulose). Das três resinas estudadas, foi escolhida para determinação experimental das isotermas de adsorção da dextrana-sacarase, a resina DEAE-Celulose, por possibilitar a dessorção da enzima na presença de NaCl em concentração mínima de 0.50 M.

Souza (1993) determinou experimentalmente as isotermas de adsorção, bem como determinou os parâmetros da equação de Langmuir (q_m , k_1 e k_2). Para promover a adsorção da enzima, Souza (1993) reporta a utilização de uma solução tampão de acetato à concentração de 0,2 m M. Equação de Langmuir:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C (q_m - q) - k_2 q \quad (1)$$

Currallero et al. (1998) estudaram a influência da presença de NaCl na faixa de concentrações de 0 a 0.5M. Neste trabalho, foi verificada que a presença de NaCl em pouco afeta a contante k_1 . Entretanto, as constantes q_m e k_2 são fortemente dependentes da concentração de NaCl, sendo válidas as seguintes equações:

$$q_m = 18,7 \exp(-11,78 [NaCl]^2 + 3,30 [NaCl] + 5,02) \quad (2)$$

$$k_2 = 2,52 + \frac{6,18 [NaCl]}{0,122 + [NaCl]} \quad (3)$$

Sendo assim, existem duas determinações experimentais diferentes para a cinética de adsorção da dextrana-sacarase em DEAE – Celulose. Simulando a adsorção através da equação de Langmuir, podemos comparar o perfil de concentração da enzima livre

utilizando as constantes obtidas por Souza (1993) e por Curralero et al. (1998). Para a simulação, foi utilizada a equação de Langmuir, dada pela equação (1). Foram utilizados cinco tampões diferentes, que resultam em valores diferentes para as constantes k_1 ; k_2 e q_m . A tabela 1 apresenta as condições das simulações:

Tabela 1 – Constantes da equação de Langmuir utilizadas na simulação da adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose (Souza, 1993) e Curralero et al. (1998).

Sim	Dados Experimentais	k_1 (l g/h)	k_2 (h ⁻¹)	q_m (g/l res)
A	Souza (1993) Tampão de Acetato 0.2 mM	7,11	3,54	519,751
B	Curralero et al. (1998) ausência de NaCl	2,22	3,84	2830
C	Curralero et al.(1998) [NaCl]= 0,10 M	2,22	5,00	3570
D	Curralero et al.(1998) [NaCl] = 0,25 M	2,22	7,55	3090
E	Curralero et al.(1998) [NaCl] = 0,50 M	2,22	8,33	810
E	Curralero et al. (1998) [NaCl] = 0,37 M	2,22	7,17	1922
E	Curralero et al.(1998) [NaCl] = 0,35 M	2,22	7,10	2312
E	Curralero et al.(1998) [NaCl] = 0,40 M	2,22	7,26	1614

O gráfico comparativo do perfil de concentração de enzima livre obtido com a simulação da adsorção da dextrana-sacarase e DEAE-Celulose, utilizando os tampões da tabela 1, é apresentado na figura 1.

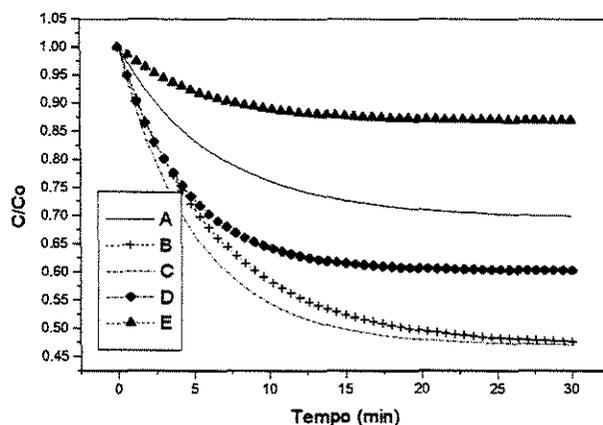


Figura 1 – Gráfico comparativo da adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose, segundo tabela 1.

Analisando-se o gráfico apresentado na figura 1, observa-se que somente para a concentração salina de 0,50 M a quantidade de enzima adsorvida é menor que a obtida quando se utiliza os dados experimentais de Souza (1993). Dessa forma, pode-se dizer que existe uma faixa de concentração salina onde os resultados obtidos com a utilização das constantes obtidas por Souza (1993) e por Currelero et al. (1998) são bastante próximos. Esta faixa ocorre para concentrações salinas entre 0,35 M e 0,40 M, tendo sido obtidos resultados bastante próximos para a concentração salina de 0,37 M, como pode ser observado na figura 6.2:

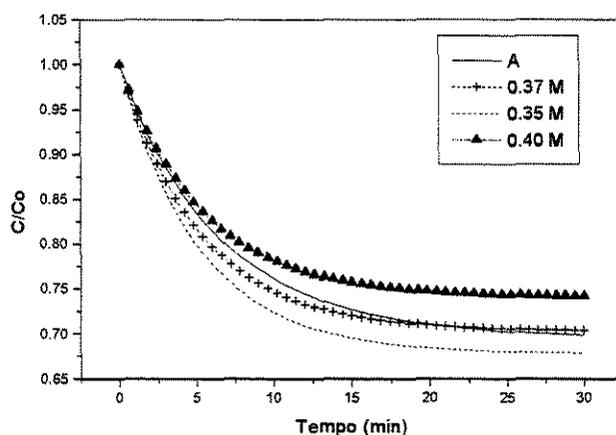


Figura 6.2 - Gráfico comparativo da adsorção de dextrana-sacarase em DEAE-Celulose.

De acordo com os perfis de enzima adsorvida, pode-se dizer que a presença de sal até uma concentração salina de 0,30 M no tanque de adsorção não prejudicaria a adsorção da enzima. Entretanto, foi observada alta adsorção enzimática em concentrações salinas baixas, evidenciando a necessidade de manter a concentração salina elevada no tanque de dessorção. Esse comportamento muito provavelmente se deve ao balanço iônico do sistema, visto ser a DEAE-Celulose uma resina trocadora de íons.

Quanto a dessorção da enzima, não foi encontrado nenhum dado experimental. A única informação disponível é a concentração salina mínima em torno de 0.50 M para que haja dessorção. Entretanto nada se sabe sobre a cinética de dessorção. Dessa forma, a dessorção foi considerada instantânea nos sistemas estudados. De acordo com as hipóteses de Langmuir, a dessorção depende somente da quantidade de enzima adsorvida, dessa forma foi utilizado para a taxa de dessorção a seguinte equação:

$$\frac{dq}{dt} = k_3q \quad (4)$$

O sucesso da utilização de uma rede neural está na escolha dos dados utilizados para o treinamento da rede. Neste trabalho, os dados para treinamento da rede foram obtidos a partir de constantes e equações de modelos, visto serem escassos os dados experimentais disponíveis. Para conferir aplicabilidade à rede proposta, os dados experimentais não devem ser ajustados a modelos conhecidos, pois não haveria sentido em se treinar uma rede neural quando os modelos e suas respectivas constantes são conhecidos e fornecem bons resultados. A obtenção de dados experimentais para treinamento da rede para predição da taxa de reação enzimática pode ser realizada através da determinação do perfil de consumo de substrato para várias concentrações de enzima e substrato. O número de dados irá depender da disponibilidade em realizar os ensaios, comportamento da reação e aplicação desejada para a rede.

Para utilização do modelo híbrido apresentado no Capítulo 6, foi utilizada uma rede *backpropagation*. A rede foi treinada com um conjunto de 225 pares de entrada/saída, que por motivos práticos não são apresentados. Os dados de entrada são a concentração de substrato e enzima livre no tanque de dessorção.

Para o treinamento da rede, os pesos e biases foram inicializados randomicamente, tendo sido utilizados $\alpha = 0.8$ e $\eta = 0.3$. Foi arbitrado um erro máximo de 1.5×10^{-5} . Os seguintes dados foram obtidos com o treinamento da rede:

Pesos da camada input para hidden

W(1,1)	-0.14350229
W(1,2)	-6.16922745
W(2,1)	-3.02410651
W(2,2)	1.57652121

Pesos da hidden para output

WL(1,1)	-7.04812027
WL(1,2)	-5.19210806

Tetas

TETI (1)	1.081825
TETI (2)	-1.32933
TEH (1)	2.648885

Após o treinamento da rede, a mesma deve ser testada com o objetivo de verificar se a rede está respondendo corretamente. Dessa forma, o conjunto de pares utilizados para o teste da rede deve ser diferente daqueles utilizados para o treinamento da mesma. Para testar a rede, foi utilizado o seguinte conjunto de pares de treinamento apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Dados utilizados para testar a rede para predição da taxa de reação

Par para teste	Enzima livre (g/l)	Substrato (g/l)	Taxa de reação (g/lh)
1	0,25	25,00	38,7989
2	0,75	2,00	39,3918
3	0,56	18,00	81,5206
4	0,15	25,00	23,2793
5	0,22	15,00	30,6676
6	0,83	20,00	123,561
7	0,35	10,00	43,2824
8	0,78	5,00	72,0575
9	0,83	3,00	57,3374
10	0,39	6,00	39,3465
11	0,47	25,00	72,9420
12	0,65	2,00	34,1396

Apêndice 5**Considerações sobre o estado estacionário**

O sistema proposto não recebe alimentação de enzima. Dessa forma, a remoção contínua de enzima impede que o estado estacionário seja atingido. Entretanto, para o tempo de processo utilizado nas simulações, as variações são quase imperceptíveis.

O tempo de operação do reator irá depender de alguns fatores não abordados neste trabalho tais como, o tempo necessário para reativação da resina, cronograma para limpeza e esterilização do sistema, e eventuais reposições enzimáticas. Dessa forma, foram realizadas simulações para o sistema triplo estágio, com a finalidade de se determinar o intervalo de tempo em que é possível operar o sistema sem a necessidade de reposição enzimática, bem como a influência das vazões de alimentação na determinação desse tempo. As condições operacionais para a estas simulações são apresentadas na tabela 1. Os dados experimentais relativos a cinética de adsorção da enzima utilizados nesta simulação são os obtidos por Curralero et al. (1998).

Tabela 1 – Condições operacionais para o reator triplo estágio para um intervalo de tempo de 10.000 horas.

Sim	F_1 (l/h)	F_2 (l/h)	F_3 (l/h)	F_R (l/h)	E_o (mol/l)	E_{o1} (mol/l)	C_o (g/l)	S_o (g/l)
Ap1	100	150	0	250	0,50	0,75	1.0	200
Ap2	100	70	0	250	0,50	0,75	1.5	200

* fração líquida = 0,5

Os resultados obtidos com as simulações da tabela 1, são apresentados nas figuras de 1 a 4. Observa-se que para um intervalo de tempo muito grande, ocorre a perda total da enzima e conseqüentemente um acúmulo de substrato. Estes resultados sugerem que seja realizada a alimentação de enzima no sistema. Entretanto, o sistema não pode operar continuamente por um intervalo de tempo muito grande.

Devido ao fato da reação ser enzimática, há a necessidade de paradas para limpeza ou reativação da enzima. No estudo de viabilidade, foram consideradas paradas semanais, ou seja 168 horas de operação contínua.

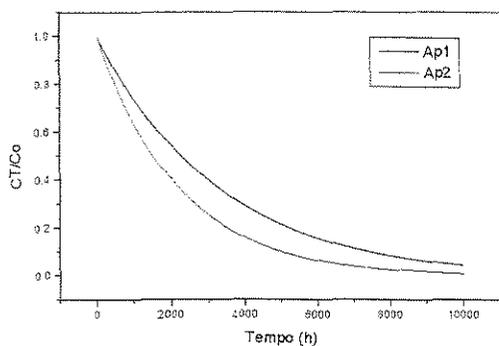


Figura 1 – Quantidade total de enzima retida no sistema .

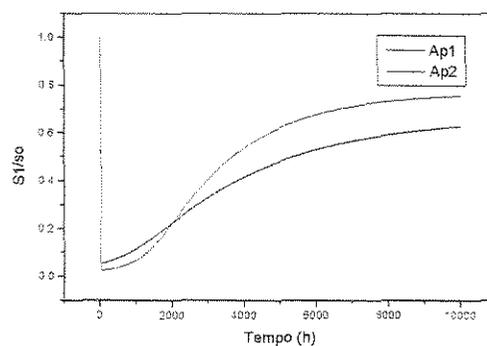


Figura 2 – Consumo de substrato no estágio de dessorção.

Os gráficos apresentados na figuras 3 e 4 apresentam o intervalo de tempo de 180 horas de operação contínua.

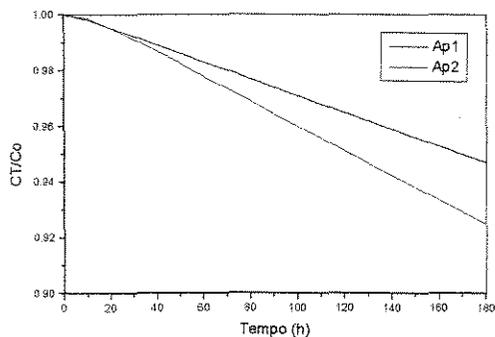


Figura 3 – Quantidade total de enzima retida no sistema .

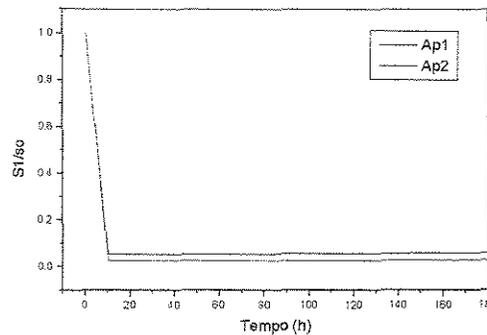


Figura 4 – Consumo de substrato no estágio de dessorção.

De acordo com os gráficos das figuras 3 e 4 é possível a operação do sistema num intervalo de tempo de 180 horas, sem que a perda enzimática seja superior a 80 % (valor considerado na estimativa econômica). Devido a alta quantidade de enzima retida no sistema, não há acúmulo de substrato.

Os gráficos apresentados nas figuras evidenciam que apesar do sistema não entrar em estado estacionário, há a possibilidade de operação contínua, em um determinado intervalo de tempo. Este intervalo de tempo é definido em função da quantidade de enzima retida no sistema e vazões de operação, visto que os resultados evidenciam que as vazões de operação afetam a retenção enzimática e conseqüentemente o consumo de substrato.

Uma possibilidade para prolongar o intervalo de operação, sem paradas, seria a alimentação de enzima, por pulso. Entretanto, primeiramente é necessário determinar o ótimo tempo de operação contínua, que não é só função da retenção enzimática, mas também da necessidade de limpeza e reativação e ou reposição da resina.