
CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Enzima

Neste trabalho foi utilizado a enzima β -galactosidase, produzida a partir da fermentação de uma cepa selecionada do fungo *Aspergillus oryzae*. Essa enzima foi adquirida de *Sigma Chemical CO*, disponível na forma de um pó branco, cuja atividade declarada pelo fabricante, utilizando lactose como substrato era de 9 unidades por mg de sólido. A unidade de atividade utilizada pelo fabricante é de 1 μ mol do substrato reagido por minuto a pH 4,5 a 30°C. Todos os reagentes que foram utilizados nos experimentos apresentaram grau de pureza analítica e estão listados no Anexo B.

3.2 – Unidade Experimental

A unidade experimental utilizada para a determinação da atividade enzimática para a enzima nas formas livre e imobilizada está representada esquematicamente nas Figuras 3.1 e 3.2. Ela consistia de um microrreator de mistura, de volume útil de 100mL, dotado de uma camisa externa para circulação de água proveniente de banho termostatizado, para controle da temperatura. A agitação era realizada por agitador magnético.

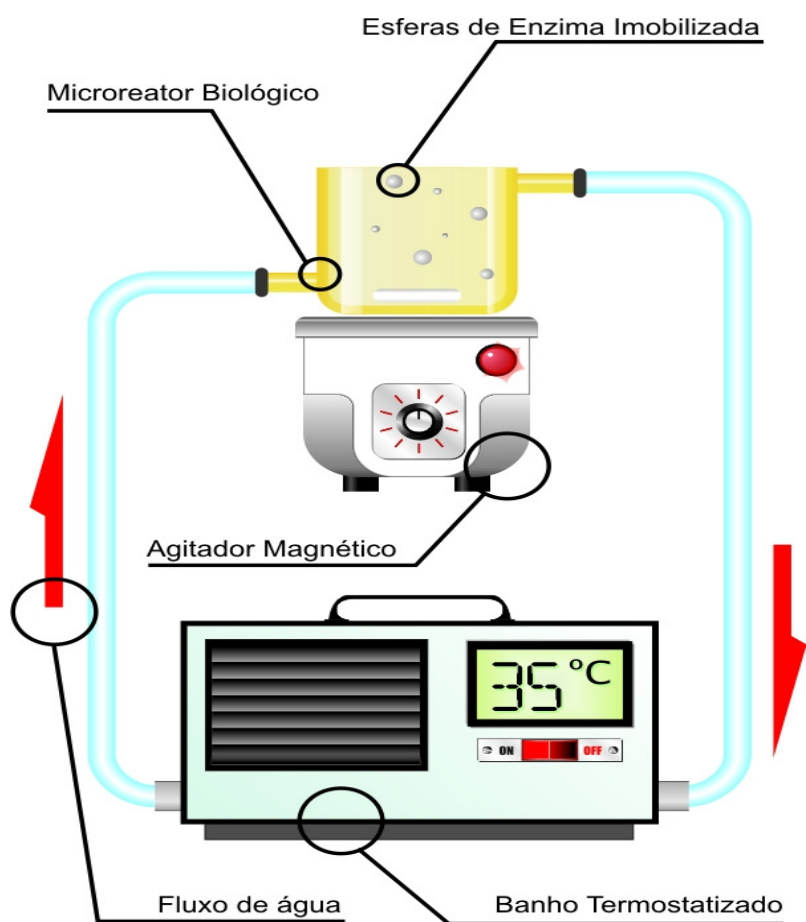


Figura 3.1 – Representação esquemática da unidade experimental.

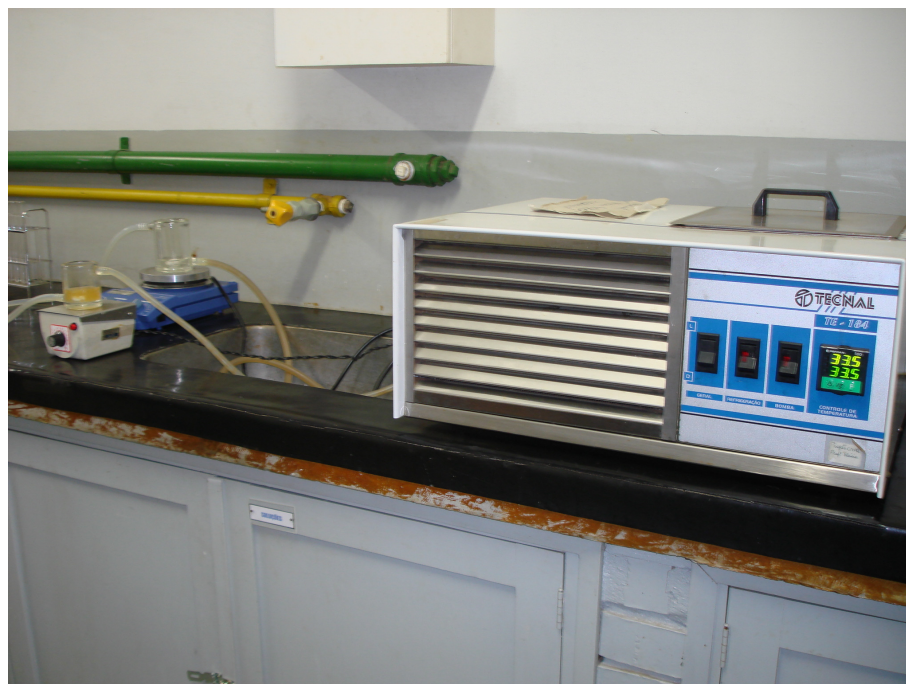


Figura 3.2 – Unidade Experimental

3.3 - Determinação da atividade de β -galactosidase livre e imobilizada pelo método das velocidades iniciais

A atividade catalítica da β -galactosidase em solução e imobilizada, em todos os experimentos, foi determinada pelo método das velocidades iniciais da reação de hidrólise de lactose.

Em um microrreator conforme Figura 3.1, eram colocados 50 mL de solução de lactose em tampão adequado na concentração e no pH desejados para o experimento, no qual, após a estabilização da temperatura no valor desejado, adicionava-se 0,5 mL da enzima lactase na forma livre diluída a 1% em tampão adequado. Os tampões utilizados foram acetato, na faixa de pH de 3,6 a 5,6 à concentração de 10^{-1} M; e o tampão citrato-fosfato na faixa de pH 2,6 a 3,6 e de 5,6 a 7,0; à concentração de 10^{-1} M. As descrições destes tampões são apresentadas no Anexo A. Definiu-se a unidade de atividade específica para a enzima livre como sendo gramas de glicose produzida por litro por minuto por grama de proteína ($\text{g}_{\text{glicose}}/\text{L.minuto.mg}_{\text{proteína}}$) nas condições de pH, temperatura e concentração de lactose usadas no respectivo experimento e, em todo o trabalho, a unidade de atividade para a enzima livre foi abreviada por U_L (unidade de atividade para a enzima na sua forma livre).

Para a determinação de atividade de enzima imobilizada, adicionava-se ao microrreator, 50mL de solução de lactose, no pH desejado e, após estabilização da temperatura, era adicionada ao reator a enzima imobilizada, sempre utilizando o mesmo número de partículas (15cm^3 e aproximadamente 110 partículas).

A unidade de atividade foi definida por grama de lactose reagida por minuto por metro cúbico de biocatalisador ($\text{g}_{\text{lactose}}/\text{min.m}^3$ biocatalisador) nas condições de pH, temperatura e concentração de lactose usadas no respectivo experimento, a qual por todo o trabalho, a unidade de atividade para a enzima na forma imobilizada, foi abreviada por U_I (unidade de atividade para a enzima na sua forma imobilizada).

Para a enzima em ambas as formas, foram retiradas amostras em intervalos de tempo adequados, sendo colocadas em tubos de ensaios tampados, os quais foram imediatamente imersos em um banho de água em ebulição por 10 minutos para a completa inativação da lactase. A glicose das amostras em cada tubo foi dosada pelo método da glicose-oxidase (BAO *et al.* 2004) conforme item C.1 no Anexo C.

As inclinações das retas da concentração de glicose em função do tempo de reação fornecem as velocidades iniciais da reação de hidrólise da lactose.

3.4 – ESTUDO DA ENZIMA LIVRE

3.4.1 - Influência do pH e da temperatura na atividade da β -galactosidase livre

Com o objetivo de estudar a influência do pH e da temperatura na atividade da enzima lactase na forma livre, as atividades enzimáticas foram determinadas pelo procedimento de taxas iniciais de reação como descrito no item 3.3, utilizando em todos experimentos, uma concentração de lactose de 50 g/L. Para o estudo da influência do pH, a temperatura do meio reacional foi mantida fixa a 35°C, variando o pH do meio reacional na faixa de 3,0 a 7,0, utilizando os tampões acetato e citrato-fosfato. A temperatura dos ensaios foi fixada em 35°C, uma vez que nesta temperatura a enzima mantém-se estável durante todo o tempo do experimento, conforme recomendação do fabricante. Para o estudo da influência da temperatura, manteve-se o pH reacional em 4,5 em tampão acetato e variou-se a temperatura de 5 a 70°C.

3.4.2. Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase livre

A relação entre a atividade da enzima β -galactosidase e concentração de substrato (lactose) foi determinada experimentalmente pelo procedimento de velocidades iniciais de reação conforme item 3.3, na faixa de concentração do substrato de 10 a 100 g/L, a 35°C e pH igual a 4,5 em tampão acetato. O volume reacional era de 50 mL de solução de lactose, ao qual era adicionado 0,5 mL de enzima diluída a 1% (p/v).

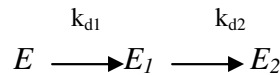
3.4.3 - Estudo da estabilidade da enzima livre em relação ao pH

Amostras de enzima de atividade conhecida, diluídas a 1% (p/v), foram incubadas em tampão citrato-fosfato, na faixa de pH de 3,0 a 7,0 à temperatura de 35°C, por 18 horas. Após este tempo, foram determinadas as atividades enzimáticas residuais conforme item 3.3, a 35°C, pH 4,5 em tampão acetato, numa concentração inicial de lactose de 50 g/L e comparadas com a atividade inicial (A_0), determinada nestas mesmas condições, porém sem ser submetida à incubação.

3.4.4 - Estudo da estabilidade térmica da enzima livre

Soluções da enzima β -galactosidase, de atividade conhecida, diluídas a 1% em tampão acetato, a pH 4,5 foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e incubadas em um banho termostatzado, à temperaturas na faixa de 53 à 65°C. Para cada temperatura, previamente determinada, amostras de 1mL da mesma foram retiradas em intervalos adequados de tempo (1 em 1 minuto para 65°C, de 3 em 3 minutos para 63°C, de 5 em 5 minutos para 61°C, de 7 em 7 minutos para 59°C, de 11 em 11 minutos para 57°C, de 15 em 15 minutos para 55°C, de 25 em 25 minutos para 53°C), para a determinação da atividade residual. Estas amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e a seguir 0,5 mL das mesmas foi adicionado a 50mL de solução de lactose a 50g/L, pH 4,5 em tampão acetato, na temperatura de 35°C para determinar a atividade enzimática residual conforme metodologia descrita no item 3.3. Os resultados de atividade enzimática em função do tempo de incubação obtidos foram analisados pelo modelo de desativação de primeira ordem e pela modelagem de desativação enzimática em série com dois estágios, realizando regressões não-lineares aplicadas às Equações 3.1, 3.2 e 3.3, para determinar os melhores ajustes e os parâmetros cinéticos (HENLEY e SADANA, 1985)

:



$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_{d1}.t)} \quad (3.1)$$

$$\frac{A}{A_0} = (1 - \alpha_1).e^{(-k_{d1}.t)} + \alpha_1 \quad (3.2)$$

$$\frac{A}{A_0} = \alpha_2 + \left(1 + \frac{\alpha_1 k_{d1}}{k_{d2} - k_{d1}} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_{d2} - k_{d1}}\right).e^{(-k_{d1}.t)} - \left(\frac{\alpha_1 k_{d1}}{k_{d2} - k_{d1}} - \frac{\alpha_2 k_2}{k_{d2} - k_{d1}}\right).e^{(-k_{d2}.t)} \quad (3.3)$$

Sendo: $\frac{A}{A_0}$ = atividade relativa

$\alpha_1 = \frac{E_1}{E}$ - razão entre a atividade específica do estado final (E_1) para uma modelagem

de inativação com uma única etapa e a atividade inicial E

$$\alpha_2 = \frac{E_2}{E} - \text{razão entre a atividade específica do estado final (E}_2\text{) para uma modelagem}$$

de inativação em série em duas etapas e a atividade inicial E; k_{d1} e k_{d2} = constantes cinéticas

Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste aos dados experimentais às equações de desativação térmica em série utilizando a Equação 3.4. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela regressão linear dos valores de $\ln(k_d)$ em função de $1/T$ ajustados pela equação de Arrhenius, apresentada na Equação 3.5.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.4)$$

$$\ln(k_d) = \ln a - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.5)$$

Sendo: k_d = constante cinética de desativação, a = fator de frequência para a reação,

E_d = energia de ativação do processo de desativação térmica, T = temperatura absoluta.

3.4.5 – Planejamento Composto Central

Para a realização de experimentos significativos e confiáveis, deve-se utilizar um método científico de planejamento. Além disso, quando o problema envolve dados que podem conter erros experimentais, um modo adequado de análise é por métodos estatísticos. Em qualquer análise experimental deve-se seguir duas etapas: o planejamento experimental e a análise estatística dos dados, esta última, depende do tipo de planejamento realizado (OLIVEIRA, 2004). As vantagens do uso do planejamento experimental são (BARROS NETO *et al.* 1995 *apud* OLIVEIRA, 2004):

- Reduzir o tempo de experimentação, pois permite a otimização do número de experimentos;
- Reduzir dos custos relativos à execução dos ensaios, fato que está relacionado à redução da quantidade de experimentos;
- Permitir a avaliação e a minimização do erro experimental;
- Permitir a otimização multivariada, e
- Não requerer conhecimentos elevados em estatística.

Supondo que dentro da região experimental a atividade enzimática pode ser ajustada por uma superfície de resposta de 2ª ordem, esta técnica, que tem como base o planejamento

fatorial dos experimentos foi de fundamental importância neste trabalho, pois permitiu verificar os efeitos individuais e as interações entre as variáveis, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e o equacionamento empírico dos resultados em função das variáveis escolhidas (BOX *et al.* 1978).

O número de variáveis a serem estudadas, aliada à necessidade de obter uma estimativa de parâmetros de uma superfície de segunda ordem e ainda, a redução do esforço experimental, levaram a utilização do Planejamento Fatorial Fracionário do tipo Composto Central (PCC). Esse tipo de planejamento estatístico estuda os efeitos da interação dos parâmetros em questão. Cada variável é estudada com 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$), cada nível possui seu respectivo valor nominal. O parâmetro α utilizado foi o ortogonal de modo a se obter um planejamento, onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não estão correlacionados entre si (BOX *et al.* 1978).

Os PCC são planejamentos fatoriais de 1ª ordem, aumentados por pontos adicionais (axiais e centrais) para permitir a estimação dos parâmetros de uma superfície de 2ª ordem. Portanto, nesta tese foram realizados dois tipos de PCC compostos por um planejamento fatorial:

- a dois níveis com três variáveis, acrescido de duas réplicas no ponto central, 2³ ensaios para investigação de um modelo linear e ainda 6 experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 16 experimentos conforme ilustra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Esquema do Planejamento Composto Central a dois níveis com três variáveis.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	Planejamento Fatorial 2 ^k
2	-1	-1	+1	
3	-1	+1	-1	
4	-1	+1	+1	
5	+1	-1	-1	
6	+1	-1	+1	
7	+1	+1	-1	
8	+1	+1	+1	
9	$-\alpha$	0	0	Pontos Axiais 2.K
10	$+\alpha$	0	0	
11	0	$-\alpha$	0	
12	0	$+\alpha$	0	
13	0	0	$-\alpha$	
14	0	0	$+\alpha$	
15	0	0	0	Pontos Centrais
16	0	0	0	

- a dois níveis com duas variáveis, acrescido de **3** réplicas centrais, 2^2 ensaios para investigação de um modelo linear, 4 ensaios distribuídos ortogonalmente (pontos axiais) a uma distância α do ponto central, totalizando 11 experimentos, apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Esquema do Planejamento Composto Central a dois níveis com duas variáveis.

Experimento	X1	X2	
1	-1	-1	Planejamento fatorial
2	1	-1	
3	-1	1	
4	1	1	
5	0	$-\alpha$	Pontos axiais
6	0	α	
7	$-\alpha$	0	
8	α	0	
9	0	0	Pontos Centrais
10	0	0	
11	0	0	

Para que o PCC seja ortogonal, utilizou-se o valor de $\alpha = 1,287$ para os planejamento com 3 variáveis e o valor $\alpha = 1,147$ para o planejamento com 2 variáveis, isto é, um planejamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX *et al.* 1978).

O valor de α , foi calculado através da Equação 3.6:

$$\alpha = (QG/4)^{1/4} \quad (3.6)$$

em que, $Q = [(G + T)^{1/2} - G^{1/2}]^2$

G = número de pontos fatoriais ($G = 2^k$, se completo);

T = número de pontos adicionais no PCC; $T = 2k +$ número de réplicas centrais.

O cálculo de α foi realizado utilizando o software *Statistica 7.0*. Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a Equação geral de codificação (3.7).

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.7)$$

Sendo: X_n é o valor da variável no experimento na forma codificada;

X é o valor real da variável a ser calculado;

X_0 é o valor real da variável no ponto central;

X_{+1} é o valor real da variável no nível superior;

X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

A variável dependente em todos os planejamentos utilizada nesta tese foi a atividade enzimática que é representada pela resposta (Y). A equação do modelo polinomial de segunda ordem obtido por um método de regressão múltipla é representada pela Equação 3.8.

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} x_j x_m + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \quad (3.8)$$

Sendo: Y = atividade enzimática; k = nº de variáveis independentes; x = variáveis independentes; b_0, b_j, b_{ij}, b_{jj} = parâmetros do modelo

Com a equação empírica da regressão múltipla foi possível construir uma superfície de resposta que permitiu verificar a existência de uma região ótima para a atividade enzimática na qual se encontra uma faixa de combinação das variáveis em questão, além de deter informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação de uma variável que pode ser admitida ao redor do valor ótimo que mantém o processo na condição otimizada.

A esta equação foram aplicados os resultados experimentais obtidos e feita uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de *t de Student* para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância (valor-p) superior a 10%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes foram consideradas não relevantes quando (valor-p) for superior a 10%. Assim os parâmetros não significativos foram eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo. Pode-se ainda, prever qual a melhor condição para este processo. O valor do coeficiente de determinação (R^2) e a comparação entre F calculado e F tabelado pelo teste F de Fisher foram utilizados para constatação da significância ou não do modelo conforme descrito por RODRIGUES e IEMMA (2005).

Com o objetivo de encontrar o valor do ponto estacionário da resposta estudada deriva a Equação 3.8 da resposta Y pela variável X_k , isto é:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = \frac{\partial Y}{\partial X_2} = \dots = \frac{\partial Y}{\partial X_k} = 0 \quad (3.9)$$

$$\text{Sendo, } Y = b_0 + x'b + x'Bx \quad (3.10)$$

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} [b_0 + x'b + x'Bx] = b + 2Bx = 0 \quad (3.11)$$

Sendo: b_0 é o termo independente; $x'b$ são os termos de 1ª. ordem na função de resposta; $x'Bx$ é a contribuição quadrática.

Então, o ponto estacionário é dado por: $x_0 = - (1/2) B^{-1}b$, onde B é a matriz ($k \times k$) na qual a diagonal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da equação e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2 (ex: a_{12} e a_{21} correspondem a metade do coeficiente da interação X_1X_2). A matriz b é uma matriz coluna composta pelos coeficientes associados às variáveis isoladas (variáveis lineares). O ponto estacionário (x_0) pode ser:

- Um ponto onde a superfície atinge um **máximo**;
- Um ponto onde a superfície atinge um **mínimo**, ou
- Um ponto nem de máximo, nem de mínimo $\Rightarrow$ **Ponto de sela** (“*saddle point*”).

Para determinar a natureza desse ponto estacionário é necessário fazer uma análise canônica, que considera uma translação da superfície de resposta da origem ($X_1, X_2, \dots, X_k$) = (0, 0, ..., 0) para o ponto estacionário x_0 (Figura 3.3). Daí a função de resposta é formulada em termos de novas variáveis, $w_1, w_2, \dots, w_k$.

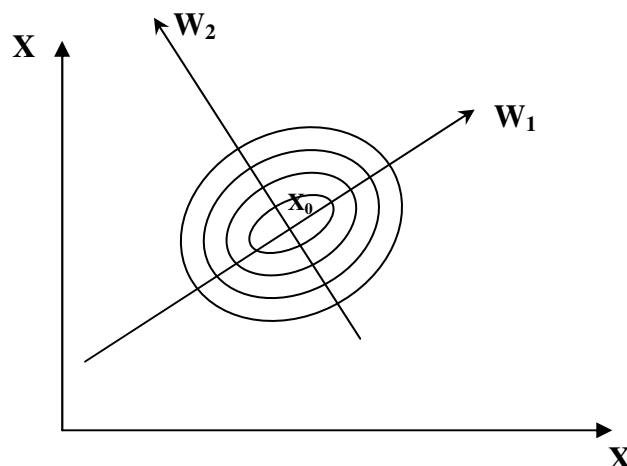


Figura 3.3 – Translação da superfície de resposta da origem para o ponto estacionário.

Então, obtêm-se a função de resposta em termos das novas variáveis:

$$Y = y_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.12)$$

sendo: y_0 : a resposta estimada no ponto estacionário e $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ são as raízes características.

Os sinais dos λ 's e a grandeza dos λ 's ajudam a determinar a natureza do ponto estacionário e, a relação entre os w 's e os x 's também são importantes, pois indicam ao pesquisador as regiões úteis para exploração.

Se $\lambda_i < 0$, sendo $i = 1, 2, \dots, k$, quando movimentam-se em qualquer direção a partir do ponto estacionário, teremos um decréscimo de Y , isto é, o ponto estacionário x_0 é um ponto de resposta máxima da superfície ajustada. Se $\lambda_i > 0$, o ponto estacionário x_0 é um ponto de mínimo para a superfície ajustada e, se os λ 's têm sinais diferentes, o ponto estacionário x_0 não é nem ponto de máximo, nem de mínimo.

A obtenção dos pontos estacionários e a análise canônica dos dados para o cálculo dos pontos de maximização das respostas foram realizados utilizando um algoritmo implementado no software *Maple* VIII.

3.4.6 - Influência da concentração inicial de glicose, galactose e lactose na atividade da enzima livre

Foi utilizado um planejamento fatorial fracionário do tipo composto central (PCC) a dois níveis com três variáveis, com o objetivo de analisar a influência conjunta da concentração dos produtos de reação (glicose e galactose) e do substrato (lactose) na hidrólise enzimática. Neste planejamento, cada experimento foi realizado à temperatura de 35°C em tampão acetato à pH 4,5 e as atividades foram determinadas experimentalmente pelo procedimento de velocidades iniciais de reação conforme item 3.3. As faixas de concentração para as variáveis em estudo foram de 15 a 55g/L de lactose e de 1,25 a 11,26g/L de glicose e galactose, baseadas em estudos preliminares. Estas faixas de concentração foram baseadas nos trabalhos de LADERO *et al.* (1998) e FERNANDES *et al.* (2006).

Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (onde X_1 é concentração de lactose (g/L); X_2 é a concentração de glicose (g/L); X_3 é a concentração de galactose (g/L), estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Matriz do Planejamento Composto Central da concentração inicial de glicose e galactose na atividade enzimática da lactase livre

Experimento	Valor real (valor codificado)		
	Lactose (g/L)	Glicose (g/L)	Galactose(g/L)
1	15 (-1)	1,25 (-1)	1,25 (-1)
2	15 (-1)	1,25 (-1)	10 (+1)
3	15 (-1)	10 (+1)	1,25 (-1)
4	15 (-1)	10 (+1)	10 (+1)
5	50 (+1)	1,25 (-1)	1,25 (-1)
6	50 (+1)	1,25 (-1)	10 (+1)
7	50 (+1)	10 (+1)	1,25 (-1)
8	50 (+1)	10 (+1)	10 (+1)
9	10 (- α)	5,63 (0)	5,63 (0)
10	55 (+ α)	5,63 (0)	5,63 (0)
11	32,5 (0)	0 (- α)	5,63 (0)
12	32,5 (0)	11,26 (+ α)	5,63 (0)
13	32,5 (0)	5,63 (0)	0 (- α)
14	32,5 (0)	5,63 (0)	11,26 (+ α)
15	32,5 (0)	5,63 (0)	5,63 (0)
16	32,5 (0)	5,63 (0)	5,63 (0)

As Equações de codificação para a lactose, glicose e galactose são ilustradas nas Equações 3.13, 3.14 e 3.15, respectivamente.

$$\text{- Concentração de lactose: } X_1 = \frac{X(g/L) - 32,5}{50 - 15} \quad (3.13)$$

$$\text{- Concentração de glicose: } X_2 = \frac{X(g/L) - 5,63}{10 - 1,25} \quad (3.14)$$

$$\text{- Concentração de galactose: } X_3 = \frac{X(g/L) - 5,63}{10 - 1,25} \quad (3.15)$$

Este estudo apresentou como principal objetivo fazer uma análise qualitativa para verificar se algum dos produtos da reação, glicose e galactose, exerciam efeito inibidor da atividade enzimática de β -galactosidase na forma livre. Assim, a análise canônica para a otimização do ponto de máxima atividade não foi realizada.

3.4.7 – Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima livre

Com base nos resultados obtidos do item anterior, pode-se concluir que a glicose não apresentou influência significativa na atividade de β -galactosidase na forma livre, portanto, estudou-se apenas a influência da concentração inicial de galactose na atividade enzimática. Este estudo foi baseado no trabalho de PORTACCIO *et al.* (1998), que estudou a influência de galactose na atividade da referida enzima e analisou os resultados pela análise de Dixon. No presente trabalho foram determinadas as atividades enzimáticas para concentrações de lactose (S) na faixa de 5 a 100g/L em presença de concentrações de galactose (I) na faixa de 0 a 10g/L, conforme Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores das concentrações de lactose (S) e galactose (I) para determinação do modelo cinético de inibição enzimática

Experimento	S	I	Experimento	S	I
1	5	0	16	60	0
2	5	2,5	17	60	2,5
3	5	5	18	60	5
4	5	7,5	19	60	7,5
5	5	10	20	60	10
6	20	0	21	80	0
7	20	2,5	22	80	2,5
8	20	5	23	80	5
9	20	7,5	24	80	7,5
10	20	10	25	80	10
11	40	0	26	100	0
12	40	2,5	27	100	2,5
13	40	5	28	100	5

Continuação da Tabela 3.4

14	40	7,5	29	100	7,5
15	40	10	30	100	10

Cada experimento foi realizado à temperatura de 35°C, com 50 mL de substrato nas concentrações desejadas, em tampão acetato à pH 4,5, utilizando 0,5mL de enzima diluída a 1% (p/v) em tampão acetato a pH 4,5 e as atividades foram determinadas experimentalmente pelo procedimento de velocidades iniciais de reação, conforme item 3.3. Os resultados experimentais de velocidade de reação foram ajustados aos modelos cinéticos de inibição competitiva (Equação 3.16), inibição não competitiva (Equação 3.17), inibição acompetitiva (Equação 3.18), inibição mista linear (Equação 3.19) e inibição parcialmente não competitiva (Equação 3.20), utilizando o *software Statistica 7.0*.

- **Inibição Competitiva**

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(S + K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.16)$$

- **Inibição Não Competitiva**

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (3.17)$$

- **Inibição Acompetitiva**

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.18)$$

- **Inibição Mista Linear**

$$v = \frac{V_m \cdot S}{\left(K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i} \right) \right)} \quad (3.19)$$

- **Inibição Parcialmente Não Competitiva**

$$v = \frac{V_m \cdot S \left(1 + \frac{\beta I}{K_i} \right)}{\left(K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right)} \quad (3.20)$$

3.5 – Avaliação do processo de hidrólise de lactose com enzima imobilizada

3.5.1- Estudo preliminar da metodologia de imobilização de β -galactosidase

A enzima foi imobilizada em alginato de sódio de grau técnico e gelatina PA conforme descrito por CABRAL (1989) e TANRISEVEN e DOGAN (2002). Uma mistura de 1,75g de alginato de sódio e 1g de gelatina era dissolvida em 40g de água a 80°C. Em seguida, resfriava-se até 40 °C e adicionava-se 10 mL da enzima diluída a 10% (p/v) conforme o experimento, completando assim o volume a 50 g. Com o auxílio de uma bomba peristáltica, essa suspensão era gotejada em solução 0,05M de CaCl₂ contendo glutaraldeído nas concentrações de 1, 3 e 5% (v/v) em volume conforme o experimento, sob agitação magnética, formando assim as partículas do biocatalisador imobilizado com diâmetro médio de 4,4 mm. A Figura 3.4 ilustra a unidade experimental utilizada para a confecção das partículas de biocatalisador e a Figura 3.5 ilustra as partículas com biocatalisador imobilizado.

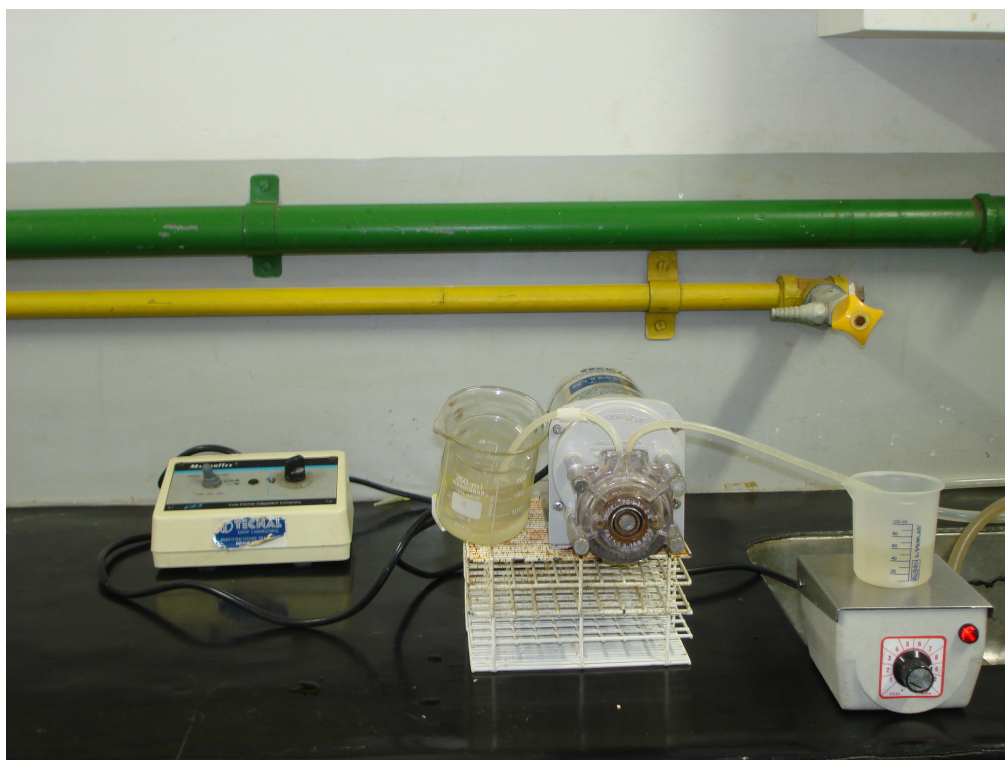


Figura 3.4 - Unidade experimental utilizada para a confecção das partículas de biocatalisador.



Figura 3.5 – Partículas com biocatalisador imobilizado.

As partículas do biocatalisador produzidas eram mantidas em solução de CaCl_2 0,05M por pelo menos 12 horas em temperatura de 4 °C em geladeira. Para os ensaios, as partículas eram lavadas com tampão acetato 10^{-1} M, pH 4,5 e após seu uso nos experimentos, eram novamente lavadas com tampão acetato e mantidas em tampão acetato a pH 4,5. Verificou-se que o glutaraldeído, que funciona como agente reticulante, era uma variável de interesse na imobilização da enzima β -galactosidase em alginato de sódio. Para tanto, efetuou-se o estudo de 3 conjuntos diferentes de biocatalisador imobilizado, que foram confeccionados variando a concentração de glutaraldeído da solução de CaCl_2 em 1, 3 e 5%, determinando diariamente sua atividade.

3.5.2 - Otimização do processo de imobilização da enzima β -galactosidase

Na literatura consultada não foi encontrado nenhum trabalho que estudou a influência conjunta das variáveis: concentração de alginato, de gelatina e de glutaraldeído no processo de imobilização de lactase. No trabalho de TANRISEVEN e DOGAN (2002), são apresentados os resultados de imobilização de β -galactosidase por oclusão em fibras de gel de alginato em presença de gelatina e glutaraldeído em uma única condição de imobilização. No

presente trabalho optou-se por estudar a influência das variáveis concentração de alginato, concentração de gelatina e de glutaraldeído simultaneamente no processo de imobilização da enzima, visando otimizar tal processo, utilizando assim um planejamento estatístico. O processo de imobilização envolve diversas variáveis, assim a análise e planejamento dos experimentos são mais confiáveis utilizando técnicas estatísticas para esse fim. Utilizou-se então um planejamento composto central (PCC) com o objetivo de se obter as melhores combinações destas variáveis visando maximizar a atividade da enzima imobilizada. As faixas de concentrações escolhidas para cada variável foram obtidos através de testes preliminares e também com base nos trabalhos de BÓDALO *et al.* (1991); ATES e MEHMETOGLU (1997); BECERRA *et al.* (2001); TANRISEVEN e DOGAN (2002). Para a confecção dos biocatalisadores imobilizados, utilizou-se praticamente o mesmo procedimento adotado no item 3.5.1. A diferença consistiam em variar as concentrações de alginato de sódio, gelatina e glutaraldeído conforme o experimento determinado pelo planejamento experimental. Utilizou-se nos 16 experimentos o volume de enzima de 10mL na diluição de 10%. Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento (X_1 é concentração de alginato(p/v); X_2 é concentração de gelatina (p/v); X_3 é concentração de glutaraldeído (v/v), estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Matriz do Planejamento Composto Central na otimização do processo de imobilização da enzima lactase.

Exp.	Valor codificado (valor real)			Exp.	Valor codificado (valor real)		
	X_1	X_2	X_3		X_1	X_2	X_3
1	-1(1,628%)	-1(0,88%)	-1(0,88%)	9	- α (1%)	0 (3,9%)	0(3,9%)
2	-1(1,628%)	-1(0,88%)	+1(7%)	10	+ α (6,62%)	0 (3,9%)	0(3,9%)
3	-1(1,628%)	+1(7%)	-1(0,88%)	11	0 (3,8%)	- α (0%)	0(3,9%)
4	-1(1,628%)	+1(7%)	+1(7%)	12	0 (3,8%)	+ α (7,8%)	0(3,9%)
5	+1(6%)	-1(0,88%)	-1(0,88%)	13	0 (3,8%)	0 (3,9%)	- α (0%)
6	+1(6%)	-1(0,88%)	+1(7%)	14	0 (3,8%)	0 (3,9%)	+ α (7,8%)
7	+1(6%)	+1(7%)	-1(0,88%)	15	0 (3,8%)	0 (3,9%)	0(3,9%)
8	+1(6%)	+1(7%)	+1(7%)	16	0 (3,8%)	0 (3,9%)	0(3,9%)

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando as Equações de codificação 3.21, 3.22 e 3.23:

$$\text{- Concentração de alginato (p/v): } X_1 = \frac{X(\%) - 3,81\%}{\frac{6\% - 1,628\%}{2}} \quad (3.21)$$

$$\text{- Concentração de gelatina (p/v): } X_2 = \frac{X(\%) - 3,9\%}{\frac{7\% - 0,88\%}{2}} \quad (3.22)$$

$$\text{- Concentração de glutaraldeído (v/v): } X_3 = \frac{X(\%) - 3,9\%}{\frac{7\% - 0,88\%}{2}} \quad (3.23)$$

Em todos os experimentos de caracterização e estudos cinéticos envolvendo a enzima imobilizada realizados, foram utilizadas partículas de biocatalisador imobilizado nas condições ótimas obtidas neste estudo.

3.5.3 – Estudo da influência da concentração de enzima no processo de imobilização

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração da enzima na imobilização, confeccionou-se 7 conjuntos de biocatalisadores imobilizados conforme item 3.5.2 modificando apenas a concentração da enzima, que assumiu os seguintes valores em % (v/v): 1, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 17,5. Em seguida, cada um destes conjuntos foram colocados no reator que continha 50 mL de solução de lactose a 50g/L em tampão acetato a pH 4,5 e determinadas as atividades enzimáticas obtidas conforme item 3.3 a 35°C.

3.5.4 - Influência conjunta do pH e temperatura na atividade da enzima imobilizada

Este estudo foi realizado por um Planejamento Composto Central (PCC) com o objetivo de estudar a influência conjunta das variáveis temperatura (X_1) e pH (X_2) na atividade da enzima imobilizada. Uma análise simultânea da influência das variáveis pH e temperatura na atividade de β -galactosidase não foi encontrado na literatura. Assim, as faixas de valores destas variáveis foram obtidas pela realização de testes preliminares e também com base nos trabalhos de BÓDALO *et al.* (1991); ATES e MEHMETOGLU, (1997); LADERO *et al.* (1998); LADERO, *et al.* (2000), BECERRA *et al.* (2001); TANRISEVEN e DOGAN (2002); FERNANDES *et al.* (2006). Neste item foram utilizadas as condições otimizadas para a imobilização da enzima obtidas no item 3.5.2. Os valores codificados e reais das variáveis

do planejamento, (X_1 é temperatura expressa em graus Celsius e X_2 é o pH, são apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Matriz do Planejamento Composto Central no estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da lactase imobilizada.

Experimento	Valor real (valor codificado)	
	Temperatura (°C)	pH
1	30 (-1)	3,2 (-1)
2	58 (1)	3,2 (-1)
3	30 (-1)	5,7 (1)
4	58 (1)	5,7 (1)
5	44 (0)	4,4 (0)
6	44 (0)	4,4 (0)
7	44 (0)	4,4 (0)
8	28 (- α)	4,4 (0)
9	60 (+ α)	4,4 (0)
10	44 (0)	3 (- α)
11	44 (0)	5,9 (+ α)

As Equações 3.24 e 3.25 representam a codificação da temperatura e do pH respectivamente.

$$X_1 = \frac{T - 44}{\frac{58 - 30}{2}} \quad (3.24)$$

$$X_2 = \frac{pH - 4,4}{\frac{5,7 - 3,2}{2}} \quad (3.25)$$

Após obtidos os resultados dos experimentos, estes foram analisados por superfície de resposta e por análise canônica, conforme item 3.4.5 para a obtenção dos valores de pH que maximizam a atividade enzimática.

3.5.5 – Determinação da energia de ativação da reação de hidrólise de lactose por β -galactosidase imobilizada

Com o objetivo de estudar a influência da temperatura isoladamente na atividade da enzima β -galactosidase na forma imobilizada, foram determinadas as atividades enzimáticas

pelo procedimento de velocidades iniciais de reação conforme item 3.3. Os experimentos foram realizados utilizando uma concentração de lactose de 50 g/L em tampão acetato a pH 4,5 variando-se a temperatura de 10 a 80°C. Para cada valor de temperatura estudado foi confeccionado um conjunto partículas de biocatalisador imobilizado, utilizando as condições otimizadas para a imobilização da enzima, exceto a concentração da mesma, que foi usada diluída a 1%(p/v) com objetivo de reduzir gastos com enzima. A energia de ativação foi obtida graficamente, utilizando-se a Equação 3.26.

$$\ln(A) = \ln(A^*) - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (3.26)$$

sendo

A = Atividade enzimática; A* = fator de frequência para a reação

E_a = energia de ativação do processo; T = temperatura absoluta.

3.5.6 – Estudo da estabilidade térmica da enzima imobilizada

Com o objetivo de estudar a estabilidade térmica da enzima β-galactosidase imobilizada, foram incubadas amostras da mesma em um banho termostatzado no intervalo de temperatura de 53 à 65°C. Para cada temperatura estudada, preparou-se vários conjuntos de partículas de biocatalisador imobilizado que foram colocadas em erlenmeyers tampados contendo 50mL de tampão acetato a pH 4,5. Para cada temperatura de incubação, os conjuntos de partículas imobilizadas foram retiradas em intervalos adequados de tempo (2 em 2 minutos para 65°C, de 4 em 4 minutos para 63°C, de 7 em 7 minutos para 61°C, de 10 em 10 minutos para 59°C, de 13 em 13 minutos para 57°C, de 20 em 20 minutos para 55°C, de 45 em 45 minutos para 53°C). Estas amostras foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e a seguir as partículas do biocatalisador foram colocadas em 50mL de solução de lactose a 50g/L, pH 4,5 em tampão acetato, na temperatura de 35°C para determinar a atividade residual pelas velocidades iniciais da reação de hidrólise de lactose, conforme metodologia descrita no item 3.3. Os resultados de atividade enzimática obtidos foram analisados pela modelagem em série, utilizando as Equações 3.1, 3.2 e 3.3 por meio de regressões não-lineares para determinar os melhores ajustes e os parâmetros cinéticos. Os tempos de meia vida foram determinados para cada temperatura, considerando o melhor ajuste dos resultados experimentais às Equações de desativação térmica (Equações 3.1, 3.2 e 3.3) utilizando a Equação 3.4. A energia de ativação do processo de desativação térmica foi calculada pela Equação 3.5 através de regressão linear.

3.5.7 – Estudo da estabilidade da enzima imobilizada em relação ao pH

As amostras de enzima imobilizada foram colocadas em erlenmeyers contendo tampão acetato e citrato-fosfato cujos valores de pHs variaram de 2,5 a 8 (conforme item 3.3). Os mesmos foram incubados em banho termostatizado à temperatura de 35°C por 18 horas. Após este tempo, foram determinadas as atividades enzimáticas residuais conforme item 3.3, a 35°C, numa concentração de lactose de 50 g/L à pH a 4,5 em tampão acetato. A atividade relativa (A_i/A_0) para cada valor de pH foi determinada pela relação entre a atividade residual (A_i) e a atividade sem incubação (A_0), sendo esta atividade determinada nas mesmas condições anteriores.

3.5.8 – Influência da concentração inicial de galactose na atividade da enzima imobilizada

Conforme item 3.4.6, a glicose não apresentou inibição significativa na atividade da lactase na forma livre. Desta forma este resultado foi estendido para a forma imobilizada onde estudando-se apenas a influência da galactose na atividade enzimática desta forma de enzima. Adotou-se o mesmo procedimento experimental do item 3.4.7. Para tanto, 5 conjuntos de biocatalisadores imobilizados foram confeccionados (um para cada concentração de substrato) utilizando as condições de imobilização otimizadas anteriormente conforme item 3.5.2. Cada experimento foi realizado à temperatura de 35°C adicionando as partículas de catalisador em 50 mL de substrato na concentração desejada do experimento a pH 4,5 em tampão acetato. As atividades enzimáticas foram determinadas experimentalmente pelo procedimento de velocidades iniciais de reação, conforme item 3.3. Os resultados experimentais de velocidade inicial de reação foram ajustados aos modelos cinéticos de inibição conforme item 3.4.7.

3.5.9 – Influência da concentração de lactose na atividade da β -galactosidase imobilizada

A dependência entre a atividade da enzima β -galactosidase e a concentração de substrato (lactose) foi determinada experimentalmente pelo procedimento de velocidades iniciais de reação conforme item 3.3, na faixa de concentração do substrato de 10 a 140 g/L, a 35°C em tampão acetato a pH 4,5. O volume reacional era de 50 mL de solução de lactose, ao

qual eram adicionados as partículas de biocatalisador imobilizado, confeccionadas conforme item 3.5.2, exceto a concentração de enzima utilizada que foi de 1% (p/v).

3.5.10 -Estudo da transferência de massa no sistema com a enzima imobilizada

Para a verificação dos efeitos de transferência de massa foi implementado um programa para o cálculo do fator de efetividade parâmetro determinante no fenômeno de transferência de massa baseado no modelo e hipótese propostos por KHORASHEH *et al.* (2002), que adota as seguintes considerações para o desenvolvimento do modelo cinético com enzimas imobilizadas:

- a) A cinética da enzima na forma livre é descrita pela equação de Michaelis-Menten para reações irreversíveis;
- b) A enzima é uniformemente distribuída ao longo de todo material do suporte;
- c) O efeito de partição entre o suporte e o seio da fase fluida é negligenciado;
- d) Temperatura e difusividade efetiva são constantes dentro do suporte;
- e) Condições de estado estacionário;
- f) A desativação da enzima é negligenciada.

As considerações acima são empregadas para o desenvolvimento e resolução das equações diferenciais que se seguem. A Equação 3.27 de Michaelis-Menten para reações irreversíveis é dada por:

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (3.27)$$

Onde v é a velocidade de reação, V_m é a máxima velocidade de reação, K_m é a constante de Michaelis-Menten e S a concentração de substrato. A Equação 3.28 e as condições de contorno associadas (Equações 3.29, 3.30 e 3.31), expressam a concentração de substrato adimensional C . A obtenção da Equação 3.8 adimensional é obtida das equações 3.32 a 3.36 em 2.28 para partícula esférica.

$$\frac{d^2 C}{dX^2} + \frac{(g-1)}{X} \frac{dC}{dX} = \phi^2 \frac{C}{1 + \beta_b C} \quad (3.28)$$

$$\text{Para } X=0: \frac{dC}{dX} = 0; \quad (3.29)$$

$$\text{Para } X=1: C=1 \text{ (ausência de resistência externa de transferência de massa)} \quad (3.30)$$

$$\frac{dC}{dX} = Bi(1 - C) \quad (\text{com resistência externa de transferência de massa}) \quad (3.31)$$

Onde X é o adimensional da distância variando do centro à superfície de simetria da partícula e g é o fator de forma da partícula, o qual assume os valores 1, 2 e 3 para as formas retangulares, cilíndricas e esféricas respectivamente. Os parâmetros adimensionais definidos estão ilustrados nas Equações 3.32 a 3.36, como se segue:

$$C = \frac{S}{S_b} \quad (3.32)$$

$$X = \frac{x}{R} \quad (3.33)$$

$$\beta_b = \frac{S_b}{K_m} \quad (3.34)$$

$$\phi = R \sqrt{\frac{V_m}{K_m \cdot D_e}} \quad (\text{módulo de Thiele}) \quad (3.35)$$

$$Bi = \frac{k_{La}}{D_e} \quad (\text{número de Biot}) \quad (3.36)$$

Nas expressões anteriores, r é a distância ao centro, R é raio da partícula, S é a concentração de substrato dentro do partícula, S_b é a concentração de substrato no seio da fase líquida, k_i é o coeficiente de transferência de massa externo, D_{ef} é a difusividade efetiva do substrato na partícula. Na condição de estado estacionário, a taxa de reação pode ser avaliada a partir do perfil obtido pela resolução da Equação 3.28. Por qualquer um dos métodos: i) a partir da velocidade de difusão de substrato na superfície da partícula, ii) a partir da velocidade de transferência de massa do seio da fase líquida para a superfície externa da partícula e iii) a partir da integração da taxa de reação da superfície da partícula ao centro. As Equações correspondentes aos métodos citados são dadas pelas Equações 3.37 a 3.39.

$$v = \frac{gDe}{R} \left. \frac{dS}{dx} \right|_{x=R} \quad (3.37)$$

$$v = \frac{gk_1}{R} (S_b - S)|_{x=R} \quad (3.38)$$

$$v = g \int_0^R \left[\frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \right] x^{g-1} dx \quad (3.39)$$

Para descrever a limitação do efeito de transferência de massa na taxa de reação global, a seguinte definição para o fator de efetividade η foi utilizada e está ilustrada na equação 3.40.

$$\eta = \frac{\text{velocidade de reação}}{\text{velocidade de reação na ausência de resistências internas e externas}} \quad (3.40)$$

O numerador está relacionado com uma das Equações de 3.37 a 3.39 e o denominador é a velocidade de reação por unidade de volume da partícula para a concentração de substrato no seio da fase fluida. Empregando-se a Equação 3.39, obtém-se a Equação 3.41 como expressão para η :

$$\eta = g(1 + \beta_b) \int_0^1 \frac{C}{1 + \beta_b C} X^{g-1} dX \quad (3.41)$$

Para a resolução numérica da Equação 3.41 é necessário o conhecimento do perfil de concentração do substrato intra-partícula. Neste caso torna-se necessário a resolução da Equação 3.28 e o conhecimento dos parâmetros aparentes do modelo de Michaelis-Menten e da difusividade efetiva. Os parâmetros aparentes do modelo cinético de Michaelis-Menten foram determinados utilizando otimização pelo método dos mínimos quadrados no software Origin®.

A difusividade efetiva foi estimada pela resolução da Equação 3.42 a qual é a solução da Equação 3.28 considerando cinética de primeira ordem (RIBEIRO, 1999), utilizando os valores dos parâmetros aparentes calculados e o raio da partícula medido experimentalmente.

$$\frac{\phi}{\tanh \phi} = 1 + \frac{1}{3} \left(\frac{V_m}{K_m} \right)_{ap} \cdot \frac{R^2}{D_{es}} \quad (3.42)$$

3.5.10.1 - Resolução numérica das equações do modelo

O sistema de equações da continuidade para cada concentração inicial de substrato foi resolvido pelo método de aproximação polinomial por colocação ortogonal (VILLADSEN e MICHELSEN, 1978), e obteve-se o seguinte sistema de Equações algébricas não lineares (3.43 a 3.45) - para o caso simétrico:

$$\sum_{j=1}^{NP+1} B(k, j)C(j) + \frac{(g-1)}{X(k)} \sum_{j=1}^{NP+1} A(k, j)C(j) = \phi^2 \frac{C(k)}{(1 + \beta_b C(k))}, \quad k = 1, NP \quad (3.43)$$

$$Cj = \frac{S}{S_0} = 1 \quad \text{para } k = NP+1 \quad (3.44)$$

Recai-se, assim, no sistema de equações algébricas não-lineares:

$$Fi = \sum_{j=1}^{NP+1} B(k, j)C(j) + \frac{(g-1)}{X(k)} \sum_{j=1}^{NP+1} A(k, i)C(j) - \phi^2 \frac{C(k)}{(1 + \beta_b C(k))} = 0 \quad (3.45)$$

Resolveu-se este sistema pelo método de Newton-Raphson, utilizando-se algoritmo LU a cada iteração para obter o perfil de concentração adimensional dentro da partícula.

O perfil de concentração adimensional foi utilizado para calcular o fator de efetividade por integração numérica da Equação 3.41. Os valores preditos das velocidades de reação inicial, v_0 , podem ser obtidos para as diferentes concentrações iniciais de substrato, com v_0 (velocidade observada ou aparente) dado pela Equação 3.46:

$$v_0 = \eta \frac{VmS_{b0}}{Km + S_{b0}} \quad (3.46)$$