RODRIGO DE ANDRADE COSTA

Degradação Enzimática de Clorofenol em Microrreator

São Paulo

2016

RODRIGO DE ANDRADE COSTA

Degradação Enzimática de Clorofenol em Microrreator

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Ardson dos Santos Vianna
Junior

São Paulo

2016

RODRIGO DE ANDRADE COSTA

Degradação Enzimática de Clorofenol em Microrreator

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química

Área de Concentração: Departamento de
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Ardson dos Santos Vianna
Junior

São Paulo

2016

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Costa, Rodrigo de Andrade

Degradação enzimática de clorofenol em microrreator / R. A. Costa --
versão corr. -- São Paulo, 2016.
83 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São
Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Microrreator 2.Degradação enzimática 3.Cinética 4.Enzimas
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de
Engenharia Química II.t.

Dedico aos meus pais, Carlos Alberto Costa, Guislaine Gonçalves de Andrade Costa e Priscilla de Andrade Costa, por tudo que eles são em minha vida, como base, como exemplo, e por todo o amor, carinho, dedicação que eles têm comigo e pôr sempre estarem do meu lado em todas as horas. Sem essas pessoas maravilhosas o meu caminho seria bem mais complicado. Obrigado família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Ardson dos Santos Vianna Junior, e aos Professores Dr. Enzo Laurenti e a Dra. Katia Ribeiro, pela orientação deste trabalho e a todos os professores envolvidos direta ou indiretamente.

Ao técnico Rodrigo Ramos, por toda ajuda e suporte.

Aos meus amigos da Universidade Santa Cecília e da Escola Politécnica da Universidade São Paulo, em especial, Fábio Coffani, Lucas Bernardo Monteiro, Paulo Rogério, Rita Zolin, Andhros, Thais Keiko, Ana Paula e Adriana por toda ajuda.

E a todos aqueles que de uma maneira ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

Procure ser um homem de valor, em vez de ser um
homem de sucesso.

Albert Einstein

RESUMO

O microrreator faz parte de conjunto de dispositivos de uma nova e promissora tecnologia, que podem ser chamados de micro fabricados, atuante em campos como a da química, biológica, farmacêutica, engenharia química e biotecnologia. Trata-se de um dispositivo que possibilita reação química, tais como os reatores convencionais, mas com dimensões menores, com canais na escala micrométrica. A tecnologia de miniaturização de dispositivos para reações químicas vem se expandindo promovendo uma importante evolução, com microssistemas que abrange dispositivos mais eficazes, com configuração e geometrias específicas e menor consumo de energia, onde reações com elevadas taxas de transporte podem ser usadas para muitas finalidades diferentes, tais como, reações rápidas, mistura, reações sensíveis à temperatura, temperatura de homogeneização, ou até mesmo precipitação de nano partículas. Devido sua escala ser extremamente reduzida em relação à escala macro, oferecem um sistema que permite uma investigação do processo em um curto espaço de tempo, sendo muito útil para o rastreo de substratos, enzimas, condições de reação, bem como a determinação de parâmetros cinéticos. O presente trabalho teve por objetivo estudar a biodegradação enzimática de 2,4,6-Triclorofenol, com a utilização das enzimas Lacase e *Soybean Peroxidase* em microrreator da Syrris com volume de 250 μ l, que permite o estudo de cinéticas muito rápidas. Para as análises de degradação utilizou-se duas enzimas, a Lacase em concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ml; e a *Soybean Peroxidase* em concentrações de 0,0005; 0,001 e 0,002 mg/ml com a adição de Peróxido de Hidrogênio. Através dos ensaios realizados obteve-se dados experimentais da reação enzimática, possibilitando a verificação da taxa inicial de reação e sua cinética. Posteriormente, realizou-se as análises em simulação utilizando os dados experimentais, que através de um sistema de EDOs estimando inicialmente as constantes cinéticas k_1 , k_2 e k_3 usando a ferramenta ESTIMA, onde apresentaram duas respostas, uma resposta típica de mínimos quadrados, e a outra resposta que a velocidade inicial, que foi melhor representada pelos parâmetros obtidos. O método empregado na degradação do substrato, o microrreator mostrou-se eficiente, permitindo a detecção de baixo consumo de substrato para a determinação da taxa inicial, em curto tempo de residência. Perante os ensaios realizados com Lacase e *Soybean Peroxidase*, o microrreator é também um equipamento eficaz na repetitividade e na reprodutibilidade dos dados obtidos em diferentes concentrações.

Palavras-chave: Microrreator, Degradação enzimática, Cinética, Enzimas.

ABSTRACT

The microreactor is part of a set of devices in a new and promising technology, which can be called micro manufactured, active in fields such as chemical, biological, pharmaceutical, chemical engineering and biotechnology. It is a device that enables chemical reactions, such as conventional reactors, but with smaller dimensions, in the micrometer scale channels. Miniaturization technology devices for chemical reactions is expanding promoting an important development, with microsystems covering most effective devices, configuration and specific geometries and lower power consumption, where reactions with high transportation fees can be used for many different purposes such as fast reactions, mixing, temperature sensitive reactions, homogenization temperature or even precipitation of nanoparticles. Because of its scale is greatly reduced compared to the macro scale, provide a system which allows an investigation of the process in a short time, being very useful for screening for substrates, enzymes, reaction conditions, and the determination of kinetic parameters. One of the advantages of using microreactors is that this equipment requires small amounts of reagents for performing a catalytic reaction of action, and is very important when dealing with enzyme as a catalyst. This study aimed to study the enzymatic biodegradation of 2,4,6-Trichlorophenol with the use of laccase and Soybean Peroxidase enzymes in microreactor Syrris with volume of 250 μl , which allows the study of very fast kinetics. For degradation analyzes were used two enzymes, laccase concentrations of 0.05; 0.1 and 0.2 mg / ml; and Soybean peroxidase at concentrations of 0.0005; 0.001 and 0.002 mg / ml with the addition of Hydrogen Peroxide. Through trials was obtained experimental data from enzyme reaction, allowing the verification of the initial reaction rate and its kinetics. Later, there was the analysis simulation using the experimental data, which through a system of ODEs initially estimating the rate constants k_1 , k_2 and k_3 using the ESTIMA tool, which had two answers, a typical response of least squares, and another answer to the initial rate, which was best represented by the parameters obtained. The method used in substrate degradation, the microreactor was efficient, allowing low substrate consumption detection for determining the initial rate in the short residence time. Before the tests with Laccase and Soybean Peroxidase, the microreactor is also an effective equipment in the repeatability and reproducibility of the data obtained at different concentrations.

Keywords: Microreactor, Enzymatic degradation, Kinetics, Enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Sistema chave-fechadura (<i>Lock-and-Key</i>) entre a enzima e o substrato	19
Figura 3.2 - Gráfico demonstrativo da atividade catalítica da enzima	20
Figura 3.3 - Atuação no processo de oxirredução da enzima Lacase.....	25
Figura 3.4 - Curva de reação representativa na formação de produto	30
Figura 3.5 - Representação gráfica da análise de curso de tempo	31
Figura 3.6- Representação esquemática da equação de Michaelis-Menten	35
Figura 3.7 - Representação esquemática da equação de Lineweaver-Burk	36
Figura 3.8 - Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk, demonstrando desvios experimentais.....	38
Figura 3.9- Representação gráfica da equação de Hanes-Woolf, demonstrando desvios experimentais.....	39
Figura 3.10 - Representação gráfica da equação de Eadie-Hofstee, demonstrando desvios experimentais.....	40
Figura 3.11 - Representação gráfica linear direta proposta por Eisenthal e Cornish-Bowden.....	41
Figura 3.12 - Variação da forma gráfica linear direta	42
Figura 3.13 - Representação simulada dos três tipos de regime de fluxo	47
Figura 4.1 - Microrreator – unidade piloto	55
Figura 4.2 - (a) Sistema de armazenamento de reagentes; (b) Sistema de controle fluxo; (c) Sistema de controle de temperatura; (d) Chip - Microrreator	56
Figura 4.3 - Base do microrreator.....	57
Figura 4.4 - Enzimas: (a) Lacase; (b) Soybean Peroxidase - SBP	57
Figura 4.5 - Curva de calibração do 2,4,6 – Triclorofenol.....	61
Figura 5.1 - Ensaios com Lacase com concentração de 0,1 mg/ml, comparativo entre os ensaios realizados no microrreator e em reator batelada.	65
Figura 5.2 - Comparativo entre os ensaios de degradação com <i>Soybean Peroxidase</i> para três concentrações.....	66
Figura 5.3 - Comparativo entre os ensaios com <i>Soybean Peroxidase</i> , em concentração de 0,0005	67
Figura 5.4 - Comparativo entre os ensaios com <i>Soybean Peroxidase</i> , em concentração de 0,001	67
Figura 5.5 - Comparativo entre os ensaios com <i>Soybean Peroxidase</i> , em concentração de 0,002	68
Figura 5.6 - Comparativo entre os novos ensaios com <i>Soybean Peroxidase</i> para três concentrações	68

Figura 5.7 - Comparativo entre os ensaios de degradação com Lacase, em concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 mg/ml	69
Figura 5.8 - Ensaio com Lacase com concentração de 0,05 mg/ml.....	70
Figura 5.9 - Ensaio com Lacase com concentração de 0,1 mg/ml.....	71
Figura 5.10 - Ensaio com Lacase com concentração de 0,2 mg/ml.....	71
Figura 5.11 - Gráfico da velocidade inicial em função da concentração de enzima utilizada	73
Figura 5.12 - Gráfico da velocidade inicial em função da concentração de enzima utilizada	74
Figura 5.13 - Comparação dos dados experimentais (pontos) e a solução do modelo (linhas) para $E_0=0,2$ mg/ml e $S_0=4,936$ mg/ml.....	75
Figura 5.14 - Comparação dos dados experimentais (pontos) e a solução do modelo (linhas) para $E_0=0,1$ mg/ml e $S_0=4,936$ mg/ml.....	76
Figura 5.15 - Comparação dos dados experimentais (pontos) e a solução do modelo (linhas) para $E_0=0,05$ mg/ml e $S_0=4,936$ mg/ml.....	77

Sumário

1.Introdução	13
2. Objetivos Gerais e Específicos	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. Fundamentos teóricos	16
3.1. Enzimas	16
3.1.1. Introdução	16
3.1.2. Nomenclatura e Classificação	17
3.1.3. Atividade catalítica	18
3.1.4. Mecanismo	21
3.1.5. Inibidores	22
3.1.6. Temperatura	23
3.1.7. pH	24
3.1.8. Lacase	24
3.1.9. SBP - Soybean Peroxidase	26
3.2. Cinética	28
3.2.1. Introdução	28
3.2.2. Cinética Enzimática	29
3.2.3. Análise de dados cinéticos	29
3.2.3.1. Taxa inicial	30
3.2.3.2. Análise de curso de tempo	31
3.2.3.3. Michaelis-Menten	32
3.2.3.4. Lineweaver-Burk	35
3.2.3.5. Hanes-Woolf	38
3.2.3.6. Eadie-Hofstee	39
3.2.3.7. Gráfico linear direto	40
3.3. Microrreator	43
3.3.1. Introdução	43
3.3.2. Mistura	44
3.3.3. Transferência de energia	47
3.3.4. Transferência de massa	47
3.3.5. Tempo de residência	48
3.3.6. Aumento de escala	48
3.3.7. Biorreatores	48
3.4. Equações Diferenciais Ordinárias	51
3.4.1. Série de Taylor	51
3.4.2. Métodos Explícitos	52
3.4.3. Métodos Implícitos	52
3.4.4. Rigidez	53
4. Materiais e Métodos	55
4.1. Unidade Experimental	55
4.2. Método Experimental	59
4.2.1. Curva de calibração	60
4.3. Análise dos dados	62

5. Resultados e discussões	64
5.1. Resultados Experimentais.....	64
5.1.1. Experimento Preliminar.....	64
5.1.2. Degradação com <i>Soybean Peroxidase</i>	65
5.1.3. Degradação com Lacase	69
5.2. Análise dos dados	73
5.2.1. Velocidade Inicial.....	73
5.2.2. Solução das EDOs	75
6. Conclusões	78
7. Referências	80

1. Introdução

A vida como um todo deve manter o equilíbrio, deve ser bem orquestrada, por isso depende da associação de uma série de fatores, relações e sistemas. Uma forma de interação é via reações químicas. Muitas destas reações ocorrem de maneira lenta e progressiva, para se manter os processos vitais, mas para as outras, a natureza encontrou uma forma de acelerar ou aumentar a velocidade destas reações através da catálise biológica. Estas ações catalíticas facilitam os processos vitais em todas as suas formas (Motta, 2011).

Na Engenharia Química, o reator é um equipamento onde as reações devem acontecer de forma que possibilitem a obtenção, formação ou para a modificação em busca de uma otimização e de novos produtos. Através dos reatores é possível ter controle do tempo de residência, temperatura, quantidades de reagentes inseridos entre outros.

O microrreator é um dispositivo que possibilita a reação química, tais como os reatores convencionais, mas com dimensões menores, com canais na escala micrométrica. Faz parte de um grupo de equipamentos, que podem ser chamados de micro fabricados, que está sendo alvo crescente de estudos devido a sua aplicação em diversas áreas como biológica, química, farmacêutica (Trachsel, 2008).

Entre as várias áreas que vêm sendo estudadas, a área de meio ambiente tem sido foco quase que prioritário, devido à ação das indústrias, já que causa modificações ao meio ambiente. Uma ação possível é a utilização de enzimas como catalisador nas reações de degradação de compostos aromáticos clorados, devido a sua especificidade.

Um dos exemplos importantes de poluente orgânico nas indústrias têxteis são compostos aromáticos. Outras indústrias também lançam compostos tóxicos e potencialmente cancerígenos, por exemplo, refino de petróleo, papel e celulose, couro, plásticos e preservação da madeira. Efluentes vindos destas indústrias devem ser tratados antes de serem lançados em corpos d'água maiores, como lagoas, rios e lagos (Kalsoom et al., 2013).

Alguns métodos químicos, tais como as técnicas de oxidação avançada, têm sido adotados para manipulação de tais efluentes, mas têm sucesso limitado à medida que a escala é comercial. Neste processo de remoção dos contaminantes têm sido utilizados métodos biológicos, que através do potencial metabólico de microrganismos é possível degradar uma ampla variedade de poluentes, e vem sendo explorada com algum sucesso. Sua principal vantagem de biorremediação é o seu custo reduzido em comparação com as técnicas convencionais. Além disso, o método é ambientalmente amigável, deixando o ecossistema

intacto, não acrescentando quaisquer variáveis para ele, também podendo lidar com menores concentrações de contaminantes (Rauf M. A. e Ashraf S. S., 2012; Chandra R. e Singh R., 2012).

As enzimas são responsáveis pela geração de radicais livres altamente reativos que se submetem a uma série complexa de reações de clivagem espontânea. Alguns exemplos comuns de enzimas utilizadas para a degradação de corantes são as peroxidases (*Horseradish peroxidase* - HRP, *Manganese peroxidase*, *Soybean peroxidase* - SBP, *Lignin peroxidase* - LiP), lacases, tirosinase etc (Kalsoom et al., 2013). São utilizados para o tratamento de águas residuais, que apresentam em sua composição contaminantes aromáticos, e podem sofrer um processo de degradação.

2. Objetivos Gerais e Específicos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar a cinética de degradação de compostos aromáticos clorados em microrreator, utilizando enzimas em um processo de oxidação-redução.

2.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar a degradação de 2,4,6 – Triclorofenol com a utilização de Lacase e *Soybean Peroxidase*;
- II. Desenvolver um método analítico para quantificar a degradação;
- III. Estudar a cinética de degradação no microrreator.

3. Fundamentos teóricos

Aqui são apresentados os fundamentos básicos para o entendimento sobre enzimas, cinética e microrreatores.

3.1. Enzimas

3.1.1. Introdução

As enzimas são proteínas, consideradas catalisadores biológicos por exercer a função de aumentar a velocidade de uma reação química. Possuem elevada massa molecular e atuam sobre substratos específicos, de forma a aumentar significativamente as velocidades (Fogler, 2009). São substâncias sólidas, difíceis de serem cristalizadas, devido à complexidade de suas estruturas químicas. Normalmente são solúveis em soluções aquosas. (Kieling, 2002). Sua estrutura como um todo é essencial para a atividade catalítica, que é definida pelas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, sendo proteínas globulares apresentando diversos tamanhos (Whitaker, 1972). Contém um centro ativo ou núcleo, denominado de *apoenzima*. Algumas vezes apresentam um grupo não proteico, uma molécula metalorgânica, denominado de *coenzima*. *Holo enzima* é o nome de toda a molécula (apoenzima + coenzima), que dependendo do tipo de ligação entre o grupo proteico e a proteína, pode ser separada através de métodos brandos (Lehninger et al., 2008). Devido ao sítio ativo das enzimas, elas são específicas, ou seja, hidrolisam e sintetizam um composto em particular. Sendo em alguns casos limitada a ações com ligações específicas dentro dos compostos que estão sofrendo reação (Kieling, 2002).

Como catalisador, substancialmente oferece vantagens importantes sobre os catalisadores químicos, que são derivados a partir de recursos renováveis, são biodegradáveis. São submetidas a condições relativamente moderadas de temperatura e pH. Tendem a apresentar seletividade excelente tanto para reagentes quanto para produtos (Cherry, 2003). Assim, pode-se dizer que, sua introdução como catalisador resulta em economia significativa de recursos, tais como energia e água, trazendo benefícios para a indústria e o meio ambiente. Por isso têm-se a necessidade de encontrar métodos de produção e prestação de serviço que não agride o meio ambiente, ou que diminua o impacto ambiental já sancionado. A tecnologia

enzimática oferece um grande potencial para ajudar a enfrentar esses desafios (Kirk, 2002; Cherry, 2003).

3.1.2. Nomenclatura e Classificação

A nomenclatura das enzimas tem sido feita de várias maneiras. Antigamente recebiam nomes de quem as descobriu. Com o aumento do número de enzimas descobertas, fez-se necessária uma sistematização. A mais utilizada é feita pela adição do sufixo *ase* ao nome do substrato (a molécula na qual a enzima exerce sua ação catalítica), ou à palavra ou frase que descreve sua atividade. Por exemplo, a enzima *urease* que catalisa a hidrólise da uréia a amônia e CO₂; a *arginase* catalisa a hidrólise da arginina a ornitina e uréia; e a *DNA polimerase* que catalisa a polimerização dos nucleotídeos para formar o DNA.

Devido ao contínuo aumento de produção de enzimas e a falta de uma nomenclatura universalmente reconhecida, houve a proposta de uma classificação sistemática recomendada por acordo internacional. Assim foi adotado um sistema para nomear e classificar as enzimas. A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) adotou um sistema que divide as enzimas em seis classes, cada uma com suas subclasses, de acordo com a natureza da reação química que catalisam. Assim para cada enzima são atribuídos um nome sistemático e um número classificatório de 4 dígitos, identificando a reação que catalisa. Por exemplo:

A enzima utilizada é a *ATP-glicose fosfotransferase*, nome baseado na reação de transferência de um grupo de fosfato do ATP para a glicose. Seu número de classificação é *E.C. 2.7.1.1*, onde *EC* representa Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB. O primeiro dígito (2) representa o nome da classe (*transferase*), o segundo dígito (7) é a subclasse (*fosfotransferase*), o terceiro dígito (1), indica uma fosfotransferase, que apresenta um grupo hidroxila aceptor de fosfato, e o quarto dígito (1) indica que a D-glicose é aceptor do grupo fosfato. Para muitas enzimas o nome trivial pode ser utilizado, como por exemplo, a hexoquinase (Lehninger et al., 2008).

A tabela 3.1 abaixo relaciona os códigos utilizados para a aplicação do número de identificação das enzimas.

Tabela 3.1: Classe, tipo de reação e atuação das enzimas.

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada	Atuação
1	Oxirredutases	Reações de oxidação-redução, transferência de elétrons (hidretos H^- e átomos de H^+ - <i>Desidrogenases</i> e <i>Oxidases</i>)	1.1.atuando em CH-OH 1.2.atuando em C=O 1.3.atuando em C=O- 1.4.atuando em CH-NH ₂ 1.5.atuando em CH-NH- 1.6.atuando em NADH, NADPH
2	Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais entre moléculas (amina, fosfato, acil, carboxil - <i>Quinases</i> e <i>Transaminases</i>)	2.1.grupos com um carbono 2.2.grupos aldeído ou cetona 2.3.grupos acil 2.4.grupos glicosil 2.7.grupos fosfatos 2.8.grupos contendo enxofre
3	Hidrolases	Reações de hidrólise utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas (ligação covalente - <i>Peptidases</i>)	3.1.ésteres 3.2.ligações glicosídicas 3.4.ligações peptídicas 3.5.outras ligações C-N 3.6.anidridos ácidos
4	Liasas	Reações com a adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações através de remoção de grupos (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico - <i>Dehidratases</i> e <i>Descarboxilases</i>).	4.1. =C=C= 4.2. =C=O 4.3. =C=N-
5	Isomerases	Reações de transferência de grupos dentro da mesma molécula para a formação de isômeros (reações de Inter conversão entre isômeros óticos ou geométricos - <i>Epimerases</i>)	5.1.racemases
6	Ligases	Reações que formam ligações químicas através de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre à custa de energia - <i>Sintetases</i>).	6.1. C-O 6.2. C-S 6.3. C-N 6.4. C-C

3.1.3. Atividade catalítica

As enzimas atuam de forma que a reação aconteça com uma energia de ativação menor, possibilitando acelerar processos biológicos somente com sua presença e sem o seu consumo. Mas sua atividade depende da integridade de sua estrutura proteica como um todo. Podendo se dizer que a atividade é geralmente destruída, quando uma enzima se encontra desnaturada ou dissociada em subunidades ou partes. Assim pode-se dizer que, todas as estruturas das enzimas são essenciais para a atividade catalítica.

As enzimas em seu processo catalítico convertem uma substância, chamada de substrato, em um produto, como mostrado na Figura 3.1; são extremamente específicas para o tipo de reação no qual vão catalisar.

Figura 3.1 – Sistema chave-fechadura (*Lock-and-Key*) entre a enzima e o substrato.

Fonte: http://www.insumos.com.br/funcionais_e_nutraceuticos/materias/86.pdf

As enzimas são sintetizadas por células vivas, atuando em quase todas as reações metabólicas dos organismos vivos. Portanto, elas estão presentes em vários alimentos, atuando na quebra do alimento em compostos mais simples. Por exemplo, as lipases que hidrolisam as gorduras em glicerol e ácidos graxos, e as amilases hidrolisam amido em açúcares.

Sua eficiência como catalisador pode ser explicada através da concentração de sua atividade (U/ml), sendo determinado a partir da velocidade de reação, ou seja, a atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa para a formação de produto por unidade de tempo. Para reações catalisadas, a velocidade de reação pode ser acelerada para a ordem de milhões de vezes, por exemplo, a enzima orotidina monofosfato descarboxilase diminui o tempo de reação por ela catalisada de 78 milhões de anos para 25 milissegundos (Radzicka, 1995).

A figura 3.2 abaixo ilustra a atividade catalítica da enzima sobre o substrato, na formação do produto em uma reação bioquímica.

Figura 3.2 – Gráfico demonstrativo da atividade catalítica da enzima.

Fonte: <http://bio12-ciencia.blogspot.com.br/2011/04/atividade-enzimatica.html>

A atividade enzimática pode depender de determinadas moléculas, chamadas *cofatores*. Na natureza química, os cofatores são muito variáveis, podendo ser um ou mais íons metálicos Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou uma molécula orgânica como uma vitamina B_{12} , ou até mesmo uma molécula metal-orgânica chamada *coenzima*. Estes cofatores podem participar diretamente ou não na reação enzimática, mas algumas enzimas requerem ambas, a coenzima e um ou mais íons metálicos, que está firmemente ou covalentemente ligada à parte proteica da enzima, sendo chamado de grupo prostético (Lehninger et al., 2008).

Os cofatores que possuem uma ligação forte às enzimas são distintos de outras coenzimas, portanto não são liberados do sítio ativo durante a reação catalisada. Um exemplo é a anidrase carbônica. Estas moléculas possuem uma ligação estreita com as enzimas e normalmente encontradas no sítio ativo, onde estão envolvidas na reação catalítica. Outro exemplo são a flavina e grupos heme, que estão envolvidas em reações de oxidação-redução. As coenzimas como transportadores transitórios de grupos funcionais específicos são geralmente derivadas de vitaminas, nutrientes orgânicos, necessários em pequenas quantidades, na alimentação diária (Lehninger et al., 2008).

Através de substâncias pode-se diminuir ou eliminar totalmente a atividade de algumas enzimas; essas substâncias são chamadas de inibidores enzimáticos. Esta inibição pode ser

reversível ou irreversível, existindo dois tipos de inibição enzimática reversível: a competitiva e a não competitiva.

A inibição enzimática reversível competitiva ocorre quando o inibido se liga reversivelmente ao sítio de ligação do substrato. O efeito é revertido aumentando a concentração de substrato. Este tipo de inibição depende da concentração de substrato e de inibidor.

A inibição enzimática reversível não competitiva ocorre quando o inibidor liga-se reversivelmente à enzima em um sítio próprio de ligação, podendo estar ligado à mesma ao mesmo tempo em que o substrato. Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor.

Na inibição enzimática irreversível, há modificação covalente e definitiva no sítio de ligação ou no sítio catalítico da enzima.

3.1.4. Mecanismo

A cinética enzimática estuda a velocidade das reações enzimáticas, bem como os fatores que a influenciam, envolvendo informações sobre o mecanismo de ação catalítica da enzima, que é parte da Enzimologia. Apesar de sua abrangência, as enzimas podem ser analisadas via as suas velocidades para a quantificação de sua eficiência no processo catalítico (Borzani et al., 2001).

Para aumentar a velocidade de uma reação é necessário aumentar a concentração de enzima para a mesma concentração de substrato. Se a concentração de substrato é baixa, tem-se uma subutilização do sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, pouco produto é formado. Com o aumento da concentração de substrato, pode-se atingir a velocidade máxima de reação, ou seja, a máxima conversão de produto para uma quantidade de enzima pré-determinada; se a reação está saturada, a adição de substrato não alterará mais a velocidade da reação.

Neste processo, o substrato (S) liga-se ao sítio ativo de uma enzima (E), formando um complexo enzima-substrato (ES), que contém uma energia de ativação ligeiramente menor que o substrato isolado, tornando o processo rápido e reversível antes da formação do produto; ocorre um estado de transição. Após um tempo, o produto formado se dissocia da enzima, obtendo-se o produto final e a enzima sem alteração de suas características.

Através de modelos propostos por Michaelis e Menten (Lehninger et al., 2008), a cinética da reação pode ser descrita da seguinte forma: a enzima (E) reage com um substrato (S), formando

um composto intermediário conhecido como complexo enzima-substrato (ES), no qual se decompõe em enzima (E) e o produto (P).

Sua cinética é influenciada através da concentração de substrato e da concentração de enzima. O balanço molar para cada espécie é:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1 [E][S] + k_2 [E.S] \quad (3.1)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1 [E][S] + k_2 [E.S] + k_3 [E.S] \quad (3.2)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 [E.S] \quad (3.3)$$

$$\frac{d[E.S]}{dt} = k_1 [E][S] - k_2 [E.S] - k_3 [E.S] \quad (3.4)$$

Onde $t=0$, $[S] = [S]_0$, $[E] = [E]_0$, $[P] = [P]_0$, $[R] = [R]_0$ e $[E.S] = 0$.

3.1.5. Inibidores

Os inibidores são agentes moleculares que interferem na catálise das enzimas, diminuindo ou interrompendo as reações. Este estudo pode fornecer informações importantes a respeito dos mecanismos enzimáticos e também para definir vias metabólicas. Existem duas classes de inibidores, os reversíveis e os irreversíveis (Lehninger et al, 2008).

Consideramos entre os tipos de inibição reversível, apenas dois, a inibição competitiva e a inibição não competitiva. A inibição competitiva acontece quando o inibidor compete com o substrato, ocupando o sítio ativo da enzima, e seguindo o modelo de Michaelis-Menten, o caso mais simples pode ser representado através das seguintes equações químicas (Borzani et al, 2001).

Já os inibidores não competitivos ligam-se em regiões diferentes do sítio ativo, como ao ES, sendo representado nas seguintes equações.

As inibições irreversíveis são aquelas que combinam com um grupo funcional na molécula da enzima, ou as destroem, ou que formam associação covalente bastante estável. Esses inibidores apresentam uma ferramenta muito útil no estudo do mecanismo das reações enzimáticas, como o desenvolvimento de drogas para a obtenção de novos agentes farmacêuticos, em que novos substratos são sintetizados baseando-se em conhecimentos recém adquiridos (Lehninger et al, 2008).

3.1.6. Temperatura

A temperatura é um dos fatores que podem influenciar a atividade e pode ser responsável para obter o nível máximo de atividade, chamado de ponto ótimo. A maioria das enzimas apresenta um melhor desempenho entre as temperaturas de 30°C a 70°C, sendo que em baixas temperaturas elas se encontram muito rígidas e quando a temperatura é muito elevada sua atividade cai bruscamente, devido a sua desnaturação (Motta, 2001; Kielling, 2002).

A velocidade das reações enzimáticas é muito sensível a temperatura, pois pode ser duplicada ao cada aumento de 10°C na temperatura da reação. Isto segue uma regra geral nas reações de catálise enzimática, contudo não se observa um aumento indefinido. Uma velocidade máxima ou ponto ótimo é alcançado, a partir do qual sua atividade começa a decrescer. O efeito da temperatura é complexo, devido a várias causas. Com o aumento de temperatura, tem-se a atividade molecular aumentada, o que amplia a formação de complexo enzimático. No entanto, com um aumento contínuo, tem-se a ocorrência inicial de inativação gradativa da atividade enzimática.

Em geral, as enzimas reagem muito lentamente nas temperaturas de subcongelamento e sua atividade aumenta com o aumento de temperatura até atingir uma atividade ótima em temperaturas ao redor de 45°C.

3.1.7. Ph

As enzimas, em sua ação catalítica, reagem na faixa de pH entre 4,5 e 8,0. O pH influencia diretamente em sua velocidade reacional, tendo cada reação enzimática um pH ótimo (Whitaker, 1972). Este valor ótimo varia com as diversas enzimas e os diferentes substratos sobre os quais atuam.

O pH influencia de várias maneiras:

- ✓ O sítio ativo pode conter aminoácidos com grupos ionizados que podem variar com o pH;
- ✓ A ionização de aminoácidos que não estão no sítio ativo pode provocar modificações na formação da enzima;
- ✓ O substrato pode ver-se afetado pelas variações do pH.

Valores extremos, altos e baixos, podem provocar a desnaturação proteica da enzima, modificando sua atividade. Por isso, é recomendável verificar a faixa de pH em que a enzima é estável.

As enzimas podem ser inativadas ou desnaturadas por diversos fatores, como calor, ponto isoelétrico, sequestro de sais de cálcio e agitação mecânica.

3.1.8. Lacase

A lacase (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigénio oxidoreductase) é uma das poucas enzimas que devido à sua ampla especificidade. Foi estudada amplamente desde o final do século passado (Gochev, 2007). A enzima foi descrita pela primeira vez por, Yoshida em 1883, em seu estudo sobre a árvore *Rhus Vernicifera*, sendo descoberto um tipo de cobre contendo poli fenol oxidase. E posteriormente, em 1896, Bertrand e Laborde, demonstraram que a lacase é uma enzima fúngica (Thurston 1994; Levine, 1965).

Lacases são enzimas que em sua estrutura contêm cobre. Sua função é catalisar a oxidação de uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono, di, e poli fenóis, amino fenóis, fenóis metoxi, aminas aromáticas e ascorbato (Gallup et al., 2002), onde os fungos são os principais produtores, especialmente *Basidiomycetes*, sua atividade pode ser demonstrada na figura 3.3.

Figura 3.3 – Atuação no processo de oxirredução da enzima Lacase

Devido à sua ampla especificidade de substrato, que pode ainda ser estendido a diversas compostos não fenólicos recalcitrantes da presença de mediadores, as lacases são amplamente usadas em muitos processos industriais e ambientais. Suas aplicações comerciais são encontradas na indústria de papel e, bio-branqueamento, *biosensing* e bebida destilada. Sendo aplicado na remoção de um elevado número de poluentes ambientais, tais como os alcenos, clorofenóis, corantes, herbicidas, policíclicos hidrocarbonetos aromáticos e benzopireno (Cuoto e Herrera, 2006; Gianfreda et al., 1999).

Os compostos agem de forma concomitante, reduzem o composto e retiram oxigênio para a água. O sítio ativo é semelhante à da ascorbatoxidase, ceruloplasmina e oxidase da bilirrubina. Todos os fungos lacases são glicoproteínas (Mayer & Staples, 2002). O sítio catalítico da lacase é comum mesmo entre espécies diferentes, mas o resto da estrutura da enzima apresenta alta diversidade. Lacases fúngicas são principalmente indutíveis, extracelulares, monoméricas glicoproteínas com teores de carboidratos (Heinzkill et al, 1996) e são enzimas multinucleares (Gayazov Rodakiewicz-Nowak, 1996).

Geralmente o sítio ativo da lacase compreende quatro átomos de Cu em três grupos. Átomos de Cu diferem um do outro nos sinais de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) (Gianfreda et al., 1991).

Sendo membro de um grupo de enzimas chamados de proteínas de cobre azul ou oxidantes de cobres azuis. A capacidade das lacases de oxidar compostos fenólicos, assim como para reduzir o oxigênio molecular para a água levou a estudos intensivos para estas enzimas (Thurston, 1994).

3.1.9. SBP – *Soybean Peroxidase*

As enzimas peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são heme-proteínas, classificadas como doadores de H_2O_2 , sendo oxiredutase. Pertencem a uma classe de proteínas, que tem como função oxidar uma variedade de hidrogênio com o consumo de peróxido ou oxigênio molecular, assim como acceptor de elétrons em reações de oxidação. Estas enzimas podem ser encontradas em diversos organismos vivos, especialmente vegetais, mas também pode-se encontrar nas bactérias, fungos e vertebrados.

Pertence a uma grande família, sendo classificadas em três grupos com base na homologia de aminoácidos e a constituição de metais na sua estrutura (Ghaemmaghami et al, 2010).

- **Classe I:** são peroxidases intracelulares, incluindo Citocromo-C Peroxidase, Ascorbato Peroxidase e Catalase peroxidase;
- **Classe II:** são as enzimas secretoras de fungos, como Peroxidase de Manganês e Lignina Peroxidase;
- **Classe III:** são as plantas secretoras de peroxidase, como o tegumento da semente de soja – *Soybean Peroxidase* (SBP), *Rábano Peroxidase* (HRP), a Cevada (BP1), e o Amendoim (PNP).

No entanto, as plantas e os resíduos de alimentos vegetais não têm recebido muita atenção para este propósito, mas em alguns casos, estas enzimas oxidativas dos tecidos de plantas apresentam potencial para degradar eficazmente poluentes recalcitrantes.

Com isso, as peroxidases de plantas estão recebendo uma maior atenção devido à sua expansiva bio ativação, as suas propriedades e potenciais aplicações em diversas áreas como bioquímica, clínica, biotecnologia, testes bioanalíticos, biossensores, síntese de polímero etc. Vêm sendo observados avanços recentemente em síntese, sob condições controladas, verificando que são compostos altamente valiosos.

Soybean Peroxidase – SBP é uma enzima com extraordinária estabilidade e propriedade catalítica, pertencendo à classe III das peroxidases, que são a das plantas, sendo extraída da casca da semente da soja.

A utilização desta enzima pode ser encontrada na aplicação de tratamentos de águas residuas contendo compostos fenólicos, que estão presentes nas diversas indústrias. Além dos produtos químicos aromáticos, sua utilização é empregada para processos como alimentos para animais, resíduos industriais, marcador enzimático em diagnósticos médicos e na Imuno-histoquímica de células etc (J. LIU et al., 2005).

Devido as suas propriedades incomuns, nos recentes anos a *soybean peroxidase* tem sido foco de pesquisas, por ser uma fonte de fácil obtenção, já que o conteúdo da casca de soja é abundante. Abrange uma ampla gama de substratos, além de conter uma elevada estabilidade térmica e estabilidade dentro de uma grande faixa de pH. Algumas das novas aplicações sugeridas incluem a síntese de resina fenólica de alta qualidade, a degradação da lignina, e a disposição de resíduos (Kalsoom et al., 2013).

3.2. Cinética

3.2.1. Introdução

Uma reação química pode ser analisada através de sua cinética. Com a cinética pode-se prever o tempo em que a reação ocorrerá, ou seja, o estudo da cinética de um processo em relação a sua velocidade, seus fenômenos e como podem ser manipulados para um melhor controle dos produtos a serem adquiridos e seus rendimentos (Purich, 2010; Souza E., 2005; Borzani et al, 2001).

A velocidade de reação química depende de vários fatores, incluindo a concentração dos reagentes, o pH, a força iônica, propriedades de solventes, temperatura, e também a concentração de catalisadores, quando utilizado (Purich, 2010).

Para compreender a cinética de reações catalisadas por enzimas, é necessário uma compreensão simples sobre a cinética química, ou seja, um processo reacional que não seja catalisada por enzimas, devido à sua proximidade do equilíbrio (Cook, 2007).

Mas esta compreensão é um tanto quanto relutante, pois encontrou-se muita dificuldade nos primeiros estudos da cinética enzimática, com reações de longos períodos de tempo, e a tentativa de explicar as observações realizadas com termos de equações de velocidade integrados semelhantes aos comumente utilizados em cinética química. Logo em seguida, Michaelis-Menten mostraram de uma maneira mais simplificada, através das taxas iniciais de uma reação, analisando a fase de primeira ordem, fase esta que estabelece a velocidade inicial da reação enzimática, de um substrato em diversas concentrações pode-se estudar o comportamento de enzimas, mas não se aplica em todos os casos. Pois, evita-se a utilização de equações de velocidade integrados. Entretanto, realizar experimentos no estado estacionário, nem sempre é possível, devido a projeção de progresso, gráfico da formação de produto por período de tempo, não ser essencialmente linear durante um período prolongado, sendo a estimativa do declive inicial da curva, a velocidade inicial, subjetivo e passível de resultados tendenciosos, pode ser removido usando uma forma integrada da equação de velocidade (Cornish, 2004).

As enzimas participam no mecanismo como um catalisador convencional, ou seja, incidem em torno da velocidade em que a transformação acontece no início da degradação, quando valem as hipóteses de MM, onde as taxas são iguais, como demonstra a equação 3.5 abaixo (Borzani et al, 2001).

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} \quad (3.5)$$

3.2.2. Cinética enzimática

A cinética enzimática estuda a velocidade, atividade e seletividade dos produtos de formação, bem como os fatores que a influenciam, como pH, temperatura, concentrações de reagentes, enzimas, ativadores, inibidores, podendo também ser alvo de estudos para o controle, a otimização de processos e a projeção de equipamentos (reatores) mais adequados (Schmal, 2013; Borzani et al., 2001).

3.2.3. Análise dos dados cinéticos

Para a determinação de parâmetros através de dados experimentais, pode-se utilizar os métodos diferenciais e integrais. O método diferencial, que através de equações que contém as derivadas ou diferenciais de uma ou mais variáveis dependentes, em relação a uma ou mais variáveis independentes. E com o método integral, onde a partir da equação 3.17, a expressão é colocada de forma que graficamente têm-se uma reta, que através dos coeficientes pode-se determinar os dados cinéticos (Schmall, 2013).

$$(-r_S) = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad (3.17)$$

O método integral é um processo que adota-se uma cinética, ou seja, 1ª ordem, 2ª ordem etc. Depois integra-se a equação 3.5.

Normalmente as velocidades das reações são analisadas através do método da taxa inicial, que baseia-se na medição das velocidades próximos de $t=0$ (Purich, 2010). Outra análise dos dados cinéticos é o acompanhamento do consumo do substrato ou a formação de produto com curso de tempo, durante o desenvolvimento da reação a partir de seu início, demonstrando como a velocidade de consumo varia com o tempo, levando a uma descrição mais completa dos dados obtidos ao longo do tempo, projetando um segmento maior detalhando a curva de progresso da reação (Purich, 2010; Borzani et al., 2001).

3.2.3.1. Taxa inicial

O método da taxa inicial compreende na medição da velocidade inicial de reação, durante sua fase linear, sendo determinada pela sua inclinação ($\Delta[P]/\Delta t$) que decorre próximo a $t=0$. Para a medição dos dados o método de ensaio deve ser sensível suficientemente para a detecção de baixas concentrações de produto. Para a fase da taxa inicial reações que exibem fase de retardamento não podem ser analisadas, porque a inclinação não reflete a verdadeira velocidade inicial, como demonstra a Figura 3.4 (Purich, 2010).

Figura 3.4 – Curva de reação representativa na formação de produto.

Fonte: Purich, 2010.

Para determinar a velocidade inicial utiliza-se cerca de 3 a 10% da concentração do substrato no início da reação, no qual foi convertido em produto. Mas devido às diferentes condições de solução em diversas reações, pode-se alterar o intervalo de tempo durante o qual uma reação é catalisada por enzima, sendo observada apenas a cinética linear (Copeland, 2000).

3.2.3.2. Análise de curso de tempo

A curva de análise de tempo de curso representa a cinética da reação enzimática, ou seja, representa o quanto de substrato está sendo consumido e quanto produto está sendo formado na reação ao longo do tempo (Purich, 2010).

Mediante a reação enzimática com determinado substrato pode-se observar uma curva de progresso, onde a uma queda exponencial da taxa de consumo do substrato e um aumento de mesma ordem da produção de produto, como demonstra a Figura 3.5 abaixo (Marangoni, 2003; Copeland, 2000).

Figura 3.5 – Representação gráfica da análise de curso de tempo.

Fonte: Copeland, 2000.

Com as dificuldades de realizar ensaios para a verificação da cinética enzimática em longos períodos de tempo, buscou-se explicar as observações feitas em dados experimentais, inicialmente através de equações de velocidade integrados semelhantes as equações utilizadas em cinética química. Posteriormente, Michaelis-Menten mostrou que o comportamento das enzimas poderia ser estudado apenas por suas velocidades iniciais (Cornish, 2004).

Devido à complexidade para a dedução de parâmetros cinéticos através de curvas de curso de tempo, a utilização de equação integrada é bastante incomum, mesmo em tempos modernos. Este método de integrações provém da equação de Michaelis-Menten e foram introduzidas de forma imposta, ou seja, a aplicação destas equações está proposta para todas as

reações enzimáticas, ao invés de cada mecanismo ser tratado de uma forma específica (Cornish, 2013). Na aplicação do método de integração obtém-se a equação 3.6.

$$t = \frac{1}{V} \left[p + K_m \ln \left(\frac{a_0}{a_0 - p} \right) \right] \quad (3.6)$$

Até mesmo outros processos cinéticos de multi - estágios mais complexos também podem ser analisados por análise de curva de progresso. Outra análise é através das equações diferenciais, onde as equações de primeira ordem têm a forma $y' (x) = dy/dt = f (x, y)$, e as equações de ordem superior podem ser expressas por um sistema de equações (Purich, 2010).

3.2.3.3. Michaelis - Menten

Em 1913, L. Michaelis e M. L. Menten postularam a teoria da ação e cinética enzimática, ou seja, através de diferentes concentrações de substrato, são mensuradas as velocidades iniciais, que permitem verificar graficamente os valores dos parâmetros cinéticos e a precisão dos ensaios. Uma avaliação visual é possível, levando a uma equação que nos permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia em função da concentração do substrato (Lehninger et al., 2008; Cornish, 2004).

Esta simplificação no tratamento cinético de reações catalisadas por enzimas permitiu propor um modelo. Michaelis e Menten fizeram explicitamente ou implicitamente algumas hipóteses, como a taxa de v_0 inicial deve ser medida durante a fase inicial de reação, de modo que o nível de consumo de substrato deve ser pequeno, e o acúmulo de produto deve ser pouco ou nenhum ($d[S]/dt$ em $t=0$ versus $[S]$, ver fig. 3.5). Sob tais condições, não há possibilidade de inibição do produto, a concentração total de enzima permanece constante e é igual à soma das concentrações das formas livres e complexadas. A enzima interage rapidamente com substrato para atingir o equilíbrio. A enzima obedece a uma cinética de saturação, de tal modo que a taxa catalisada depende da concentração do complexo enzima-substrato, assim evitando qualquer necessidade de resolução de uma equação quadrática (Schmal, 2013; Purich, 2004).

Para o estudo da cinética tem-se sua representação esquemática do processo enzimático através do modelo abaixo (Schmal, 2013).

Em relação as taxas de consumo de substrato e acumulo do produto na reação, obtêm-se:

$$(-r_s) = k_1[E] \times [S] - k_2[ES^*] \quad (3.7)$$

$$r_p = k_3[ES^*] \quad (3.8)$$

Em relação ao complexo enzima-substrato tem-se igualmente:

$$r_{ES^*} = k_1[E] \times [S] - k_2[ES^*] - k_3[ES^*] = 0 \quad (3.9)$$

Mas, nem todas as enzimas são complexadas e recuperadas, além de que as enzimas livres são as que participam da reação inicial. Efetuando um balanço das enzimas, onde a soma das enzimas livre com as complexadas é equivalente as enzimas totais:

$$E_T = E + ES^* \quad (3.10)$$

Rearranjando as equações 3.7 e 3.9, pode-se determinar a concentração das enzimas complexadas:

$$[ES^*] = \frac{k_1[E_T][S]}{k_1[S] + k_2 + k_3} \quad (3.11)$$

Substituindo a equação 3.11 em 3.8, e considerando $(-r_s) = r_p$:

$$(-r_s) = \frac{k_1 k_3 [E_T][S]}{k_1[S] + k_2 + k_3} \quad (3.12)$$

Dividindo por k_1 , obtêm-se a constante de Michaelis-Menten:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3.13)$$

Taxa máxima quando as enzimas estão complexadas:

$$V_{m\acute{a}x} = k_3[E_T] \quad (3.14)$$

Onde,

$$k_3 = k_{cat} \quad (3.15)$$

Substituindo estes parâmetros na equação 3.12, obtém-se:

$$(-r_S) = \frac{k_{cat}[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad (3.16)$$

Ou,

$$(-r_S) = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad (3.17)$$

Sendo relacionado à velocidade inicial de consumo de substrato ($v_o = -r_S$), a velocidade máxima (V_{max}), a concentração inicial do substrato e a constante de Michaelis-Menten (K_M), então obtém-se a forma gráfica da equação de Michaelis-Menten, representada na figura 3.6.

Figura 3.6 – Representação esquemática da equação de Michaelis-Menten.

Fonte: Motta, 2011.

Esta saturação acontece à medida que é aumentada a concentração de substrato, aumentando também a quantidade de enzima presente sob a forma de complexo enzima-substrato (ES). Quando todos os centros ativos estão ocupados de substrato, atingindo a velocidades máxima ($V_{\max}$), ou seja, não existe enzima livre para ligar mais substrato e a concentração de complexo ES é igual à concentração de enzima. A Figura 3.5 apresenta uma curva não linear. De forma a facilitar a análise de dados, diversos processos de linearização foram propostos, e são apresentados a seguir (Lehninger et al., 2008).

3.2.3.4. Lineweaver - Burk

O rearranjo feito por Lineweaver e Burk (1934) é simplesmente a inversão dos dois lados da equação, por isso gera o gráfico dos duplos recíprocos (Cornish, 2004), onde:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max}[S]} \quad (3.18)$$

Separando-se os componentes do lado direito do numerador, obtém-se:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]} \quad (3.19)$$

Simplificando-a, obtém-se a equação de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3.20)$$

Esta equação é a representação gráfica dos duplos recíprocos, ou seja, a recíproca da velocidade inicial ($1/v_o$), versus a recíproca da concentração de substrato ($1/[S]$), que fornece uma reta com inclinação de K_m/V_{max} (Lehninger et al., 2008), onde sua forma é igual à todas as equações lineares, isto é, $y = ax + b$, onde a variável dependente $y = 1/v$, a inclinação $a = K_m / V_{max}$, e a variável independente $x = 1/[S]$ (Purich, 2010). Como representado na figura 3.7 abaixo.

Figura 3.7 - Representação esquemática da equação de Lineweaver-Burk.

Fonte: Motta, 2011.

Outra análise que pode ser realizada através deste método é a determinação dos parâmetros K_{cat} e K_A , que provem da equação 3.17 de Michaelis-Menten.

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3.21)$$

Onde,

$$\frac{1}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{1}{k_{cat}[E_T]} \quad (3.22)$$

$$\frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{1}{k_A[E_T]} \quad (3.23)$$

Substituindo 3.22 e 3.23 em 3.21, obtém-se:

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1}{k_A[E_T]} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat}[E_T]} \quad (3.24)$$

Simplificando:

$$\frac{[E_T]}{v_o} = \frac{1}{k_A} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad (3.25)$$

De qualquer maneira graficamente não tem alterações, apenas há um tratamento diferente para os dados à serem obtidos, na inclinação que obtém-se os valores de K_m/V_{max} , tem-se $1/k_A[E_T]$, quando a reta intercepta o eixo $1/v_o$ obtém-se $1/k_{cat}[E_T]$ e no eixo $1/[S]$, onde obtém-se $-1/K_m$, tem-se k_A/K_{cat} (Cornish, 2004).

Embora seja o método mais amplamente utilizado na cinética enzimática, o gráfico de Lineweaver-Burk sofre limitações estatísticas inerentes, devido a apresentar impressão distorcida do erro experimental, onde os dados com velocidades menores têm desproporcionalmente maior na dispersão, que esta distorção tende a aumentar convertido para valores $1/v$. Em contrapartida, os dados com velocidades maiores são estatisticamente mais significativos obtidos em concentrações de substrato mais elevadas. (Purich, 2010). Isto pode ser avaliado a partir das barras de erro mostradas na Figura 3.8, que são visivelmente assimétricas apesar de terem sido calculadas a partir da mesma gama simétrica de erros em " v " (Purich, 2010; Cornish, 2004).

Figura 3.8 – Representação gráfica da equação de Lineweaver-Burk, demonstrando desvios experimentais.

Fonte: Cornish, 2004.

Dowd e Riggs (1965) avaliaram a capacidade do duplo recíproco, identificando os dados mais pobres para suavizar sua influência, mas não a realidade da dispersão, o que foi responsável por uma popularidade extraordinária com bioquímicos (Cornish, 2004).

Em princípio, o problema com o método pode ser superado pela utilização de dados mais adequados, mas esta solução não é completamente satisfatória, devido à varredura de alguns dados para se obter uma linha de melhor ajuste, apenas para efeito visual (Cornish, 2004).

3.2.3.5. Hanes - Woolf

A partir das equações de Lineweaver-Burk, multiplica-se ambos os lados da equação 22 ou 23 por $[S]$, obtém-se as equações:

$$\frac{[S]}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot [S] \quad (3.26)$$

$$\frac{[E_T][S]}{v_o} = \frac{1}{k_A} + \frac{1}{k_{cat}} \cdot [S] \quad (3.27)$$

A forma gráfica mostra na ordenada $[S]/v$ e $[S]$ na abscissa. Também é um gráfico linear, com inclinação $1 / K_{cat} [Et]$ ($= 1 / V$) e coeficiente linear $1 / K_a [Et]$ ($= K_m / V$) sobre a $[S] / v$ eixo, e $-K_{cat} / K_A$ ($= -K_m$) no eixo $[S]$. Esta representação é chamada de gráfico de Hanes-Woolf, é ilustrado na Fig. 3.9. Através desta representação gráfica se pode observar dados mais homogêneos, como pode ser julgada a partir das barras de erro, fornecendo estatisticamente a estimação de dados mais confiáveis (Cornish, 2004).

Figura 3.9 – Representação gráfica da equação de Hanes-Woolf, demonstrando desvios experimentais.

Fonte: Cornish, 2004.

3.2.3.6. Eadie-Hofstee

A equação de Eadie-Hofstee é uma reorganização da equação 3.21 de Lineweaver-Burk, e ambas derivam da equação de Michaelis-Menten, que representam os dados da reação enzimática através de um gráfico linear, obtendo-se a equação 3.28 abaixo (Purich, 2010; Cornish, 2004).

$$v = V_{max} - K_m \cdot \frac{v}{[S]} \quad (3.28)$$

Esta representação gráfica (Fig. 3.9) é conhecida como gráfico de Eadie-Hofstee em reconhecimento aos seus autores. Apresentando bons resultados experimentais, proporcionando estimativas com mais significado estatístico para V_{max} e K_m do que os obtidos através de

Lineweaver-Burk, apesar da maioria dos bioquímicos preferirem usar este método, (Purich, 2010).

Figura 3.10 – Representação gráfica da equação de Eadie-Hofstee, demonstrando desvios experimentais.

Fonte: Cornish, 2004.

Com um valor de inclinação igual a $-K_m$, a linha resultante pode ser extrapolada em ambas as direções, obtendo-se um valor de intercepção de $V_{\max}$ no eixo v (eixo vertical) e um valor de intercepção de $V_{\max} / K_m$ no eixo $v/[S]$ (eixo horizontal).

Comparando os métodos, Eadie-Hofstee tem o caráter oposto do Lineweaver-Burk, que tende a uma melhor visualização do comportamento dos dados, como quaisquer desvios dos pontos da linha obtida, especialmente se há desvios sistemáticos (Dowd e Riggs, 1965). Sendo um excelente método para usar na detecção de desvios no comportamento de Michaelis-Menten (Cornish, 2004).

3.2.3.7. Gráfico linear direto

Em 1974, houve a introdução de um quarto método gráfico por Eisenthal e Cornish-Bowden. O método linear direto evita limitações estatísticas encontradas em outros procedimentos gráficos (Purich, 2010). A partir da equação de Eadie-Hofstee (eq. 3.28), como ponto de partida se obtém a equação 3.29, onde tem-se uma forma simplificada, reorganizada, com um planejamento diferente da equação de Michaelis-Menten, proposta por Eisenthal e Cornish-Bowden, para demonstrar a dependência de $V_{\max}$ em K_M (Cornish, 2004).

$$V_{max} = v + \frac{v}{[S]} \cdot K_M \quad (3.29)$$

Onde V_{max} e K_M são tratados como variáveis, $[S]$ e v como constantes, pois $[S]$ e v foram medidos experimentalmente. Esta equação define uma linha reta de inclinação $v / [S]$, interceptando V_{max} e K_M , nos eixos de V e $[S]$ respectivamente. Na equação 3.29, qualquer valor de K_M , pode-se definir o valor de V_{max} . Consequentemente, esta equação relaciona todos os pares de valores, analisando-as individualmente todas as linhas traçadas com os valores de K_M e V_{max} de com as condições experimentais (Cornish, 2004).

Graficamente, a concentração do substrato é marcada ao longo da abscissa, eixo horizontal para a esquerda da origem, sendo observada com sua velocidade inicial ao longo da ordenada, eixo vertical. Quando repetido para um certo número de pares de concentração de substrato e da velocidade inicial, à família de linhas resultantes convergem para o primeiro quadrante de um ponto com as coordenadas de K_M e V_{max} , como pode-se ver através da figura 3.11 abaixo. (Purich, 2010).

Figura 3.11 – Representação gráfica linear direta proposta por Eisenthal e Cornish-Bowden.

Fonte: Cornish, 2004.

Para a equação de Michaelis-Menten, existe três manipulações para a sua linearização, para o gráfico linear direto também há uma variação analítica. Pode-se observar que na figura 10 (Cornish-Bowden e Eisenthal, 1978), em que as intercepções são $[S] / v$ e $1 / v$ em vez de $-[S]$ e v podem ser preferíveis na prática, porque as linhas se cruzam em ângulos maiores e os pontos de intersecção são melhores definidos.

Figura 3.12 – Variação da forma gráfica linear direta.

Fonte: Cornish, 2004.

O gráfico linear direto possui algumas vantagens sobre os outros métodos gráficos descritos. A mais evidente é que, na sua forma original (Figura 3.12) não requer o cálculo de tudo. Isto permite que seja utilizado na bancada do laboratório, enquanto ocorre uma experiência, que dá uma ideia visual imediata dos valores dos parâmetros e susceptíveis de desenho necessário para defini-las com precisão. A vantagem mais importante, talvez seja que, o gráfico linear direto tem algumas propriedades estatísticas, que implicam sua condução a valores de parâmetros confiáveis. Por outro lado, não é bom para mostrar uma grande quantidade de dados no mesmo gráfico, devido a saturação de dados na área gráfica, ocasionando falhas nos dados. Esta característica torna-o mais adequado para a utilização em laboratório para as análises de dados experimentais e para a subsequente apresentação dos resultados (Cornish, 2004).

3.3. Microrreator

3.3.1. Introdução

A Engenharia química é um ramo da engenharia, que abrange todo o âmbito do processo industrial, tais como, projeto, otimização, simulação, planejamento, construção e operação de plantas, que é relacionado com a produção de compostos e produtos cuja fabricação requer sofisticadas transformações físicas e químicas da matéria. Também enfoca no design de novos materiais e tecnologias, sendo uma área de grande importância em pesquisa e desenvolvimento. Também engloba a área ambiental, uma vez que contribui para a concepção de processos ecológicos e para a descontaminação do ambiente (Bazzo e Pereira, 2006).

Todas essas vertentes da Engenharia Química também são compartilhadas com outras áreas do conhecimento, onde a interdisciplinaridade é importante para a evolução dos processos industriais, como a Engenharia de Micro Processos, que é proveniente da miniaturização da tecnologia de dispositivos, ou micro estruturados que combina tecnologia de microssistemas. Para reações químicas, a miniaturização vem sendo aplicada para o desenvolvimento de dispositivos mais eficazes, dimensões espaciais para aplicações específicas e a economia de energia, e, por isso, vem atraindo muito interesse (Maruyama et al., 2003).

Essa intensificação nos processos industriais, beneficia o desenvolvimento da miniaturização de equipamentos, onde os comprimentos característicos em sua escala atingem camadas limite. Onde as elevadas taxas de transporte podem ser usadas para muitas finalidades diferentes, tais como, reações rápidas, mistura, reações sensíveis à temperatura, temperatura de homogeneização, ou até mesmo precipitação de nano partículas (Kockmann, 2008).

Com os avanços tecnológicos a área de micro fabricados tem sido alimentado com novas oportunidades para pesquisas de micro reações e microanálise, fazendo parte de uma nova e promissora tecnologia, atuante em campos como a da química, biológica, farmacêutica, engenharia química e biotecnologia, tais como os reatores convencionais, mas com dimensões menores, com canais na escala micrométrica que são os, micro permutadores de calor, sistemas de análise química em miniatura e microrreatores (Lloret et al., 2013; Trachsel, 2008).

Essas reduções em tamanho e a integração de vários dispositivos de funções múltiplas, tem o potencial para formar microestruturas ou microssistemas com a mesma capacidade que um sistema macro convencional é capaz de exercer, e ainda de modo que é possível otimizar o processo. Sendo sistemas que atuam em faixas micrométricas em relação aos componentes de

reação e normalmente são integrados com sensores e atuadores. A fusão dessas tecnologias vem para produzir uma gama de novos dispositivos, e em relação a micro reação esses dispositivos estão sendo amplamente utilizados devido à alta taxa de transferência de massa e calor, estudos do mecanismo e cinética de reação, e acompanhamento do processo (Jensen, 2001).

As vantagens de se trabalhar em pequena escala e volumes reduzidos, micro ou nano-fluídica, para os reagentes utilizados são eficiência energética, maior rendimento e seletividade, maior velocidade de reação, segurança, flexibilidade e controle de processo mais intenso, além de um melhor controle de temperatura de reação, melhor transferência de calor e massa, (Ehrfeld et al, 2000; Jensen, 2001; Yoshida et al, 2005; Dudukovic, 2010; Lloret et al., 2013).

Embora a capacidade ou até mesmo o volume de um microrreator seja pequena, não se limita necessariamente para a produção de pequenas quantidades de produtos. Uma produção de maior quantidade pode ser configurada em uma produção de longo tempo, sendo capaz de produzir toneladas por ano, devido ao fluxo contínuo dos reagentes. Estas características tornam o microrreator adequado a utilização para a aplicação em reações catalíticas, tais como, na biotransformação de compostos, biossíntese e bioanálise. Em contrapartida, suas proporções, que são extremamente reduzidas em relação à escala macro, oferecem um sistema que permite uma investigação do processo em um curto espaço de tempo, sendo muito útil para o rastreamento de substratos, enzimas, condições de reação, bem como a determinação de parâmetros cinéticos. Sendo que, suas características podem influenciar a própria essência das reações químicas de diversas maneiras (Lloret et al., 2013).

3.3.2. Mistura

A mistura de substâncias para as reações químicas em sua maioria é obtida através da difusão molecular, mas em microrreatores o caminho para que a mistura seja através de difusão é curta, em contrapartida há um aumento na velocidade de mistura, atingindo resultado que podem se equiparar com reator de macro escala (Yoshida Jun-ichi, 2009).

Algumas vantagens dos micromisturadores em relação aos misturadores convencionais:

- Compacidade e baixo custo de capital;
- Baixo consumo de energia e outras despesas;
- Baixo desgaste e sem partes móveis, minimizando a manutenção;
- Fornece uma operação em sistema fechado;

- Tempo curto de mistura;
- Mistura bem definida, com alta regularidade estrutural;
- Facilita o processo analítico de reações rápidas;
- Manipulação precisa, devido à mistura de pequenos volumes.

Na mistura há dois meios que classificam os micromisturadores: ativos e passivos. A mistura ativa conta com a aplicação de partes móveis ou funções externas, tais como pressão, campo elétrico forçado, vibrações induzidas, membranas piezométricas, pequenos rotores. Já para os micromisturadores passivos ou dispositivos que dependem de mistura passiva, utilizam a energia do fluxo de alimentação, devido à sua configuração geométrica ou ação hidrostática do dispositivo, gerando esquemas de fluxo através de configurações especiais, onde se realiza uma reorganização de fluxo, afim de aumentar a interface entre a área de contato e os fluidos, aumentando o desempenho de mistura e resultando em uma mistura mais rápida e eficaz. (Hessel et al, 2005; Jani et al., 2011).

Para microrreatores e micromisturadores, efeitos de vorticidade ocorrem em escoamentos com baixo número de Reynolds, onde o desenvolvimento de vórtices é também dependente da geometria dos canais e que esse efeito pode ser utilizado para melhorar a qualidade de mistura (Engler et. al., 2004), que pode ser definido através da equação 3.30.

$$Re = \frac{d|u|}{\nu} \quad (3.30)$$

Onde, u é a velocidade de fluxo, d é a dimensão característica do canal e ν a viscosidade cinemática do fluido. Devido às características dos microcanais e a velocidade de fluxo imposta, a mistura apresenta baixo Re , predominando o processo difusivo. Outra análise de fluxo é através de Peclet, demonstrada na equação 3.31.

$$Pe = \frac{d|u|}{D_{mol}} \quad (3.31)$$

Onde, D_{mol} é a difusividade molecular. Para microcanais o Pe é aproximadamente, indicando que a mistura do fluxo de fluido também percola em processo difusivo, sendo proporcional ao comprimento de mistura para fluxo unidirecional laminar.

Mas devido à configuração dos microrreatores e micromisturadores, outros parâmetros controlam a mistura dentro dos canais ao longo do dispositivo no sentido transversal e longitudinal. O número de Dean, equação (3.32), é uma análise adimensional para a descrição do fluxo em um canal curvo, descrevendo a relação das forças centrífugas entre às forças viscosas, levando em consideração a geometria dos microcanais (Jani et al., 2011).

$$Dn = Re \sqrt{\frac{d_i}{d_c}} \quad (3.32)$$

Onde, d_i é o diâmetro interno e o d_c é o diâmetro da curvatura do microcanal. Para incluir o efeito helicoidal no número de Dean, têm-se de modificar a consideração ao diâmetro de curvatura, pode-se definir na equação 3.33.

$$d_c' = d_c \left(1 + \left(\frac{p}{\pi \cdot d_c} \right)^2 \right) \quad (3.33)$$

Onde, p é a distância entre duas curvaturas. O número de Dean modificado é calculado pela equação 3.34.

$$Dn' = Re \sqrt{\frac{d_i}{d_c'}} \quad (3.34)$$

Apresentando características iniciais de fluxo parabólico e laminar, até ser influenciado por forças centrífugas.

Este fenômeno pode ser encontrado em micromisturadores simples. Um exemplo é em forma de T estático, que mesmo para fluxo laminar apresenta linhas de correntes diferentes, como observa-se na figura 3.13 abaixo:

Figura 3.13 - Representação simulada dos três tipos de regime de fluxo.

Fonte: Kockmann et al., 2006

Em baixas velocidades, pode-se observar um regime de fluxo estratificado, em que as linhas de corrente de fluxo seguem o canal da parede quase sem indício de turbulência, onde o princípio de mistura é exclusivamente a difusão. Em velocidades médias, obtém-se um regime de fluxo de vórtice, sendo constituído dentro dos canais, mesmo com este comportamento o princípio de mistura é a difusão, mostrando a simetria axial no canal de mistura, mas entra em uma região onde a melhoria da qualidade de mistura não é essencialmente efetiva, devido à velocidade e o curto tempo de residência. Já no terceiro regime, com fluxos em altas velocidades, a simetria apresentada no regime anterior é quebrada, onde as linhas de corrente não se encontram apenas no meio do canal de mistura, mas se entrelaçam e chegando ao lado oposto da parede. Conduzindo a uma melhoria elevada da qualidade de mistura (Jani et al., 2011).

Para baixos números de Re , a qualidade de mistura é relativamente alta, devido à difusão e o fluxo mais lento. Já para Re maiores que 10, a qualidade de mistura aumenta devido ao vórtice induzido, onde há efeitos convectivos e o alargamento da interface entre os componentes (Kockmann et al., 2006).

3.3.3. Transferência de energia

Uma característica dos microrreatores é uma relação maior entre superfície-volume, em comparação a reatores convencionais, por isso a transferência de energia ocorre rapidamente (Yoshida Jun-ichi, 2009).

3.3.4. Transferência de massa

Uma das diversas características dos microrreatores é a grande taxa de transferência de massa. O aumento da taxa de transferência de massa em microrreatores, se deve à reorientação

e o estiramento das interfaces do fluido, pela imposição de restrições geométricas na configuração do microrreator (Adeosun e Lawal, 2005).

3.3.5. Tempo de residência

O tempo de residência de uma reação refere-se ao período de tempo que os elementos de volume permanecem no interior do reator. Em alguns casos é chamada de *função de distribuição da idade de saída*, ou seja, se considerarmos a “idade” de um átomo como o tempo que ele permaneceu no ambiente de reação, então irá se referir à distribuição de idade da corrente efluente. Sendo que em reatores um parâmetro utilizado é o tempo espacial ou tempo de residência médio, τ , que foi definido como sendo igual a V/Q (Fogler, 2009).

Podendo ser modificada, ajustando o comprimento dos microcanais e velocidade do fluxo dos componentes que serão introduzidos no microrreator. Esta característica operacional é extremamente útil no controle e otimização do processo reativo. (Yoshida Jun-ichi, 2009).

3.3.6. Aumento de escala

A ampliação de escala dos reatores, pode apresentar uma variedade de problemas, tais como a redução do rendimento e da seletividade. Para solucionar estas questões, necessita-se de um exame mais criterioso das condições de reação, que requer muito tempo e mão de obra.

Na utilização dos microrreatores, no entanto, o volume de produção pode ser aumentado através do aumento o tempo de operação e do número de reatores em escala, sem alterar o tamanho dos reatores. Assim, uma mudança para produção industrial é possível sem a alteração das condições de reação (Yoshida Jun-ichi, 2009).

3.3.7. Biorreatores

Os biorreatores podem ser chamados também de reatores bioquímicos, biológicos, no qual ocorre uma série de reações catalisadas por biocatalisadores, podendo ser enzimas ou células vivas, como microbianas, animais ou vegetais (Schmidell et al., 2001).

Uma das vantagens de se utilizar microrreatores é este equipamento requer pequenas quantidades de reagentes para realizar uma reação de ação catalítica, sendo muito importante quando se trata de enzimas como agente catalisador. Por tanto, a possibilidade de se obter

excelentes resultados com o mínimo de enzima é uma das razões para o aumento do interesse em biorreatores. De acordo com o esquema proposto de M. Miyazaki e H. Maeda, através das técnicas fundamentais na utilização de biorreatores, podem ser divididas em dois grupos principais: o primeiro que inclui os reatores de fluxo contínuo com enzimas em solução, e o segundo pertence aos sistemas que contêm enzimas imobilizadas dentro de um microrreator. Devido as características de construção, técnicas e métodos experimentais há uma grande diferença entre eles, por isso devem ser tratados separadamente (Laurenti e Vianna Junior, 2015).

Já a imobilização de enzimas apresenta vantagens na biocatálise, possibilitando melhorar o controle da reação, com a separação entre o catalisador, os reagentes e os produtos, evitando a contaminação dos produtos pela enzima, suprimindo as reações laterais indesejáveis, com a reutilização do catalisador, obtendo um maior desempenho, resultados mais consistentes e custos mais baixos em comparação com o anteriormente descrito. Além disso, a miniaturização oferece a oportunidade para melhorar o desempenho cinético de enzimas, tornando estes dispositivos, particularmente atrativas para aplicações analíticas e biotecnológicas (Matosevic et al., 2011). Todos estes fatores são cruciais para melhorar a eficiência do sistema e contribui para o desenvolvimento de um sistema ótimo, bem como melhorar a extensão da área de contato entre a enzima e reagentes. Apesar das diferenças entre os métodos, materiais e enzimas, os tipos mais comuns de biomicroreatores pode ser dividido em quatro categorias principais:

- a) Enzimas imobilizadas de superfície: enzimas são ligados à superfície pré-constituída de um microrreator (por exemplo, ativado pelos canais interiores de um capilar) e exposto ao fluxo de reagentes;
- b) A enzima ativada grânulos: uma quantidade apropriada de grânulos porosos, previamente funcionalizados com enzimas, são embalados em conjunto para encher a câmara de um microrreator;
- c) Enzima contendo monólitos: monólitos meso ou macroporosos são revestidos com uma camada resistente ou diretamente preparado em um microcanal e funcionalizado com enzimas; e

- d) As membranas: são enzimas imobilizadas sobre uma membrana de ultra filtração seletiva.

Em cada tipo de biomicroreator, enzimas estão imobilizados num suporte sólido por métodos tais como adsorção, imobilização covalente, ou aprisionamento (Asanomi et al., 2011; Wong et al., 2009). Alguns destes procedimentos são o resultado de métodos anteriormente utilizados em macro escala, enquanto outros têm sido desenvolvidos especificamente para microestruturas e levam em consideração os problemas específicos relacionados com o pequeno tamanho destes sistemas. No caso de enzimas imobilizadas-superfície, cada um dos materiais requer modificações oportunas, a fim de ligar uma proteína.

3.4. Equações Diferenciais Ordinárias

Uma equação diferencial ordinária (EDO) é uma equação que contém uma ou várias derivadas de uma função desconhecida (Kreyszig, 2006). Para resolver uma EDO, obtém-se uma solução geral, mas na prática, o melhor é encontrar a função específica que satisfaz uma determinada equação de acordo com o comportamento a ser analisado. Essas exigências são dados inseridos como condição inicial para a solução específica, assumindo valores iniciais no momento ($t=0$). Para equações de primeira ordem a condição inicial é demonstrada pela equação 3.35. Onde uma equação com um ou mais valores iniciais é chamado de problema de valor inicial (PVI) (Nagy, 2016).

$$\frac{dy}{dt} = f(y, t), \quad y(t_0) = y_0 \quad (3.35)$$

3.4.1. Série de Taylor

Dada uma função indefinidamente diferenciável em um certo ponto de seu domínio, a derivada é definida de qualquer ordem de f em $x=x_0$, $f^{(n)}(x_0)$, assim podemos escrever a série de Taylor demonstrado na equação 3.36 (Rosa, 2013).

$$f(x) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{f^{(n)}(x_0)}{n!} (x - x_0)^n \quad (3.36)$$

Se expandirmos a Série de Taylor pode ser representada por uma série de potências, com o raio de convergência. Assim,

$$f(x) = f(x_0) + f'(x_0)(x - x_0) + \frac{f''(x_0)}{2!}(x - x_0)^2 + \frac{f'''(x_0)}{3!}(x - x_0)^3 + \dots \quad (3.37)$$

$$R_{n+1} = \frac{f^{(n+1)}(x_0)}{(n+1)!} (\xi_i)^{n+1} \quad (3.38)$$

Com a aproximação da primeira derivada temos,

$$f(x) = f(x_0) + f'(x_0)(x - x_0) \quad (3.39)$$

Com a aproximação a derivada no ponto x_i pode-se atribuir $x_{i+1} \rightarrow x$ e $x_i \rightarrow x_0$, obtendo,

$$f(x_{i+1}) = f(x_i) + f'(x_i)(x_{i+1} - x_i) \quad (3.40)$$

3.4.2. Métodos Explícitos

Os métodos explícitos calculam o estado do sistema num tempo posterior ao estado atual do sistema, quando da nova estimativa da solução no ponto x_{i+1} , utilizam informações de x_i .

Método de Euler explícito

$$u_{i+1} = u_i + f'(u_i)(x_{i+1} - x_i) \quad (3.41)$$

$$u_{i+1} = u_i + h \cdot g(u_i) \quad (3.42)$$

Método de Runge-Kutta explícito

$$u_{i+1} = u_i + \sum_{j=1}^v w_j k_j \quad (3.43)$$

$$k_j = h \cdot f \left(x_i + c_j h, u_i + \sum_{l=1}^{j-1} a_{jl} k_l \right) \quad (3.44)$$

3.4.3. Métodos Implícitos

Enquanto os métodos implícitos encontram a solução resolvendo uma equação que envolve ambos estados atual e posterior do sistema.

Método de Euler implícito

$$u_{i+1} = u_i + h \cdot g(u_{i+1}) \quad (3.45)$$

Método de Runge-Kutta implícito

$$u_{i+1} = u_i + \sum_{j=1}^v w_j k_j \quad (3.46)$$

$$k_j = h \cdot f \left(x_i + c_j h, u_i + \sum_{l=1}^j a_{jl} k_l \right) \quad (3.47)$$

3.4.4. Rigidez

Rigidez é típico em um sistema que envolve mudanças dinâmicas "rápidas" combinado com mudanças mais "lentas". Em fatos, a taxa de produção e consumo de uma espécie está ligada a ordem de sua magnitude. Por conseguinte, para um pequeno tamanho de passo de tempo (ou comprimento de passo, dependendo do tipo de reator é utilizado) recolhido o método numérico utilizado para resolver o sistema, algumas equações podem variar em muito mais do que os outros e esta é a origem de problemas numéricos.

Rigorosamente, não há uma definição universalmente aceita de rigidez. Alguns autores examinam o comportamento de soluções de passo fixo, outras introduzir índices, tais como índice de rigidez, relacionada com os valores da própria matriz Jacobiana. Spijker (1996) afirma que "rigidez ocorre com o maior tamanho de passo para garantir a estabilidade numérica e é muito menor do que o maior passo para que o erro de discretização local seja suficientemente pequeno". Quando se resolve as equações diferenciais, existem componentes que variam muito mais rápido do que os outros, isto é, em casos para as espécies de radicais. Este critério é formalizado pelos requisitos assumindo que os valores λ da própria matriz Jacobiana são todos negativos.

MATLAB oferece várias funções concebidas para resolver problemas duros: ode15s, ode23s e ode23tb:

- Ode15s baseia-se nas fórmulas de diferenciação numérica (NDF). Ele pode, opcionalmente, utilizar os menos eficientes fórmulas de diferenciação para trás (BDFs)
- Ode23s baseia-se em uma fórmula Rosenbrock modificado de ordem 2.
- Ode23tb é uma fórmula de Runge-Kutta implícito com uma primeira fase que é um passo regra trapezoidal e uma segunda fase, que é um BDF de ordem 2.

4. Materiais e Métodos

São apresentados no presente tópico a unidade experimental, a unidade de análise e o método experimental empregado para a realização dos experimentos.

4.1. Unidade Experimental

No presente trabalho está sendo estudada a degradação de compostos clorados através de uma reação enzimática, em microrreatores, presente no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

A Figura 4.1 abaixo apresenta uma vista geral do equipamento.

Figura 4.1 – Microrreator – unidade piloto.

Esta unidade de micro processo é composta por subunidades, onde cada módulo é responsável por uma operação unitária, como mostrado na Figura 4.1. Os frascos são para o armazenamento de reagentes, mas também podem ser utilizados como vasos de pressão. Um sistema com duas bombas e micro seringas são usados para o controle de fluxo. Há uma unidade de controle de pressão. Também tem uma unidade de controle de temperatura, onde é acoplado o microrreator. Todos os módulos são da marca Syrris, e compõem o sistema Asia para química de fluxo.

Figura 4.2 – (a) Sistema de armazenamento de reagentes; (b) Sistema de controle fluxo; (c) Sistema de controle de temperatura; (d) Chip - Microrreator

O armazenamento dos reagentes do sistema Asia é composto por uma base de alumínio, parafusos de aço inoxidável e bandeja de polipropileno para 4 frascos de vidro com tampas de septo, com capacidade de 250 ml, podendo ser carregado através de uma cânula. Os frascos podem ser pressurizados com a injeção de gás inerte, até uma pressão de 10 bar. A saída é mantida a uma pressão de 1 bar. Isso permite um bom fluxo de entrada, minimiza a cavitação e a formação de bolhas de gás durante o bombeamento em altas vazões.

O sistema de controle de fluxo compõe-se de duas bombas de sucção contendo canais independentes e micro seringas que auxiliam no controle de fluxo para até 20 bar. O sistema é controlado por um painel frontal por torção e clique de um botão de controle.

Para o acoplamento do chip do microrreator, o sistema de controle de temperatura contém um adaptador para seu acoplamento. Onde o microrreator pode ser aquecido. O microchip pode ser encaixado no sistema de controle de aquecimento, que permite temperaturas de até 250 °C.

O microrreator (Chip) utilizado é de vidro, permitindo a visualização do fluxo reativo; seu volume é de 250 µl, permite uma faixa de temperatura de trabalho entre – 20 °C à + 250°C e uma pressão de até 30 bar.

Figura 4.3 – Base do microrreator.

A base do microrreator (Chip Header), mostrado na Figura 4.3, permite o alinhamento e a conexão das entradas e da saída através de tubos, sendo fixado ao microrreator por dois parafusos de cabeça estriada, e sua vedação é efetuada com anéis de borracha (oring), entre os tubos de entrada e saída com a superfície de vidro.

Para o processo enzimático catalítico de degradação foi utilizado o reagente 2,4,6 – Triclorofenol ($C_6H_3Cl_3O$), com pureza de 98% da Aldrich.

Figura 4.4 – Enzimas: (a) Lacase; (b) Soybean Peroxidase - SBP.

No processo de reação no microrreator, foram usadas duas enzimas para a catalise do reagente, a Lacase e a *Soybean Peroxidase*, Figura 4.4, em solução aquosa.

Nas reações que foram efetuadas com *Soybean Peroxidase*, foi adicionado Peróxido de Hidrogênio.

Para a inibição ou paralisação do processo reacional, utilizou-se o reagente Ácido Clorídrico P.A. com 37% de pureza, da Synth.

Ao final do processo reacional, foram usados recipientes de vidro de 2 ml com tampa de rosca para a coleta do produto final na saída do microrreator, que foi analisada off-line em cromatógrafo líquido ultra-rápido UFLC (Shimadzu LC-20AD Prominence).

O sistema de UFLC operou com coluna LICHROSPHER 100 RP-18 5 μ m 125 X 4 mm, com vazão de 0,6 ml/min, o solvente da fase móvel utilizada foi o Acetonitrila (CH₃CN), da marca Tedia, com concentração de 60%, temperatura de 40 °C, tempo estimado de análise de 10 min e comprimento de onda usado para detecção de 220 nm.

O Ácido Acético Glacial (CH₃COOH), da marca Tedia, é adicionado a água desmineralizada, sendo adicionados 2% do volume de água, com o propósito de evitar a formação de fungos, para a melhor confiabilidade das análises.

4.2. Método experimental

Foram utilizadas uma solução de 2,4,6 – Triclorofenol (Aldrich) 5,0 mmol em 0,2 mol de Buffer com pH 5,4; as enzimas, Lacase 0,2; 0,1 e 0,05 mg/ml em solução tampão e *Soybean Peroxidase* (SBP) nas concentrações de 0,002; 0,001 e 0,0005 mg/ml em solução tampão com a adição de H₂O₂.

O método empregado para o preparo das soluções:

1 – Preparação da solução tampão de fosfato:

- a. Diluiu-se fosfato de potássio em água desmineralizada para a concentração de 0,2 mol em um balão volumétrico de 250 ml;
- b. Adicionou-se NaOH para o acerto do pH, onde o Buffer deve apresentar um pH de 5,4 e após volumar o nível do balão volumétrico.

2 – Preparação da Lacase:

- a. Diluiu-se a Lacase em solução tampão até a concentração de 0,2; 0,1 e 0,05 mg/ml em 50 ml de solução.

3 – Preparação da solução de 2,4,6 – Triclorofenol:

- a. Diluiu-se 2,4,6 - Triclorofenol em solução tampão até a concentração de 0,005 mol/l, em volume de 25 ml.

4 – Preparação da solução de *Soybean Peroxidase*:

- a. Diluiu-se *Soybean Peroxidase* em solução tampão até as concentrações de 0,002; 0,001 e 0,0005 mg/ml, em volume de 50 ml cada;
- b. Adicionou-se Peróxido de Hidrogênio (0,6 mM).

5 – Preparação da solução inibidora, responsável pela paralisação da reação enzimática, de Ácido Clorídrico com concentração de 0,1M.

4.2.1. Curva de calibração

Construção da curva de calibração do 2,4,6 – Triclorofenol:

- Foram utilizados recipientes com 900 μL de HCl, com a variação na concentração de TCP em 100 μL ;
- Posteriormente analisada no sistema de HPLC, para a obtenção da curva de calibração;
- O sistema de HPLC operou com vazão de 0,6 ml/min, concentração de Acetonitrila de 60%, temperatura de 40 °C, tempo estimado de análise de 10 min., e comprimento de onda de 220 nm.

Obtendo os seguintes resultados:

Tabela 4.1 - Concentração, porcentagem e a área, de TCP analisado no HPLC.

Conc. de TCP (mM)	% de TCP em 100 μL	Área
0,05	100	1722941
0,04	80	1362357
0,03	60	1090945
0,02	40	702841
0,01	20	335367
0,0025	5	81964
0	0	0

E construindo a curva chegamos a figura a seguir.

Figura 4.5 – Curva de calibração do 2,4,6 – Triclorofenol.

Após a preparação das soluções, os ensaios foram realizados, adicionando uma solução de enzima (Lacase ou SBP) em um frasco de alimentação e em outro a solução do 2,4,6 – Triclorofenol (TCP). Sendo ajustado o fluxo ($\mu\text{l}/\text{min}$) das soluções, para que se iniciem os ensaios no microrreator. Ressaltando que para a coleta do produto final da reação catalítica enzimática de oxidação-redução do TCP, utilizou-se frascos de 2 ml. Sendo que inicialmente antes da coleta foi inserido 900 μl do inibidor (HCl), para parar a reação e obter dados confiáveis, e posteriormente coletando 100 μl do produto final na saída do microrreator. E os mesmos também foram analisados no sistema de UFLC, depois se verificou os resultados e com a curva de calibração transcrevendo as concentrações obtidas para as plotagens gráficas.

4.3. Análise dos dados

O modelo resolvido aqui é um conjunto de equações diferenciais, resultante dos balanços de massa para substrato (S), enzima (E), produto (P) e complexo ativado (E.S), a partir do item 3.2.3.3.

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1 [E][S] + k_2 [E.S] \quad (5.1)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1 [E][S] + k_2 [E.S] + k_3 [E.S] \quad (5.2)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 [E.S] \quad (5.3)$$

$$\frac{d[E.S]}{dt} = k_1 [E][S] - k_2 [E.S] - k_3 [E.S] \quad (5.4)$$

Onde $t=0$, $[S]=[S]_0$, $[E]=[E]_0$, $[P]=[P]_0$, $[R]=[R]_0$ e $[E.S]=0$.

O sistema de EDOs foi resolvido usando um método BDF (back diferencial formulae) com ordem variável, pacote DASSL (Petzold *et al.*, 1989). Uma estimativa inicial foi feita para as constantes cinéticas k_1 , k_2 e k_3 usando a ferramenta ESTIMA. A sequência de etapas é similar à seguida em modelos lineares, ou seja: i- resgata-se o conjunto de dados experimentais (x^e, y^e); ii- calcula-se a estimativa do modelo y^c a partir das mesmas entradas x^e ; iii- calcula-se a diferença entre o valor estimado e o experimental, ou seja, o erro; iv- calcula-se a função de verossimilhança S , que pondera os erros associados às entradas x e às saídas y ; v- encontram-se os parâmetros do modelo ao minimizar o cômputo total do erro estimado por S . A função de probabilidade S é:

$$S = \sum_{i=1}^{n_{exp}} \left\{ \sum_{j=1}^{n_{ent}} \frac{(x_j^e - x_j^c)^2}{(\sigma_{x_j}^2)_i} + \sum_{j=1}^{n_{sai}} \frac{(y_j^e - y_j^c)^2}{(\sigma_{y_j}^2)_i} \right\} \quad (5.5)$$

Onde $x_j^e, x_j^c, y_j^e, y_j^c$ são os j -ésimos elementos dos vetores $\underline{x}^e, \underline{x}^c, \underline{y}^e, \underline{y}^c$ respectivamente, e $(\sigma_{x_j}^2)_i$ e $(\sigma_{y_j}^2)_i$ são as variâncias associadas a $\underline{x}^e$ e $\underline{y}^e$ no i -ésimo experimento.

5. Resultados e Discussões

São apresentados os resultados da degradação de 2,4,6 – Triclorofenol utilizando as enzimas Lacase e *Soybean Peroxidase* no microrreator de 250 μl . Obtiveram-se dados da reação de oxidação-redução do substrato através da catálise enzimática, possibilitando a construção dos gráficos da concentração de produto por tempo de residência para três concentrações de enzimas. Cada ponto foi obtido em triplicata para um tempo de residência, ou seja, $t_R = 250 \mu\text{l}/\text{vazão}$. Ao se impor uma vazão no equipamento, tem-se um tempo de residência que equivale a um ponto no estudo da cinética.

5.1. Resultados experimentais

5.1.1. Experimento preliminar

O primeiro resultado a ser apresentado foi a comparação entre dados obtidos em reator batelada e o microrreator para Lacase e concentração de 0,1 mg/ml, Figura 5.1. É possível observar diferenças significativas. A literatura indica que o microrreator trabalha de forma mais homogênea, em curtos tempos de residência, devido ao tempo e forma de coleta do produto final, minimizando possíveis erros experimentais, e também auxiliando no aumento da eficiência no processo de degradação do substrato.

Figura 5.1 - Ensaios com Lacase com concentração de 0,1 mg/ml, comparativo entre os ensaios realizados no microrreator e em reator batelada.

5.1.2. Degradação com *Soybean Peroxidase*

Os resultados que seguem são as curvas de degradação do 2,4,6 – Triclorofenol com a utilização de *Soybean Peroxidase*, Figuras 6.2 a 6.6. Foram realizados ensaios utilizando três concentrações diferentes das enzimas para a degradação de 2,4,6 – Triclorofenol: 0,0005; 0,001 e 0,002 mg/ml. Todas as reações foram realizadas no microrreator, mostrado na Figura 18.

Analisando as concentrações de 0,002; 0,001 e 0,0005 de *Soybean Peroxidase*, pode-se observar a atuação da degradação enzimática através do gráfico comparativo, como demonstrado na Figura 5.2. Pode-se observar que com o aumento do tempo de residência a reação tende a um limite de degradação. Contudo, existem poucos pontos no início da reação que possibilite uma clara observação da cinética, principalmente na taxa inicial.

Figura 5.2 – Comparativo entre os ensaios de degradação com *Soybean Peroxidase* para três concentrações

Novos ensaios com *Soybean Peroxidase* foram realizados para verificar a repetibilidade dos experimentos. Os dados foram comparados com os primeiros ensaios, mostrado nas Figuras 5.3 a 5.5. E a comparação entre os novos ensaios na Figura 5.6.

Figura 5.3 – Comparativo entre os ensaios com *Soybean Peroxidase*, em concentração de 0,0005.

Figura 5.4 – Comparativo entre os ensaios com *Soybean Peroxidase*, em concentração de 0,001.

Figura 5.5 – Comparativo entre os ensaios com *Soybean Peroxidase*, em concentração de 0,002.

Figura 5.6 – Comparativo entre os novos ensaios com *Soybean Peroxidase* para três concentrações

Pode-se observar, que através de novos ensaios, mesmo com o aumento de pontos analisados ou intervalo de tempo sendo reduzido pela metade, confirma-se a cinética da reação, garantindo através do microrreator a reprodutibilidade, nas concentrações de 0,002; 0,001 e 0,0005 mg/ml de *Soybean Peroxidase*, e o método que foi aplicado para a obtenção dos dados experimentais.

5.1.3. Degradação com Lacase

Os resultados que seguem são as curvas de degradação do 2,4,6 – Triclorofenol com a utilização de Lacase, Figuras 5.7 a 5.10. Realizou-se ensaios utilizando três concentrações diferentes das enzimas para a degradação de 2,4,6 – Triclorofenol: 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ ml. Todas as reações foram realizadas no microrreator, mostrado na Figura 5.7.

A partir dos gráficos 5.7 a 5.10, é possível afirmar que ocorre a degradação de 2,4,6 – Triclorofenol. A velocidade de degradação é alta para todas as concentrações. Estas caem rapidamente até 60 segundos e depois os valores são praticamente constantes, indicando que a degradação terminou.

Figura 5.7 - Comparativo entre os ensaios de degradação com Lacase, em concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 mg/ml.

Analisando as concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 de Lacase, pode-se observar os dados cinéticos através da atuação da enzima nos vários tempos de residência, onde os dados apresentam a degradação de 2,4,6 – Triclorofenol. Contudo, em certos tempos de residência há saltos nas concentrações apresentadas, sendo característico nas três concentrações, como pode ser verificado no gráfico 5.7.

Novos ensaios com Lacase na concentração de 0,2 mg/ml foram realizados para verificar a reprodutibilidade dos dados experimentais. Houve a adição de um ponto com o tempo de residência de 15 segundos, para melhor análise da taxa inicial desta reação, figura 5.10.

Figura 5.8 - Ensaio com Lacase com concentração de 0,05 mg/ml.

Figura 5.9 - Ensaio com Lacase com concentração de 0,1 mg/ml.

Figura 5.10 - Ensaio com Lacase com concentração de 0,2 mg/ml.

Os primeiros ensaios com Lacase na concentração de 0,2 mg/ml foram realizados com os mesmos tempos de residências das demais concentrações, porém o primeiro ponto com 30 segundos de residência no microrreator já apresenta uma grande degradação de 2,4,6 – Triclorofenol. Com o acréscimo do ponto em 15 segundos, fica claro o comportamento da taxa inicial, facilitando a análise de dados. Com a análise do curso de tempo de cada reação enzimática, pode-se através da taxa inicial obter a velocidade inicial das concentrações de Lacase inseridas no microrreator, mostrando graficamente a velocidade em função das concentrações de enzima, como na Figura 5.12.

5.2. Análise dos dados

5.2.1. Velocidade inicial

Com a análise do curso de tempo de cada reação enzimática, pode-se através da taxa inicial obter a velocidade inicial das reações enzimáticas com *Soybean Peroxidase* e Lacase inseridas no microrreator, mostrando graficamente a velocidade inicial em função das concentrações de enzima utilizada, como nas Figuras 5.11 e 5.12.

Figura 5.11 – Gráfico da velocidade inicial em função da concentração de enzima utilizada.

Figura 5.12 - Gráfico da velocidade inicial em função da concentração de enzima utilizada.

5.2.2. Solução das EDOs

O sistema de EDOs foi resolvido com o pacote DASSL. Depois, todos os dados experimentais foram utilizados para se fazer uma estimação das constantes cinéticas k_1 , k_2 e k_3 , demonstrados na Figuras 5.13 a 5.15.

Figura 5.13 - Comparação dos dados experimentais (pontos) e a solução do modelo (linhas) para $E_0=0,2$ mg/ml e $S_0=4,936$ mg/ml.

As simulações representam as tendências principais dos dados experimentais. Contudo, as Figuras (a) substrato versus tempo e (b) produto versus tempo, com $k_1=0,45$ ml/mg s; $k_2=1,01$ 1/s e $k_3=1,16$ 1/s, apresentam uma resposta típica de mínimos quadrados, colocando parte dos dados acima da curva e parte dos dados abaixo. A velocidade inicial foi melhor representada pelos parâmetros que geraram as figuras (c) substrato versus tempo e (d) produto versus tempo, com $k_1=0,97$ ml/mg s; $k_2=35,23$ 1/s e $k_3=16,94$ 1/s. Portanto, é possível afirmar que o modelo não representou o conjunto de dados experimentais.

Fig. 5.14 - Comparação dos dados experimentais (pontos) e a solução do modelo (linhas) para $E_0=0,1$ mg/ml e $S_0=4,936$ mg/ml.

Fig. 5.15 - Comparação dos dados experimentais (pontos) e a solução do modelo (linhas) para $E_0=0,05$ mg/ml e $S_0=4,936$ mg/ml.

6. Conclusões

O método empregado na degradação de 2,4,6 – Triclorofenol em microrreator, com a utilização de enzimas para sua catálise é eficiente, permitindo através de seu método detectar o baixo consumo de substrato para a determinação da taxa inicial, em curto tempo de residência. Para uma análise mais criteriosa é possível coletar amostras da reação com o tempo de residência na ordem de segundos.

Verificando os ensaios preliminares efetuados com Lacase, o gráfico comparativo indica claramente a diferença entre os reatores utilizados nas mesmas condições de coleta. Para o tempo de residência de 10 minutos, o reator batelada degradou cerca de 53 % de TCP, em contrapartida, o microrreator obteve a mesma porcentagem de degradação em 1 minuto e meio, tendo resultados superiores ao reator de batelada, em relação à diminuição do tempo de residência e a porcentagem de degradação. O microrreator também apresentou dados mais homogêneos do que os apresentados utilizando o reator batelada.

Posteriormente foram os ensaios para a análise da cinética com a utilização de Lacase. Analisando as concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 de Lacase, pode-se observar a degradação de 2,4,6 – Triclorofenol ao longo do tempo, onde apresentou alguns picos de não conformidade característicos nas concentrações analisadas, mas com a velocidade inicial da reação sendo proporcionalmente crescente com a concentração de enzima utilizada. Na utilização desta enzima há uma maior atividade na fase inicial de reação, ficando praticamente estável a degradação de TCP ao longo do tempo.

Com a utilização de *Soybean Peroxidase* – SBP, observa-se que em um curto tempo de residência com as concentrações de 0,002; 0,001 e 0,0005 mg/ml apresentam uma degradação acima de 70% do substrato utilizado, e com o aumento do tempo de residência aproximam-se de um limite de degradação. Para as concentrações de 0,001 e 0,0005 mg/ml devido serem próximas, com o aumento do tempo de residências os dados se tornam praticamente equivalentes, ou seja, dependendo do tempo de residência pode-se utilizar uma concentração menor de *Soybean Peroxidase* para se obter a mesma degradação do substrato.

Ao efetuar a reprodutibilidade dos ensaios, confirmou-se a boa atuação do método empregado na obtenção dos dados e cinética da reação na análise de curso de tempo, sendo que em cada tempo de residência houve a retirada em triplicata, e nas análises das taxas iniciais de cada ensaio permitindo plotar a velocidade inicial de reação em função da concentração de enzima utilizada no meio reacional.

Perante os ensaios realizados com Lacase e *Soybean Peroxidase*, o microrreator é também um equipamento eficaz na repetitividade e na reprodutibilidade dos dados obtidos em diferentes concentrações.

Com os dados experimentais obtidos no microrreator estimou-se com o sistema de EDOs as constantes cinéticas k_1 , k_2 e k_3 , onde apresentam uma resposta típica de mínimos quadrados, e a outra resposta que a velocidade inicial foi melhor representada pelos parâmetros, podendo afirmar que o modelo não representou satisfatoriamente o conjunto de dados experimentais.

7. Referências

- Adeosun, J.T.; Lawal, A.** Mass transfer enhancement in microchannel reactors by reorientation of fluid interfaces and stretching, *Sensors and actuators B: Chemical*, V. 110: 101-111, 2005.
- Asanomi Y., Yamaguchi H., Miyazaki M., Maeda H.** Enzyme-immobilized microfluidic process reactors, *Molecules*, 16, 6041-6059, 2011.
- Bazzo W. A., Pereira L. T. V.** Introdução à engenharia: conceitos, ferramentas e comportamentos. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2006, 270 p.
- Borzani W., Schmidell W., Lima U. A., Aquarone E.** *Biotecnologia Industrial: Fundamentos – volume I.* São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 2001, 254 p.
- Brenan, K. E., Campbell S. L., Petzold L. R.** *Numerical Solution of Initial-Value Problems in Differential-Algebraic Equations*, Elsevier, 1989.
- Chandra R., Singh R.** Decolourisation and detoxification of rayon grade pulp paper mill effluent by mixed bacterial culture isolated from pulp paper mill effluent polluted site. *Biochem Eng Journal*, 61:49–58, 2012.
- Cherry J. R., Fidantsef A. L.** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Biotechnology*, 14:438–443, 2003.
- Cook P. F., Cleland W. W.** *Enzyme – Kinetics and mechanism.* New York, Garland Science Publishing, 2007, 404 p.
- Copeland R. A.** *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis – 2^a edition.* New York, Wiley-VCH, Inc, 2000.
- Cornish-Bowden A.** *Fundamentals of Enzyme Kinetics – 3^a edition.* London, Published by Portland Press Ltd, 2004, 422 p.
- Cornish-Bowden A.** The origins of enzyme kinetics – Review. *FEBS Letters* 587: 2725 – 2730, 2013.
- Dudukovic, M.P.** *Chem. Eng. Sci.*, 65: 3–11, 2010.
- Ehrfeld, W., Hessel, V. and Löwe, H.** *Microreactors: New technology for modern chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- Engler M., Kockmann N., Kiefer T., Woias P.** Numerical and experimental investigations on liquid mixing in static micromixers, *Chemical Engineering Journal*, V.101: 315-322, 2004.
- Fogler, H. S.** *Elementos de engenharia das reações químicas.* Rio de Janeiro, LTC, 4^a ed., 2009, 853 p.

Goodwine B. Engineering Differential Equations: Theory and Applications. New York: Springer, 2011, 741 p.

Hereijgers J., Desmet G., Breugelmans T., De Malsche W. Strategies to integrate porous layers in microfluidic devices, *Microelectron. Eng.*, 132: 1-13, 2015.

Hessel V., Löwe H., Müller A., Kolb G. Chemical Micro Process Engineering – Processing and Plants, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

Jani, J. M., Wesling, M., Lammertink, R. G. H. Geometrical influence on mixing in helical porous membrane microcontactors: *Journal of Membrane Science*, 378: 351–358, 2011.

Jensen, K. F. *Chemical Engineering Science* 56, 293-303, 2001.

Jensen, K. F. Microreaction engineering - is small better?, *Chemical Engineering Science* 56(2): 293–303, 2001

Kalsoom U., Ashraf S. S., Mohammed A. M., Muhammad A. R. and Bhatti H. N. Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase. *Chemistry Central Journal*, 7:93, 2013.

Kieling Dirlei D. ENZIMAS - Aspectos Gerais, Universidade Federal de Santa Catarina - Centro Tecnológico - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos Disciplina de Engenharia Bioquímica, 2002.

Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C. Industrial enzyme applications. *Biotechnology*, 13: 345–351, 2002

Kockmann N. Transport Phenomena in Micro Process Engineering – Heat and Mass Transfer. Germany, Hannover: Spring-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, 365p.

Kockmann N., Kiefer T., Engler M., Woias P. Convective mixing and chemical reactions in microchannels with high flow rates. *Sensors and Actuators B*, 117: 495–508, 2006.

Kreyszig E. Advanced Engineering Mathematics – 9th Edition. Singapore: Jonh Wiley & Sons, 2006, 1093p.

Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. Principles of Biochemistry – Fifth Edition. New York: Freeman, 2008, 1158p.

Laurenti E., Vianna Jr. A. S. Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives – Review. *Biocatalysis* 1: 148–165, 2016.

Lerou, J. J., Harold, M. P., Ryley, J., Ashmead, J., O'Brien, T. C., Johnson, M., Perrotto, J., Blaisdell, C. T., Rensi, T. A. and Nyquist, J. Microfabricated minichemical systems: Technical feasibility, *DECHEMA Monographs* 132: 51–69, 1995.

Lloret L, Eibes G., Moreira M. T., Feijoo G., Lema J. M., Miyazaki M. Improving the catalytic performance of laccase using a novel continuous-flow microreactor: *Chemical Eng. Journal*, 223: 497–506, 2013.

Matosevic S., Szita N., Baganz F. Fundamentals and applications of immobilized microfluidic enzymatic reactors, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 325-334, 2011.

Maruyama T., Uchida J., Ohkawa T., Futami T., Katayama K., Nishizawa K., Sotowa K., Kubota F., Kamiya N., Goto M. Enzymatic degradation of p-chlorophenol in a two-phase flow microchannel system. *Lab Chip*, 3(4): 308–12, 2003.

Motta Valter T. Bioquímica. Rio de Janeiro: Medbook, 2011, 488p.

Nagy G. Ordinary differential equations - Mathematics Department, Michigan State University, East Lansing, MI, 48824, 2016.

Pinto, J.C. Planejamento de Experimentos para Tratamento de dados e Controle de Qualidade, SOLEQ, Salvador, Bahia, 1993.

Purich D. L. Enzyme Kinetics: Catalysis & Control. London, Academic Press, 2010, 892 p.

Radzicka A., Wolfenden R. A proficient enzyme, *Science*, 6, 1995, 267p.

Rauf M. A., Ashraf S. S. Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chem Eng Journal*, 209:520–530, 2012.

Roberge, D.M, Ducry, L., Bieler, N., Cretton, P., Zimmermann, B. *Chem. Eng. Technol.*, 28, no3, p. 318-323, 2005.

Rosa C. F. Serie de Taylor e Aplicações, Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Departamento de Matemática, 2013.

Santos, T.J., Pinto, J.C. Taking Variable Correlation into Consideration during Parameter Estimation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 15, 1, 1-15, 1998.

Schmall M. Cinética e Reatores: teoria e exercícios – 2^a ed. Rio de Janeiro, Editora Synergia: COPPE/UFRJ: FAPERJ, 2013, 678 p.

Schmidell W., Lima U. A., Aquarone E., Borzani W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica – volume II. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 2001, 541 p.

Souza E. Fundamentos de termodinâmica e cinética química. Belo Horizonte, Editora UFMG, 2005, 343 p.

Tisma M., Zelic B., Vasic-Racki D., Znidarsic-Plazl P., Plazl I. Modelling of laccase-catalyzed l-DOPA oxidation in a microreactor. *Chemical Engineering Journal* 149: 383–388, 2009

Trachsel F. Dissertation: Design of a microreactor for reactions using supercritical fluids as the reaction solvent. ETH Zurich. No. 17681, 2008.

Whitaker, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences. New York: Marcel Dekker Inc., 1972, 636p.

Wong L. S., Khan F., Micklefield J. Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications, *Chem. Rev.*, 109: 4025-4053, 2009.

Yoshida, J., Nagaki, A., Iwasaki, T., & Suga, S. *Chem. Eng. Technol.*, 28(3): 259, 2005.

Yoshida Jun-ichi Organic Electrochemistry, Microreactors, and Their Synergy. The Electrochemical Society *Interface*, 2009.