UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Hidrólise Contínua de Sacarose em um Reator Enzimático com Membrana

Adriana Célia Lucarini

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lucarini, Adriana Célia
L932h Hidrólise contínua de sacarose em um reator enzimático
com membrana / Adriana Célia Lucarini. -- São Paulo, 2003.
212p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Júnior, Adalberto

1. Biotecnologia 2. Enzimologia industrial 3. Bioreator :
Biotecnologia I. T. II. Pessoa Júnior, Adalberto, orientador.

620.8 CDD

Adriana Célia Lucarini

Hidrólise Contínua de Sacarose em um
Reator Enzimático com Membrana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2003.

*Aos meus pais, Graciana e Bruno, e ao
meu marido, Edson, pelo amor e
dedicação incondicional. Por sempre me
apoiarem no caminho que escolhi e
valorizarem quem eu sou.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. pela orientação, amizade e confiança depositada em meu trabalho. Gostaria de demonstrar com estas palavras minha grande admiração pelo “PROFESSOR” Adalberto, que merece este título antes de qualquer outro, pois em todos os dias de nossa convivência foi um mestre e amigo em todas as horas.

Ao Prof. Tit. Michele Vitolo, com quem tive o prazer e a honra de aprender durante todos estes anos. Minha profunda admiração e respeito pelo seu apoio, conhecimento e amizade.

À reitoria do Centro Universitário da FEI e em particular, ao Departamento de Engenharia Química, por incentivar o aperfeiçoamento constante de seus professores e apoiar o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Elena Taqueda pela amizade e pelo importante auxílio com os planejamentos experimentais.

Aos professores e amigos Prof. Lyrio Sartorio, Dra. Rivana B.F. Marino e Dr. Milton Caetano Ferreroni pelo incentivo e constante interesse na evolução desta tese.

Ao meu irmão Bruno pela amizade e colaboração, principalmente nas horas que mais necessitei.

Às amigas Regiane e Leda pelo apoio e amizade.

À todos os meus ex-alunos de Iniciação Científica e eternos amigos que neste últimos anos contribuíram para a evolução desta tese.

À toda a equipe técnica do Centro dos Laboratórios Químicos da FEI.

Ao Márcio, amigo de todas as horas, agradeço pela sua criatividade, competência e amizade.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos pelo carinho e incentivo.

À FAPESP pelo financiamento do projeto ao qual este trabalho está vinculado e à Fundação Educacional Inaciana pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

Acima de tudo a Deus, proporcionando a mim força e perseverança ao longo destes anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Biocatálise	3
2.2. Biorreatores	3
2.2.1. Otimização de um Bioprocesso	7
2.3. Reatores Enzimáticos com Membrana.....	9
2.3.1. Reatores com Membrana Biocatalítica	10
2.3.2. Vantagens e Desvantagens do Uso de Reatores Enzimáticos com Membrana.....	12
2.3.3. Classificação dos Reatores com Membrana	18
2.3.3.1. Força Motriz	18
2.3.3.2. Estrutura da Membrana	18
2.3.3.3. Geometria da Membrana	23
2.3.3.4. Direção do Fluxo	25
2.3.4. Aplicações de Reatores Enzimáticos com Membrana	28
2.4. Invertase	37
2.5. Frutose	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais.....	45
3.1.1. Enzima.....	45
3.1.1.1. Invertase.....	45
3.1.2. Substrato.....	46
3.1.2.1. Sacarose.....	46

3.1.3. Soluções Tampão.....	47
3.1.4. Reativo de DNS.....	47
3.1.5. Membranas.....	48
3.2. Métodos.....	49
3.2.1. Determinação da Atividade da Invertase.....	49
3.2.2. Reator Enzimático com Membrana.....	51
3.2.2.1. Biorreator REM 01.....	51
3.2.2.1.1. Montagem e Operação do Biorreator.....	54
3.2.2.1.2. Detalhes de Operação do Biorreator.....	56
3.2.2.1.3. Especificações do Biorreator.....	57
3.2.2.1.4. Metodologia para Coleta de Amostras.....	58
3.2.3. Determinações Analíticas.....	60
3.2.3.1. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores pelo método do DNS.....	60
3.2.3.2. Determinação de Glicose (Método Enzimático).....	61
3.3. Metodologia de Análise dos Resultados.....	64
3.3.1. Cálculo dos Parâmetros Termodinâmicos.....	64
3.3.2. Análise dos Resultados Obtidos no Biorreator.....	66
3.3.2.1. Cálculo da Concentração de Frutose Formada.....	66
3.3.2.2. Cálculo da Concentração de Sacarose Consumida.....	67
3.3.2.3. Cálculo do Grau de Conversão da Reação de Hidrólise da Sacarose.....	67
3.3.2.4. Cálculo da Velocidade de Reação ou Produtividade.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1. Caracterização da Invertase.....	69
4.1.1. Determinação da Velocidade de Reação da Invertase em Função da Concentração da Enzima	69
4.1.2. Cinética da Invertase	71
4.1.3. Influência do pH na Velocidade de Reação da Invertase	78
4.1.4. Influência da Temperatura na Velocidade de Reação da Invertase	81
4.1.4.1. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos da Invertase	86
4.2. Simulação Matemática em Computador de um Reator Enzimático CSTR	93
4.2.1. Estimativa da Influência da Taxa de Diluição (D) e da Concentração de Substrato na Alimentação (So) no Grau de Conversão da Sacarose (X)	96
4.2.2. Simulação do Comportamento do Reator e Validação Experimental das Estimativas	102

4.2.3. Complementos dos Estudos de Simulação	107
4.3. Biorreator Enzimático: Uso da Invertase	111
4.3.1. Experimentos Iniciais	111
4.3.2. Experimentos com Variação da Concentração de Sacarose	129
4.3.3. Experimento com Variação da Temperatura	140
4.3.4. Otimização das Condições de Operação do Reator Enzimático com Membrana com Invertase	143
4.3.4.1. Planejamento Experimental I	143
4.3.4.2. Planejamento Experimental II	166
4.3.4.3. Otimização e Validação dos Modelos Estatísticos.....	182
4.3.4.4. Operação do Reator Enzimático com Açúcar Cristal	195
 5. CONCLUSÕES.....	 199
 ANEXO.....	 203
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 207
 APÊNDICE.....	 I

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.2.1	Tipos de reatores enzimáticos (BOMMARIUS, 1993; WANG <i>et al.</i> , 1979).	6
Figura 2.2.2	Características importantes no projeto de um biorreator genérico.	8
Figura 2.3.1	Queda do fluxo permeado com o tempo em processos de separação com membranas. Polarização de Concentração e <i>Fouling</i> (NOBREGA <i>et al.</i> , 2003).	16
Figura 2.3.2	Membranas de ultrafiltração: fotos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de algumas membranas poliméricas (NOBREGA <i>et al.</i> , 2003).	20
Figura 2.3.3	Tipos diferentes de módulos de membranas: membranas planas montadas em (a) módulos placas e quadros, (b) módulos espirais, (c) membranas cilíndricas tipo capilar montadas em módulos tubo e casco (NOBREGA <i>et al.</i> , 2003; GIORNO; DRIOLI, 2000).	23
Figura 2.3.4	Configurações de reatores com membrana: (a) filtração tradicional (<i>dead-end filtration</i>), (b) filtração tangencial (<i>cross-flow filtration</i>) (BOMMARIUS, 1993).	25
Figura 2.3.5	(a) Reatores com Membrana de Contato Direto, (b) Reatores com Membrana de Difusão, (c) Reatores com Membrana Multifásicos. •, Enzima; S ₁ e S ₂ , substratos e P ₁ e P ₂ , produtos (PRAZERES; CABRAL, 1994).	27
Figura 2.4.1	Hidrólise da sacarose pela ação da invertase.	37
Figura 3.2.1	Fluxograma da metodologia para a determinação da atividade enzimática da invertase.	50
Figura 3.2.2	Célula de Ultrafiltração agitada AMICON® adaptada como reator enzimático com membranas. (A) Esquema da célula; (B) Foto da célula em operação.	51
Figura 3.2.3	Reator enzimático com membrana imerso em banho de temperatura controlada (vista lateral).	52
Figura 3.2.4	Esquema experimental montado em laboratório para execução do experimento.	53
Figura 3.2.5	Foto da montagem experimental utilizada para os ensaios com a invertase no biorreator.	53
Figura 3.2.6	Montagem da célula de ultrafiltração com lista de partes do equipamento.	54
Figura 3.2.7	Detalhamento do tubo de entrada da tampa superior.	54
Figura 3.2.8	Esquema da válvula de pressurização da célula de ultrafiltração AMICON.	55

Figura 3.2.9	Detalhe da coleta de amostra na saída do biorreator.	59
Figura 3.2.10	Fluxograma com Metodologia para determinação de Açúcares Redutores pelo método do DNS.	60
Figura 3.2.11	Curva-padrão de glicose para a dosagem de Açúcares Redutores (AR) pelo método do DNS.	61
Figura 3.2.12	Reações envolvidas na determinação de glicose pelo método enzimático.	62
Figura 3.2.13	Exemplo de curva de calibração do reagente para a dosagem da glicose pelo método enzimático.	63
Figura 3.3.1	Estequiometria da reação de hidrólise da sacarose pela ação da invertase.	66
Figura 4.1.1	Velocidade de Reação da Invertase em função da concentração de suspensão enzimática ([S]=100 mM, pH=4,6 e T=37°C). O trecho linear está apresentado em vermelho.	71
Figura 4.1.2	Distribuição de frequências em diagramas de pontos para os valores de K_M (74±30 mM).	75
Figura 4.1.3	Distribuição de frequências em diagramas de pontos para os valores de $v_{\max}$ ($0,96 \pm 0,31 \left(\frac{mg \text{ AR}}{ml \cdot min} \right)$).	75
Figura 4.1.4	Cinética de Michaelis-Menten da Invertase Sigma®. Dados experimentais (valores médios), limites inferior (LI) e superior (LS) de confiança.	77
Figura 4.1.5	Velocidade enzimática em função da concentração de sacarose ([E]=40µg/mL, pH=4,6 e T=37°C). Dados dos ensaios V e VI que utilizaram concentrações de sacarose até 400 mM.	78
Figura 4.1.6	Curva de variação da velocidade de reação em função da variação do pH para a enzima invertase.	79
Figura 4.1.7	Velocidade de reação da invertase em função da temperatura para os dados de tempo de reação de 10 minutos (todos os ensaios).	83
Figura 4.1.8	Velocidade de reação da invertase em função da temperatura para os dados de tempo de reação de 10, 15 e 30 minutos (todos os ensaios).	83
Figura 4.1.9	Velocidade de reação da invertase para diferentes temperaturas em função do tempo. (A) Ensaio I; (B) Ensaio II.	85
Figura 4.1.10	Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da invertase. Dados do Ensaio I, onde foi utilizado para o cálculo as velocidades referentes às temperaturas 25, 37, 45, 55 e 60 °C.	86
Figura 4.1.11	Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da invertase. Dados do Ensaio II, onde foi utilizado para o cálculo as velocidades referentes às temperaturas 1, 35, 45 e 60 °C.	87

Figura 4.1.12	Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da invertase. Dados do Ensaio I, onde foi utilizado para o cálculo as velocidades referentes às temperaturas 25, 37, 45, 55, 60 e 65 °C.	87
Figura 4.1.13	Velocidade de reação da invertase em função do tempo para cada temperatura estudada no Ensaio I e suas respectivas equações de reta e coeficientes angulares. Consideraram-se todos os valores de velocidade para a estimativa da tendência linear, com exceção do ensaio a 25 °C que considerou apenas as velocidades do intervalo de tempo de 20 a 60 minutos. (A) ensaio a 25°C; (B) ensaio a 37°C; (C) ensaio a 45°C; (D) ensaio a 55°C; (E) ensaio a 60°C e (F) ensaio a 70°C.	90
Figura 4.1.14	Velocidade de reação da invertase em função do tempo para cada temperatura estudada no Ensaio II e suas respectivas equações de reta e coeficientes angulares. Consideraram-se todos os valores de velocidade para a estimativa da tendência linear. (A) ensaio a 35°C; (B) ensaio a 45°C e (C) ensaio a 60°C.	91
Figura 4.1.15	Gráficos de Arrhenius para determinação da energia de desativação térmica da invertase (E_d). Dados dos ensaios I e II (para a linearização utilizaram-se os valores de $\ln v$ obtidos para as temperaturas 25 °C, 35 °C, 37 °C, 45 °C, 55 °C, 60 °C e 70 °C).	92
Figura 4.2.1	Esquema de um reator contínuo tipo CSTR.	93
Figura 4.2.2	Representação Esquemática em Diagrama de Blocos da Rotina de Integração numérica feita no Simulink.	95
Figura 4.2.3	Influência da concentração de sacarose na alimentação do reator (S_0) no grau de conversão, para diferentes valores de taxa de diluição (D).	98
Figura 4.2.4	Simulação da influência da taxa de diluição (D) no grau de conversão.	99
Figura 4.2.5	Perfil da produção de frutose em função da concentração de substrato na alimentação (S_0) para diferentes valores de taxa de diluição (D) e considerando estado estacionário.	100
Figura 4.2.6	Tempo para que o reator atinja regime permanente (RP) em função da concentração de substrato na alimentação (S_0) para diferentes valores de taxa de diluição (D).	100
Figura 4.2.7	Curvas de concentração de substrato na saída do reator (S) em função do tempo, obtidas no software MatLab para as simulações deste item.	103
Figura 4.2.8	Comparação dos valores simulados e obtidos experimentalmente da concentração de substrato (S) na saída do reator. Os valores experimentais correspondem aos dados do ensaio I02 que foi realizado nas mesmas condições da simulação.	105
Figura 4.2.9	Curvas de concentração de substrato na saída do reator (S) em função do tempo obtidas no software MatLab para as simulações deste item.	108

Figura 4.2.10	Comparação dos graus de conversão obtidos pela simulação e com valores experimentais para duas concentrações de enzima no reator. (A) concentração de enzima de 500 µg/mL (valores experimentais do ensaio 104). (B) concentração de enzima de 1000 µg/mL (valores experimentais do ensaio 109). A barra de erros representa o intervalo obtido pelo desvio padrão para o grau de conversão experimental.	110
Figura 4.3.1	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 101</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=500$ µg/mL; $Q=1,0$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 77,5\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,78$ mmol/h.mg).	113
Figura 4.3.2	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 102</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=40$ µg/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 36,3\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=1,85$ mmol/h.mg).	114
Figura 4.3.3	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 103</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=250$ µg/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 84,7\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,81$ mmol/h.mg).	115
Figura 4.3.4	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 104</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=500$ µg/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 86,7\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,42$ mmol/h.mg).	116
Figura 4.3.5	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 105</i> ($[S]=1000$ mM; $[I]=1000$ µg/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 69,4\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,33$ mmol/h.mg).	117
Figura 4.3.6	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 106</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ µg/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 82,4\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,20$ mmol/h.mg).	118
Figura 4.3.7	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 107</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ µg/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 90,0\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,12$ mmol/h.mg).	119

Figura 4.3.8	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 109</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 91,0\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,21$ mmol/h.mg).	120
Figura 4.3.9	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio Batelada</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=500$ $\mu\text{g/mL}$). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão máxima ($X_{\text{médio}} = 100\%$).	121
Figura 4.3.10	Grau de Conversão X em função do tempo para os ensaio 102, 103, 104, 109 e batelada.	123
Figura 4.3.11	Influência da concentração de invertase no grau de conversão médio da sacarose ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{Sacarose}]=500$ mM e $Q_{\text{média}}=0,4$ mL/min).	125
Figura 4.3.12	Influência da concentração de invertase na velocidade de reação média expressa por unidade de volume de reação processado ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{Sacarose}]=500$ mM e $Q_{\text{média}}=0,4$ mL/min).	125
Figura 4.3.13	Influência da concentração de sacarose no grau de conversão ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{invertase}]=1000$ mM e $Q_{\text{média}}=0,4$ mL/min).	126
Figura 4.3.14	Influência da vazão de alimentação no grau de conversão da sacarose ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{Sacarose}]=500$ mM).	126
Figura 4.3.15	Influência da vazão de alimentação na velocidade de reação média expressa por unidade de volume de reação processado ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{Sacarose}]=500$ mM).	127
Figura 4.3.16	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio 110</i> ($[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min; pH=4,6; $100 \leq [S] \leq 500$ mM). Na Figura A a linha cheia representa a conversão média. Na Figura B a linha cheia representa o logaritmo da velocidade média de reação.	131
Figura 4.3.17	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo dos <i>Ensaio 112 e 113</i> ($[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min; pH=4,6; $100 \leq [S] \leq 1500$ mM). Na Figura A a linha cheia representa a conversão média. Na Figura B a linha cheia representa o logaritmo da velocidade média de reação.	132
Figura 4.3.18	Variação do Grau de Conversão em função da concentração de substrato alimentado no reator e comparação dos dados experimentais com a estimativa feita por simulação matemática.	135
Figura 4.3.19	Taxa de reação (r) em função da concentração de sacarose. (A) com os dados de concentração de sacarose na alimentação do reator $\square S_o$; (B) com os dados de concentração de sacarose na saída do reator $\square S_{\text{saída}}$.	137
Figura 4.3.20	Taxa de reação (r) em função da concentração de sacarose. (A) com os dados de concentração de sacarose na alimentação do reator $\square S_o$; (B) com os dados de concentração de sacarose na saída do reator $\square S_{\text{saída}}$.	138

Figura 4.3.21	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio I14</i> ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ μ g/mL; $Q=0,4$ mL/min; $T=55^{\circ}\text{C}$). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 109,8\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,27$ mmol/h.mg).	141
Figura 4.3.22	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI01</i> ($\text{pH} = 3,5$; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 90,0\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,22$ mmol/h.mg).	146
Figura 4.3.23	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI02</i> ($\text{pH} = 3,5$; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,6$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 79,1\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,73$ mmol/h.mg).	147
Figura 4.3.24	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI03</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 82,0\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,23$ mmol/h.mg).	148
Figura 4.3.25	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI04</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,6$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 81,1\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,76$ mmol/h.mg).	149
Figura 4.3.26	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI05</i> ($\text{pH} = 3,5$; $T = 55^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 94,7\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,22$ mmol/h.mg).	150
Figura 4.3.27	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI06</i> ($\text{pH} = 3,5$; $T = 55^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,6$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 85,2\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,80$ mmol/h.mg).	151
Figura 4.3.28	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI07</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 55^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 91,5\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,24$ mmol/h.mg).	152
Figura 4.3.29	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI08</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 55^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,6$ mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 93,7\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,86$ mmol/h.mg).	153

Figura 4.3.30	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI09</i> ($\text{pH} = 4,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 95,9\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,53\text{ mmol/h.mg}$).	154
Figura 4.3.31	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI10</i> ($\text{pH} = 4,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 95,2\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,59\text{ mmol/h.mg}$).	155
Figura 4.3.32	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI11</i> ($\text{pH} = 4,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 89,6\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,56\text{ mmol/h.mg}$).	156
Figura 4.3.33	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI12</i> ($\text{pH} = 4,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 97,6\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,57\text{ mmol/h.mg}$).	157
Figura 4.3.34	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI13</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 98,0\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,25\text{ mmol/h.mg}$).	168
Figura 4.3.35	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI14</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,6\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 88,4\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,81\text{ mmol/h.mg}$).	169
Figura 4.3.36	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI15</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 71,8\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,40\text{ mmol/h.mg}$).	170
Figura 4.3.37	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI16</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 96,2\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,58\text{ mmol/h.mg}$).	171
Figura 4.3.38	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI17</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 89,5\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,51\text{ mmol/h.mg}$).	172

Figura 4.3.39	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio PI18</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 90,3\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,51\text{ mmol/h.mg}$).	173
Figura 4.3.40	Superfície de Resposta obtida para a análise estatística da variável resposta X no REM com invertase. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na tabela 4.3.20.	180
Figura 4.3.41	Superfície de Resposta obtida para a análise estatística da variável resposta r no REM com invertase. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na tabela 4.3.20.	181
Figura 4.3.42	Gráfico de rampas para a solução 3 da otimização 1 (Tabela 4.3.28).	184
Figura 4.3.43	Gráfico de rampas para a solução 1 da otimização 2 (Tabela 4.3.30).	186
Figura 4.3.44	Gráfico de rampas para a solução 1 da otimização 3 (Tabela 4.3.32).	188
Figura 4.3.45	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio VI01</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 96,8\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,58\text{ mmol/h.mg}$).	191
Figura 4.3.46	Comparação entre o grau de conversão predito e experimental.	193
Figura 4.3.47	Comparação entre a velocidade de reação predita e experimental.	193
Figura 4.3.48	Queda no grau de conversão médio ao longo do tempo.	194
Figura 4.3.49	Queda na velocidade de reação média ao longo do tempo.	194
Figura 4.3.50	Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do <i>Ensaio VI02</i> ($\text{pH} = 5,5$; $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 1,0\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 93,9\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,58\text{ mmol/h.mg}$).	196

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.3.1	Comparação dos reatores com membrana e reatores com biocatalisador imobilizado (BOMMARIUS, 1993).	12
Tabela 2.3.2	Classificação de membranas e tipos de separação.	22
Tabela 2.3.3	Quadro resumo de características dos reatores com membrana (PRAZERES; CABRAL, 1994).	24
Tabela 2.3.4	Exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor agro-alimentício (GIORNO; DRIOLI, 2000).	31
Tabela 2.3.5	Exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor farmacêutico e biomédico (GIORNO; DRIOLI, 2000).	34
Tabela 2.4.1	Valores das constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$ para a invertase solúvel.	40
Tabela 2.5.1	Características típicas do xarope de frutose (CRUEGER; CRUEGER, 1984).	42
Tabela 2.5.2	Composição típica de carboidratos dos xaropes de frutose (HFCS) (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 a).	43
Tabela 2.5.3	Composição típica de adoçantes comerciais (PEPPLER; REED, 1987).	44
Tabela 3.1.1	Composição do reativo de DNS em porcentagem em peso.	48
Tabela 3.2.1	Especificações da célula de ultrafiltração Amicon® Modelo 8050.	58
Tabela 3.2.2	Dados da curva-padrão de glicose.	61
Tabela 3.2.3	Preparo do reativo de trabalho.	62
Tabela 3.2.4	Esquema de preparação das soluções de glicose para a confecção da curva de calibração.	63
Tabela 4.1.1	Resultados de velocidade de reação da Invertase (v) em função de diferentes concentrações da enzima (6 repetições e valor médio).	70
Tabela 4.1.2	Valores das constantes cinéticas K_M e $v_{máx}$ encontrados na literatura para a invertase solúvel.	72
Tabela 4.1.3	Equação de Michaelis-Menten e quatro equações de linearização derivadas (BAILEY; OLLIS, 1987).	73
Tabela 4.1.4	Médias das velocidades de reação (v) em diferentes concentrações de sacarose para os experimentos de cinética da invertase (pH=4,6 e T=37°C). Os onze conjuntos de experimentos estão representados pelos algarismos romanos I a XI.	74
Tabela 4.1.5	Constantes cinéticas calculadas para cada conjunto de experimentos (I a XI) pela linearização de Lineweaver-Burk (regressão linear das curvas $1/v$ em função de $1/S$, com as respectivas correlações de cada linearização).	74

Tabela 4.1.6	Análise estatística com os dados experimentais de velocidade referentes aos ensaios: I, II, III, VII, VIII, IX e X e XI.	76
Tabela 4.1.7	Equações provenientes da linearização por Lineweaver-Burk dos valores médios, limite inferior e limite superior de velocidades apresentadas na tabela 4.1.6.	76
Tabela 4.1.8	Velocidade de reação para a enzima invertase em diferentes valores de pH.	79
Tabela 4.1.9	Velocidades de reação da Invertase (v) em diferentes tempos e temperaturas.	82
Tabela 4.1.10	Cálculos das energias de ativação e valor médio.	88
Tabela 4.1.11	Entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG) calculados para a invertase.	89
Tabela 4.1.12	Valor da energia de desativação térmica (E_d) para a enzima invertase.	92
Tabela 4.2.1	Vazão (Q), taxa de Diluição (D) e respectivos tempos de residência (τ) simulados.	97
Tabela 4.2.2	Valores de grau de conversão (X) obtidos pela simulação com taxa de diluição (D) variando de 0,008 a 0,12 min ⁻¹ e diferentes concentrações de substrato na alimentação (S_0).	98
Tabela 4.2.3	Valores experimentais dos parâmetros cinéticos determinados para a invertase.	102
Tabela 4.2.4	Comparação dos valores obtidos de Grau de Conversão (X), tempo para regime permanente (t_{RP}) e concentração de frutose (g/L) obtidos pela simulação e experimentalmente ($D=0,008$ min ⁻¹ e $S_0=500$ mM).	105
Tabela 4.2.5	Comparação dos graus de conversão (X) para os valores simulados e experimentais.	109
Tabela 4.2.6	Comparação dos valores experimentais e simulados de tempo necessário para atingir regime permanente (t_{RP}), considerando para todos as mesmas condições experimentais $S_0=500$ mM, $D=0,008$ min ⁻¹ , $t=37^\circ\text{C}$ e $\text{pH}=4,6$ e os parâmetros para a simulação $K_M=71$ mM e $K_{cat}=0,0694 \left(\frac{\text{mmol SACAROSE consumida}}{\mu\text{g}_{enzima} \cdot \text{min}} \right)$.	109
Tabela 4.3.1	Condições Experimentais fixas para os ensaios I01 a I09.	111
Tabela 4.3.2	Condições Experimentais para o ensaio em processo descontínuo.	111
Tabela 4.3.3	Descrição das condições testadas dos ensaios I01 a I09 (para todos estes ensaios o pH foi mantido em 4,6 e a temperatura em 37°C).	112
Tabela 4.3.4	Quadro resumo dos ensaios I01 a I09.	124
Tabela 4.3.5	Condições Experimentais fixas para os ensaios I10, I12 e I13.	129
Tabela 4.3.6	Condições empregadas nos ensaios I10, I12 e I13.	130

Tabela 4.3.7.1	Quadro resumo dos ensaios I10 a I13.	133
Tabela 4.3.7.2	Valores simulados e obtidos experimentalmente de grau de conversão (X) e concentração de substrato residual (S) em função da concentração de substrato na entrada do reator (S_0).	134
Tabela 4.3.8	Quadro resumo dos resultados de r e X dos ensaios I10, I12 e I13.	136
Tabela 4.3.9	Quadro resumo dos valores obtidos para os parâmetros cinéticos.	138
Tabela 4.3.10	Condições Experimentais do ensaio I14.	140
Tabela 4.3.11	Comparação dos resultados obtidos para ensaios realizados em duas diferentes temperaturas.	142
Tabela 4.3.12	Condições experimentais dos ensaios PI01 a PI12.	144
Tabela 4.3.13	Níveis de variação das variáveis estudadas no Planejamento Experimental I.	144
Tabela 4.3.14	Matriz do Planejamento Experimental I, utilizado para o estudo das variáveis: vazão (Q), pH e temperatura, na conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.	144
Tabela 4.3.15	Resultados do Planejamento Experimental I. Todos os ensaios foram realizados com [Sacarose]=500 mM e [invertase] = 1000 μ g/mL.	158
Tabela 4.3.16	Resultados ($X_{\text{médio}}$; $r_{\text{médio}}$) obtidos no Planejamento Experimental I, no estudo da conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.	159
Tabela 4.3.17	Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta grau de conversão da sacarose em frutose (X) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental I.	162
Tabela 4.3.18	Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta taxa ou velocidade de reação de hidrólise da sacarose (r) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental I.	163
Tabela 4.3.19	Condições experimentais fixas para os ensaios PI13 a PI18.	166
Tabela 4.3.20	Níveis de variação das variáveis estudadas no Planejamento Experimental II para o REM com invertase.	166
Tabela 4.3.21	Matriz do Planejamento Experimental II utilizado para o estudo das variáveis: vazão (Q) e temperatura, na conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.	167
Tabela 4.3.22	Resultados do Planejamento Experimental II. Todos os ensaios foram realizados com [Sacarose]=500 mM e [invertase]=1000 μ g/mL.	174
Tabela 4.3.23	Resultados ($X_{\text{médio}}$; $r_{\text{médio}}$) obtidos no Planejamento Experimental II, no estudo da conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.	175

Tabela 4.3.24	Matriz de planejamento e resultados ($X_{\text{médio}}$; $r_{\text{médio}}$) do projeto composto de 2ª ordem resultante da composição dos planejamentos experimentais I e II para o REM com invertase.	176
Tabela 4.3.25	Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta grau de conversão da sacarose em frutose (X) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental composto de 2ª ordem.	177
Tabela 4.3.26	Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta taxa de reação de hidrólise da sacarose (r) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental composto de 2ª ordem.	178
Tabela 4.3.27	Considerações principais para a Otimização 1. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.	183
Tabela 4.3.28	Soluções para a Otimização 1. Os valores apresentados para A e B são codificados, e os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.	183
Tabela 4.3.29	Considerações principais para a Otimização 2. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.	185
Tabela 4.3.30	Soluções para a Otimização 2. Os valores apresentados para A e B são codificados, e os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.	185
Tabela 4.3.31	Considerações principais para a Otimização 3. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.	187
Tabela 4.3.32	Soluções para a Otimização 3. Os valores apresentados para A e B são codificados, e os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.	187
Tabela 4.3.33	Quadro resumo das otimizações.	188
Tabela 4.3.34	Condições experimentais do ensaio VI01.	190
Tabela 4.3.35	Comparação dos valores de X e r preditos pelos modelos estatísticos para o REM com Invertase.	192
Tabela 4.3.36	Condições experimentais do ensaio VI02.	195
Tabela 4.3.37	Comparação dos resultados obtidos para ensaios VI02 e PI16.	197

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSTR.....	<i>Continuous stirred tank reactor</i>
REM.....	Reator enzimático com membrana
STR.....	<i>Stirred tank reactor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta\mu$	Gradiente de potencial químico
ΔC	Gradiente de concentração
ΔE	Gradiente de potencial elétrico
ΔG	Energia Livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔP	Gradiente de pressão
Δp_i	Gradiente de pressão parcial
ΔS	Entropia
[E].....	Concentração de enzima
[invertase].....	Concentração de invertase [$\mu\text{g/mL}$]
[S].....	Concentração de substrato
[sacarose].....	Concentração de sacarose
AR.....	Concentração de açúcares redutores (glicose e/ou frutose)
D.....	Taxa de diluição [min^{-1}]
E_a	Energia de ativação
E_d	Energia de desativação térmica
K_{CAT}	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis Menten
Q.....	Vazão [mL/min]
r.....	Velocidade ou taxa de reação
S_0	Concentração de sacarose na alimentação [mM]
T.....	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$] ou [Kelvin]
t_{RP}	Tempo para atingir estado estacionário
v.....	Velocidade de reação da invertase [$\text{mg}_{\text{AR}}/\text{mL}\cdot\text{min}$]
$v_{\text{máx}}$	Velocidade máxima de reação
X.....	Grau de conversão [%]
ψ	Coefficiente térmico de desnaturação da enzima
τ	Tempo de residência [min]

RESUMO

Reatores enzimáticos com membrana (REM) combinam muitas das características desejáveis em um bioprocesso, tais como: reator de elevada produtividade, reprodutibilidade no tempo, fácil controle e automação, operação em regime contínuo, eficiente separação de biocatalisador, substratos e produtos, com a viabilidade do uso de enzimas sem necessidade de imobilização. Este estudo faz parte do desenvolvimento e otimização de um bioprocesso que utiliza um reator enzimático com membrana com a enzima invertase, que catalisa a hidrólise da sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose. Estudou-se a influência de algumas variáveis operacionais e de reação no comportamento do REM. Este reator consiste de um tanque agitado de 50 mL onde células de *Saccharomyces cerevisiae*, contendo a invertase, ficam retidas por meio de uma membrana (ϕ_{poro} 0,45 μm), disposta na parte inferior do sistema. A configuração deste é semelhante a um reator contínuo tipo tanque agitado (CSTR). Inicialmente, avaliou-se a influência das variáveis: concentração de sacarose e concentração de enzima, por meio de experimentos seriais, que possibilitaram fixar estas variáveis em níveis adequados, de 500 mM e 1 mg/mL, respectivamente, para a continuidade dos ensaios por meio de planejamentos experimentais fatoriais. Foi utilizado um planejamento experimental (2^3 + estrela) e a análise de superfície de resposta para avaliar a influência das variáveis: vazão de alimentação do substrato, temperatura e pH. Para a análise estatística dos resultados, utilizaram-se como respostas o grau de conversão da sacarose e a produtividade em frutose, determinadas em amostragens feitas durante o tempo de operação do reator, em média de 8 a 9 horas por condição avaliada. Dos resultados obtidos, mostraram-se significativos, com 95% de confiança, os efeitos lineares e quadráticos da vazão e temperatura. As condições ótimas encontradas foram: vazão de alimentação entre 0,4 e 1,0 mL/min e temperatura 51°C. O grau de conversão obtido foi de aproximadamente 95%, com as seguintes condições experimentais: concentração da suspensão de células de 1mg/mL, temperatura de 51°C, pH 5,5; concentrações de sacarose de 500 mM e vazão de alimentação de 1,0 mL/min. Para esta condição obteve-se uma produtividade da ordem de 0,6 mmol frutose/h.mg invertase. Os desvios entre os valores previstos pelo modelo estatístico e pelo modelo experimental foram da ordem de 3%. Em função dos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que esta concepção de reator é eficiente para a bioconversão da sacarose e, portanto, o processo contínuo com reator com membrana é promissor para o desenvolvimento de processos enzimáticos desta natureza.

ABSTRACT

Enzymatic membrane reactors combine several desirable characteristics in a bioprocess, such as high productivity, reproducibility, easy control and automation, continuous operation, efficient separation of biocatalyst, substrate and products, and the use of enzymes without immobilization. This work is part of the development and optimization of a bioprocess using an enzymatic reactor which utilizes a membrane reactor for the enzymatic hydrolysis of sucrose in a solution of fructose and glucose, containing the enzyme invertase. The influence of some operational and reaction variables on the performance of the membrane reactor was studied. The bioreactor consisted of a 50 mL-stirred tank where intact cells of *Saccharomyces cerevisiae*, containing invertase in the cell wall, are retained inside the reactor by a microfiltration membrane (ϕ_{pore} 0.45 μm). The flat sheet membrane is fixed at the bottom of the device. The reactor configuration is similar to a continuous stirred tank reactor (CSTR). Initially, the influence of sucrose and enzyme concentration was evaluated through a series of experiments in order to determine the suitable levels of these variables. Sucrose was set to 500 mM and enzyme set to 1 mg/mL. This allowed the work to continue by means of experimental factorial designs. It was utilized a 2^3 full experimental design followed by a 2^{nd} order statistical design and, the surface response methodology in order to evaluate the influence of volume feeding rate of the substrate, temperature and pH on fructose productivity and sucrose conversion. The values were obtained during the reactor operation. The average operation time was from 8 to 9 hours for all evaluated conditions. From the statistical analysis, it was concluded that the linear and quadratic effects of temperature and flow rate on the results were the most significant with 95% of confidence. The optimum conditions found for this bioprocess were volume feeding rate between 0.4 and 1.0 mL/min and temperature of 51°C. The degree of conversion of sucrose obtained experimentally was 95%, in the following experimental conditions: cell concentration of 1mg/mL, temperature of 51°C, pH 5.5; sucrose concentration of 500 mM and feeding rate of 1.0 mL/min. For this operational condition it was obtained a productivity of about 0.6 mmol fructose/h.mg invertase. The deviation between the predicted values by the statistical model and the experimental data was 3%. Based on the results obtained in this work, it can be concluded that this conception of bioreactor is efficient for the bioconversion of sucrose and, a continuous membrane reactor process is very promising for the development of this kind of enzymatic process.

1. INTRODUÇÃO

As bioconversões, reações químicas catalisadas por enzimas ou células e executadas em meio com alta ou baixa atividade de água, apresentam grande interesse na síntese orgânica, sobretudo de compostos opticamente ativos (ROCHA-FILHO; VITOLO, 1998). O sucesso da biocatálise se deve ao fato da transformação ocorrer em condições brandas de pH e temperatura, ser altamente seletiva (do ponto de vista químico, da estereoespecificidade e enantioseletividade), gerar efluentes menos tóxicos e facilmente tratáveis, alguns deles biodegradáveis, produzir produtos sensíveis a condições extremas de processo, além de possibilitar a execução de reações simultâneas (BOMMARIUS, 1993). Segundo BOMMARIUS (1993), a síntese de moléculas assimétricas através da biocatálise aumentou em 7% no período de 1970 a 1990. Isso ocorreu porque a disponibilidade de catalisadores enzimáticos e celulares aumentou com o desenvolvimento da Biotecnologia (novas técnicas de cultivo microbiano, isolamento de microrganismos, processos de purificação, desenvolvimento das técnicas de DNA-recombinante) e houve um aumento do número de estudos da síntese bio-orgânica. Atualmente a biocatálise é usada em vários processos industriais, tais como: na conversão da insulina suína em humana, na produção de aspartame, de acrilamida e de penicilinas semi-sintéticas (ADISSON *et al.*, 1988; ROBERTS, 1990; ROCHA-FILHO; VITOLO, 1998).

A necessidade de compostos enantiomericamente puros nas indústrias farmacêutica, alimentícia e agrícola continua sendo a fonte de interesse da associação de biocatalisadores aos processos (BOMMARIUS, 1993). As reações de biotransformação geralmente estão competindo com outros processos, tais como: extração de fontes naturais, fermentação ou síntese química. A extração depende da disponibilidade da matéria-prima natural e a obtenção de pureza elevada no produto final é difícil. A fermentação, para ser econômica, necessita de processos com grandes volumes de trabalho, pois o produto final está diluído na maioria dos casos. A síntese química apresenta em relação à biocatálise menor enantioseletividade e número de *turn over* (constante catalítica que corresponde ao número de moléculas de substrato que um sítio ativo consegue transformar por segundo, para enzimas este número é da ordem de 10^2 a 10^5 sob temperatura ambiente) (BOMMARIUS, 1993; BAILLEY; OLLIS, 1986).

Para uma biocatálise eficiente é necessário não só dispor do biocatalisador específico, mas também de um biorreator adequado (NIELSEN; VILLADSEN, 1993). O biorreator pode ser considerado o equipamento central de qualquer bioprocessamento industrial. É precedido pelas operações de preparo de meios e seguido pelas operações de separação e purificação do produto de interesse. Sem dúvida, o custo do processo de purificação é dos mais elevados no processo global, especialmente quando o produto de interesse se encontra diluído no efluente proveniente do reator. Portanto, uma integração da maioria das

etapas envolvidas no bioprocesso pode se tornar importante para redução de custos e elevação da produtividade, como por exemplo os reatores com membrana, que permitem a separação do bioproduto dos outros componentes da reação no próprio biorreator (NIELSEN ; VILLADSEN, 1993).

Os reatores enzimáticos com membrana (REM) aparecem como alternativa viável aos reatores tradicionais de enzimas imobilizadas (leito fixo, CSTR tradicional, leito fluidizado), já que o biocatalisador não precisa estar necessariamente ligado a um suporte insolúvel (PRAZERES; CABRAL, 1994). Neste último aspecto diferencia-se do reator agitado tradicional (CSTR-TRAD), embora mantenha todos os atributos favoráveis deste tipo de reator contínuo. Salienta-se que o REM, em princípio, permite integrar em uma única etapa a conversão catalítica, a separação/concentração do produto e a recuperação do biocatalisador. O REM apresenta as seguintes vantagens: catálise homogênea, ausência de limitações difusionais, estéricas e conformacionais, alta atividade por unidade de volume, possibilidade de se trabalhar em condições assépticas, produtividade constante garantida pela manutenção da atividade enzimática no reator e possibilidade de uso de sistemas multi-enzimáticos e bifásicos (CANTARELLA *et al.*, 1989).

A invertase (EC. 3.2.1.26, β -fructofuranosidase) é uma enzima que catalisa a hidrólise de carboidratos β -fructofuranosídicos e, por exemplo, no caso da sacarose, permite a obtenção de uma mistura de açúcares redutores formada por glicose e frutose, de poder adoçante superior ao da solução de sacarose e que não cristaliza facilmente (VITOLLO, 1979).

É fato que a produção mundial de sacarose é elevada, sendo produzida a partir da cana-de-açúcar e da beterraba pelos países tropicais e europeus, respectivamente. Portanto, a utilização desta matéria-prima na produção de outros produtos de interesse pode ser economicamente viável se o produto final tiver maior valor agregado. Para o Brasil, considerando-se a volatilidade do mercado mundial de *commodities* como o açúcar e o etanol, dispor de um trinômio "sacarose/etanol/produtos derivados" equilibrado, sem dúvida teria relevância econômica. Com os avanços da Biotecnologia, tem sido dada ênfase ao projeto de processos mais eficientes, uma vez que a utilização de substrato e as operações de separação e purificação dos produtos representam custos elevados no processo produtivo. Uma das características de um bioprocesso otimizado é a presença de um reator de alta produtividade, que contenha um biocatalisador estável e permita uma eficiente e rápida separação do biocatalisador, substratos e produtos (BOMMARIUS, 1993).

Dentro deste contexto, foi proposto um projeto de bioconversão da sacarose em frutose, utilizando reator enzimático com membrana continuamente agitado, contendo a enzima invertase, que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. Apresenta-se a seguir uma revisão bibliográfica dos temas envolvidos no desenvolvimento deste projeto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOCATÁLISE

A biocatálise compreende a transformação de substratos (matérias-primas) em produtos de interesse industrial, através de transformações promovidas por biocatalisadores, tanto em sistemas homogêneos como heterogêneos. Entende-se por biocatalisadores as enzimas, as células ou os anticorpos, porém as enzimas são as responsáveis pela maior parte das biotransformações e, portanto é comum entender a biocatálise como sendo o uso principalmente de enzimas. A ação catalítica das enzimas é extremamente eficiente e seletiva comparada com catalisadores químicos e normalmente apresentam elevadas velocidades de reações, trabalham em condições de pH e temperatura brandas e elevada estereoespecificidade. A biocatálise é particularmente útil quando se busca economia de energia, aumento de segurança no processo, redução de impactos ambientais e aumento na qualidade dos produtos (GIORNO; DRIOLI, 2000).

As maiores dificuldades no uso de biocatalisadores em escala industrial são: a pouca disponibilidade de enzimas puras a um preço aceitável (normalmente as preparações comerciais são misturas de proteínas); as dificuldades na imobilização de enzimas, principalmente as que necessitam de cofatores; a necessidade dos biocatalisadores de operarem em baixa concentração de substrato e a contaminação microbiana. Porém, o potencial de aplicações das enzimas levou a uma série de desenvolvimentos em vários setores da Biotecnologia, tais como: a indução de microrganismos para produzir enzimas específicas; o desenvolvimento de técnicas de purificação de enzimas; o desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas; e o projeto de processos produtivos mais eficientes (GIORNO; DRIOLI, 2000).

2.2. BIORREATORES

Biorreatores são equipamentos utilizados tanto para a fermentação (utilização de microrganismos para a bioconversão) como para as reações baseadas em processos enzimáticos. No projeto de um reator a distinção entre estas duas aplicações é desnecessária, e parâmetros como: cinéticas da reação/crescimento, transferência de massa e agitação devem ser levados em conta. A escala do bioprocessos industrial é extremamente dependente da natureza do processo. Produtos de alto valor agregado, como por exemplo hormônio de crescimento humano, são produzidos em biorreatores com 200 L, enquanto produtos mais tradicionais da indústria farmacêutica, como a penicilina, são produzidos em biorreatores com 200 m³. No tratamento de efluentes, algumas plantas

industriais têm que contar com reatores com capacidade de 15.000 m³ (NIELSEN; VILLADSEN, 1993).

O primeiro bioprocesso com uso de microrganismos em escala industrial, desenvolvido pela indústria farmacêutica, foi a produção da penicilina, utilizando um biorreator tipo tanque agitado (STR - *stirred tank reactor*), que ainda é a concepção preferida no projeto de biorreatores. Com o alto capital que é investido nestes equipamentos, muitas indústrias preferem modificar os biorreatores existentes, trocando agitadores ou sistemas de transferência de ar ou calor, a introduzir novas concepções de processo. Além do que, o biorreator com tanque agitado pode ser útil em diferentes processos, permitindo grande flexibilidade, e esta é a razão pela qual este tipo de equipamento é sempre a primeira escolha quando um novo processo é desenvolvido (NIELSEN; VILLADSEN, 1993). Dentre os diferentes projetos de reator, pode-se dizer que para trabalhos em pequena escala, um reator descontínuo é suficiente. No entanto, para volumes maiores de trabalho, o processo contínuo tem maior aceitação e produtividade.

A maioria dos processos enzimáticos é conduzida em reatores tipo batelada. O processo descontínuo (Figura 2.2.1g), apesar de ser o mais simples, é usado somente quando a escala de trabalho é pequena ou quando o biocatalisador apresenta custo baixo ou desativa rapidamente. Os reatores descontínuos têm de uma série de limitações, tais como: as oscilações de batelada para batelada, o elevado custo operacional, as freqüentes paradas no processo e a necessidade de recuperar a preparação enzimática após cada ciclo de processo, a menos que, se adapte uma unidade de ultrafiltração subsequente (Figura 2.2.1b). Em qualquer processo descontínuo, os tempos de residência dos reagentes, dos produtos e do catalisador são idênticos (BOMMARIUS, 1993).

A imobilização de enzimas sobre suportes sólidos foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas para a retenção do biocatalisador enzimático dentro do reator, permitindo assim o uso de processos contínuos, que apresentam vantagens de melhor controle do processo, maior produtividade, produtos mais uniformes e a integração das etapas de purificação no processo. A imobilização de enzimas pode ser realizada pela ligação química ou física da enzima em suportes ou superfícies sólidas. A primeira aplicação industrial de sucesso de enzimas imobilizadas foi a produção de ácido L-aspartico por CHIBATA *et al.* na Tanabe Seiyaku Co. em 1973 (SHI *et al.*, 1996). Desde então, com o desenvolvimento de biocatalisadores mais específicos para a síntese orgânica e processos em grande escala, muitos métodos para reter eficientemente o biocatalisador no reator têm sido estudados.

Processos contínuos com enzimas imobilizadas são na maioria dos casos realizados em reatores de leito fixo ou empacotado (Figura 2.2.1c) que funcionam geralmente como reatores de fluxo pistonado (PFR - *Plug Flow Reactor*). Os problemas de gradientes radiais ou axiais de pH e temperatura podem ser eliminados aumentando-se a velocidade do fluido na coluna, de forma que o reator passe a ser operado como um reator de leito fluidizado (Figura 2.2.1d) (BOMMARIUS, 1993).

Os reatores com membrana representam outra técnica importante para reatores enzimáticos contínuos, pois membranas com tamanhos de poro específicos permitem a remoção contínua das moléculas de substrato e produto, porém, retém o biocatalisador dentro do reator, não havendo necessidade de imobilização para a maioria das aplicações. A grande vantagem desta concepção de reator é que a reação e a separação ocorrem simultaneamente e, se possível em um mesmo equipamento. Em alguns casos pode-se imobilizar o biocatalisador sobre a estrutura da própria membrana usada para a separação. A remoção contínua dos produtos torna este processo vantajoso também nos casos em que o produto exerce inibição sobre o biocatalisador, mantendo sua concentração em níveis baixos e aumentando a eficiência do processo (NOBREGA *et al.*, 2003).

Reatores com membrana podem ser operados como reatores contínuos do tipo tanque agitado (CSTR – *Continuous Stirred Tank Reactor*) acoplados a sistemas de filtração tradicional (*Dead-end Filtration*) (Figura 2.2.1e); ou podem ser operados como reatores contínuos tubulares (Figura 2.2.1i) com ou sem reciclo (Figura 2.2.1f), em módulos de membranas cilíndricas para filtração tangencial (*Cross-flow Filtration*) (BOMMARIUS, 1993).

Apesar da retenção de enzimas por membranas e a imobilização em suportes sólidos serem separadas como duas técnicas distintas de retenção do biocatalisador, as linhas que separam as duas técnicas não ficam muito bem definidas quando se imagina a membrana como uma superfície de imobilização, e muitas vezes os reatores com membrana são caracterizados como um caso especial de reatores com enzimas imobilizadas (BOMMARIUS, 1993). Tanto os reatores com enzimas imobilizadas como os reatores com membrana podem ser considerados equipamentos onde ocorre simultaneamente a etapa de reação e a de separação e purificação, pois ambos possuem a capacidade inerente de separação *in situ* de substratos e produtos do biocatalisador. A maioria destes reatores funciona em regime contínuo (BOMMARIUS, 1993).

Os biorreatores do tipo tanque agitado são tipicamente cilindros com o fundo côncavo. A relação entre a altura e o diâmetro do tanque varia geralmente em 1:1, 2:1 e 3:1. Em tanques menores o controle de temperatura é alcançado com o uso de camisas de aquecimento/resfriamento, e em tanques maiores, trocadores de calor ou serpentinas internas e/ou externas são necessários para manter a temperatura constante com uma faixa de variação de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Normalmente os tanques agitados são equipados com chicanas (*baffles*) que previnem a formação de vórtices. A agitação mecânica é feita com uma ou mais pás montadas em um eixo central. Os chamados biorreatores com alta eficiência são reatores disponíveis no mercado com volume útil geralmente inferior a 10 L e que contém um número elevado de sensores *in situ* e *on-line* monitorando os mais diferentes parâmetros do processo. São praticamente biorreatores ideais, onde a influência da dinâmica do equipamento é devidamente controlada, e a reprodutibilidade é elevada. Esses equipamentos possuem uma elevada transferência de massa e tempo de mistura reduzido. Qualquer variação observada é então consequência da reação e não do reator, uma vez

que o equipamento é homogêneo em praticamente todo o sistema reacional (NIELSEN; VILLADSEN, 1993).

Figura 2.2.1. Tipos de reatores enzimáticos (BOMMARIUS, 1993; WANG *et al.*, 1979).

2.2.1. Otimização de um Bioprocesso

Um dos principais objetivos em um bioprocesso é alcançar um elevado rendimento em tempo mínimo, com elevada conversão do substrato e seletividade química. Inicialmente, para o sistema reativo escolhido, valores de pH e temperatura são escolhidos de acordo com as propriedades dos reagentes, dos produtos e da enzima (BOMMARIUS, 1993). No caso dos biocatalisadores, as faixas de valores variam para a temperatura entre 30 a 60°C e para o pH entre 5 e 8. A concentração inicial de substrato é importante para o rendimento e para a seletividade no caso de ocorrer reações paralelas ou sequenciais. Em sistemas multi-enzimáticos deve-se determinar a razão ótima de atividade e estabilidade para o complexo enzimático em função das condições da reação. A estabilidade do biocatalisador é muito importante, e é expressa pelo consumo de biocatalisador por unidade de peso do produto ou por tempo de meia-vida do biocatalisador. As constantes de equilíbrio da reação, além das constantes de inativação e tempo de meia vida da enzima são importantes e devem ser estudados junto com a cinética da reação, que deve ser determinada também nas condições ótimas de operação do processo (vazão, tempo de residência), ao invés de apenas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima ou em soluções extremamente diluídas. A influência de todos estes parâmetros no processo deve ser medida na conversão global do substrato em produto ao invés de apenas na velocidade inicial de reação. Outra ferramenta importante no desenvolvimento de um processo e no aumento de escala é a taxa de reciclo do reator, que é a proporção de substrato incorporada à vazão de reciclo (BOMMARIUS, 1993).

As principais características de um bioprocesso otimizado são: reator com elevada produtividade, biocatalisador estável, reprodutibilidade, fácil controle e automação, rápida e eficiente separação do biocatalisador, dos substratos e produtos, e possibilidade de operação em processo contínuo ou semicontínuo. A figura 2.2.2 ilustra as principais características que devem ser avaliadas na otimização de um bioprocessos.

Figura 2.2.2. Características importantes no projeto de um biorreator genérico.

2.3. REATORES ENZIMÁTICOS COM MEMBRANA

Em diversos processos químicos e bioquímicos, a separação dos reagentes dos produtos e a recuperação e reutilização do catalisador são etapas das mais importantes do processo. Os reatores com membrana são equipamentos que integram as etapas de conversão catalítica, separação ou concentração do produto e recuperação do catalisador em uma única operação (PRAZERES; CABRAL, 1994).

O conceito básico de um reator com membrana consiste na separação do biocatalisador (enzimas ou células) dos produtos (ou ainda, dos substratos) por uma membrana semipermeável que cria uma barreira seletiva. Define-se uma membrana como uma barreira física que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma das várias espécies químicas presentes nas fases (NOBREGA *et al.*, 2003). A separação é conseguida porque a membrana é atravessada com maior facilidade por um dos componentes do que pelos restantes. Membranas normalmente são compostas de materiais sintéticos, podem ser sólidas ou líquidas, neutras ou carregadas, hidrofílicas ou hidrofóbicas.

Para que os solutos sejam separados do meio reacional é necessária a ação de uma força motriz que está presente entre as faces da membrana. Esta força motriz pode ser um gradiente de potencial químico ($\Delta\mu$) e/ou um gradiente de potencial elétrico (ΔE). Como a maior parte dos processos são atérmicos o gradiente de potencial químico poder ser expresso como sendo um gradiente de concentração (ΔC), um gradiente de pressão (ΔP) ou um gradiente de pressão parcial (Δp_i). Os produtos resultantes da catálise devem permear continuamente pelos poros da membrana pelo mecanismo de difusão (induzida pelo gradiente de concentração) e/ou de convecção (usualmente induzida pelo gradiente de pressão) (NOBREGA *et al.*, 2003; PRAZERES; CABRAL, 1994). A utilização de reatores com membrana, como uma opção para a retenção do biocatalisador, tornou-se possível apenas quando a tecnologia de membranas avançou a ponto de permitir um controle preciso da espessura e do poro das membranas (BOMMARIUS, 1993).

Além de funcionar como uma barreira de separação seletiva, as membranas também fornecem um suporte estrutural para o biocatalisador e podem ser usadas neste tipo de reator como uma matriz de imobilização da enzima, sem nenhuma intenção de separação (GIORNO; DRIOLI, 2000). Mais recentemente, as funções da membrana foram ampliadas com o uso deste tipo de reator em sistemas de bioconversão em duas fases. Neste caso a membrana age como um suporte para a interface entre as duas fases, a membrana não somente separa as fases como também fornece uma área de contato interfacial à enzima que atua como um catalisador interfacial. As vantagens oferecidas pelos reatores com membrana juntamente com uma grande variedade de tipos de membranas, módulos e materiais comercialmente disponíveis a custos reduzidos os tornaram uma

alternativa importante aos reatores enzimáticos convencionais, tais como os leitos fixos ou fluidizados (PRAZERES; CABRAL, 1994). Atualmente existe uma grande preocupação no desenvolvimento de tecnologias adequadas ao meio ambiente, o que torna estes reatores com membrana atrativos, pois na maioria dos casos não exigem aditivos, operam em condições moderadas de temperatura e pressão e reduzem a formação de produtos secundários (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Um dos primeiros usos de membranas em reatores enzimáticos aconteceu em 1970, quando BUTTERWORTH *et al.* apud BOMMARIUS (1993) utilizaram um sistema tradicional de filtração (*Dead-end Filtration System*) na hidrólise do amido para produzir glicose utilizando α -amilase. Porém, o sistema teve sérios problemas devido à polarização de concentração da membrana, fazendo com que o fluxo de filtrado decrescesse com o tempo e houvesse perda de enzima. Novos estudos foram feitos desde então, incluindo o método de filtração tangencial para operação de reatores com membrana. Em 1972, KNAZEK *et al.* apud BOMMARIUS (1993) publicaram trabalhos sobre o uso de um reator utilizando membranas tipo fibras ocas (*Hollow-Fiber*) para o crescimento de células animais. Baseados em um trabalho de WANDREY *et al.* (1979) apud BOMMARIUS (1993), a empresa Degussa AG/GBF (Alemanha, patente) introduziu, em 1981, um dos primeiros processos contínuos empregando um reator com membrana para a produção de L-aminoácidos (metionina e valina) com a enzima aminoacilase.

Os reatores com membrana são particularmente adequados para transformações enzimáticas complexas, que envolvem, por exemplo, mais de uma enzima ou regeneração de cofator. A concepção deste tipo de reator permite operações pouco usuais como o uso de sistemas bifásicos com meio orgânico e aquoso e operações com sistemas de micelas reversas. Considerando a integração de operações, os reatores enzimáticos com membrana consistem de um sistema integrado de bioconversão e separação, e, portanto representam um passo revolucionário no desenvolvimento de uma nova geração de reatores enzimáticos. Os processos com membranas apresentam, ainda, vantagens como: tecnologia limpa; são extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de ampliação de escala (*scale up*); e, se integram facilmente como outras operações unitárias devido ao fácil ajuste das características da membrana e dos módulos ao processo (NOBREGA *et al.*, 2003).

2.3.1. Reatores com Membrana Biocatalítica

Uma membrana pode servir também como superfície para a imobilização de um biocatalisador. Em um reator com membrana a enzima pode ser utilizada de duas formas: (1) suspensa no meio líquido e compartimentalizada por uma membrana no reator; (2) imobilizada na matriz da membrana. No segundo método a membrana age como um suporte para o catalisador e como a unidade de separação (GIORNO; DRIOLI, 2000). A

imobilização direta da enzima na superfície da membrana pode ser alcançada por aprisionamento (*entrapment*), formação de gel de polarização ou gelificação, adsorção física, ligação iônica, ligação covalente ou ligações cruzadas (*cross-linking*) (PRAZERES; CABRAL, 1994).

Enzimas ou células também podem ser aprisionadas na matriz polimérica durante a preparação da membrana e, nesse caso, para que a reação ocorra o substrato deve permear a membrana e o produto é recolhido no permeado (GIORNO; DRIOLI, 2000). Outra forma de imobilização é a gelificação que consiste na passagem de uma solução de enzima através de uma membrana de ultrafiltração de forma que a enzima se deposite sobre a superfície e se acumule formando uma fina camada de gel de polarização que contém a atividade catalítica. Esta imobilização dinâmica ocorre quando a interface membrana-líquido atinge o valor da concentração de formação do gel (GIORNO; DRIOLI, 2000). Outras formas de imobilização são: (1) ligação iônica em suportes de troca iônica (DEAE celulose, DEAE sephadex ou caboximetilcelulose), (2) adsorção por interação de Van der Waals em suportes hidrofóbicos (polipropileno ou teflon), (3) ligação covalente entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos e o suporte da membrana. A ligação covalente é usualmente formada por pontes formadas por moléculas de reagentes bi- ou multifuncionais como o glutaraldeído. A única desvantagem deste método é a grande perda de enzima por desnaturação (GIORNO; DRIOLI, 2000; BOMMARIUS, 1993).

Além do tipo de imobilização, reatores contendo membranas biocatalíticas podem diferir quanto à forma de operação. Por exemplo, os reatores com membrana de ultrafiltração são usados quando o substrato possui massa molar muito maior que o produto e tanto o substrato quanto o produto são solúveis no mesmo solvente. Neste caso pode-se escolher uma membrana de porosidade adequada de tal forma que o substrato entre em contato com a enzima imobilizada na membrana, mas não passe por ela, enquanto o produto é recuperado no permeado. No caso em que substrato e produto possuem massas molares próximas é necessário ajustar a velocidade da filtração de acordo com o tempo de reação (GIORNO; DRIOLI, 2000). Quando o substrato possui solubilidade diferente do produto (exemplo: ésteres e seus produtos de hidrólise) pode-se usar um reator bifásico com membranas. Neste tipo de sistema a "biomembrana" fica localizada entre duas fases líquidas imiscíveis. A fase orgânica contém o substrato que é transportado por difusão até a enzima onde ocorre a reação e o produto é extraído na fase aquosa, do outro lado da membrana (MERÇON *et al.*, 2000).

2.3.2. Vantagens e Desvantagens do Uso de Reatores Enzimáticos com Membrana

Reatores enzimáticos com membranas apresentam vantagens que os tornam uma alternativa preferencial quando comparados com outros reatores enzimáticos mais tradicionais (descontínuo, leito fixo e leito fluidizado) ou a outras técnicas de imobilização de enzimas, que podem danificar o biocatalisador e impor limitações de transporte de massa.

A Tabela 2.3.1 apresenta as vantagens e desvantagens de reatores com biocatalisador imobilizado e reatores com membrana.

Tabela 2.3.1. Comparação dos reatores com membrana e reatores com biocatalisador imobilizado (BOMMARIUS, 1993).

	Vantagens	Desvantagens
Reatores com Membrana	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de limitações de transferência de massa • Facilidade no aumento de escala 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de pré-filtração • Ineficiência com produtos poliméricos • Ineficiência com a precipitação de produtos
Reatores com Biocatalisador Imobilizado	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas potencialmente mais estáveis • Possibilidade de co-imobilização 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldades para esterilização • Limitações de transferência de massa • Custos adicionais com a imobilização • Ineficiência com a precipitação de produtos

A imobilização altera muito mais a atividade e estabilidade do biocatalisador do que o aprisionamento em membranas. Porém, foi o uso de enzimas imobilizadas que permitiu a exploração maior do potencial da biocatálise, sendo, portanto uma tecnologia mais bem difundida para processos enzimáticos, e um aumento na atividade e estabilidade da enzima imobilizada pode ser um fator importante na escolha desta técnica. No entanto, para os reatores com membrana, a ausência de limitações de transferência de massa, mesmo em altas concentrações de biocatalisador, o aumento fácil de escala através da adequação da área da membrana e a baixa desativação da enzima em processamentos contínuos, são as maiores vantagens. Além disso, os produtos são na maior parte isentos de microrganismos e agentes pirogênicos, características fundamentais na obtenção de produtos

farmacêuticos. Somente no caso de produtos que sofrem precipitação os reatores com membrana não podem ser utilizados, por ocorrer bloqueio da membrana (BOMMARIUS, 1993).

As principais vantagens e desvantagens dos reatores com membrana estão apresentadas a seguir (PRAZERES; CABRAL, 1994).

Vantagens:

1. Operação Contínua.

Uma das maiores vantagens dos reatores com membrana é a operação com enzimas em regime contínuo, o que contribui para um aumento de produtividade e viabilidade econômica, além da possibilidade de controle avançado do processo.

2. Integração das Operações de Reação e Separação.

Uma das vantagens mais importantes desta concepção de reator é a remoção seletiva dos produtos do meio de reação. No caso de reações de equilíbrio, isto pode contribuir para o seu deslocamento no sentido de obtenção do produto de interesse. Também no caso de inibição, ocorre a remoção contínua de produtos que inibem a reação o que aumenta a conversão e a velocidade de reação, ao contrário do que acontece em batelada, assim como a possibilidade de trabalho com substratos contendo inibidores (como no caso de tratamento de efluentes), reduzindo-se a inibição pela diluição. O deslocamento de equilíbrio em reações termodinamicamente desfavoráveis é usado também nas aplicações tradicionais da Engenharia Química, tal como em reações de desidrogenação usando catalisadores químicos tradicionais (SARACCO *et al.*, 1999).

3. Enriquecimento e Concentração dos Produtos.

No caso de sistemas multi-produtos a membrana pode exibir uma seletividade entre os produtos, podendo concentrar aquele que tem maior rejeição pela membrana.

4. Controle da Massa Molar do Hidrolisado.

Na hidrólise de macromoléculas um corte molecular adequado da membrana permite o controle da massa molar do produto hidrolisado, pois permite a retenção de produtos de maior massa molar no reator.

5. Possibilidade de Condução de Reações Multifásicas.

Os reatores com membrana possibilitam a condução de reações em duas fases, sem os problemas decorrentes desta aplicação, como por exemplo, a desativação das enzimas devido à necessidade de agitação vigorosa para manutenção de emulsões e os altos custos de energia gastos para isso.

6. Uso na Pesquisa de Mecanismos de Enzimas.

Em escala de laboratório reatores com membrana de ultrafiltração são uma ferramenta importante e útil para o estudo de enzimas e seus mecanismos, tais como, cinética, efeitos de inibição e desativação enzimática.

7. Ausência de Limitações de Transferência de Massa.

Diferente do que ocorre em reatores convencionais de leito fixo e leito fluidizado, as limitações de transferência de massa, que ocorrem na maioria dos casos, os reatores com membrana não apresentam esta limitação pois o mecanismo de transferência convectivo é maior que o difusivo. Com isso a melhora na transferência de massa entre substratos, produtos e enzima acarreta um aumento na produtividade quando comparados aos reatores tradicionais com enzima imobilizada.

Desvantagens:

As maiores desvantagens estão associadas com a diminuição do desempenho durante a operação do reator, normalmente causada por perda de atividade catalítica ou da eficiência de filtração (redução do fluxo de permeado). Nos casos associados à perda de atividade catalítica a adição de nova enzima pode manter a produtividade constante no reator.

Dois fenômenos distintos normalmente são responsáveis pela perda da capacidade de filtração da membrana durante a operação: a polarização de concentração (*concentration polarization*) e o *fouling* (nome atribuído a um conjunto de fenômenos tais como: adsorção de solutos na superfície e nos poros da membrana e entupimento dos poros da membrana, fenômenos estes inerentes aos processos de separação por membranas) (NOBREGA *et al.*, 2003). Um bom controle da polarização de concentração e dos efeitos de *fouling* é essencial para manter constante os fluxos mássicos e a eficiência dos reatores com membrana.

1. Perda de Enzima ou Cofatores

Além da perda das enzimas por inativação térmica, pode existir uma perda por permeação pelos poros da membrana, mesmo que a massa molar seja maior do que o corte molecular da membrana. Isto porque, dependendo da forma da molécula e da distribuição de poros, a enzima pode passar pela membrana e causar uma redução gradual da atividade se ela não está em excesso. Também moléculas pequenas de ativadores ou cofatores podem escapar pela membrana o que também causa redução na atividade.

2. Adsorção Indesejável e “Envenenamento” da Enzima

Quando a enzima é usada na forma livre pode ocorrer uma adsorção indesejável da enzima sobre a membrana, com alterações em sua conformação, o que contribui para uma redução na atividade. Em alguns casos a enzima pode ser “envenenada” pelo contato com a membrana, pois o material da membrana pode influenciar na sua estabilidade.

3. *Inativação da Enzima por Fatores como:* tensões de cisalhamento, fricção gerada em paredes e recintos, aquecimento local, aeração, interfaces, adsorção, altas taxas de recirculação e rotação de agitadores.

4. Inibição de Enzimas por substratos/produtos

Ocorre principalmente em reatores com membrana que usam enzimas imobilizadas na membrana devido ao acúmulo de moléculas de substratos e/ou produtos na camada de gel adjacente à membrana.

5. Polarização de Concentração e “Fouling”

Durante a utilização de membranas os fluxos permeados obtidos com soluções são na prática menores do que os observados com solventes puros e isto acontece devido a dois fenômenos: a polarização de concentração e o *fouling*.

Observa-se, logo nos primeiros instantes do processamento de uma solução, queda acentuada no fluxo de permeado em relação ao fluxo do solvente puro, provocada pela polarização de concentração, a qual se segue de uma queda mais lenta mas constante ao longo do tempo. Como a polarização de concentração se estabelece rapidamente, esta variação adicional de fluxo é atribuída a possíveis alterações na membrana conhecida como *fouling*, como ilustra a figura 2.3.1 (NOBREGA *et al.*, 2003).

Figura 2.3.1. Queda do fluxo permeado com o tempo em processos de separação com membranas. Polarização de Concentração e *Fouling* (NOBREGA *et al.*, 2003).

O fenômeno de concentração de polarização ocorre devido ao aumento da concentração de sólidos ou soluto na superfície da membrana com a conseqüente formação de um filme estagnante de alta concentração de sólidos. Na superfície da membrana a concentração é máxima e diminui na direção do meio líquido. Este gradiente de concentração causa uma difusão de sólidos na direção oposta ao fluxo principal e com isso uma redução no fluxo global de permeado. Com o acúmulo de macromoléculas na superfície da membrana, como estas têm a capacidade de gelificar, ao atingir-se o seu produto de solubilidade elas formam uma camada de gel. A partir daí, ao aumentar a pressão de alimentação compacta-se a camada de gel formada, até um limite a partir do qual a camada de gel, de característica porosa, se comporta como uma segunda membrana com conseqüente redução no fluxo de permeado. Em alguns casos o fenômeno relacionado à polarização de concentração (adsorção, deposição, interações membrana/soluto) aumenta a capacidade de rejeição da membrana, evitando-se a perda de soluto durante a filtração. A espessura da camada de polarização de concentração depende da turbulência no líquido.

O segundo fenômeno limitante que interfere na filtração é o *fouling* e está associado com modificações das propriedades de filtração da membrana. Alguns dos fenômenos associados ao *fouling* são: adsorção na membrana das espécies presentes tanto na superfície como nos poros; entupimento de poros por moléculas ou partículas em

suspensão; depósito na superfície da membrana de macromoléculas que formam um gel ou até mesmo um precipitado na superfície da membrana. Cada um destes fenômenos provoca alterações na membrana e conseqüentemente uma resistência adicional à transferência de massa do solvente (NOBREGA *et al.*, 2003).

O fenômeno de polarização de concentração pode ser considerado reversível, ou seja, uma vez terminada a operação e efetuada a limpeza da membrana, o fluxo original com o solvente puro é restabelecido. O fenômeno de polarização de concentração pode ser reduzido manipulando-se algumas condições operacionais, tais como: aumento da vazão de recirculação, introdução de ciclos de lavagem com fluxo invertido por um curto intervalo de tempo (*backflushing*) ou fluxos pulsantes por variação da pressão durante o processo. Além disso, um eficiente procedimento de limpeza da membrana pode ser usado entre operações consecutivas para uma restauração completa do fluxo de permeação original. Já os fenômenos que constituem o *fouling* devem ser considerados parcial ou totalmente irreversíveis e levam à redução progressiva na eficiência da membrana, devido à redução no fluxo de permeado e aumento da rejeição de solutos. O *fouling* pode ser minimizado por tratamentos da membrana, operação com velocidades tangenciais elevadas (número de Reynolds elevado) e pressão de transmembrana não muito elevada, pois o aumento de velocidade provoca uma diminuição da camada limite de polarização e estes fenômenos dependem basicamente da concentração de soluto na interface membrana/solução (NOBREGA *et al.*, 2003).

2.3.3. Classificação dos Reatores com Membrana

Os reatores com membrana podem ser classificados de acordo com: (1) a força motriz; (2) a estrutura da membrana; (3) a geometria da membrana; e (4) a direção do fluxo.

2.3.3.1. Força Motriz

Os equipamentos utilizados como reatores com membrana podem ser classificados de acordo com a principal força motriz que efetua a separação, em do tipo “Transporte Difusivo” ou “Transporte Convectivo”.

Transporte Difusivo

Neste tipo de reator a membrana é uma barreira somente ao transporte difusivo, pois a separação está baseada apenas na diferença de concentração entre o fluido no interior do reator e a corrente de permeado (ΔC). O processo de difusão através de uma membrana em um recipiente contendo água é conhecido como diálise. Se a difusão de partículas carregadas, geralmente íons, tem o auxílio de um gradiente de carga, o processo é chamado de eletrodiálise (BOMMARIUS, 1993).

Transporte Convectivo

Neste tipo de reator aplica-se um gradiente de pressão (ΔP) ou de temperatura através da membrana e o transporte convectivo passa a ser a principal força de separação dos sólidos e do solvente. Para alcançar fluxos elevados, qualquer projeto de reator com este tipo de força motriz, imposta por um fluxo forçado através da membrana ou diferença de pressão, é mais eficiente que o transporte difusivo (BOMMARIUS, 1993). Dentre os processos de separação com membranas os mais empregados na área de biotecnologia são aqueles que utilizam a diferença de pressão como força motriz, tais como: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (NOBREGA *et al.*, 2003).

2.3.3.2. Estrutura da Membrana

A maior parte das membranas, em contraste com os filtros (superfícies porosas normalmente de materiais naturais), tradicionalmente utilizados nas operações de separação sólido-líquido de suspensões convencionais (filtração clássica), são materiais sintéticos que contém diâmetros de poro mais reduzidos. Na filtração por membranas a separação pode inclusive ser feita com base no tamanho molecular das espécies, como é o caso da retenção de macromoléculas em solução por membranas de ultrafiltração (BOMMARIUS, 1993).

As membranas sintéticas comerciais em sua grande maioria são de natureza orgânica e preparadas pela precipitação de soluções poliméricas utilizando-se diferentes técnicas. As membranas podem apresentar as mais variadas características químicas e físicas e em função das aplicações a que se destinam, apresentam diferentes estruturas. De um modo geral as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas ou porosas. Também podem ser classificadas como isotrópicas (simétricas) ou anisotrópicas (assimétricas), de acordo com a simetria dos poros na seção transversal da membrana. A maioria das membranas comerciais é assimétrica, ou seja, o diâmetro dos poros aumenta continuamente na direção do fluxo. A superfície destas membranas é formada por uma camada ultrafina microporosa depositada sobre outra camada de porosidade maior. Este tipo de membrana é menos susceptível ao entupimento e permite maiores velocidades de filtração (maior fluxo de permeado) (Figura 2.3.2). Membranas utilizadas para microfiltração podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, com diâmetros de poro que variam de 0,05 a 5 μm . Membranas para ultrafiltração normalmente são anisotrópicas e possuem diâmetros de poro variando entre 1 e 500 nm (NOBREGA *et al.*, 2003).

Membrana plana assimétrica **Membrana plana composta** **Membrana plana simétrica** **Fibra oca composta**

Figura 2.3.2. Membranas de ultrafiltração: fotos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de algumas membranas poliméricas (NOBREGA *et al.*, 2003).

Em processos que utilizam membranas porosas (microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração) a seletividade está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana. A microfiltração encontra-se no limite entre a filtração clássica e a filtração por membranas, pois nada mais é do que uma filtração que utiliza membranas sintéticas como barreira seletiva e que dispensa o uso de auxiliares de filtração. Membranas de microfiltração, ao contrário das membranas de ultrafiltração, são permeáveis à maioria dos compostos solúveis, independente do valor de suas massas molares (NOBREGA *et al.*, 2003), porém, PESSOA-JR e VITOLO (1998) comprovaram que algumas enzimas podem adsorver às paredes dos poros de membranas de microfiltração e, por isso, parte da enzima pode ficar retida.

O diâmetro da maioria das células de microrganismos está em torno de $1\mu\text{m}$ (leveduras e fungos com dimensões entre 1 a $10\mu\text{m}$ e células bacterianas entre 0,3 a $10\mu\text{m}$) e, portanto, são retidas por membranas de microfiltração. Proteínas são retidas por membranas de ultrafiltração comerciais (BOMMARIUS, 1993). As membranas de ultrafiltração (UF) são adequadas para a retenção da maioria das enzimas que tem massa molar entre 10 e 100 kDa. As membranas normalmente são classificadas pela “massa molar de corte” ou “diâmetro de corte nominal” (*nominal molecular weight cutoff* – NMWCO ou simplesmente, *cut off*) que representa a massa molar de um macrossoluto capaz de ser rejeitado em 90%, em condições bem definidas de filtração e que normalmente variam de 500 a 100.000 Da ou 1-100 nm de porosidade (PRAZERES; CABRAL, 1994).

Os materiais mais utilizados na fabricação das membranas de ultrafiltração são polímeros sintéticos e alguns materiais cerâmicos. Os polímeros utilizados nas membranas são na maior parte dos casos: polietersulfona que é um material hidrofóbico; celulose regenerada ou acetato de celulose que é um material hidrofílico; e outros materiais como: nylon, politetrafluoretileno (PTFE, teflon), polietersulfona ou difluoreto de polivinilideno (PVDF) (MILLIPORE, 1999; BOMMARIUS, 1993).

As membranas cerâmicas comparadas às membranas poliméricas são mais resistentes a altas temperaturas e produtos químicos e mecanicamente mais resistentes sob pressão. A escolha de uma membrana normalmente é feita levando-se em conta características como morfologia, porosidade, distribuição do poro, diâmetro de corte nominal, resistência química, tolerância à temperatura, pH e pressão (PRAZERES; CABRAL, 1994).

Nos últimos 30 anos, novos materiais poliméricos têm sido desenvolvidos com sucesso para o uso em membranas. Existem pesquisas na área de modificação de polímeros comerciais e as principais técnicas de modificação são: química e fotoquímica. A maioria das pesquisas de modificação de membranas de ultrafiltração está focada na redução do *fouling* durante a filtração de sistemas biológicos alterando-se a hidrofilicidade e carga da membrana. PIERACCI *et al.* (1999) apresentam resultados de modificação de membranas comerciais de polietersulfona por fotólise com radiação ultravioleta e polimerização de monômeros hidrofílicos na superfície da membrana. Os resultados mostraram que o aumento da hidrofilicidade da superfície da membrana reduziu o *fouling* e estes resultados podem ser aplicados para membranas usadas em biotecnologia, alimentos e bebidas e tratamento de efluentes.

Tabela 2.3.2. Classificação de membranas e tipos de separação.

	Osmose Inversa (OI)	Nanofiltração (NF)	Ultrafiltração (UF)	Microfiltração (MF)
Membrana	Densa Assimétrica	Porosa Assimétrica	Microporosa Assimétrica	Microporosa Assimétrica ou Simétrica
Espessura	150 μm	150 μm	150 – 250 μm	10 - 150 μm
Diâmetro do Poro	Membrana Densa	0,5 - 5 nm MWCO : 300 a 2000 Da	1 – 500 nm MWCO : 5 a 500 kDa (mais utilizados de 10 a 100 kDa)	0,05 - 5 μm (mais utilizados 0,1 a 0,22 μm)
Retenção	CEMM, CBMM, sais, cloreto de sódio, glicose, aminoácidos, proteínas	CEMM, mono-, di-, e oligossacarídeo, ânions polivalentes	Macromoléculas, proteínas, polissacarídeos, vírus	Particulados, poeira, bactérias, células
Material da Membrana	CA Membrana Composta	CA Membrana Composta	Cerâmica, PSO, CA, PVDF, Membrana Composta	Cerâmica, PP, PSO, PVDF
Modulos	-Espirais -Placas e Quadros	-Espirais -Placas e Quadros	-Espirais -Placas e Quadros - Fibra Oca	-Placas e Quadros -Fibra Oca
Pressão	15 – 80 atm	5 – 25 atm	1 – 7 atm	0,5 – 2 atm

Nomenclatura: CA – acetato de celulose; PSO – polisulfona; PVDF – difluoreto de polivinilideno; PP – polipropileno; CEMM – compostos de elevada massa molar (100.000 a 1 milhão g/mol); CBMM – compostos de baixa massa molar (1.000 a 100.000 g/mol); Macromoléculas- 1 milhão g/mol; MWCO – massa molar de corte (*Molecular weight cut-off*)

2.3.3.3. Geometria da Membrana

As membranas podem ser preparadas tanto na geometria plana (*flat-sheet*) como na geometria cilíndrica. As membranas planas podem ter uma configuração em módulos de placas e quadros (*plate-and-frame* ou *flat-plate*) (Figura 2.3.3a) ou em módulos espirais (*spiral-wound*) (Figura 2.3.3b). As membranas cilíndricas podem ser montadas em módulos casco e tubo (*tube-and-shell* ou *lumen-shell*) (Figura 2.3.3c) e podem ser divididas em três categorias, em função do diâmetro externo (DE) do cilindro: tubulares ($DE > 3 \text{ mm}$), capilares ($0,5 \text{ mm} < DE < 3 \text{ mm}$) ou tipo fibra oca (*hollow-fiber*) ($DE < 0,5 \text{ mm}$) (NOBREGA *et al.*, 2003; GIORNO; DRIOLI, 2000).

Figura 2.3.3. Tipos diferentes de módulos de membranas: membranas planas montadas em (a) módulos placas e quadros, (b) módulos espirais, (c) membranas cilíndricas tipo capilar montadas em módulos tubo e casco (NOBREGA *et al.*, 2003; GIORNO; DRIOLI, 2000).

Reatores com o biocatalisador segregado em membranas tipo fibra oca, são adequados para enzimas e células que podem ser desativadas por cisalhamento causado pela agitação. Este tipo de reator é muito utilizado em aplicações terapêuticas, como por exemplo, o pâncreas artificial, fígado artificial e aparelhos de hemodiálise e desintoxicação extra-corpórea (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Atualmente, o custo das membranas caiu, pois apresentam maior estabilidade e podem ser regeneradas mais vezes. Portanto, ao invés de minimizar a área da membrana para um determinado fluxo, prefere-se fornecer área de membrana suficiente para otimizar o tempo de operação de um reator com membrana. A operação estéril e a remoção de agentes pirogênicos com o uso de membranas de ultrafiltração reduzem custos no tratamento ou validação dos produtos e também a perda do biocatalisador por contaminação. Porém, um dos desafios na condução de um processo que utiliza reatores com membrana é minimizar a polarização causada pela alta concentração protéica que se forma após as adições de biocatalisador, necessárias para repor a sua desativação (BOMMARIUS, 1993).

Tabela 2.3.3. Quadro resumo de características dos reatores com membrana (PRAZERES; CABRAL, 1994).

Função da Membrana	<ul style="list-style-type: none"> • Barreira Semi-permeável • Matriz de Imobilização • Separação de Fase
Retenção da Enzima	<ul style="list-style-type: none"> • Exclusão Molecular • Repulsão Eletrostática • Adsorção Física • <i>Cross-linking</i>
Localização da Enzima	<ul style="list-style-type: none"> • Solução • Poros da Membrana • Superfície da Membrana
Módulos de Membranas	<ul style="list-style-type: none"> • Placas e Quadros • Tubular • Fibra Oca • Espiral • Célula de Ultrafiltração • Filtro Rotativo
Material da Membrana	<ul style="list-style-type: none"> • Cerâmica • Celulose • Nylon • Polipropileno • Poliamida • Polisulfona • Politetrafluoretileno • Acetato de Celulose

A seleção da membrana a ser utilizada em um reator enzimático com membranas deve levar em conta a massa molar da enzima, do substrato e do produto, assim como a natureza química das espécies químicas e da membrana de forma a facilitar a permeação do produto e a retenção da enzima (PRAZERES; CABRAL, 1994). A seletividade da membrana em relação a um soluto está associada a um processo de exclusão pelo tamanho da molécula. No entanto, a natureza química da membrana pode interferir na permeação do soluto, devido a interações não-específicas (hidrofóbicas, hidrofílicas, eletrostáticas) que levam à formação da camada de gel de polarização (PRAZERES; CABRAL, 1994).

2.3.3.4. Direção do Fluxo

Processos de separação por membranas podem ser operados em fluxo tangencial (*cross flow filtration*) ou fluxo convencional (*dead end filtration*).

Os reatores com membrana originalmente eram projetados para filtração com direção do fluxo perpendicular à superfície da membrana (filtração convencional), como apresentado na Figura 2.3.4a. Neste esquema pode ocorrer a formação de gel de polarização sobre a membrana, uma vez que o material se acumula na parte superior da membrana, bloqueando o fluxo, apesar destes problemas serem minimizados com agitadores. No caso particular da microfiltração, de maneira análoga ao que ocorre na filtração clássica, esta polarização se traduz na formação de uma torta (NOBREGA *et al.*, 2003). Atualmente emprega-se também a filtração tangencial, inclusive com reciclo (Figura 2.3.4b). Neste caso, a vazão de alimentação é feita paralelamente à superfície da membrana e o fluido a atravessa no sentido perpendicular, reduzindo o acúmulo de material sobre a membrana (BOMMARIUS, 1993).

Figura 2.3.4. Configurações de reatores com membrana: (a) filtração tradicional (*dead-end filtration*), (b) filtração tangencial (*cross-flow filtration*) (BOMMARIUS, 1993).

Um dos critérios classicamente utilizados para a classificação dos reatores com membrana é baseado na configuração e na hidrodinâmica do sistema. De acordo com essa classificação são globalmente divididos em reator contínuo de mistura perfeita - CSTR e fluxo pistonado, com estas categorias subdivididas. Alguns reatores com membrana, de acordo com o regime de fluxo caem fora desta classificação. Por esta razão e por causa do advento dos reatores multifásicos PRAZERES e CABRAL (1994) propõem uma classificação mais ampla dos reatores com membrana, baseados no mecanismo de contato entre enzima e substrato. A classificação é:

- a) **Reatores com Membrana de Contato Direto:** são aqueles que promovem o contato direto entre enzima e substrato, ou seja, o substrato é adicionado do lado da membrana que contém a enzima, na maior parte dos casos solúvel. Neste caso as células de ultrafiltração tipo filtração tradicional compõem os reatores mais utilizados. Neste tipo de reator a separação ocorre no mesmo compartimento de reação, que por sua vez é pressurizado, pois o fluxo é forçado pelos poros da membrana, e pode-se considerar a unidade toda como um reator contínuo de mistura perfeita (Figura 2.3.5a).
- b) **Reatores com Membrana de Difusão:** são aqueles que promovem o contato enzima-substrato por difusão simples das moléculas de substrato através dos poros da membrana, ao compartimento adjacente onde está localizada a enzima (solúvel ou imobilizada). Estes reatores catalisam reações somente com substratos de baixa massa molar e o produto difunde após catálise para a mesma corrente de substrato não convertido. Esses reatores agem como dialisadores e força motriz é a concentração ao invés da pressão (Figura 2.3.5b).
- c) **Reatores com Membrana Multifásicos:** compreende uma classe de reatores capaz de promover o contato interfacial entre enzimas e substratos na matriz da membrana. Substrato e enzima podem estar localizados em ambas as fases e a difusão é o transporte de massa predominante. A membrana normalmente age como um suporte para a interface entre as duas fases líquidas (polar e apolar) onde se encontram os substratos e/ou produtos. A membrana não somente separa as duas fases imiscíveis, como também provê uma área de contato interfacial junto com a enzima que age como um catalisador interfacial. Este tipo de reator tem sido muito utilizado com lipases e fosfolipases (Figura 2.3.5c).

Figura 2.3.5. (a) Reatores com Membrana de Contato Direto, (b) Reatores com Membrana de Difusão, (c) Reatores com Membrana Multifásicos. •, Enzima; S_1 e S_2 , substratos e P_1 e P_2 , produtos (PRAZERES; CABRAL, 1994).

2.3.4. Aplicações de Reatores Enzimáticos com Membrana

Uma vez apresentados os princípios de operação, vantagens e desvantagens do uso de reatores com membrana, pode-se concluir que esta concepção de reator pode ser aplicada para qualquer reação enzimática cujo objetivo é desenvolver processos contínuos de elevada produtividade.

PRAZERES e CABRAL (1994) dividem algumas das principais aplicações em quatro tipos: hidrólise de macromoléculas, reações com regeneração do cofator, hidrólises e sínteses catalisadas por lipases e catálises em micelas reversas.

1. Hidrólise de macromoléculas

Aplicações cujo objetivo é principalmente a hidrólise de proteínas, peptídeos e carboidratos (amido, celulose, pectinas e maltodextrina). Neste tipo de processo, um dos maiores objetivos é a separação dos produtos de baixa massa molar e a retenção das macromoléculas de substrato (além da enzima) no reator, o que exige para esta aplicação reatores com contato direto entre enzima e substrato. Os reatores com membrana favorecem as reações nas quais o produto de hidrólise inibe a enzima. Em um processo de hidrólise enzimática de material celulósico, utilizando-se celulase, observou-se um aumento no grau de conversão, de 35% para 53%, quando se comparou o uso de reator enzimático com membranas com o processo descontínuo tradicional. Isso porque os açúcares fermentescíveis resultantes da hidrólise são inibidores da celulase (GAN *et al.*, 2002).

Além da hidrólise, outras aplicações podem ser feitas em reatores com membrana, como a modificação de macromoléculas. SLOMINSKA *et al.* (2002) estudaram o desenvolvimento de um reator enzimático com membranas, composto por um CSTR e uma unidade externa de ultrafiltração com módulo tipo *spiral-wound*, para a síntese enzimática de ciclodextrinas a partir de amido. A enzima ciclodextrina-glicosiltransferase e o substrato não convertido ficavam retidos no reator e a membrana separava o produto de acordo com as dimensões físicas.

2. Reações com Regeneração do Cofator

A possibilidade de imobilização de coenzimas em polímeros solúveis de elevada massa molar, como o PEG, aumentou o potencial de uso de processos enzimáticos em larga escala, antes limitado somente a degradações mais simples que fazem uso das hidrolases, pois a maioria das outras enzimas requer coenzimas na reação (BERKE *et al.*, 1988). Houve um crescente interesse no uso de reatores enzimáticos com membranas para a síntese de produtos de maior valor agregado (química fina), principalmente em compostos com atividade ótica ou separação de misturas racêmicas. Um grupo de reações que teve

interesse foram as reações que envolvem um segundo substrato como cofator ou coenzima, tal como: NAD^+ , NADP^+ , coenzima A ou ATP. Estas reações dependentes de coenzimas (reações de síntese, transferências de grupos ou de oxi-redução) são atrativas do ponto de vista industrial devido à grande variedade de produtos que podem ser obtidos. Porém, o custo dos cofatores é elevado e processos contínuos com essas reações são viáveis economicamente somente nos casos em que o cofator é regenerado. Se a coenzima não é imobilizada ela deverá ser removida do produto final tornando-se ideal retê-la dentro do reator.

Existe um número grande de publicações de aplicações de reatores com membrana com propostas para a regeneração de cofatores (PRAZERES; CABRAL, 1994). Os reatores com membrana oferecem a possibilidade de regeneração de cofatores usando uma segunda enzima e/ou outro substrato acoplados ao sistema reacional assim como a retenção do cofator por aumento de sua massa molar. Dependendo da configuração do reator e da porosidade da membrana, o cofator pode ser imobilizado por ligação covalente a polímeros solúveis como o PEG (polietileno glicol) e o cofator é então retido pela membrana por exclusão molecular ou repulsão eletrostática.

Este tipo de reator foi usado para a produção de diferentes compostos como: aminoácidos, glicose-6-fosfato, 6-fosfogliconato, lactato e lactonas. A empresa DEGUSSA AG desenvolveu um processo em grande escala para a produção de L-alanina a partir do ácido pirúvico, catalisado por L-alanina desidrogenase, com o NAD^+ sendo regenerado a NADH durante o processo por formato desidrogenase. Neste caso, o NADH é mantido no sistema por imobilização em PEG, com uma eficiência de cerca de 500.000 moléculas de produto sendo produzidas por molécula de NAD regenerado (PRAZERES; CABRAL, 1994). BERKE et al. (1988) imobilizaram a coenzima ATP em polietileno glicol (PEG), um polímero solúvel em água e obtiveram resultados satisfatórios com sistemas enzimáticos dependentes de ATP, como por exemplo a hexoquinase, utilizando a enzima acetato quinase para a regeneração do ATP. Existem sistemas dependentes de coenzimas que utilizam membranas carregadas negativamente como forma de reter o cofator dentro do reator. A retenção é obtida por repulsão eletrostática entre o cofator carregado negativamente e a membrana (GIORNO; DRIOLI, 2000).

3. Hidrólises e sínteses catalisadas por lipases

Atualmente, um grande número de aplicações de reatores enzimáticos com membranas usam lipases, devido ao grande interesse (científico e econômico) de pesquisa com estas enzimas nos últimos anos. Como as lipases atuam normalmente em interfaces de superfícies polares/apolares, reatores com membrana multifásicos, que promovem o contato interfacial entre enzimas e substratos, são adequados para este fim. A maioria dos exemplos de uso de lipases está relacionada com a hidrólise de lipídeos e gorduras para a

produção de ácidos graxos mono e di-glicerídeos e glicerol ou com a síntese de ésteres, incluindo-se reações de transesterificação e resolução de misturas racêmicas de ésteres (PRAZERES; CABRAL, 1994). SAKAKI *et al.* (2002) estudaram a resolução de uma mistura racêmica de ácido 2-hidroxi-octanóico usando uma lipase em um reator com membranas bifásico usando membranas capilares como suporte para a imobilização da enzima.

4. *Catálise em micelas reversas*

Este é um uso mais recente onde reatores com membrana também têm sido utilizados para o uso de enzimas microencapsuladas em micelas reversas. Membranas sintéticas semipermeáveis podem reter as micelas reversas que serão utilizadas na bioconversão. Porém, é preciso levar em consideração a estabilidade dos sistemas micelares frente ao cisalhamento normalmente encontrado nos equipamentos de ultrafiltração, além da possibilidade de contaminação do produto final com tensoativo (PRAZERES; CABRAL, 1994).

5. *Uso de sistemas multi-enzimáticos*

Reatores com membrana são interessantes também para a condução de reações sequenciais ou com duas ou mais enzimas agindo em conjunto. Existem casos na literatura de reatores que trabalham com duas enzimas agindo sinergisticamente no mesmo processo como o caso do uso de β -amilase/isoamilase e α -amilase/amiloglicosidase na produção de xaropes de maltose a partir do amido. Um caso de reação em seqüência foi relatado por Kragl e colaboradores (apud PRAZERES; CABRAL, 1994) da produção de ácido N-acetilneuramínico. Os autores usaram um epimerase para a isomerização de N-acetilglicosamina em N-acetilmanosamina, que foi então convertida no produto final pela adição de ácido pirúvico pela ação de uma liase.

A Tabela 2.3.4 apresenta exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor agro-alimentício.

Tabela 2.3.4. Exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor agro-alimentício (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Reação	Objetivo	Reator com Membrana
Hidrólise de pectinas em sucos de frutas	- O uso de pectinases e pectinoesterases imobilizadas em membranas de ultrafiltração aumentam o fluxo de permeado durante a clarificação de sucos de frutas, pois estas enzimas reduzem a viscosidade do meio.	- CSTR com membrana de ultrafiltração
Tratamento do vinho	- Células de <i>Leuconostoc oenos</i> imobilizadas em uma membrana microporosa foram usadas para acelerar a fermentação maloláctica (conversão do ac. málico em ac. láctico) em vinhos brancos.	- Membranas capilares de microfiltração
Tratamento de leite e soro de queijo	- Uso de reatores com membrana para a remoção de lactose de leites e laticínios para consumo humano. - Produção de hidrolisado de soro de queijo para a produção de intermediários farmacêuticos e alimentos infantis por ação de tripsina e quimotripsina. - Conversão da lactose em xarope de glicose e galactose por ação de β -galactosidase. - Hidrólise de K-caseína por endopeptidases em derivados de leite.	- Reatores tipo fibra oca (<i>hollow fiber</i>) com enzima gelificada sobre a membrana ou CSTR com membrana de ultrafiltração (UF).
Hidrólise de amido a maltose	- Para a produção de xaropes de glicose, por ação de α -amilase, β -amilase e pululanases	- CSTR com membrana de ultrafiltração (UF)
Hidrólise de celulose	- Hidrólise de celulose a celobiose e glicose por ação de celulasas e β -glicosidases para a produção de etanol e proteínas.	- Reator tipo fibra oca (<i>hollow-fiber</i>).

(continuação) Tabela 2.3.4. Exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor agro-alimentício (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Reação	Objetivo	Reator com Membrana
Tratamento de óleos e gorduras	- Hidrólise de triglicerídeos a ácidos graxos e glicerol por ação de lipases para uso em alimentos, cosméticos e emulsificantes.	- Reator com Membranas capilares de ultrafiltração.
	- Hidrólise de óleo de oliva.	- Reator com membrana hidrofóbica
	- Hidrólise de óleo de soja.	- Reator com membrana hidrofílica tipo fibra oca
	- Hidrólise de gordura de leite.	- Reator com membrana de polipropileno tipo "spiral-wound"
Fermentação	- Fermentação de açúcares por leveduras para a produção de álcool. - Cultivo Anaeróbio de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> para a produção de ácidos carboxílicos.	- CSTR com membrana de ultrafiltração (UF)
Conversão de glicose a ácido glicônico	- Por ação de glicose-oxidase e catalase para a prevenção do escurecimento e formação de odores desagradáveis durante o armazenamento de produtos contendo ovos.	- Reator com membranas tipo leito empacotado.

Diferentes sistemas têm sido utilizados na obtenção de produtos de uso farmacêutico utilizando-se reatores com membrana. Os principais produtos são aminoácidos, antibióticos, antiinflamatórios, drogas anticâncer, vitaminas, etc., como mostra a tabela 2.3.5. Os maiores problemas na obtenção destes produtos em larga-escala incluem: (1) o uso de cofatores de elevado custo; (2) a baixa solubilidade em água dos substratos; (3) a separação e purificação de produtos de misturas complexas. No entanto muitos estudos têm mostrado que os reatores com membrana podem superar estas dificuldades (GIORNO; DRIOLI, 2000). No caso de substratos com baixa solubilidade em

água, a reação heterogênea é conduzida em um sistema emulsionado, onde a fase orgânica contém o substrato e o produto é extraído na fase aquosa com a enzima adsorvida na interface. No entanto, o problema destes sistemas é o aumento de escala relacionados com a estabilidade da emulsão e com a separação das fases. O uso de enzimas em meio orgânico com baixo teor de água tem possibilitado inúmeras novas aplicações em biotransformações. Neste caso, o uso de enzimas imobilizadas, principalmente em matrizes hidrofílicas, auxilia na manutenção do conteúdo de água em torno da enzima, aumentando sua resistência à maioria dos solventes orgânicos (GIORNO; DRIOLI, 2000).

HERRMANN *et al.* (1991) fizeram um estudo do aumento de escala de um reator enzimático com membranas usado para síntese um dipeptídeo analgésico ("kyotorphin") sintetizado por α -quimotripsina. No processo enzimático foi integrado um HPLC *on-line* a um sistema de controle automático computadorizado, visando a produção semi-automática do dipeptídeo.

Tabela 2.3.5. Exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor farmacêutico e biomédico (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Reação	Objetivo	Reator com Membrana
Produção de Aminoácidos	- Conversão de ácido fumárico a ácido L-aspartico por aspartase de <i>Escherichia coli</i> para uso em fármacos e aditivos alimentares.	- "Entrapment" em gel de poliacrilamida
	- Conversão de ácido L-aspartico a L-alanina por <i>Pseudomonas dacunhae</i> para uso em fármacos	- Ligação iônica em DEAE-sephadex
	- Conversão de mistura racêmica D,L-acetil aminoácidos em L-aminoácidos por ação de aminoacilase (produção de enantiômeros opticamente puros)	- Membranas de ultrafiltração de polisulfona
	- Hidrólise de proteínas do trigo por ação de tripsina e quimotripsina para a produção de peptídeos para uso clínico	- Aprisionamento em membrana de poliuretano
	- Hidrólise de arginina e asparagina por ação de arginase e asparaginase no uso de tratamento de leucemia (drogas anticâncer)	- Aprisionamento em membrana de triacetato de celulose.
	- Síntese de tirosina por tirosinase	- Confinamento em membrana de ultrafiltração carregada
	- Reações de desidrogenação por sistemas enzimáticos dependentes de NAD(P)H na produção de aminoácidos enantioméricos	
Produção de Esteróides	- Conversão de cortexolona em hidrocortisona por ação de <i>Curvularia lunata</i> e <i>Cândida simplex</i>	- "Entrapment" em gel de poliacrilamida
Produção de antiinflamatórios	- Hidrólise de ciano-ésteres em ibuprofeno por ação de lipase	- Aprisionamento em reator hollow-fiber bifásico

(continuação) Tabela 2.3.5. Exemplos de aplicações de reatores com membrana no setor farmacêutico e biomédico (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Reação	Objetivo	Reator com Membrana
Produção de antibióticos	- Produção de ampicilina e amoxilina por penicilina amidase	- Aprisionamento em membrana de triacetato de celulose.
	- Hidrólise de 5- <i>p</i> -HP-hidantoína em D- <i>p</i> -HP-glicina por ação de hidantoinase e carbamilase para produção de intermediários na produção de cefalosporina	-Aprisionamento em membranas de ultrafiltração de polisulfona
Produção de oligonucleotídeos	- Hidrólise de DNA por ação de DNase	- Gelificação em membranas capilares de ultrafiltração

No caso de cultivos microbianos, a aplicação de um reator contínuo de membranas, que consiste de um biorreator tradicional acoplado à uma unidade de ultrafiltração, pode trazer vantagens para a etapa de purificação. Durante a operação do reator seu volume é mantido constante pela adição de meio de cultura esterilizado e a solução permeada contém o produto extracelular, junto com outras moléculas não retidas pela membrana. Um exemplo é o da produção de ácido láctico por bactérias (GIORNO; DRIOLI, 2000).

Outro uso de reatores com membrana que tem atraído muito investimento é no desenvolvimento de órgãos artificiais. São utilizados para tratamentos extra-corporais ou reposição de órgãos. Em muitas aplicações da área médica as membranas já são utilizadas. Um exemplo são as hemodiálises em rim artificial, onde a membrana permite a remoção de toxinas do sangue arterial e em pulmões artificiais onde o sangue passa por membranas hidrofóbicas que permitem a troca de gases, mas não de líquidos. Reatores com membrana usando células animais, fragmentos de tecidos ou enzimas poderão ter importantes aplicações, tais como: (1) o pâncreas artificial com ilhotas de Langerhans, células produtoras de insulina e reguladora do nível de glicose no sangue do paciente. Este pâncreas de membrana bioartificial representa uma alternativa ao transplante de órgãos em pacientes diabéticos dependentes de insulina; (2) outro uso de membranas em equipamentos extra-corpóreo é a imobilização de hepatócitos em membranas de hollow-fiber em fígados artificiais para o tratamento temporário de pacientes na fila de transplante de fígado (AMBROSINO *et al.*, 2002; GIORNO; DRIOLI, 2000).

Outro uso recente de reatores com membrana é no tratamento biológico de efluentes. Muitos estudos tem sido desenvolvidos no uso de membranas e reatores com

membrana para esta finalidade (BEM AIM; SEMMENS, 2003). FANE e CHANG (2002) apontam uma forte tendência do uso de membranas submersas para o projeto de biorreatores com tratamento de efluentes. Neste tipo de reator as membranas de microfiltração fazem a remoção de sólidos suspensos, tais como bactérias, vírus e macromoléculas, fazendo a redução parcial da DBO (demanda bioquímica de oxigênio) do efluente, enquanto as membranas de ultrafiltração retêm orgânicos de baixa massa molar. Borbulhamento de gás no interior do reator e o *backflushing* são utilizados neste caso para controlar a deposição de material e o *fouling*. Um exemplo de caso é o uso de membranas tipo fibras ocas submersas.

Outros usos de reatores com membrana incluem o tratamento de águas e efluentes por microrganismos tais como *Mycobacterium*, *Pseudomonas putida* e *Hyphomicrobium*, capazes de degradar tricloroetileno, etileno e dimetilsulfetos (GIORNO; DRIOLI, 2000). FUCHS *et al.* (2003) estudaram o tratamento anaeróbico de três diferentes efluentes ("cama de frango", resíduos agrícolas e efluente sintético) usando um tanque agitado acoplado a uma unidade de ultrafiltração tangencial e obtiveram uma elevada produção de biogás. BÓDALO *et al.* (2001) apontaram o uso de reatores com membrana para a remoção de contaminantes tóxicos como fenóis e clorofenóis por peroxidase. LÓPEZ *et al.* (2002) fizeram uso de um reator enzimático com membrana biocatalítica para a degradação de corantes por peroxidases.

Pode-se utilizar ao invés da enzima células intactas para a biotransformação, com a vantagem de se utilizar membranas de microfiltração no lugar das de ultrafiltração. SHI *et al.* (1996) demonstraram a produção de ácido L-aspartico a partir de fumarato com células de *Escherichia coli* contendo aspartase. Neste tipo de reator o fluxo pode diminuir rapidamente devido à formação de gel de polarização sobre a membrana. Uma agitação adequada e a operação de *backflushing* destroem esta camada (SHI *et al.*, 1996).

PRAZERES e CABRAL (1994) apontam em sua revisão tópicos que representarão novos nichos de pesquisa para o uso de reatores com membrana:

- Exploração de campos elétricos como força motriz para o transporte de solutos por membranas e eventualmente como técnica alternativa para a regeneração de cofatores;
- Utilização dos reatores com membrana em reações que formam produtos insolúveis para explorar a capacidade de ultrafiltração das membranas de reter produtos sólidos;
- Pesquisa de reatores com membrana com reações sequenciais catalisadas por sistemas multi-enzimáticos;
- Melhora na eficiência de reatores com membrana pelo uso de equipamentos em série ou paralelo;
- Uso de reatores com membrana para o desenvolvimento de processos de síntese enzimáticas de compostos quirais de aplicação farmacêutica.

2.4. INVERTASE

A sacarose é um dissacarídeo que por hidrólise libera uma molécula de α -D-glicose e uma de β -D-frutose. A hidrólise da sacarose pode ser feita por via ácida ou enzimática, catalisada pela enzima β -fructofuranosil-fructohidrolase ou β -fructofuranosíase (EC 3.2.1.26), mais conhecida como invertase ou sacarase (VITOLO, 1979). A invertase catalisa a hidrólise do terminal não redutor de carboidratos β -D-fructofuranosídicos em β -fructofuranosídeos quebrando uma ligação glicosídica α -1,4, e por exemplo, no caso da hidrólise da sacarose [O- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-frutofuranosídeo], obtém-se uma mistura equimolar de glicose e frutose, como mostra a Figura 2.4.1.

Figura 2.4.1. Hidrólise da sacarose pela ação da invertase.

Dentre as várias aplicações para a invertase, destaca-se a fabricação de xarope de glicose-frutose a partir de substratos ricos em sacarose como: açúcar de cana, açúcar de beterraba ou melaço. Da ação da invertase sobre a sacarose ($[\alpha]_D = +66,5^\circ$) obtém-se uma mistura levógira de açúcares redutores (glicose: $[\alpha]_D = +52,5^\circ$ e frutose: $[\alpha]_D = -92^\circ$), surgindo daí o nome "açúcar invertido", que é dado à mistura de monossacarídeos (RIBEIRO, 1997).

O substrato para a invertase deve necessariamente possuir um resíduo β -fructofuranosil não substituído, ou seja, livre. A enzima combina-se, primariamente, com este grupo através do oxigênio osídico e dos grupos hidroxila dos carbonos 6 e 3. Talvez ocorra uma interação com a hidroxila do carbono 2 da glicose, visto ser a sacarose o substrato preferencial. É perfeitamente aceito que a ruptura se dê pelo lado do grupo β -fructofuranosil (VITOLO, 1979).

Tanto a hidrólise ácida como a enzimática da sacarose possui vantagens e desvantagens. Na hidrólise ácida o catalisador e o processo global apresentam custo baixo. Porém, em função da elevada temperatura do processo, a solução de açúcar invertido apresenta coloração devido à oxidação e formação de subprodutos, e uma baixa conversão da matéria prima. A hidrólise enzimática apresenta elevada conversão, um tempo de

residência no reator menor que o do método químico, baixa temperatura do processo e principalmente, a solução de açúcar invertido é incolor e mais pura que a proveniente do método químico. Porém, uma das desvantagens é que ao se aplicar a enzima na forma livre normalmente utiliza-se o processo em batelada, o que dificulta a reutilização da enzima no lote seguinte. O desafio da hidrólise enzimática continua sendo o desenvolvimento de processos contínuos eficientes, onde o custo do biocatalisador seja minimizado. De modo geral, os processos enzimáticos vêm sendo viabilizados satisfatoriamente com a tecnologia de enzimas imobilizadas e o desenvolvimento de processos em reatores com membrana de ultrafiltração (RIBEIRO, 1997).

A invertase foi sem dúvida uma das primeiras carboidrases a ser estudada e sua história se inicia por volta do início do século XIX, quando descobriu-se a ação invertásica da levedura que desde então motivou inúmeros trabalhos científicos e tecnológicos (VITOLLO, 1979). Historicamente, a invertase foi uma das primeiras enzimas a ser obtida na forma de extrato bruto, e já em meados do século passado, encontrava-se disponível no comércio (VITOLLO, 1983).

A fabricação do açúcar invertido reveste-se de grande importância industrial, apresentando vantagens de possuir poder adoçante superior ao da sacarose e de não cristalizar quando usado em concentração elevada (VITOLLO, 1979). A invertase também pode ser utilizada em produtos para higiene bucal, na hidrólise da rafinose, gentianose e inulina para obtenção de melibiose, gentiobiose e D-frutose, respectivamente. Também é importante para a hidrólise da sacarose existente no melaço da cana de açúcar ou beterraba no preparo de meios de cultivo para microrganismos não produtores de invertase. Dentre as aplicações atuais encontra-se a utilização da invertase na forma imobilizada em biossensores, para a determinação potenciométrica da concentração de sacarose (RIBEIRO, 1997).

A invertase pode ser obtida de diferentes leveduras, mas sem dúvida sua principal fonte é a *Saccharomyces cerevisiae* do levedo comercial ou fermento de pão. Em menor escala também se destaca a *Saccharomyces carlsbergensis* como produtora de invertase.

A levedura usada na extração da invertase poderá provir da biomassa residual de destilarias de álcool ou de cultivos microbianos em meio contendo melaço de cana de açúcar, através de processo fermentativo contínuo, descontínuo ou descontínuo-alimentado (VITOLLO *et al.*, 1985; VITOLLO *et al.*, 1987). As células, uma vez obtidas, são separadas do caldo fermentado e a seguir submetidas à ruptura mecânica ou autólise a fim de extrair a invertase. O extrato enzimático pode ser concentrado e purificado, por exemplo, por precipitação com acetona ou simplesmente comercializado como extrato bruto após adição de produtos estabilizantes (VITOLLO, 1979).

A célula de levedura é constituída de parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, um ou mais vacúolos, mitocôndrias, glóbulos de gordura, grânulos de volutina e citoplasma. A parede celular, que é responsável pela forma da célula da levedura, é

constituída pelas seguintes substâncias: glucana, manana, proteínas, lipídeos, material inorgânico e quitina (VITOLLO, 1979). Em geral, a invertase produzida pela levedura não é liberada para o meio (ou seja, é intracelular), mas fica retida no espaço periplásmico da célula. Foi demonstrada a existência de dois tipos de invertase na célula de *S. cerevisiae*: uma situada no citoplasma e desprovida de manana (intracitoplasmática); e outra, situada no espaço periplásmico contendo este polissacarídeo e representando 95% da enzima produzida pela levedura (extracitoplasmática) (RIBEIRO, 1997; VITOLLO, 1983). A manana é um polímero de manose contendo N-acetilglicosamina e fosfato que está associado a um peptídeo.

A invertase extracitoplasmática apresenta massa molar de 270 kDa e possui cerca de trinta cadeias de manana por molécula, ligadas à fração protéica através de ligações glicosamil-asparagina (RIBEIRO, 1997). É uma glicoproteína com aproximadamente 50%(p/p) do seu conteúdo na forma de carboidratos (TREVISAN, 1993) e possui uma estrutura quaternária com duas cadeias polipeptídicas que se associam formando estruturas quaternárias tetraméricas, hexaméricas ou até octaméricas (RIBEIRO, 1997). A invertase extracitoplasmática está instalada entre a parede celular e a membrana citoplasmática, ou seja, no espaço periplásmico. A invertase intracitoplasmática tem massa molar de 135 kDa (VITOLLO, 1979; VITOLLO, 1983).

A faixa de pH ótimo para atividade da enzima está entre 4,0 e 5,0; mais especificamente em pH 4,5 – 4,6 (RIBEIRO, 1997). O pH de estabilidade encontra-se entre 3,5 e 5,5. Contudo, em valor de pH igual a 3,0 a invertase permanece com 80% da sua atividade catalítica e em pH 8,0 a atividade cai à metade (TREVISAN, 1993).

A atividade máxima é alcançada na faixa de temperatura entre 40 e 55°C, em presença de soluções diluídas de sacarose. Em temperaturas abaixo de 40°C a invertase é bem estável, com perda de atividade mínima, inferior a 5%. Porém, para valores acima de 40 °C a queda de atividade se acentua e a 60 °C, 80% da atividade é perdida irreversivelmente (VITOLLO, 1979). Elevadas concentrações de sacarose aumentam a estabilidade da enzima e podem permitir sua utilização em temperaturas de até 65 - 70°C (TREVISAN, 1993).

Existem várias substâncias que inibem a invertase. Inorgânicas, como os íons: Ag^+ , Hg^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} e I^- ; e, orgânicas, como: anilina, o,m,p-toluidina, tri-cloro e tri-bromo anilinas, ácido aminobenzóico, ácido sulfanílico e ácido iodo-acético. Os inibidores inorgânicos podem ser eliminados do meio de reação com a adição de agentes quelantes como EDTA (VITOLLO, 1979).

Observa-se para a invertase que a velocidade da reação diminui com o aumento da concentração de substrato, ou seja, a equação de Michaelis-Menten é parcialmente válida. Para a sacarose, o decréscimo da velocidade se inicia após o substrato atingir cerca de 10% (p/v) e cai à metade com cerca de 25 % (p/v) (VITOLLO, 1979), podendo atingir um quarto da atividade inicial com 70% (p/v) (TREVISAN, 1993). Os efeitos que causam essa

redução na velocidade da reação são: menor concentração de água no sistema, efeitos inibitórios do substrato sobre o catalisador e aumento da viscosidade do meio (VITOLO, 1979). Existe uma relação entre velocidade de reação da invertase e viscosidade, como foi verificado por VITOLO (1979), que aumentou a viscosidade do meio com carboximetilcelulose (CMC) mantendo fixa a concentração de substrato em 10% (p/v). Com o aumento da viscosidade do meio de 1,3 para 8,6 cP a velocidade de reação da invertase apresentou queda de aproximadamente 50% de um extremo a outro.

VITOLO (1979) determinou os parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para a invertase extraída de levedura de panificação (*S. cerevisiae*). Os valores médios calculados por diferentes métodos de linearização da equação cinética de Michaelis-Menten (Lineweaver-Burk, Woolf, Hofstee, Cornish-Eisenenthal) estão mostrados na Tabela 2.4.1. A não concordância dos valores para os parâmetros cinéticos da invertase pode ser atribuída a fatores como: as preparações enzimáticas possuem graus de pureza diferentes, a existência de isoenzimas gera parâmetros cinéticos distintos, diferentes métodos analíticos e métodos gráficos são empregados na determinação e o uso de diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Para muitas invertases o K_M encontra-se próximo a 30mM.

Tabela 2.4.1. Valores das constantes cinéticas K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para a invertase solúvel.

Referência	Microrganismo	K_M	$V_{m\acute{a}x}$
VITOLO (1979)	<i>S. cerevisiae</i> (Levedura de panificação)	$25,5 \pm 7,3$ mM	$0,654 \pm 0,120$ (mg AR/ml.min)
NELSON (1933) apud VITOLO (1979)	<i>S. cerevisiae</i>	16 – 40 mM	N.D.
BERGGREN (1969) apud VITOLO (1979)	<i>S. cerevisiae</i>	18 – 32 mM	N.D.
RIBEIRO (1997)	<i>S. cerevisiae</i> (Sigma ^R grau V)	18,5 mM	0,104 (mg ART/ml.min)
N.D. dado não disponível			

2.5. FRUTOSE

Até a década de 1960, a frutose era tradicionalmente produzida a partir de soluções de açúcar invertido usando o método do frutonato de cálcio para separação. Este envolve a mistura de hidróxido de cálcio com soluções de açúcar invertido, tratamento com dióxido de carbono e separação do carbonato de cálcio, seguido de evaporação a vácuo e cristalização fracionada do frutonato de cálcio. A partir de 1964 a frutose passou a ser produzida em escala industrial usando resinas de troca iônica para sua separação do açúcar invertido (CRUEGER; CRUEGER, 1984). A frutose também pode ser produzida por isomerização da glicose, utilizando-se a enzima glicose-isomerase e produzindo-se xaropes com elevada concentração de frutose (*High Fructose Corn Syrups* – HFCS). Os xaropes de frutose, que são uma mistura de frutose e glicose de elevada viscosidade, são muito parecidos ao mel e as principais fontes de glicose industriais são os hidrolisados de milho (COKER; VENKATASUBRAMANIAN; 1985b)

Até 1976 tem-se informação de que a sacarose foi utilizada comercialmente como o principal adoçante da indústria alimentícia, com a produção mundial a partir da cana de açúcar (60%) e a partir da beterraba (40%). Em 1976 foi produzido um total de 81×10^6 toneladas de sacarose (CRUEGER; CRUEGER, 1984). A partir de então, a posição no mercado mundial da sacarose caiu, principalmente com o advento dos xaropes de frutose obtidos enzimaticamente de hidrolisado milho - HFCS (*High Fructose Corn Syrups*). Em 1981, o consumo de sacarose caiu nos EUA em cerca de 29%, devido à substituição pelo xarope de frutose. O xarope de frutose passou a ter custo equivalente ou até inferior à sacarose nos EUA, em 1981 seu valor no mercado foi 30% inferior ao valor da sacarose, o que facilitou a sua entrada no setor alimentício. Em 1984 a venda de xarope de frutose excedeu 10 bilhões de libras nos EUA, representando cerca de 34% do mercado americano de adoçantes (COKER; VENKATASUBRAMANIAN; 1985b).

A técnica de isomerização foi desenvolvida inicialmente no Japão e depois nos EUA, e este processo ganhou destaque com o avanço na tecnologia de imobilização de enzimas em suportes insolúveis, o que permitiu o uso de processos contínuos com menor custo do biocatalisador. Desde 1977, esta linha de produção de frutose por isomerização da glicose foi uma das primeiras e principais aplicações comerciais com destaque de enzimas imobilizadas (CRUEGER; CRUEGER, 1984). A evolução da tecnologia para a produção de adoçantes a partir do milho foi um dos passos mais significativos da Biotecnologia. O descobrimento, isolamento e aplicação de diversas carboidrases resultou no desenvolvimento de muitos tipos de hidrolisados de milho, utilizados como adoçantes. O termo “adoçante de milho” é utilizado para os carboidratos preparados a partir de hidrolisado de milho (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985b).

Geralmente, o xarope de glicose é obtido da sacarificação do amido de milho (enzimática) e purificado por filtração e resina de troca iônica. A maior parte da glicose é obtida por via enzimática da sacarificação do amido, principalmente o de milho. Sua produção é feita a partir de xarope de milho com grau de hidrólise de 95 a 98%. O xarope é refinado por filtração ou centrifugação, tratado com carvão ativado e com resinas de troca iônica. Este xarope possui em média concentração de sólidos de 70 a 78 %p/p (PEPPLER; REED; 1987).

Para a produção do xarope de frutose, geralmente se utiliza o hidrolisado de milho contendo 94 a 96% do peso seco em glicose. Utilizando este nível de glicose seria de se esperar obter de 47 a 48% de frutose no equilíbrio, uma vez que a conversão da glicose a frutose é uma reação reversível com constante de equilíbrio de aproximadamente 1 a 60°C (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 b). No entanto, a reação é muito lenta para atingir o equilíbrio e é mais produtivo parar a reação com um nível de conversão de 42%, de forma a se obter tempos de residência adequados. O tempo de residência utilizado nos reatores com glicose-isomerase varia de 0,5 a 4 horas (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 b). Depois da isomerização o xarope de frutose é tratado com carvão ativado, resinas de troca iônica e então concentrado.

Tabela 2.5.1. Características típicas do xarope de frutose (CRUEGER; CRUEGER, 1984).

Peso Seco.....	71%
pH.....	4 a 5
Sólidos insolúveis.....	0,05 a 0,1%
Frutose.....	42% (em peso seco)
Glicose.....	53% (em peso seco)
Oligossacarídeos.....	5% (em peso seco)

O preparo do HFCS enriquecido em frutose (acima de 42%) pode ser por concentração do HFCS 42%. Muitas técnicas de separação da frutose podem ser utilizadas para esse propósito. Elevados níveis de frutose podem ser alcançados com o fracionamento do xarope de frutose 42% em colunas cromatográficas. A frutose é mais fortemente adsorvida por grupos catiônicos do que a glicose (PEPPLER; REED, 1987). A frutose forma, por exemplo, complexos com cátions como cálcio mais facilmente que a glicose, e com isso muitas resinas catiônicas em leitos empacotados são utilizadas para separar a frutose por técnicas cromatográficas (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 b). Xarope de frutose contendo aproximadamente 90% de frutose é o mais enriquecido que se conhece. Frações entre 42% e 90% podem ser obtidas por mistura dos xaropes de diferentes concentrações (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 b).

Na maioria das aplicações, os xaropes de frutose (HFCS) substituem a sacarose como adoçante. A D-glicose possui apenas 70 a 75% do poder adoçante da sacarose, porém a frutose possui o dobro do poder adoçante da sacarose. A frutose também é muito utilizada em produtos dietéticos porque é absorvida mais lentamente no estômago e intestino, e com isso não afeta rapidamente o nível de glicose no sangue (CRUEGER; CRUEGER, 1984).

Xaropes contendo 42% em peso seco de frutose (HFCS 42%) podem ser utilizados na maioria dos produtos da indústria alimentícia que fazem uso de adoçantes líquidos. O desenvolvimento de uma segunda geração de xaropes, mais concentrados em frutose, aumentou o número de aplicações. Por exemplo o uso de HFCS 55% em frutose substituiu quase que toda a sacarose em bebidas e refrigerantes. HFCS com 90% em frutose (o mais concentrado até o momento) tem grande aplicação em produtos novos e especializados do setor alimentício, sendo ideal para alimentos de reduzido teor calórico como geléia e gelatinas (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 a, 1985 b).

Os HFCS possuem preço competitivo à sacarose nos EUA, e isso facilitou a substituição da sacarose pelo xarope de frutose no setor alimentício, principalmente: em bebidas, frutas enlatadas, sorvetes e produtos de panificação. A indústria de bebidas é um dos ramos industriais de maior consumo de produtos adoçantes. Em 1984 a maioria das indústrias americanas de bebidas substituíram a sacarose pelo HFCS. Em 1985, no mercado americano, 50 a 60% dos HFCS produzidos foram utilizados na indústria de bebidas, 14% no setor de panificação e 7% no setor de enlatados (COKER; VENKATASUBRAMANIAN; 1985 b).

Tabela 2.5.2. Composição típica de carboidratos dos xaropes de frutose (HFCS) (COKER; VENKATASUBRAMANIAN, 1985 a).

	HFCS 42%	HFCS 55%	HFCS 90%
	(%)*	(%)	(%)
Frutose	42	55	90
Dextrose	52	42	7
Monosacarídeos (totais)	94	97	97
Polissacarídeos	6	3	3

* percentual em relação ao peso seco

Tabela 2.5.3. Composição típica de adoçantes comerciais (PEPPLER; REED, 1987).

	Sólidos Totais (%)	Processo de conversão	Grau de Hidrólise (%)	% sacarídeos***				Poder Adoçante**
				F	G	M	P	
Sacarose	100	-	-	0	0	0	0	1
Açúcar Invertido	77	Ácido	100	45	48	0	4	1,2 – 1,3
Glicose	91	Enzimático	99,5	0	99	0	1	0,75
HFCS 42% *	71	Multi Enzimático	-	42	52	2	4	1
HFCS 80% *	77	Multi Enzimático	-	80	19	0	1	1,1 – 1,6

*HFCS = *High Fructose Corn Syrup* - xarope de frutose obtida a partir de isomerização de xarope de glicose de milho.

** poder adoçante em relação à sacarose (base seca).

*** F...frutose; G...glicose; M...maltose; P...polissacarídeos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Enzima

3.1.1.1. Invertase

Foi empregada a Invertase (E.C.3.2.1.26) SIGMA® (Grade V: Practical - número de catálogo I-9253 *from Baker's Yeast* - obtida de levedura de panificação liofilizada e apresentada na forma de sólido). O sólido contendo a invertase apresentou atividade catalítica nominal entre 30 e 50 U/mg. De acordo com o fabricante, uma unidade (U) de atividade corresponde à quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de sacarose a 55°C e pH=4,5.

O produto adquirido da SIGMA consiste em células de levedura seca, que formam suspensão não homogênea (grumos) quando dispersas em água ou tampão (ver Apêndice A). Com hidratação e sob agitação, a suspensão torna-se facilmente homogeneizável.

Tamização da Invertase em Peneiras Mesh

Para tornar o pó invertásico mais homogêneo para ser utilizado nos ensaios de determinação da cinética da invertase, moeu-se uma dada quantidade em almofariz com pistilo, que era mantido em um banho de gelo para minimizar a desnaturação da enzima. A seguir, realizou-se uma separação granulométrica, utilizando-se peneiras Tyler/Mesh. Utilizou-se a fração recolhida entre as peneiras (-32; +325) Tyler/Mesh, ou seja, fração com diâmetro de partícula compreendido entre 45 e 500 μ m. Essa fração foi armazenada em frasco seco sob refrigeração.

Concentração das Suspensões Utilizadas nos Ensaios de Caracterização da Invertase

A concentração das suspensões utilizadas nos ensaios de determinação da cinética da invertase, determinação dos parâmetros termodinâmicos e influência do pH foi de 40 μ g/mL de invertase (células secas) diluída em água destilada ou tampão acetato de sódio 50mM pH 4,6. Para os ensaios de determinação da velocidade de reação em função da concentração de enzima, as suspensões foram preparadas em concentrações que variaram de 10 a 500 μ g/mL. A suspensão era sempre mantida sob agitação contínua em agitador magnético para a realização dos ensaios de cinética a fim de evitar sedimentação dos grumos e minimizar a falta de homogeneidade na suspensão enzimática (Apêndice A).

O volume recomendado para a preparação da enzima foi de no mínimo 1L para evitar erros de pesagem.

3.1.2. Substrato

3.1.2.1. Sacarose

Soluções de Sacarose Utilizadas nos Ensaios de Caracterização da Invertase

As soluções de sacarose (P.A. Merck®) utilizadas nos ensaios de caracterização da invertase foram preparadas em água destilada e armazenadas por congelamento. Para os ensaios de determinação da cinética enzimática foram preparadas soluções nas concentrações de 100mM a 2M. Para os ensaios de determinação dos parâmetros termodinâmicos, influência da concentração de invertase e influência do pH, a solução de sacarose foi preparada sempre na concentração de 500 mM. A concentração da solução de sacarose utilizada para os ensaios de determinação da atividade enzimática da invertase foi de 500 mM.

Soluções de Sacarose Utilizadas no Biorreator

As soluções de sacarose utilizadas na alimentação do biorreator foram preparadas da seguinte forma:

- Em um Becker, pesava-se a massa de sacarose P.A. (Merck®) necessária para a concentração em estudo e diluía-se com uma fração do volume total de tampão acetato de sódio 50 mM no pH em estudo. O tampão acetato de sódio foi o único utilizado nos ensaios. Por exemplo, para o preparo de 500 mL de uma solução 500 mM de sacarose pesava-se 85,57 g de sacarose e para o preparo de 500 mL de uma solução 1M pesava-se 171,15 g de sacarose;
- Transferia-se quantitativamente a solução obtida para um balão volumétrico de 500 mL, onde completava-se o volume com tampão acetato, tomando-se o cuidado de agitar bem a solução durante a dissolução;
- Para garantir que as impurezas presentes na sacarose não interferissem na vazão de saída do biorreator, a solução de sacarose foi filtrada a vácuo em membranas Millipore (cód.GSWP04700) de éster de celulose de 47 mm de diâmetro, porosidade igual a 0,22µm, utilizando um sistema de microfiltração da Millipore®. As soluções preparadas eram congeladas para utilização posterior.

3.1.3. Soluções Tampão

Tampão Acetato 50mM

Este tampão foi preparado a partir da mistura de soluções equimolares (50mM) de acetato de sódio e de ácido acético, utilizando-se um pHmetro para ajuste do valor do pH desejado. Para o preparo da solução acetato de sódio 50 mM pesava-se 4,10g de acetato de sódio P.A. em um balão volumétrico de 1L e avolumava-se com água destilada. Para o preparo da solução de ácido acético 50 mM, pesava-se 3,3 g de ácido acético glacial em balão volumétrico de 1L e avolumava-se com água destilada.

O tampão acetato 50 mM foi utilizado nos seguintes valores de pH: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 4,6; 5,0 e 5,5.

Tampão Fosfato 50mM

Este tampão foi preparado a partir da mistura de soluções equimolares (50mM) de fosfato de sódio monobásico e de fosfato de sódio dibásico, utilizando-se um pHmetro para ajuste do valor do pH desejado com estas soluções. O tampão fosfato 50 mM foi utilizado nos seguintes valores de pH: 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0.

3.1.4. Reativo de DNS

O reativo foi preparado da seguinte forma: de um total de 1400 mL de água destilada, adicionava-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) em 1000 mL da água, com vigorosa agitação até dissolução de todo o ácido. Após esta etapa, adicionavam-se 19,8 g de hidróxido de sódio. Após dissolver todo o NaOH, adicionava-se nesta ordem: 306 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 7,6 g de fenol (aquecido em banho de água a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Era importante que esses reagentes fossem adicionados na ordem mencionada e após dissolução completa do reagente anterior. Utilizava-se o restante da água (400 mL) para a lavagem dos recipientes em que foram pesados os reagentes. Uma vez pronta a solução, esta foi filtrada (em filtro de algodão) e armazenada em frasco escuro sob condições mínimas de luminosidade. O prazo de validade é de seis meses.

Tabela 3.1.1. Composição do reativo de DNS em porcentagem em peso.

Componente	(% p/p)
Ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS)	0,60
Hidróxido de sódio	1,13
Tartarato duplo de sódio e potássio	17,50
Fenol	0,43
Metabissulfito de sódio	0,47
Água destilada	q.s.p.

3.1.5. Membranas

As membranas usadas nos ensaios com a invertase, presente em células intactas de *Saccharomyces cerevisiae*, foram de microfiltração marca Millipore® (cód. HAWP04700) fabricadas em éster de celulose com 0,45 μm de poro e 47 mm de diâmetro / Branca Lisa. Para a acomodação correta desta membrana entre a base da célula de ultrafiltração e o respectivo anel de vedação foi necessário a usinagem de um vazador em aço temperado para corte desta membrana no diâmetro entre 44,5 e 44,8 mm.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Determinação da Atividade da Invertase

A atividade enzimática da invertase foi avaliada através da medida dos produtos de hidrólise da sacarose, portanto foi feita pela dosagem dos açúcares redutores formados. A dosagem dos açúcares redutores (frutose e glicose) pode ser feita pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Estes açúcares reduzem o DNS, gerando complexos de coloração alaranjada, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria a 540 nm. A construção de uma curva padrão contendo glicose e frutose permite associar a absorvância com a concentração dos produtos de reação da invertase. Desta forma, é possível medir-se a velocidade de formação dos produtos por volume ou massa de enzima utilizada, em um

dado intervalo de tempo, ou seja, a velocidade da reação enzimática em $\left[\frac{\mu\text{moles de AR}}{\text{mL} \times \text{min}} \right]$
ou $\left[\frac{\text{mg de AR}}{\text{mL} \times \text{min}} \right]$.

O método utilizado para a determinação da atividade enzimática da invertase neste trabalho foi baseado nos procedimentos utilizados por VITOLO (1979; 1983) e RIBEIRO (1997), foi chamado de procedimento padrão e está descrito a seguir.

Em tubos de ensaio tipo *Folin-Wu* ou similar com graduação para 25 mL adicionavam-se 200 μL da solução de sacarose 500 mM e 600 μL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,6). Homogeneizava-se e incubava-se a 37°C por 10 minutos. Após esse período, adicionavam-se 200 μL da amostra contendo a invertase, convenientemente diluída. Homogeneizava-se e cronometravam-se 10 minutos, mantendo-se a 37°C em banho termostatizado. Terminava-se a reação enzimática com a adição de 1,5 mL do reativo de DNS, agitava-se, fervia-se por 5 minutos, e procedia-se à determinação dos açúcares redutores totais formados na reação, conforme método do DNS (item 3.2.3.1). Preparava-se o branco da amostra adicionando-se a enzima após a adição do reativo de DNS.

Figura 3.2.1. Fluxograma da metodologia para a determinação da atividade enzimática da invertase.

Cálculo da Velocidade de Reação ou Atividade Enzimática

Calculou-se a velocidade de reação (v) após a determinação da concentração de açúcares redutores formada durante a reação, através da equação:

$$v = \frac{[AR]_F}{V_{\text{Amostra}} \times t} \quad \left(\frac{U}{ml} \right) \text{ ou } \left(\frac{mg \text{ AR}}{ml \cdot \text{min}} \right) \quad (\text{Equação 3.2.1})$$

Onde: $[AR]_F$ = quantidade de açúcares redutores totais (mg/mL) formados durante a hidrólise da sacarose, V_{amostra} = volume de amostra utilizado (mL) e t = tempo de reação (minuto). Para o procedimento padrão a equação 3.2.1 fica reduzida à equação 3.2.2.

$$v = \frac{[AR]_F}{2} \quad (\text{Equação 3.2.2})$$

Uma unidade de atividade enzimática da invertase foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a formação de um miligrama de açúcares redutores (mistura equimolar de glicose e frutose) por minuto, sob condições padronizadas de pH 4,6, temperatura de 37°C e concentração de sacarose no meio de reação de 100 mM.

3.2.2. Reator Enzimático com Membrana

3.2.2.1. Biorreator REM 01

Este biorreator consistiu em um reator enzimático com membrana (REM) adaptado para este fim a partir de uma célula de ultrafiltração agitada AMICON® Modelo 8050. O desenho esquemático e a foto da célula em operação estão apresentados na Figura 3.2.2. A célula de ultrafiltração possui um volume útil de 50 mL. A alimentação é contínua no reator e, portanto este opera como um reator contínuo de tanque agitado (CSTR - *continuous stirred tank reactor*) não ideal.

Figura 3.2.2. Célula de Ultrafiltração agitada AMICON® adaptada como reator enzimático com membranas. (A) Esquema da célula; (B) Foto da célula em operação.

A agitação do conteúdo do biorreator é feita com o auxílio de um agitador magnético posicionado na parte inferior da célula e uma barra interna de agitação magnética. Mantendo-se o fluido agitado durante a operação, reduz-se o efeito de concentração de polarização na membrana. A vazão de alimentação é mantida por meio de uma bomba peristáltica dosadora e a temperatura é mantida constante por meio de um banho termostatzado com agitador marca QUIMIS, posicionado em uma cuba de vidro com dimensões de 17 x 22 x 55 cm, conforme Figura 3.2.3.

Figura 3.2.3. Reator enzimático com membrana imerso em banho de temperatura controlada (vista lateral).

Para a alimentação, conectou-se a célula de ultrafiltração a um reservatório contendo a solução desejada a passar no reator, e a vazão foi mantida utilizando-se uma bomba peristáltica marca MILAN® modelo 202 com vazão regulável entre 0,2 e 10 mL/min. A bomba peristáltica foi ligada a um estabilizador de voltagem, para garantir que não se teriam grandes variações na vazão, nos períodos em que o sistema ficasse ligado. A célula de ultrafiltração possui uma válvula de alívio, e a pressão máxima suportada pela válvula é de 90 psi (6,3 Kg/cm²). A Figura 3.2.4 representa o esquema utilizado para este estudo e a Figura 3.2.5 apresenta a foto da montagem experimental utilizada para os ensaios com a invertase no laboratório.

Figura 3.2.4. Esquema experimental montado em laboratório para execução do experimento.

Figura 3.2.5. Foto da montagem experimental utilizada para os ensaios com a invertase no biorreator.

A partir do ensaio PI13 manteve-se solução de sacarose sob agitação contínua, em agitador magnético, para manter a homogeneidade do substrato que entrava no reator. Parava-se a agitação somente durante o momento de coleta da amostra.

3.2.2.1.1. Montagem e Operação do Biorreator

Para descrever a montagem do sistema para o início da operação apresenta-se na Figura 3.2.6 um esquema da célula de ultrafiltração e suas partes.

Figura 3.2.6. Montagem da célula de ultrafiltração com lista de partes do equipamento.

Figura 3.2.7. Detalhamento do tubo de entrada da tampa superior.

Figura 3.2.8. Esquema da válvula de pressurização da célula de ultrafiltração AMICON.

A montagem do sistema para início da operação foi feita da seguinte forma:

1. Alojava-se a membrana no suporte de membranas (H) com o lado brilhante para cima e então se posicionava o anel de vedação (F) sobre a membrana. Delicadamente empurrava-se o anel de vedação de forma que fixasse a membrana sobre o suporte. Manuseava-se a membrana sempre pelas laterais para evitar riscar ou contaminar a sua superfície;
2. Posicionava-se o suporte de membrana (H) no corpo da célula, alinhando-se as reentrâncias;
3. Invertia-se o corpo da célula (E) e se rosqueava firmemente a base inferior da célula (J);
4. Com esta parte do reator montada, pesava-se a enzima, em balança de precisão, dentro da célula de agitação, de forma quantitativa, a fim de se evitar perdas;
5. Conectava-se o tubo de saída do filtrado (L);
6. Posicionava-se a haste de agitação (D) dentro do corpo e enrolava-se fita de Teflon sobre a parte superior do corpo (E) que entrava em contato com a tampa superior do equipamento (A), para aumentar a vedação após fechar o sistema;
7. Posicionava-se a tampa superior (A) e pressionava-se para fechar, com a válvula (B) aberta, ou seja, o reator estava despressurizado. Caso não se acomodasse facilmente lubrificava-se o anel de vedação da tampa superior (C) com água ou vaselina, com o cuidado de não permitir o contato da vaselina com a membrana, pois causaria entupimento desta;
8. Encaixava-se a tubulação de entrada de líquido na tampa superior (K;L), aumentando-se a vedação da rosca com fita de Teflon;
9. Colocava-se a célula montada no suporte (M), alinhando-se a parte inferior, o que previne a rotação da célula;

10. Com a válvula de alívio de pressão (B) aberta (virada para o lado direito), iniciava-se a alimentação ao reator e purgava-se o ar do interior do reator, preenchendo desta forma seu volume até a marca de 50 mL;
11. Fechava-se a válvula de alívio de pressão, virando-a para cima, o que garantia a pressurização do sistema e o fluxo do filtrado pela membrana na saída do reator. Durante a operação mantinha-se a válvula na posição de pressurização;
12. Colocava-se a célula pronta e em operação dentro da cuba de vidro com água, com o termostato regulado na temperatura de ensaio, para equilíbrio térmico;
13. Ligava-se o agitador magnético de tal forma que o vórtice criado ocupasse um terço do volume do líquido;
14. Iniciava-se a retirada de amostras, de aproximadamente 5 mL cada, a cada meia hora;
15. Após operação contínua, para desligar o sistema, inicialmente despressurizava-se a célula de ultrafiltração e depois se abria a tampa superior, caso contrário corria-se o risco de romper a membrana pelo vácuo formado.

3.2.2.1.2. Detalhes da Operação do Biorreator

Observações Importantes

- Soluções contendo solutos tais como sacarose, glicerina ou contendo colóides, filtram lentamente. Fluxos elevados são obtidos somente com diluição. Durante longos tempos de filtração é normal o volume da célula aumentar. A camada polarizada sobre a membrana pode ser removida com forte agitação, após despressurização da célula;
- Remover a tampa superior com a válvula de pressão aberta, senão pode-se criar vácuo que pode romper a membrana;
- Usar sempre o lado brilhante da membrana para cima;
- Não exceder 75 psi (5,3 kg/cm²) quando usar nitrogênio na linha de gás;
- Não operar a célula em temperaturas superiores a 85°C;
- Não utilizar a célula com ácidos fortes (pH<2), soluções demasiadamente alcalinas (pH>10), e solventes orgânicos tais como: acetona, hidrocarbonetos aromáticos, Cellosolve®, hidrocarbonetos halogenados, DMF, ésteres alifáticos, DMSO;
- Lavar todos os componentes com detergente neutro e água após o uso.

Manutenção

A manutenção da célula de ultrafiltração é feita da seguinte forma:

1. Trocar os anéis de vedação em qualquer sinal de ruptura ou desgaste;
2. Lubrificar os anéis de vedação com vaselina;
3. Checar o agitador para verificar a existência de rebarbas que poderiam danificar a

membrana.

Possíveis causas de problemas comuns durante a operação do biorreator

1. Nenhum ou pouco filtrado é obtido:

- Verificar se a válvula está no sentido pressurizada;
- Verificar se a face brilhante da membrana está para cima;
- Verificar se a solução é muito viscosa ou contém muitos solutos.

2. O fluxo de filtrado é muito alto:

- Verificar se a membrana não está danificada.

3. Vazamentos:

- Assegurar que o anel de vedação cobre toda a superfície periférica da membrana;
- Checar se os anéis de vedação não estão danificados;
- Checar se a base foi rosqueada firmemente.

4. O volume do líquido dentro do reator diminuiu:

- Despressurizar o sistema e completar o volume novamente até 50 mL.

5. O volume do líquido dentro do reator aumentou:

- Verificar se houve entupimento da membrana, despressurizar o sistema e aumentar a agitação;
- Deixar o tubo de silicone de saída em nível abaixo do reator para que o fluxo de saída aumente por vasos comunicantes;
- Injetar nitrogênio lentamente na célula, com a válvula pressurizando o sistema, para que o volume caia rapidamente.

3.2.2.1.3. Especificações do Biorreator

As especificações do Biorreator REM 01 estão descritas na Tabela 3.2.1.

Tabela 3.2.1. Especificações da célula de ultrafiltração Amicon® Modelo 8050.

Capacidade da célula (mL)	50
Volume mínimo de trabalho (mL)	2,5
Diâmetro da membrana (mm)	44,5
Área efetiva da membrana (cm ²)	13,4
Volume inferior à membrana (mL)	0,5
Dimensões do suporte:	
Base (cm)	7 x 7
Altura (cm)	9,8
Máxima pressão de operação	55 psi (3,9 kg/cm ²)
Material de Construção:	
Tampo	Nylon
Suporte da membrana	Polisulfona
Haste do agitador	Acetato e polisulfona
Anéis de vedação	Borracha de silicone
Corpo	Polisulfona
Base inferior	Nylon

3.2.2.1.4. Metodologia para Coleta de Amostras

As amostras foram coletadas na saída do reator para controle do grau de conversão da reação, por medidas da concentração de açúcares redutores (glicose+frutose) e/ou glicose. Media-se também a vazão mássica na entrada e saída do reator para verificação de entupimento da membrana ou vazamentos e media-se a vazão volumétrica na saída do reator para os cálculos de taxa de reação. O procedimento utilizado para a coleta de amostras está descrito a seguir:

- Inicialmente duas balanças semi-analíticas (Marte® modelo AS 2000 C) foram posicionadas na alimentação e na saída do reator, como descrito na Figura 3.2.4. Colocava-se uma proveta de 10 mL na balança, posicionada na saída do reator e ajustava-se a tara, conforme detalhe apresentado na Figura 3.2.9;

Figura 3.2.9. Detalhe da coleta de amostra na saída do biorreator.

- Iniciava-se a coleta, cronometrando-se o tempo no qual a amostra era armazenada na proveta;
- No momento em que se iniciava a medição do tempo, marcava-se a massa da solução de sacarose na alimentação, que estava sendo mantida sobre outra balança;
- Decorrido o prazo pré-determinado (5 ou 10 minutos), parava-se o cronômetro e, simultaneamente, marcava-se novamente a massa final da solução de sacarose. Anotava-se a massa e o volume da amostra;
- A amostra era diluída para análise da seguinte forma: pipetava-se 100 μL da amostra e diluía-se em 9,9 mL de água destilada que estava em um tubo de ensaio. Como a massa específica da água é 1 g/mL, obteve-se a devida quantidade através de sua massa;
- Em um microtubo armazenava-se, em freezer, cerca de 2 mL da amostra sem diluição, pois caso fosse necessário repetir a análise, tinha-se a amostra intacta.

Em cada coleta de amostra também se checavam a temperatura do banho, a agitação e o volume do reator. No Apêndice E.1 encontra-se o modelo da tabela utilizada para coleta de amostra e controle do biorreator.

3.2.3. Determinações Analíticas

3.2.3.1. Determinação da Concentração de Açúcares Redutores pelo Método do DNS

O procedimento utilizado foi uma variação do método original proposto por MILLER (1959), no que se refere à composição do reativo de DNS (item 3.1.4).

A determinação foi feita da seguinte forma: em um volume total de 1,0 mL de amostra adicionou-se 1,5 mL do reativo de DNS. Agitou-se em vórtice e aqueceu-se a mistura em banho de água fervente por 5 minutos. A amostra foi resfriada em água corrente durante 3 a 5 minutos até a temperatura ambiente. Completou-se o volume total para 25 mL com água destilada em tubos de Folin-Wu ou similar graduado e agita-se em vórtice. Determinou-se a absorvância das amostras a 540nm contra um branco (100% transmitância) preparado com 1 mL de água destilada no lugar da amostra. No caso da determinação da atividade enzimática da invertase, determinava-se também a absorvância do substrato (sacarose + tampão). A cor é estável por 30 minutos. Os valores de absorvância foram convertidos em mg de glicose através de uma curva-padrão feita com solução de glicose. Preparava-se uma solução padrão com uma concentração de 1 mg/mL de glicose. Para a determinação da curva de calibração, a solução padrão foi diluída em água destilada, completando-se sempre um volume total de 1,0 mL, conforme Tabela 3.2.2.

Figura 3.2.10. Fluxograma com Metodologia para determinação de Açúcares Redutores pelo método do DNS.

Tabela 3.2.2. Dados da curva-padrão de glicose.

Tubos	Água (mL)	Padrão (mL)	[G] (mg de glicose /mL)
Branco	1,0	—	0
1	0,9	0,1	0,1
2	0,8	0,2	0,2
3	0,6	0,4	0,4
4	0,5	0,5	0,5
5	0,4	0,6	0,6
6	0,2	0,8	0,8
7	—	1,0	1,0

Figura 3.2.11. Curva-padrão de glicose para a dosagem de Açúcares Redutores (AR) pelo método do DNS.

3.2.3.2. Determinação de Glicose (Método Enzimático)

A concentração de glicose foi obtida por método enzimático (LABORLAB cat. nº 02200) através da análise espectrofotométrica, utilizando uma curva de calibração que correlacionava absorvância (Abs) com a concentração de glicose ([G]). Para elaboração dessa curva, amostras padrão de glicose foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6 e 2,0 g/L.

O princípio do método é baseado em técnicas colorimétricas onde, inicialmente, a glicose presente na amostra é oxidada a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, em presença da glicose-oxidase. O peróxido de hidrogênio formado, na presença de peroxidase e do sistema constituído por fenol e 4-aminofenazona (aceptor de oxigênio nesta reação), reage formando um cromógeno vermelho (4-p-benzoquinona-monoiminofenazona),

conforme apresentado na Figura 3.2.12. A concentração desta substância, determinada por métodos colorimétricos, é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Figura 3.2.12. Reações envolvidas na determinação de glicose pelo método enzimático.

A análise foi realizada através da adição de 50 µL de amostra em 5 mL do reativo de trabalho, constituído por: glicose-oxidase (≥ 3000 U), peroxidase (≥ 400 U), reativo de cor 1 (formado por 4 aminofenazona 0,025 mol/L e tampão Tris 0,92 mol/L) e reativo de cor 2 (formado por: fenol 0,055 mol/L), em pH $7,4 \pm 0,1$. A mistura foi então incubada em banho termostatzado a 37°C por 10 minutos, sendo em seguida resfriada em banho de gelo. Realizava-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda ajustado para 505 nm. A cada preparo de reativo de trabalho fazia-se uma nova curva de calibração, correlacionando a concentração de cromógeno com a concentração de glicose presente na amostra.

Tabela 3.2.3. Preparo do reativo de trabalho.

n° análises	Reativo (1)	Reativo (2)	Reativo Enzimático	H ₂ O	Volume Total
	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)
20	5	5	0,3	90	100,3
100	25	25	1,5	450	501,5
200	50	50	3,0	900	1003

O reativo deve ser armazenado em geladeira e em frasco escuro, pois é sensível à luz e à temperatura, sendo de um mês seu período de validade. A partir de uma solução-mãe de glicose (2g/L), preparavam-se os correspondentes padrões, cujas concentrações variavam entre 0,2 e 2,0 mg/mL, conforme a Tabela 3.2.4. Os padrões foram armazenados em microtubos e congelados.

Tabela 3.2.4. Esquema de preparação das soluções de glicose para a confecção da curva de calibração.

[Glicose] (mg/mL)	Volume de solução- mãe (2 mg/mL)	Volume de água	Volume Total
0,2	1 mL	9 mL	10 mL
0,4	2 mL	8 mL	10 mL
0,8	4 mL	6 mL	10 mL
1,0	5 mL	5 mL	10 mL
1,2	6 mL	4 mL	10 mL
1,6	8 mL	2 mL	10 mL
2,0	10 mL	0 mL	10 mL

Figura 3.2.13. Exemplo de curva de calibração do reagente para a dosagem da glicose pelo método enzimático.

3.3. Metodologia de Análise dos Resultados

3.3.1. Cálculo dos Parâmetros Termodinâmicos

Os parâmetros termodinâmicos (E_a , ΔG , ΔS e ΔH) relacionados com a invertase foram determinados pelas equações de Arrhenius e de Eyring (OWUSU *et al.*, 1992; CASTELLAN, 1986).

Cálculo dos Valores de ΔG , ΔH , ΔS e E_a

Inicialmente estabelece-se a Equação de Arrhenius, apresentada na Equação 3.3.1:

$$v = Ae^{-E_a/RT} \quad (\text{Equação 3.3.1})$$

Sendo: v a velocidade da reação enzimática, E_a a energia de ativação (J/K.mol), A a constante de Arrhenius ou fator de frequência, R a constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J/K.mol}$) e T a temperatura absoluta em graus Kelvin (K). Traça-se a curva: $\ln v$ versus $1/T$ e por regressão linear obtém-se a equação de uma reta, de onde se extrai o valor do coeficiente angular (b) e do coeficiente linear (a) da curva, conforme mostra a Equação 3.3.2.

$$\ln v = a - b \cdot 1/T \quad (\text{Equação 3.3.2})$$

Sabendo-se o valor do coeficiente angular (b), calcula-se a Energia de Ativação (E_a), conforme Equação 3.3.3.

$$b = -(E_a/R) \quad (\text{Equação 3.3.3})$$

Para o cálculo dos parâmetros termodinâmicos ΔG , ΔH e ΔS deve-se fixar uma temperatura qualquer, de preferência a temperatura ótima, geralmente a qual se realiza a determinação da atividade enzimática da enzima. Calcula-se a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) pela Equação de Eyring (Equação 3.3.4):

$$\begin{aligned} \Delta G &= [(RT)/2,303] \cdot [\log(k_{cat}h/\kappa \cdot T)] \quad \text{ou} \quad (\text{Equação 3.3.4}) \\ \Delta G &= [(RT)/2,303] \cdot [\log k_{cat} + \log h - \log \kappa - \log T] \end{aligned}$$

Sendo: k_{cat} a velocidade específica ou constante catalítica da reação (min^{-1}), h a constante de Planck ($3,978 \cdot 10^{-32} \text{ J/min}$) e κ constante de Boltzman ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$). Para

uma determinada temperatura T, pode-se calcular o ΔG , pela Equação de Eyring, pois os valores de R, κ , h, k_{cat} (equivalente à temperatura escolhida) e T são conhecidos. Após determinado o valor de ΔG , calcula-se o valor de ΔH pela Equação 3.3.5 e o de ΔS pela Equação 3.3.6.

$$\Delta H = E_a - RT \quad (\text{Equação 3.3.5})$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (\text{Equação 3.3.6})$$

Cálculo do Coeficiente Térmico de Desnaturação da Enzima

Para incrementar a análise dos resultados, pode-se calcular o Coeficiente Térmico de Desnaturação da Enzima (Ψ). Para isso, deve-se traçar a curva do logaritmo neperiano da atividade enzimática ($\ln v$) em função do tempo (t) para cada uma das temperaturas testadas, pois a perda de atividade da enzima devido à desativação térmica segue uma cinética de primeira ordem (OWUSU *et al.*, 1992).

Após traçadas as curvas, ajusta-se a equação da reta correspondente a cada temperatura testada e com isso, obtém-se os respectivos coeficientes angulares que serão denominados de Coeficiente Térmico de Desnaturação da Enzima (Ψ). A seguir, deve-se traçar a curva do $\ln \Psi$ em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$) para discussão da relação entre as variáveis estudadas e determinação da energia de desativação térmica da enzima (E_d), segundo a Equação 3.3.7.

$$\psi = A e^{-E_d / RT} \quad (\text{Equação 3.3.7})$$

3.3.2. Análise dos Resultados Obtidos no Biorreator

Para os cálculos foram utilizadas planilhas de cálculos no Microsoft Excel, conforme exemplo do Apêndice E.2.

3.3.2.1. Cálculo da Concentração de Frutose Formada

A partir da determinação analítica de glicose (método do DNS ou método da Glicose-oxidase), feita em duplicata para cada amostra coletada, era possível calcular a absorvância média (Abs) e, por meio da curva de calibração, era possível calcular a concentração de açúcares redutores ([AR]) ou de glicose ([G]) formada durante a reação. No caso de a amostra ter sido diluída, esse valor era multiplicado por sua respectiva diluição para a obtenção do valor real da concentração.

$$Abs = a \times [AR] + b \quad \text{ou} \quad Abs = a \times [G] + b \quad (\text{Equação 3.3.7})$$

sendo: a = coeficiente angular da curva de calibração, b = coeficiente linear da curva de calibração, Abs = absorvância média, [AR] = concentração de açúcares redutores (mg/mL) e [G] = concentração de glicose (mg/mL).

Lembrando-se que a hidrólise da sacarose segue a reação:

Figura 3.3.1. Estequiometria da reação de hidrólise da sacarose pela ação da invertase.

Então, cada mol de sacarose fornece dois moles de açúcares redutores (mistura equimolar de glicose e frutose) ou um mol de glicose. Pode-se concluir que a concentração de frutose ([F]) equivale à concentração de glicose ou à metade da concentração de açúcares redutores na amostra. Logo, tem-se a relação:

$$[F] = [G] = \frac{[AR]}{2} \quad (\text{Equação 3.3.8})$$

A conversão da unidade de concentração de frutose (de mg/mL para mM) foi feita através da equação 3.3.9.

$$[F](mM) = \frac{[F](mg/mL) * 1000}{180} \quad (\text{Equação 3.3.9})$$

sendo: [F] corresponde à concentração de frutose produzida.

3.3.2.2. Cálculo da Concentração de Sacarose Consumida

A concentração de sacarose consumida corresponde à concentração de frutose ou glicose produzida, de acordo com a estequiometria da reação. Ou seja:

$$[S]_{consumida} = [F] = [G] = \frac{[AR]}{2} \quad (\text{Equação 3.3.10})$$

sendo: $[S]_{consumida}$ corresponde à concentração de sacarose consumida na reação.

Portanto a concentração de sacarose na saída do reator equivale à diferença entre a concentração de sacarose na entrada do reator ($[S]_o$) e a concentração de sacarose consumida ($[S]_{consumida}$). Ou seja:

$$[S]_{saida} = [S]_o - [S]_{consumida} \quad (\text{Equação 3.3.11})$$

3.3.2.3. Cálculo do Grau de Conversão da Reação de Hidrólise da Sacarose

Calculou-se o grau de Conversão (X) através da equação 3.3.12:

$$X(\%) = \frac{[S]_{consumida}}{[S]_o} \times 100 \quad (\text{Equação 3.3.12})$$

sendo: $[S]_{consumida}$ a concentração de sacarose consumida na reação e $[S]_o$ a concentração de sacarose na alimentação do reator.

3.3.2.4. Cálculo da Velocidade de Reação ou Produtividade

A taxa ou velocidade de reação (r) equivale à quantidade de frutose produzida por miligrama de enzima e por volume de reação. A unidade utilizada para a taxa de reação foi:

$\left(\frac{mmol_{Frutose}}{mg_{enzima} \times h} \right)$. Calculou-se como apresentado na equação 3.3.13:

$$r = \frac{\left(\frac{Q \times 60}{1000} \right)}{m_{enzima}} \times [S]_{consumida} \quad (\text{Equação 3.3.13})$$

sendo: $[S]_{consumida}$ a concentração de sacarose consumida na reação, Q a vazão volumétrica na saída do reator (mL/min) e m_{enzima} a massa de enzima pesada no reator.

As velocidades de reação (r) apresentadas em Resultados e Discussão foram calculadas levando-se em conta uma vazão constante e igual à média experimental.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA INVERTASE

Antes da montagem e operação do reator enzimático com membrana, foram realizados experimentos de caracterização da invertase utilizada. Foram levantados dados referentes à velocidade de reação e estabilidade em diferentes concentrações de substrato e enzima, valores de pH e temperatura. Estes dados resultaram na determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima em estudo.

4.1.1. Determinação da Velocidade de Reação da Invertase em Função da Concentração de Enzima

O objetivo destes ensaios foi o de verificar qual a faixa de concentrações de enzima que se obtém a velocidade máxima de reação. Esta faixa pode ser obtida pela análise do trecho linear da curva da velocidade de reação em função da concentração de enzima. O trecho linear representa uma cinética de primeira ordem ($v = k_{cat} \cdot [E_T]$, onde: v é a velocidade de reação, k_{cat} é a constante catalítica ou número de *turn-over* e $[E_T]$ é a concentração de enzima total presente) e os pontos neste trecho linear apresentam velocidade máxima e concentração saturante de substrato. Para estes experimentos a metodologia de ensaio utilizada foi o procedimento padrão de determinação da atividade enzimática apresentado no item 3.2.1 ($[S]=100\text{mM}$, $\text{pH}=4,6$ e $T=37^\circ\text{C}$). As suspensões de invertase foram preparadas conforme item 3.1.1.1. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 4.1.1 e Figura 4.1.1.

Da Figura 4.1.1 observa-se que o trecho linear de velocidade de reação esteve entre 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de invertase. Abaixo de 20 $\mu\text{g/mL}$ a precisão era baixa devido à baixa concentração de açúcares redutores formados, e por isso os valores oscilaram consideravelmente. A faixa ideal de concentração é de 40 a 80 $\mu\text{g/mL}$ de invertase, com correlação da regressão linear de 0,994. A concentração adotada para os ensaios de cinética enzimática e parâmetros termodinâmicos foi de 40 $\mu\text{g/mL}$, pois a absorvância lida situava-se na faixa da curva de calibração do DNS.

Tabela 4.1.1. Resultados de velocidade de reação da Invertase (v) em função de diferentes concentrações da enzima (6 repetições e valor médio).

Velocidade de Reação (v) $\left(\frac{mg_{AR}}{ml \cdot min} \right)$								
[Invertase] ⁽¹⁾ ($\mu g/mL$)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	v Médio ⁽²⁾ $\left(\frac{mg_{AR}}{ml \cdot min} \right)$	v Médio ⁽³⁾ $\left(\frac{mg_{AR}}{mg \cdot min} \right)$
10	0,03	0,03	0,04	0,04	0,09	0,09	0,05	4,7
20	0,03	0,09	0,04	0,08	0,17	0,26	0,11	5,6
40	0,23	0,39	0,44	0,11	0,29	0,39	0,31	7,7
50	0,38	0,79	0,75	-	0,35	0,28	0,51	10,2
70	0,55	0,85	0,73	0,34	0,85	0,74	0,67	9,7
80	0,63	0,91	0,65	0,38	1,23	0,95	0,79	9,9
100	0,67	1,02	0,99	0,61	1,29	1,05	0,94	9,4
150	1,10	1,66	1,33	0,99	1,13	-	1,24	8,3
250	1,17	2,04	2,11	1,63	2,49	2,16	1,93	7,7
500	2,82	2,83	2,56	2,75	3,61	2,93	2,92	5,8

⁽¹⁾ Essa concentração corresponde à massa de células secas tamizadas (pó invertásico – Invertase Sigma®) por volume de solução.

⁽²⁾ Corresponde às velocidades de reação expressas por volume de preparado enzimático utilizado.

⁽³⁾ Corresponde às velocidades de reação por massa de enzima. A transformação é feita da seguinte forma: $v_{massa} \left(\frac{mg_{AR}}{mg \cdot min} \right) = v_{volume} \left(\frac{mg_{AR}}{ml \cdot min} \right) \cdot \{1000 / [Invertase](\mu g/mL)\}$, sendo v_{massa} a velocidade por massa de enzima e v_{volume} a velocidade por volume de preparado enzimático.

Figura 4.1.1. Velocidade de Reação da Invertase em função da concentração de suspensão enzimática ($[S]=100$ mM, $\text{pH}=4,6$ e $T=37^\circ\text{C}$). O trecho linear está apresentado em vermelho.

4.1.2. Cinética da Invertase

Para que se possam efetuar simulações matemáticas preliminares do funcionamento do biorreator com invertase é importante o conhecimento dos valores exatos dos parâmetros cinéticos da enzima para a estimativa das taxas de diluição (D) e graus de conversão do biorreator.

A cinética enzimática da invertase é historicamente uma das mais exploradas, porém os dados de literatura não representam a realidade do sistema utilizado, visto que são discrepantes (Tabela 4.1.2). A não concordância dos valores para os parâmetros cinéticos da invertase pode ser atribuída a diversos fatores, tais como: as preparações enzimáticas possuem graus de pureza diferentes, existência de isoenzimas, emprego de diferentes métodos analíticos na determinação da atividade catalítica e o uso de diferentes cepas de *S. cerevisiae* como fonte da enzima.

O objetivo destes experimentos foi estimar as constantes cinéticas: K_M (constante de Michaelis-Menten) e $v_{\text{máx}}$ (velocidade máxima de reação), para o sistema enzimático em estudo.

Neste item, a cinética da invertase foi pesquisada pelo método das velocidades iniciais, de acordo com o modelo cinético de Michaelis-Menten. A variação da velocidade da reação frente à concentração de substrato segue parcialmente o modelo cinético de

Michaelis-Menten, cuja equação apresenta uma hipérbole retangular da variação da velocidade de reação enzimática em função da concentração de substrato (BAILEY; OLLIS, 1987). Para a sacarose, ocorre decréscimo da velocidade com concentração de substrato acima de 12%(p/v) e esta cai à metade com cerca de 25%(p/v) (VITOLO, 1984), podendo atingir um quarto da atividade inicial com 70%(p/v) (TREVISAN, 1993). Os efeitos que causariam essa redução na velocidade da reação são: menor concentração de água no sistema, efeitos inibitórios do substrato sobre o catalisador e aumento da viscosidade do meio (VITOLO, 1984).

Tabela 4.1.2. Valores das constantes cinéticas K_M e $v_{m\acute{a}x}$ encontrados na literatura para a invertase solúvel.

Referência	Microrganismo	K_M (mM)	$v_{m\acute{a}x}$ $\left(\frac{mg_{AR}}{ml.min}\right)$
VITOLO (1979)	<i>S. cerevisiae</i> (Levedura de panificação)	$25,5 \pm 7,3$	$0,654 \pm 0,120$
NELSON (1933) apud VITOLO (1979)	<i>S. cerevisiae</i>	16 – 40	ND
BERGGREN (1969) apud VITOLO (1979)	<i>S. cerevisiae</i>	18 – 32	ND
RIBEIRO (1997)	<i>S. cerevisiae</i> (Sigma ^R grau V)	18,5	0,104
ND ... dado não disponível			

Existem vários métodos de linearização do modelo cinético de Michaelis-Menten (Tabela 4.1.3) e a escolha daquele que melhor ajusta os pontos obtidos experimentalmente é importante. RIBEIRO (1997) demonstrou em sua dissertação de mestrado, que para a invertase solúvel os quatro métodos conhecidos (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, Woolf-Hofstee e Eadie-Scatchard) correlacionaram adequadamente todos os pontos experimentais, permitindo a determinação dos valores de K_M e $v_{m\acute{a}x}$ com variação intermétodos de ambas as constantes cinéticas de 1%. Portanto, optou-se neste trabalho por realizar apenas a linearização de Lineweaver-Burk, sendo esta a mais difundida entre todas para o estudo cinético de enzimas, sobretudo a invertase (VITOLO, 1979).

Tabela 4.1.3. Equação de Michaelis-Menten e quatro equações de linearização derivadas (BAILEY; OLLIS, 1987).

Autores	Equação
Michaelis-Menten	$v = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_M + S}$
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$
Hanes-Woolf	$\frac{S}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{S}{v_{\max}}$
Wolf-Hofstee	$v = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v}{S}$
Eadie-Scatchard	$\frac{v}{S} = \frac{v_{\max}}{K_M} - \frac{v}{K_M}$

Os ensaios foram realizados utilizando-se o procedimento padrão de determinação da atividade enzimática apresentado no item 3.2.1. As suspensões de invertase foram preparadas, conforme item 3.1.1.1, na concentração de 40 µg/mL. O pH foi mantido em 4,6 e a temperatura de ensaio em 37 °C. Foram realizados onze conjuntos de ensaios cinéticos rotulados como ensaios I a XI (Tabela 4.1.4), cada um com média de 10 concentrações de sacarose testadas (10 a 400 mM) por ensaio e duas repetições por concentração para cada ponto experimental. A Tabela 4.1.4 apresenta os valores das velocidades de reação obtidos em diferentes concentrações de sacarose. Na Tabela 4.1.5 estão apresentados os valores de K_M e $v_{\max}$ calculados para cada ensaio. As linearizações estão apresentadas no Anexo B.

Tabela 4.1.4. Médias das velocidades de reação (v) em diferentes concentrações de sacarose para os experimentos de cinética da invertase (pH=4,6 e T=37°C). Os onze conjuntos de experimentos estão representados pelos algarismos romanos I a XI.

Velocidade de Reação (v) $\left(\frac{mg}{ml \cdot min}\right)$											
[sacarose] (mM)	I	II	III	IV ⁽¹⁾	V	VI	VII ⁽²⁾	VIII ⁽²⁾	IX ⁽²⁾	X	XI
10	0,08	0,15	0,15	0,14	ND	ND	0,09	0,12	0,13	0,11	0,15
20	0,16	0,24	0,24	0,25	0,15	0,23	0,22	0,22	0,25	0,22	0,23
30	0,20	0,26	0,32	0,22	ND	ND	0,28	0,34	0,34	0,29	0,33
40	0,27	0,35	0,38	0,37	0,21	0,35	0,29	0,42	0,46	0,39	0,38
50	0,29	0,42	0,43	0,52	0,29	ND	0,31	0,46	0,51	0,46	0,45
60	0,34	ND	0,52	0,46	0,30	0,42	0,35	0,49	0,52	0,51	0,54
70	0,35	0,47	0,55	0,50	0,36	ND	0,37	0,57	0,46	0,58	0,55
80	0,39	0,51	0,50	0,42	0,34	0,45	0,43	0,60	0,59	0,57	0,66
90	0,34	0,54	0,54	0,55	0,37	ND	0,41	0,62	0,56	0,52	0,63
100	0,41	0,51	0,55	0,70	0,34	0,50	0,50	0,67	0,61	0,60	0,79
120					0,40	0,46					
140					0,41	0,52					
160					0,42	0,55					
180					0,36	0,54					
200					0,39	0,56					
400					0,43						

ND ... não determinado;

(1) Volumes utilizados foram 5 vezes maiores do procedimento padrão (1 mL de solução de sacarose + 3 mL de tampão + 1 mL de enzima);

(2) Volumes utilizados foram 100 vezes maiores o procedimento padrão (20 mL de solução de sacarose + 60 mL de tampão + 20 mL de enzima); nos dois casos parou-se a reação pipetando-se 1 mL da amostra em 1,5 mL de DNS após 10 minutos de reação.

Tabela 4.1.5. Constantes cinéticas calculadas para cada conjunto de experimentos (I a XI) pela linearização de Lineweaver-Burk (regressão linear das curvas $1/v$ em função de $1/S$, com as respectivas correlações de cada linearização).

Constantes Cinéticas Invertase (Sigma®)											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
K_M (mM)	100	36	48	47	53	36	100	103	88	119	83
$V_{m\acute{a}x}$ $\left(\frac{mg}{ml \cdot min}\right)$	0,87	0,68	0,85	0,79	0,54	0,66	1,02	1,40	1,27	1,46	1,05
Correlação (R^2)	0,992	0,97	0,995	0,91	0,95	0,998	0,95	0,997	0,98	0,994	0,98

Foi feita uma análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 4.1.5 (sem excluir nenhum dos resultados). Está apresentada nas Figuras 4.1.2 e 4.1.3, que representam um gráfico tipo distribuição de freqüências dos valores calculados de K_M e $v_{m\acute{a}x}$. Calculou-se a média e os limites superior e inferior de confiança para as constantes cinéticas, fornecidos pelo desvio padrão. Os valores de K_M e $v_{m\acute{a}x}$ que se encontram fora do intervalo de confiança estão em destaque na Tabela 4.1.5.

Figura 4.1.2. Distribuição de freqüências em diagramas de pontos para os valores de K_M (74 ± 30 mM).

Figura 4.1.3. Distribuição de freqüências em diagramas de pontos para os valores de $v_{m\acute{a}x}$ ($0,96 \pm 0,31 \left(\frac{mg}{ml \cdot min} \right)$).

Foi realizada uma outra análise estatística, descartando os dados dos ensaios IV (baixa correlação), V e VI (faixa de concentrações estudadas muito próximas da saturação, o que pode aumentar o erro na determinação das constantes cinéticas), dos resultados

apresentados na Tabela 4.1.3. Calcularam-se a média e os desvios-padrão para os dados de velocidade em cada concentração de sacarose estudada. Estes dados estão apresentados na Tabela 4.1.6.

Observando-se a Figura 4.1.4 verifica-se que a maior parte dos resultados experimentais de velocidade encontra-se entre os limites inferiores (LI) e superiores (LS) de velocidade, estimados pela análise estatística. Realizando-se a linearização pelo método de Lineweaver-Burk das velocidades apresentadas na Tabela 4.1.6, recalculou-se para conferência da análise anterior os valores das constantes cinéticas, conforme mostra a Tabela 4.1.6. Apesar do intervalo de confiança não coincidir entre análises, os valores das médias são praticamente iguais.

Tabela 4.1.6. Análise estatística com os dados experimentais de velocidade referentes aos ensaios: I, II, III, VII, VIII, IX e X e XI.

$v \left(\frac{mg_{AR}}{ml.min} \right)$				
[S] (mM)	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
10	0,12	±0,03	0,09	0,15
20	0,22	±0,03	0,19	0,25
30	0,30	±0,05	0,25	0,34
40	0,37	±0,06	0,30	0,43
50	0,42	±0,08	0,34	0,49
60	0,47	±0,08	0,38	0,55
70	0,49	±0,09	0,40	0,58
80	0,53	±0,09	0,44	0,62
90	0,52	±0,10	0,42	0,62
100	0,58	±0,12	0,46	0,70

Tabela 4.1.7. Equações provenientes da linearização por Lineweaver-Burk dos valores médios, limite inferior e limite superior de velocidades apresentadas na tabela 4.1.6.

Equação		K_M (mM)	v_{max} $\left(\frac{mg_{AR}}{ml.min} \right)$
Limite Inferior	$(1/v) = 91,49.(1/S) + 1,11$ correlação = 0,991	82	0,90
Média	$(1/v) = 71,17.(1/S) + 1,00$ correlação = 0,9991	71	1,00
Limite Superior	$(1/v) = 58,37.(1/S) + 0,90$ correlação = 0,998	65	1,11

Figura 4.1.4. Cinética de Michaelis-Menten da Invertase Sigma®. Dados experimentais (valores médios), limites inferior (LI) e superior (LS) de confiança.

A faixa de valores dos parâmetros cinéticos obtida pela análise estatística foi de 74 ± 30 mM para o K_M e de $0,96 \pm 0,31$ (mg AR/mL.min) para o $v_{m\acute{a}x}$. Nas duas análises estatísticas os valores de K_M médio (74 e 71 mM) e $v_{m\acute{a}x}$ médio (0,96 e 1,00 mg AR/mL.min) ficaram próximos. O que chamou a atenção durante a execução do trabalho, e daí o número de repetições, foi a variabilidade encontrada nos resultados experimentais, observado pelo elevado desvio-padrão. No caso de sistemas não-homogêneos é necessário realizar uma análise estatística dos pontos experimentais de forma a se determinar os limites das constantes cinéticas para segurança na utilização posterior dos dados.

Com os dados dos experimentos V e VI foi possível observar que após 200 mM de sacarose a velocidade de reação pouco variou com o aumento da concentração de substrato (Figura 4.1.5).

Figura 4.1.5. Velocidade enzimática em função da concentração de sacarose ($[E]=40\mu\text{g/mL}$, $\text{pH}=4,6$ e $T=37^\circ\text{C}$). Dados dos ensaios V e VI que utilizaram concentrações de sacarose até 400 mM.

4.1.3. Influência do pH na Velocidade de Reação da Invertase

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se o procedimento padrão de determinação da atividade enzimática apresentado no item 3.2.1 ($[S]=100\text{mM}$), porém utilizando o tampão referente ao valor de pH em estudo no lugar do utilizado no procedimento padrão. Foram preparadas diferentes soluções tampão para a análise da influência do valor do pH na velocidade de reação da invertase. As soluções tampão utilizadas foram fosfato de sódio (valores de pH entre 6 a 8) e acetato de sódio (valores de pH entre 3 a 5,5), todos na concentração de 50mM, conforme item 3.1.3. As suspensões de invertase foram preparadas conforme item 3.1.1.1 na concentração de $40\mu\text{g/mL}$. A temperatura de ensaio foi mantida em 37°C . A Tabela 4.1.8 apresenta os valores das velocidades de reação obtidos nos diferentes valores de pH testados.

Tabela 4.1.8. Velocidade de reação para a enzima invertase em diferentes valores de pH.

pH	Velocidade de Reação (v) $\left(\frac{\text{mg AR}}{\text{ml. min}}\right)$					% residual da velocidade ($v_{\text{ref}}=0,49$) ¹
	v_1	v_2	v_3	v_4	$v_{\text{média}}$	
3,0	0,38	0,35	0,40	-	0,38	78
3,5	0,38	0,38	0,42	0,51	0,42	86
4,0	0,40	0,39	0,50	-	0,43	88
4,6	0,40	0,40	0,59	0,54	0,48	98
5,0	0,41	-	0,56	-	0,49	100
5,5	0,39	0,40	0,45	0,35	0,39	79
6,0	0,35	0,35	-	0,28	0,33	67
7,0	0,12	0,11	-	0,19	0,14	28
8,0	0,05	0,05	0,11	0,00	0,05	10
9,0	0,03	0,03	0,03	-	0,03	6

(¹) v_{ref} . Corresponde à velocidade máxima obtida, que foi no valor de pH 5. A %residual da velocidade foi calculada da seguinte forma: %residual = $(v/0,49) \cdot 100$

Figura 4.1.6. Curva de variação da velocidade de reação em função da variação do pH para a enzima invertase.

Pode-se observar pela Figura 4.1.6 e pela tabela 4.1.8 que abaixo de pH 4 e acima de pH 5,5 ocorre queda significativa da velocidade de reação da enzima invertase. Na tabela 4.1.8 isso pode ser observado pela coluna que mostra os dados de percentual de velocidade residual, pois principalmente acima do pH 5,5 ocorre redução de mais de 20% da atividade em relação à máxima possível no ponto ótimo. RIBEIRO (1997) determinou a

influência do valor do pH do meio reacional na atividade de invertase Sigma® solúvel variando de meia unidade o valor do pH no intervalo entre 3,5 e 6,5. Para os valores de pH até 5,5 utilizou o tampão acetato 10mM e para os valores de pH 6 e 6,5 utilizou o tampão succinato 10mM. O autor observou que o valor de pH ótimo da invertase é na faixa de 4,5 (velocidade de reação máxima), sendo que acima de pH 5 a velocidade de reação cai drasticamente (RIBEIRO, 1997). Determinou também que os valores de pH ótimo e de estabilidade encontram-se na mesma faixa, e esse intervalo situa-se entre 3,5 e 5. Do exposto, observa-se claramente que os resultados obtidos estão em consonância com os do referido autor.

4.1.4. Influência da Temperatura na Velocidade de Reação da Invertase

O objetivo destes experimentos foi o de verificar a influência da temperatura na velocidade de reação da invertase e estimar os parâmetros termodinâmicos. Variaram-se, simultaneamente, temperatura e tempo de ensaio, e estes dados foram utilizados para a estimativa da energia de desativação térmica.

Os ensaios foram realizados em duplicata, utilizando-se o procedimento padrão de determinação da atividade enzimática apresentado no item 3.2.1. Foram realizados dois ensaios variando-se a temperatura e o tempo de reação (Ensaio I e Ensaio II) e um variando-se apenas a temperatura e mantendo-se fixo o tempo de reação em 10 minutos (Ensaio III). Em todos, manteve-se fixa a concentração de enzima em 40 µg/mL, o pH em 4,6 e a concentração de sacarose em 100 mM no volume total de reação. As temperaturas estudadas foram respectivamente: 1, 25, 35, 37, 45, 55, 60, 65 e 70 °C. Os tempos de reação variaram em: 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 60 minutos. Para cada tempo e temperatura o ensaio foi realizado em um tubo de ensaio diferente. A partir dos resultados obtidos foram feitos os cálculos de velocidade de reação (v), entalpia (ΔH), entropia (ΔS), energia livre de Gibbs (ΔG), energia de ativação (E_a) e energia de desativação térmica (E_d). A metodologia de cálculo está descrita no item 3.3.1.

Ao analisar os dados de velocidade de reação em função da temperatura, para 10 minutos de reação (Tabela 4.1.9), foi possível observar uma variabilidade nos resultados, porém existe uma clara tendência de que as velocidades máximas são encontradas entre 45 e 65 °C, como mostra a Figura 4.1.7. Salienta-se, também, que ao redor de 70 °C ocorreu uma forte diminuição da velocidade de reação, indicando uma desnaturação do sistema enzimático em estudo. Por conseguinte, a velocidade máxima de reação tendeu a situar-se entre 55 e 60°C. O intervalo entre 60 e 70 °C foi pouco avaliado, mas ocorreu queda acentuada da velocidade de reação, indicando ser uma região de baixa termoestabilidade desta enzima (Figura 4.1.7). Na Figura 4.1.8 compararam-se as velocidades frente à temperatura em diferentes tempos de reação, da qual observou-se que a maior atividade ocorreu nas temperaturas citadas, porém o seu valor absoluto diminuiu à medida que o tempo de reação foi aumentado.

Figura 4.1.7. Velocidade de reação da invertase em função da temperatura para os dados de tempo de reação de 10 minutos (todos os ensaios).

Figura 4.1.8. Velocidade de reação da invertase em função da temperatura para os dados de tempo de reação de 10, 15 e 30 minutos (todos os ensaios).

Os perfis de velocidade em função da temperatura obtidos neste estudo foram semelhantes aos que foram obtidos por RIBEIRO (1997), que determinou a influência da temperatura na atividade de invertase Sigma® solúvel no intervalo entre 25 e 60 °C, estabelecendo que, para um tempo de reação de 5 minutos, a velocidade de reação aumentava até 55°C e caía a 60 °C. O referido autor, verificou que a 55°C a velocidade de reação era 250% superior que a 25°C, enquanto que neste trabalho o aumento observado foi de 165% na faixa de temperatura considerada. A 65 °C observou-se, neste trabalho, uma velocidade de reação 250% maior que a 25 °C.

RIBEIRO (1997), também avaliou a termoestabilidade da invertase nas temperaturas de 30 a 60°C com tempo de exposição de 15 minutos, e verificou que acima de 50°C a atividade residual da invertase caiu acentuadamente. Verificou ainda que a 55 °C a velocidade de reação residual era 43 % menor que a 35 °C. Os resultados ora obtidos não coincidiram com os do citado autor, visto que neste trabalho ocorre queda na velocidade de reação apenas acima de 60 °C, provavelmente devido às características distintas dos preparados contendo invertase utilizados. Neste trabalho, utilizaram-se as células de levedura como o biocatalisador ao invés da invertase purificada, o que ocasiona normalmente maior termoestabilidade em relação à enzima solúvel, pois é como se a enzima estivesse imobilizada dentro da própria célula.

A figura 4.1.9 ilustra a variação da velocidade de reação em função do tempo para diferentes temperaturas, para os ensaios I e II. Os gráficos apresentados não refletem necessariamente queda da atividade enzimática por inativação térmica, pois outro efeito entra em questão: o fator tempo de reação. Com o tempo, grande parte do substrato é consumida e com o decréscimo da concentração de substrato a velocidade de reação diminui (Apêndice C). Porém, observa-se, em ambos os casos, estabilidade da atividade à 35 °C / 37 °C por 30 minutos.

Figura 4.1.9. Velocidade de reação da invertase para diferentes temperaturas em função do tempo. (A) Ensaio I; (B) Ensaio II.

4.1.4.1. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos da Invertase

Determinação da Energia de Ativação (E_a)

O cálculo da energia de ativação foi realizado com os valores das velocidades iniciais de reação e, portanto, foram utilizados apenas os dados referentes a 10 minutos de tempo de reação, apresentados na tabela 4.1.9. Nas Figuras 4.1.10, 4.1.11 e 4.1.12 tem-se os gráficos do logaritmo neperiano da velocidade de reação (v) em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$), elaborados de acordo com a equação de Arrhenius, como apresentado no item 3.3.1 (OWUSU *et al.*, 1992). Os dados de velocidade referentes à temperatura de 70 °C não foram considerados, pois a esta temperatura a enzima mostrou alta termolabilidade, podendo acarretar erro na estimativa da energia de ativação (E_a), se considerada.

Figura 4.1.10. Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da invertase. Dados do Ensaio I, onde foi utilizado para o cálculo as velocidades referentes às temperaturas 25, 37, 45, 55 e 60 °C.

Figura 4.1.11. Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da invertase. Dados do Ensaio II, onde foi utilizado para o cálculo as velocidades referentes às temperaturas 1, 35, 45 e 60 °C.

Figura 4.1.12. Gráfico de Arrhenius para determinação da energia de ativação da invertase. Dados do Ensaio I, onde foi utilizado para o cálculo as velocidades referentes às temperaturas 25, 37, 45, 55, 60 e 65 °C.

Tabela 4.1.10. Cálculos das energias de ativação e valor médio.

	Coeficiente Angular (-Ea/R)⁽¹⁾	Ea (kJ/mol)
Ensaio I	-3032,6	25,2
Ensaio II	-2790,0	23,2
Ensaio III	-3154,4	26,2
Média	-	24,9

(1) considerar R=8,314 J/K.mol.

Sob condições fisiológicas a energia das moléculas reagentes é insuficiente para superar a energia de ativação que separa os reagentes dos produtos. Isto equivale a dizer que com as condições empregadas, a transformação da sacarose em glicose e frutose utilizando somente a energia contida nas moléculas seria improvável. Neste caso, a enzima é utilizada para aumentar a velocidade de reação através da redução da energia de ativação proporcionada pelo uso destes catalisadores biológicos. O baixo valor da energia de ativação significa que esta reação enzimática ocorre facilmente, ou seja, necessita de pouca energia para alcançar o estado de transição. De fato, por se tratar de um catalisador biológico, espera-se que não necessite de condições muito severas para que a reação aconteça, uma vez que reações biológicas ocorrem em condições amenas de pH e temperatura, principalmente. A determinação dos parâmetros termodinâmicos de enzimas tem por finalidade a determinação do grau de pureza da enzima, a verificação da presença de isoenzimas ou então, a comparação de eficiência entre catalisadores imobilizados (HASSMANN, 2003).

Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos Entalpia, Entropia e Energia Livre

Os outros parâmetros termodinâmicos foram calculados de acordo com OWUSU *et al.* (1992), conforme descrito no item 3.3.1 de Materiais e Métodos, e estão apresentados na Tabela 4.1.11. Os dados de velocidade utilizados foram para 37°C para os ensaios I e III e 35°C para o ensaio II, por se tratarem de temperaturas de maior estabilidade da enzima. O cálculo da constante catalítica da reação k_{cat} encontra-se descrito no Apêndice G.

Tabela 4.1.11. Entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia livre de Gibbs (ΔG) calculados para a invertase.

	v $\left(\frac{mg \text{ AR}}{ml \cdot min}\right)$	k_{cat} (min^{-1})	$\Delta G_{(310K)}^{(1)}$ (kJ/mol)	$\Delta H_{(310K)}$ (kJ/mol)	$\Delta S_{(310K)}$ (kJ/mol)
Ensaio I	0,536	13,4	-11,1	22,6	0,11
Ensaio II	0,560	14,0	-11,1	20,6	0,10
Ensaio III	0,618	15,5	-11,0	23,6	0,11
Média	-	-	-11,0	22,3	0,11

(1) considerar $R=8,314 \text{ J/K.mol}$, $T = 310 \text{ K}$, $h = 3,978 \times 10^{-32}$ e $k = 1,381 \times 10^{-23}$

A variação da energia livre de Gibbs (ΔG) e da entropia (ΔS) indica a espontaneidade da reação catalisada sob condições de temperatura e pressão empregadas. O valor negativo de ΔG indica que o processo é exergônico, ou seja, é energeticamente favorável e ocorre com a adição de energia externa ao sistema. O valor positivo de ΔS ($\Delta S > 0$) significa que a reação é espontânea à temperatura utilizada (CASTELLAN, 1986). A variação da entalpia no sistema corresponde ao calor liberado ou absorvido na transformação (a pressão constante). O valor de ΔH positivo indica que a reação catalítica trata-se de uma reação endotérmica, ou seja, o calor de reação é positivo e extraído das vizinhanças na transformação dos substratos em produtos sob condições de temperatura e pressão constantes (CASTELLAN, 1986).

Determinação do Coeficiente de Desnaturação Térmica

O coeficiente de desnaturação térmica foi calculado conforme descrito no item 3.3.1 de Materiais e Métodos. As Figuras 4.1.13 e 4.1.14 apresentam o conjunto de retas utilizadas para a estimativa dos respectivos coeficientes angulares, que foram denominados de Coeficiente Térmico de Desnaturação da Enzima (Ψ). A seguir, traçou-se a curva do logaritmo neperiano do coeficiente térmico de desnaturação ($\ln \Psi$) em função do inverso da temperatura absoluta ($1/T$), para a determinação do valor da energia de desativação térmica da enzima (E_d) (Figura 4.1.15). Este estudo foi feito com os dados obtidos nos ensaios I e II, pois nestes variou-se temperatura e tempo simultaneamente.

Figura 4.1.13. Velocidade de reação da invertase em função do tempo para cada temperatura estudada no Ensaio I e suas respectivas equações de reta e coeficientes angulares. Consideraram-se todos os valores de velocidade para a estimativa da tendência linear, com exceção do ensaio a 25 °C que considerou apenas as velocidades do intervalo de tempo de 20 a 60 minutos. (A) ensaio a 25°C; (B) ensaio a 37°C; (C) ensaio a 45°C; (D) ensaio a 55°C; (E) ensaio a 60°C e (F) ensaio a 70°C.

Figura 4.1.14. Velocidade de reação da invertase em função do tempo para cada temperatura estudada no Ensaio II e suas respectivas equações de reta e coeficientes angulares. Consideraram-se todos os valores de velocidade para a estimativa da tendência linear. (A) ensaio a 35°C; (B) ensaio a 45°C e (C) ensaio a 60°C.

Figura 4.1.15. Gráficos de Arrhenius para determinação da energia de desativação térmica da invertase (E_d). Dados dos ensaios I e II (para a linearização utilizaram-se os valores de $\ln \Psi$ obtidos para as temperaturas 25 °C, 35 °C, 37 °C, 45 °C, 55 °C, 60 °C e 70 °C).

Tabela 4.1.12. Valor da energia de desativação térmica (E_d) para a enzima invertase.

	Coefficiente Angular $(-E_d/R)^{(1)}$	E_d (kJ/mol)
Média	3579,0	29,8

(1) considerar $R=8,314$ J/K.mol.

Comparando-se o valor da energia de ativação da reação de desativação térmica deste sistema enzimático ($E_d = 29,8$ kJ/mol) com o valor da energia de ativação da reação de hidrólise da sacarose por este mesmo biocatalisador ($E_a = 24,9$ kJ/mol), como foram obtidos valores de ordem de grandeza equivalentes, é de se esperar que a reação de desativação térmica da enzima necessite de pouca energia para ocorrer, o que é esperado por se tratar de uma enzima. Foi encontrado na literatura o valor de 302 kJ/mol para a energia de desativação térmica da invertase purificada e solúvel (BASSETTI *et al.*, 2000). O valor encontrado neste trabalho pode levar a duas hipóteses por se tratarem de células intactas: a primeira de que proteases intracelulares podem ser ativadas pelo calor e reduzir sensivelmente a estabilidade térmica da invertase, a segunda é que, devido à heterogeneidade do sistema houve restrições à transferência de massa no biocatalisador e o resultado não representa a realidade do sistema.

4.2. SIMULAÇÃO MATEMÁTICA EM COMPUTADOR DE UM REATOR ENZIMÁTICO CSTR

Estimaram-se através de simulações matemáticas a influência da taxa de diluição (D) e da concentração de sacarose no grau de conversão de um biorreator enzimático contínuo, utilizando-se a ferramenta Simulink do software matemático MaTlab versão 5.3 (licenciado para a Fundação Educacional Inaciana). Na simulação considerou-se que o reator enzimático com membrana opera de forma equivalente a um reator contínuo de mistura perfeita (CSTR – *continuous stirred tank reactor*), como apresentado na Figura 4.2.1. As principais hipóteses feitas no balanço material do substrato em reator tipo CSTR ideal são:

1. O volume de reator permanece constante no tempo ($V = \text{cte}$). Para que isso ocorra, as vazões de entrada (Q_0) e de saída (Q) do reator devem ser iguais;
2. A densidade é constante;
3. O reator é homogêneo, portanto ocorre mistura perfeita e a concentração de substrato residual (S) dentro do reator é igual à concentração de substrato na saída do reator.

Figura 4.2.1. Esquema de um reator contínuo tipo CSTR.

O balanço material genérico do substrato em um CSTR por unidade de volume e tempo está nas equações 4.2.1 e 4.2.2.

$$(\text{Acúmulo}) = (\text{Entrada}) - (\text{Saída}) - (\text{Consumo}) \quad (\text{Equação 4.2.1})$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = Q_0 S_0 - QS - r_s V \quad (\text{Equação 4.2.2})$$

Onde r_s é a velocidade de consumo de substrato.

Este balanço pode ser simplificado com as hipóteses apresentadas e com a inserção da taxa de diluição ou vazão específica (D) no lugar da vazão. Define-se a taxa de diluição (D) como o inverso do tempo de residência (τ) ou a razão entre a vazão e o volume do reator ($D=Q/V$). Pode-se substituir também o termo r_s da equação 4.2.2 pela equação cinética da reação. No caso da invertase, como esta é uma enzima que obedece ao modelo cinético de Michaelis-Menten (item 4.1.2), substitui-se a equação 4.2.3 na equação 4.2.2, obtendo-se a equação 4.2.4, que corresponde ao balanço material da sacarose em um reator enzimático contínuo tipo CSTR operando com invertase.

$$r_s = v = \left(\frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_M + S} \right) \quad (\text{Equação 4.2.3})$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_0 - S) - \left(\frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_M + S} \right) \quad (\text{Equação 4.2.4})$$

A equação 4.2.4 foi utilizada no software matemático Matlab para gerar uma simulação matemática. A integração numérica desta equação foi feita com a ferramenta Simulink do software MatLab, para diferentes valores de D e S_0 .

Figura 4.2.2. Representação Esquemática em Diagrama de Blocos da Rotina de Integração numérica feita no Simulink.

4.2.1. Estimativa da Influência da Taxa de Diluição (D) e da Concentração de Substrato na Alimentação (So) no Grau de Conversão da Sacarose (X)

Para estas simulações utilizaram-se os parâmetros cinéticos da invertase determinados anteriormente (item 4.1.2). Esses parâmetros foram determinados para as seguintes condições: concentração de invertase de 40 µg/mL, temperatura=37°C e pH 4,6. Para reduzir o número de simulações utilizou-se apenas os valores médios de $K_M = 71 \text{ mM}$ e $v_{\text{máx}} = 1,0 \left(\frac{\text{mg AR}}{\text{mL.min}} \right)$. Nas simulações, a velocidade máxima de reação passou por uma transformação de unidades, para ser expressa em quantidade de substrato consumido por unidade de tempo e volume, e ser dimensionalmente consistente com as outras grandezas do balanço material utilizado.

- *Exemplo de Transformação:*

$$v = 1,0 \left(\frac{\text{mg AR}}{\text{mL.min}} \right) \times 1000 \left(\frac{\text{mL}}{\text{L}} \right) \times \frac{1}{180} \left(\frac{\text{mmol AR}}{\text{mg AR}} \right) = 5,55 \left(\frac{\text{mmol AR}}{\text{L.min}} \right)$$

Como a estequiometria da reação de hidrólise da sacarose é:

ou seja, para cada 1 mol de sacarose consumido formam-se 2 moles de açúcares redutores. Portanto a velocidade de reação fica expressa como:

$$V = 5,55 \left(\frac{\text{mmol AR}}{\text{L.min}} \right) \div 2 = 2,775 \left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\text{L.min}} \right)$$

Os valores de taxa de diluição utilizados para a simulação estão apresentados na Tabela 4.2.1, com as respectivas vazões que fornecem este valor de D. Estes valores foram escolhidos por serem o intervalo real de operação da bomba peristáltica em uso neste trabalho (de 0,4 a 6,0 mL/min). O volume do reator enzimático com membrana utilizado em laboratório é de 50 mL. Os valores de concentração de sacarose na alimentação (So) testadas foram respectivamente: 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 mM.

Tabela 4.2.1. Vazão (Q), taxa de Diluição (D) e respectivos tempos de residência (τ) simulados.

Q (mL/min)	0,4	0,5	0,8	1,0	1,5	2,0	2,5	5,0	6,0
D* (min ⁻¹)	0,008	0,01	0,016	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,12
τ (min)	125	100	62,5	50	33,3	25	20	10	8,3

*calculado para V=50mL.

Determinaram-se o grau de conversão (X) pela equação 4.2.5 e a massa de frutose produzida, expressa em concentração (g/L), na saída do reator, pela equação 4.2.6. S corresponde ao valor estimado da concentração de substrato na saída do reator quando este encontra-se em regime permanente. Foi determinado através do gráfico de S em função do tempo, obtido para cada simulação (as simulações estão apresentadas no Apêndice D), como sendo o valor de S quando dS/dt é igual a zero, ou seja, S não varia em função do tempo.

$$X = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \cdot 100 \quad (\text{Equação 4.2.5})$$

$$Frutose_{produzida} = (S_0 - S) \cdot 180 \quad (\text{Equação 4.2.6})$$

Tabela 4.2.2. Valores de grau de conversão (X) obtidos pela simulação com taxa de diluição (D) variando de 0,008 a 0,12 min⁻¹ e diferentes concentrações de substrato na alimentação (So).

[So] (mM)	D (min ⁻¹)								
	0,008	0,01	0,016	0,02	0,03	0,04	0,05	0,10	0,12
	X (%)								
10	83,0	79,0	70,0	65,0	55,0	48,0	42,0	26,0	23,0
50	81,2	77,0	66,4	60,4	49,0	40,8	34,8	20,0	17,0
100	79,0	74,1	61,2	54,3	41,7	33,5	28,0	15,1	12,7
250	70,6	62,9	45,6	38,1	26,9	20,4	16,6	8,5	7,1
500	53,2	44,2	28,9	23,4	15,8	11,9	9,6	4,8	4,0
750	39,9	32,5	20,6	16,6	11,5	8,4	6,7	3,4	2,8
1000	31,4	25,3	15,9	12,8	8,6	6,5	5,2	2,6	2,2

Figura 4.2.3. Influência da concentração de sacarose na alimentação do reator (So) no grau de conversão, para diferentes valores de taxa de diluição (D).

Pela Figura 4.2.3 é possível observar que, nas condições simuladas, com o aumento da concentração de sacarose alimentada no reator ocorre uma queda considerável do grau de conversão, sendo esta queda mais expressiva para as taxas de diluição maiores. Taxas de diluição acima de 0,1 min⁻¹, segundo a simulação, reproduziram uma situação em que o grau de conversão se aproximou de zero, indicando condição de lavagem do reator. Na Figura 4.2.4 pode-se observar o comportamento simulado do reator para as duas

concentrações de substrato que têm maior interesse nos ensaios experimentais de bioconversão: 500 e 1000 mM.

Figura 4.2.4. Simulação da influência da taxa de diluição (D) no grau de conversão.

Pela Figura 4.2.4 pode-se observar que acima de $0,02 \text{ min}^{-1}$ ocorre queda considerável na conversão (X menor que 12%). Por isso, os primeiros ensaios experimentais com o biorreator (item 4.3.1) tiveram sua taxa de diluição fixada no valor mínimo possível para as condições experimentais em uso, que é de $0,008$ a $0,01 \text{ min}^{-1}$, pois correspondem às condições que oferecem maior grau de conversão para as concentrações de sacarose a serem testadas (500 e 1000 mM). Pode-se concluir que a relação entre grau de conversão e taxa de diluição é inversamente proporcional, sendo o mesmo observado em relação ao grau de conversão e a concentração inicial de substrato.

Figura 4.2.5. Perfil da produção de frutose em função da concentração de substrato na alimentação (S_o) para diferentes valores de taxa de diluição (D) e considerando estado estacionário.

Figura 4.2.6. Tempo para que o reator atinja regime permanente (RP) em função da concentração de substrato na alimentação (S_o) para diferentes valores de taxa de diluição (D).

Pode-se observar pela Figura 4.2.5 que, por exemplo, para D igual a $0,02 \text{ min}^{-1}$ ocorre uma saturação no sistema a partir de 400 mM de sacarose na alimentação, pois a quantidade de frutose produzida fica constante. Isso está relacionado com o tempo de residência no reator e com o tempo de reação ou constante catalítica da enzima. O gráfico também evidencia que para se obter maior produção de frutose, para concentração mais elevada de substrato inicial, deve-se aumentar o tempo de residência no reator. A Figura 4.2.6 mostra que o tempo que o sistema levou para atingir regime permanente é função de

duas variáveis testadas nesta simulação: a taxa de diluição e a concentração de substrato inicial. O tempo gasto para que o reator atinja regime permanente é maior quanto maior for a concentração inicial de substrato na alimentação e quanto menor for a taxa de diluição.

4.2.2. Simulação do comportamento do reator e validação experimental das estimativas

Para estas simulações foram utilizados os parâmetros cinéticos da invertase determinados experimentalmente neste trabalho (item 4.1.2), e que estão reapresentados na Tabela 4.2.3. Esses parâmetros foram determinados para uma concentração de invertase de 40 $\mu\text{g/mL}$, temperatura de 37°C e pH 4,6. Para a validação das simulações utilizaram-se os dados do ensaio I02, que será apresentado em detalhes no item 4.3.1 deste trabalho. Esse ensaio foi realizado no reator enzimático, operando em regime contínuo tipo CSTR com alimentação na tampa superior e saída na tampa inferior do reator, nas condições experimentais: concentração de invertase de 40 $\mu\text{g/mL}$, volume do reator mantido constante em 50 mL, concentração de sacarose na alimentação (S_0) igual a 500 mM, pH 4,6, temperatura de 37°C (valores nos quais foi determinado o $v_{\text{máx}}$) e vazão média de alimentação de $0,34 \pm 0,02$ mL/min, o que resulta em uma taxa de diluição (D) de aproximadamente $0,007 \text{ min}^{-1}$. O reator foi operado com uma membrana de acetato de celulose de diâmetro de poro médio de $0,45 \mu\text{m}$.

Tabela 4.2.3. Valores experimentais dos parâmetros cinéticos determinados para a invertase.

	$V_{\text{máx}}$ $\left(\frac{\text{mg}_{\text{AR}}}{\text{mL} \cdot \text{min}}\right)$	$V_{\text{máx}}$ $\left(\frac{\text{mmol SACAROSE consumida}}{\text{L} \cdot \text{min}}\right)$	K_M (mM)
Limite Inferior	0,90	2,50	82
Média	1,00	2,77	71
Limite Superior	1,11	3,08	65

*valores utilizados nas simulações.

Foram realizadas nove simulações com todos os valores de K_M e $v_{\text{máx}}$ apresentados na tabela 4.2.3. Foram combinados, entre si, os valores obtidos para limites inferiores, superiores e média dos parâmetros cinéticos e mantiveram-se fixas as seguintes condições: S_0 igual a 500 mM e D igual a $0,008 \text{ min}^{-1}$. Essas simulações visaram a determinação de uma faixa de valores de grau de conversão para comparação com os valores obtidos experimentalmente, como mostra a Tabela 4.2.4. Os gráficos obtidos para cada simulação estão apresentados na figura 4.2.7 e os resultados numéricos de todas as simulações estão apresentados no Apêndice D2.

Simulação 1

$$(v_{\text{máx}} = 2,5 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 71 \text{ mM})$$

Simulação 2

$$(v_{\text{máx}} = 2,77 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 71 \text{ mM})$$

Simulação 3

$$(v_{\text{máx}} = 3,08 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 71 \text{ mM})$$

Simulação 4

$$(v_{\text{máx}} = 2,5 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 82 \text{ mM})$$

Figura 4.2.7. Curvas de concentração de substrato na saída do reator (S) em função do tempo, obtidas no software MatLab para as simulações deste item.

Simulação 5

$$(v_{\text{máx}} = 2,77 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 82 \text{ mM})$$

Simulação 6

$$(v_{\text{máx}} = 3,08 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 82 \text{ mM})$$

Simulação 7

$$(v_{\text{máx}} = 2,5 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 65 \text{ mM})$$

Simulação 8

$$(v_{\text{máx}} = 2,77 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 65 \text{ mM})$$

Simulação 9

$$(v_{\text{máx}} = 3,08 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{ml} \cdot \text{min}} \right), K_M = 65 \text{ mM})$$

(Continuação) Figura 4.2.7. Curvas de concentração de substrato na saída do reator (S) em função do tempo obtidas no software MatLab para as simulações deste item.

Tabela 4.2.4. Comparação dos valores obtidos de Grau de Conversão (X), tempo para regime permanente (t_{RP}) e concentração de frutose (g/L) obtidos pela simulação e experimentalmente ($D=0,008 \text{ min}^{-1}$ e $S_0=500\text{mM}$).

	K_M	$V_{\text{máx}}$	X (%)	Frutose (g/L)	t_{RP} (min)
Simulação 01	71	2,50	48,86	43,97	440
Simulação 02	71	2,77	53,22	47,89	400
Simulação 03	71	3,08	57,66	51,89	360
Simulação 04	82	2,50	47,56	42,80	380
Simulação 05	82	2,77	51,76	46,58	360
Simulação 06	82	3,08	56,08	50,47	340
Simulação 07	65	2,50	49,62	44,66	380
Simulação 08	65	2,77	54,06	48,65	340
Simulação 09	65	3,08	58,60	52,74	460
Média (simulação)			53,05	47,73	384
Experimental (Ensaio I02)			$36,43 \pm 4,05$	$32,79 \pm 3,64$	210

Figura 4.2.8. Comparação dos valores simulados e obtidos experimentalmente da concentração de substrato (S) na saída do reator. Os valores experimentais correspondem aos dados do ensaio I02 que foi realizado nas mesmas condições da simulação.

O desvio observado na Figura 4.2.8 entre as condições experimentais e os valores estimados pela simulação pode estar relacionado com as variações entre o comportamento ideal e real do reator contínuo. Desvios do comportamento ideal do reator estão relacionados à: dificuldade de manter o volume do reator constante; falta de homogeneidade no sistema; mistura no reator não é instantânea como o modelo do CSTR prevê; a reação não é instantânea; variação na temperatura dentro do reator; variações na vazão de alimentação devido ao sistema de operação por pulsos da bomba peristáltica; deposição de células de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a membrana (o que reduz a eficiência da interação física enzima-substrato). Todos estes fatores contribuíram para redução no grau de conversão do reator real em comparação ao reator ideal em cerca de 31%. De qualquer forma pode-se dizer que as simulações foram válidas para o rastreamento das condições de operação e comportamento do reator com membrana e são uma importante ferramenta para indicar que condições iniciais devem ser estabelecidas para o biorreator.

BÓDALO *et al.* (2001) desenvolveu um modelo fenomenológico capaz de descrever o comportamento de um reator enzimático com membrana em condições não experimentais para a resolução de uma mistura racêmica DL-fenilalanina usando L-aminoacilase, para otimização do projeto do reator. A concepção do reator foi de um reator de mistura perfeita acoplado a uma unidade externa de ultrafiltração. Para a modelagem, o balanço material considerou o reator completo como um CSTR ideal, com distribuição homogênea de catalisador, substratos e produto, como neste trabalho, e a reação seguia o modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição não-competitiva pelo substrato. Os autores simularam os valores de produtividade e conversão para várias condições experimentais e verificaram que a produtividade no reator aumentava com o aumento da concentração de substrato ou aumento da vazão, porém com diminuição no grau de conversão, como observado neste trabalho no item 4.2.1. BÓDALO *et al.* (2001) tiveram também uma boa aproximação entre os valores de conversão preditos (previstos pelo modelo) e experimentais, com desvios menores que 5% na maioria dos casos. Com o seu modelo os autores detectaram que em valores de vazão mais altos existe um valor de concentração de substrato na alimentação na qual a produtividade é máxima, porém sofre redução se aumentar a vazão devido à queda do grau de conversão.

4.2.3. Complementos dos Estudos de Simulação

Supondo que para as enzimas que seguem o modelo de Michaelis-Menten, aplica-se a equação 4.2.7:

$$v_{\text{máx}} = k_{\text{cat}} \cdot [E_T] \quad (\text{Equação 4.2.7})$$

Sendo: $v_{\text{máx}}$ a velocidade máxima de reação, k_{cat} a constante catalítica da reação ou número de “turn-over” e $[E_T]$ a concentração de enzima total no reator.

Se k_{cat} é constante para o sistema enzima-substrato e $[E_T]$ é conhecido, pode-se prever a velocidade máxima de reação para outras concentrações de enzima e com isso comparar as simulações com outros valores experimentais. Duas novas concentrações de enzima foram escolhidas para as simulações: 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, por se tratarem de concentrações que foram testadas experimentalmente.

Determinação do k_{cat}

Considerando $v_{\text{máx}} = 2,775 \left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\text{L. min}} \right)$, que é valor médio da velocidade máxima da invertase e $[E_T] = 40 \mu\text{g/mL}$, tem-se:

$$k_{\text{cat}} = 0,0694 \left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\mu\text{g}_{\text{enzima}} \cdot \text{min}} \right)$$

Estimativa da $v_{\text{máx}}$

Obtém-se:

- Para $[E_T] = 500 \mu\text{g/mL} \Rightarrow v_{\text{máx}} = 34,687 \left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\text{L. min}} \right)$
- Para $[E_T] = 1000 \mu\text{g/mL} \Rightarrow v_{\text{máx}} = 69,375 \left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\text{L. min}} \right)$

Foram feitas simulações com estes valores de $v_{\text{máx}}$ (34,687 e 69,375 $\left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\text{L. min}} \right)$) e os seguintes parâmetros: $K_M = 71 \text{ mM}$, $D = 0,008 \text{ min}^{-1}$ e $S_0 = 500 \text{ mM}$.

Os graus de conversão da simulação foram comparados com os valores experimentais. Todas as simulações estão apresentadas no Apêndice D3. Para a comparação foram

utilizados os valores experimentais de dois ensaios realizados no biorreator: o ensaio I04 que utilizou $[E_T] = 500 \mu\text{g/mL}$ e o ensaio I09 que utilizou $[E_T] = 1000 \mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos nesses ensaios experimentais estão apresentados em detalhe no item 4.3.1 e a comparação está apresentada na Tabela 4.2.5.

Simulação 10

$$(v_{\text{máx}} = 34,687 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right), K_M = 71 \text{ mM})$$

Simulação 11

$$(v_{\text{máx}} = 69,375 \left(\frac{\text{mg}_{AR}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right), K_M = 71 \text{ mM})$$

Figura 4.2.9. Curvas de concentração de substrato na saída do reator (S) em função do tempo obtidas no software MatLab para as simulações deste item.

O ensaio I04 foi realizado no reator enzimático, em regime contínuo tipo CSTR, nas seguintes condições experimentais: concentração de invertase de $500 \mu\text{g/mL}$, volume do reator mantido constante em 50 mL, concentração de sacarose na alimentação (S_0) igual a 500 mM, pH 4,6, temperatura de 37°C (valores nos quais foi determinado o $v_{\text{máx}}$) e vazão média de alimentação de $0,40 \pm 0,04 \text{ mL/min}$, o que resulta em uma taxa de diluição (D) de aproximadamente $0,008 \text{ min}^{-1}$. O ensaio I09 foi realizado no reator enzimático, em regime contínuo tipo CSTR (alimentação superior e saída inferior), nas seguintes condições experimentais: concentração de invertase de $1000 \mu\text{g/mL}$, volume do reator mantido constante em 50 mL, concentração de sacarose na alimentação (S_0) igual a 500 mM, pH 4,6, temperatura de 37°C (valores nos quais foi determinado o $v_{\text{máx}}$) e vazão média de alimentação de $0,39 \pm 0,07 \text{ mL/min}$, o que resulta em uma taxa de diluição (D) de aproximadamente $0,008 \text{ min}^{-1}$. Ambos foram operados com uma membrana de acetato de celulose de diâmetro de poro médio de $0,45 \mu\text{m}$.

Tabela 4.2.5. Comparação dos graus de conversão (X) para os valores simulados e experimentais.

[E_T] (μg/mL)	X (%) <i>simulação</i>	X (%) <i>experimental</i>	Desvio entre experimental (média) e simulação (%)
500	98,18	87,50 ± 9,10	10,9
1000	99,09	91,03 ± 6,64	8,1

Tabela 4.2.6. Comparação dos valores experimentais e simulados de tempo necessário para atingir regime permanente (t_{RP}), considerando para todos as mesmas condições experimentais $S_0=500$ mM, $D=0,008$ min⁻¹, $t=37^\circ\text{C}$ e $\text{pH}=4,6$ e os parâmetros para a simulação $K_M=71$ mM e $k_{cat}=0,0694$ $\left(\frac{\text{mmol SACAROSE}_{\text{consumida}}}{\mu\text{g}_{\text{enzima}} \cdot \text{min}}\right)$.

[E_T] (μg/mL)	t_{RP} (min) <i>simulação</i>	t_{RP} (min) <i>experimental</i>
40	880	~210
500	33	~180
1000	16	~30

c

De acordo com a Tabela 4.2.6, é possível observar que, tanto para os valores simulados como para os experimentais, com o aumento da concentração de enzima reduz-se consideravelmente o tempo necessário para que o reator atinja regime permanente.

(A)

(B)

Figura 4.2.10. Comparação dos graus de conversão obtidos pela simulação e com valores experimentais para duas concentrações de enzima no reator. (A) concentração de enzima de 500 $\mu\text{g/mL}$ (valores experimentais do ensaio I04). (B) concentração de enzima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (valores experimentais do ensaio I09). A barra de erros representa o intervalo obtido pelo desvio padrão para o grau de conversão experimental.

Os desvios do valor estimado e do valor real de grau de conversão são pequenos, da ordem de 10%, apesar desta simulação contar com muitos erros de estimativa, tais como: o $v_{\text{máx}}$ real tem um desvio grande do $v_{\text{máx}}$ estimado pela constante catalítica e a elevada concentração de células no reator, o que provoca entupimento e adsorção da célula na membrana, tornando o comportamento do reator cada vez mais distante do ideal. Esta etapa do trabalho demonstrou que a simulação é eficiente para previsão do comportamento do reator, poupando com isso muito trabalho experimental.

4.3. BIORREATOR ENZIMÁTICO: USO DA INVERTASE

Neste item serão apresentados os resultados experimentais obtidos durante o estudo da operação do biorreator enzimático com membrana com a invertase, para a hidrólise enzimática da sacarose.

4.3.1. Experimentos Iniciais

Foram realizados oito experimentos iniciais (I01 a I09), de hidrólise da sacarose pela ação da invertase em reator enzimático com membrana (REM), operando em regime contínuo. O objetivo foi verificar a influência da vazão, da concentração de sacarose na alimentação e da concentração de enzima no reator, no grau de conversão da sacarose a frutose (X) e na velocidade de reação da hidrólise enzimática (r).

A seguir, nas Figuras 4.3.1 a 4.3.8, estão apresentados os resultados obtidos para cada um dos ensaios contínuos realizados neste item. A Figura 4.3.9 apresenta os resultados de um ensaio realizado em regime descontínuo. A Tabela 4.3.3 apresenta um quadro resumo com os experimentos que foram realizados nesta etapa inicial do trabalho. Todos os ensaios realizados com a invertase no reator enzimático com membrana receberam a inicial "I" na sua identificação. Algumas condições no biorreator foram mantidas iguais em todos os ensaios e estão listadas na Tabela 4.3.1. Estes ensaios tiveram a determinação da glicose realizada pelo método do DNS de determinação de açúcares redutores totais (item 3.2.3.1).

Tabela 4.3.1. Condições Experimentais fixas para os ensaios I01 a I09.

Volume do Reator.....	50 mL
Temperatura.....	37 °C
pH.....	4,6
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\varnothing_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Agitação.....	Vórtice de $\frac{1}{3}$ do volume útil do reator

Tabela 4.3.2. Condições Experimentais para o ensaio em processo descontínuo.

Volume do Reator.....	500 mL
Temperatura.....	37 °C
pH.....	4,6
Agitação.....	300 rpm

Tabela 4.3.3. Descrição das condições testadas dos ensaios I01 a I09 (para todos estes ensaios o pH foi mantido em 4,6 e a temperatura em 37°C).

Ensaio	Duração do Ensaio	[Sacarose] (mM)	[invertase] ($\mu\text{g/ml}$)	Vazão _{teórica} (mL/min)	Vazão _{real} (1) (mL/min)	Temperatura _{real} (°C)
I01	9,5 h	500	500	1,0	$0,84 \pm 0,06$	$37,1 \pm 1,2$
I02	55 h	500	40	0,4	$0,34 \pm 0,02$	$36,8 \pm 0,7$
I03	27,25 h	500	250	0,4	$0,40 \pm 0,06$	$36,0 \pm 1,4$
I04	56 h	500	500	0,4	$0,40 \pm 0,04$	$36,3 \pm 1,3$
I05	28 h	1000	1000	0,4	$0,40 \pm 0,07$	$37,9 \pm 1,5$
I06	28 h	500	1000	0,4	$0,40 \pm 0,05$	ND
I07	26,5	500	1000	0,4	$0,22 \pm 0,08$	$36,8 \pm 0,7$
I09	31 h	500	1000	0,4	$0,39 \pm 0,07$	$37,3 \pm 1,0$
Descontínuo	25 h	500	1000	-	-	

(1) corresponde à média e o desvio padrão da vazão;

(2) O ensaio I08 não consta desta lista pois sua membrana rompeu após 5 horas de ensaio e foi cancelado. As mesmas condições experimentais foram repetidas no ensaio I09;

(3) ND...não determinado.

Nos gráficos das Figuras 4.3.1 a 4.3.9 estão apresentados os principais resultados de cada um destes ensaios, citados na Tabela 4.3.3. As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de X e r dos gráficos, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice H.

Ensaio I01

(A)

(B)

Figura 4.3.1. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio I01 ($[S]=500$ mM; $[I]=500$ μ g/mL; $Q=1,0$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 77,5\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,78$ mmol/h.mg).

Ensaio I02

(A)

(B)

Figura 4.3.2. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio I02 ($[S]=500$ mM; $[I]=40$ μ g/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 36,3\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=1,85$ mmol/h.mg).

Ensaio 103

(A)

(B)

Figura 4.3.3. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio 103 ($[S]=500$ mM; $[I]=250$ μ g/mL; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 84,7\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,81$ mmol/h.mg).

Ensaio 104

(A)

(B)

Figura 4.3.4. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio 104* ($[S]=500$ mM; $[I]=500$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 86,7\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,42$ mmol/h.mg).

Ensaio I05

(A)

(A)

Figura 4.3.5. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio I05* ($[S]=1000$ mM; $[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 69,4\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,33$ mmol/h.mg).

Ensaio 106

(A)

(B)

Figura 4.3.6. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio 106* ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 82,4\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,20$ mmol/h.mg).

Ensaio I07

(A)

(B)

Figura 4.3.7. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio I07 ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 90,0\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,12$ mmol/h.mg).

Ensaio 109

(A)

(B)

Figura 4.3.8. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio 109 ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 91,0\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,21$ mmol/h.mg).

Ensaio Batelada

(A)

(B)

Figura 4.3.9. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio Batelada* ($[S]=500$ mM; $[I]=500$ μ g/mL). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão máxima ($X_{\text{médio}} = 100\%$).

Analisando-se as curvas dos gráficos do logaritmo de r em função do tempo, para os ensaios I01 a I09 observa-se que a enzima permaneceu estável por até 60 horas a 37°C em pH 4,6, quando aprisionada em um biorreator de membrana. Nos gráficos referentes ao grau de conversão em função do tempo, para os ensaios I01 a I09, constataram-se que o sistema se manteve em regime permanente durante todo o tempo de operação do reator. As variações foram pequenas e ocorreram, provavelmente, em decorrência das oscilações de vazão da bomba peristáltica, e/ou erro analítico inerente à determinação da concentração de glicose.

Foram verificadas que grandes variações na vazão e no volume do reator afetavam o funcionamento do equipamento. Isto pode ser observado nos valores do grau de conversão (X) e da velocidade de reação (r). Tem-se como exemplo para esta observação o ensaio I02, que sofreu um esvaziamento do reator entre o período de 9,5 e 24 horas do ensaio. Porém, após resolução desse problema, o reator entrou novamente em regime permanente e mostrou a capacidade de recuperação do sistema.

O ensaio em processo descontínuo, apresentado na Figura 4.3.9, foi realizado para efeito de comparação do grau de conversão experimental da hidrólise da sacarose com os conduzidos em regime contínuo. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que após 6 horas de operação em regime descontínuo, 100% da sacarose foi convertida em glicose e frutose.

A Figura 4.3.10 compara a operação do reator ao longo do tempo nos ensaios em regime contínuo (I02, I03, I04, I09) e em regime descontínuo. Observa-se desta figura a influência da concentração de invertase no grau de conversão, o que será detalhado a seguir em gráficos das médias do grau de conversão.

Figura 4.3.10. Grau de Conversão X em função do tempo para os ensaio I02, I03, I04, I09 e batelada.

Um quadro resumo dos experimentos realizados encontra-se na Tabela 4.3.4. Com os experimentos até aqui conduzidos foi possível levantar o comportamento do reator, quanto ao grau de conversão (X) da sacarose em glicose e frutose e à velocidade de reação da hidrólise enzimática (r), quando submetido à variação na vazão de alimentação (0,4 e 0,8 mL/min), concentração de invertase (40, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) e concentração de sacarose (500 e 1000 mM).

Tabela 4.3.4. Quadro resumo dos ensaios I01 a I09.

Variáveis do Experimento							Resultados (valores médios)						
Ensaio	Duração do Ensaio	[Sacarose] (mM)	[invertase] (µg/ml)	pH	T (°C)	Vazão (ml/min)	D (min ⁻¹)	Membrana	t _{RP} ⁽¹⁾ (h)	X _{médio} ⁽²⁾ (%)	r _{médio} $\left(\frac{mmol_{ruose}}{h.mg_{enzima}}\right)$	[AR] (mM)	[S] _{saída} (mM)
I01	9,5 h	500	500	4,6	37,1 ± 1,2	0,84 ± 0,06	0,017	HA 0,45 µm	2,5	77,5 ± 5,6	0,78 ± 0,08	775 ± 56	113 ± 28
I02	55 h	500	40	4,6	36,8 ± 0,7	0,34 ± 0,02	0,007	HA 0,45 µm	2,5	36,3 ± 3,9	1,85 ± 0,24	364 ± 39	318 ± 20
I03	27,25 h	500	250	4,6	36,0 ± 1,4	0,40 ± 0,06	0,008	HA 0,45 µm	2,5	84,7 ± 6,7	0,81 ± 0,13	847 ± 66	76 ± 33
I04	56 h	500	500	4,6	36,3 ± 1,3	0,40 ± 0,04	0,008	HA 0,45 µm	2,5	86,7 ± 9,5	0,42 ± 0,06	867 ± 95	67 ± 47
I05	28 h	1000	1000	4,6	37,9 ± 1,5	0,40 ± 0,07	0,008	HA 0,45 µm	2,5	69,4 ± 2,6	0,33 ± 0,06	1389 ± 53	305 ± 26
I06	28 h	500	1000	4,6	37	0,40 ± 0,05	0,008	HA 0,45 µm	2,5	82,4 ± 3,8	0,20 ± 0,03	824 ± 38	88 ± 19
I07	26,5	500	1000	4,6	36,8 ± 0,7	0,22 ± 0,08	0,004	HA 0,45 µm	2,5	90 ± 9,5	0,12 ± 0,05	900 ± 95	50 ± 47
I09	31	500	1000	4,6	37,3 ± 1,0	0,39 ± 0,07	0,008	HA 0,45 µm	1,5	91 ± 6,6	0,21 ± 0,04	910 ± 66	45 ± 33
Descontínuo	25	500	1000	4,6	37	-	-	-	-	100% (máximo)	-	1000 (máximo)	-

(1) t_{RP} = tempo para regime permanente ou estado estacionário;

(2) X_{médio} = grau de conversão médio.

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.3.4 foi possível observar os seguintes comportamentos: influência da concentração de invertase no valor de X (Figura 4.3.11), influência da concentração de invertase no valor de r (Figura 4.3.12), influência da concentração de sacarose em X (Figura 4.3.13), influência da vazão em X (Figura 4.3.14) e influência da vazão em r (Figura 4.3.15).

Figura 4.3.11. Influência da concentração de invertase no grau de conversão médio da sacarose ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,6$, $[\text{Sacarose}]=500 \text{ mM}$ e $Q_{\text{média}}=0,4 \text{ mL/min}$).

Figura 4.3.12. Influência da concentração de invertase na velocidade de reação média expressa por unidade de volume de reação processado ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,6$, $[\text{Sacarose}]=500 \text{ mM}$ e $Q_{\text{média}}=0,4 \text{ mL/min}$).

Figura 4.3.13. Influência da concentração de sacarose no grau de conversão ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{invertase}]=1000\text{ mM}$ e $Q_{\text{média}}=0,4\text{ mL/min}$).

Figura 4.3.14. Influência da vazão de alimentação no grau de conversão da sacarose ($T=37^{\circ}\text{C}$, pH 4,6, $[\text{Sacarose}]=500\text{ mM}$).

Figura 4.3.15. Influência da vazão de alimentação na velocidade de reação média expressa por unidade de volume de reação processado ($T=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 4,6$, $[\text{Sacarose}]=500 \text{ mM}$).

Como se pode observar pela Figura 4.3.11, o grau de conversão da sacarose independeu da concentração de enzima a partir de $250 \mu\text{g}$ de invertase/mL, indicando que outras variáveis devem ser estudadas a fim de elevar o grau de conversão acima deste nível de concentração de enzima. A Figura 4.3.12 mostra que a grandeza “taxa de reação” multiplicada pela concentração de invertase ($r \times [\text{invertase}]$) aumentou quase que linearmente até $250 \mu\text{g/mL}$ de enzima, permanecendo constante acima deste valor. Ou seja, esta grandeza, que está diretamente relacionada à produtividade do reator, ficou constante para concentração de invertase superior a $250 \mu\text{g/mL}$. Em função destas observações fixou-se para os próximos experimentos a concentração de invertase em $1000 \mu\text{g/mL}$, pois se considerou que concentrações superiores a essas não aumentariam a produtividade ou a conversão no reator e, ainda, poderiam causar problemas de entupimento da membrana devido à presença de maior concentração de sólidos em suspensão. Através dos dados apresentados de variação da vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) no reator, para os ensaios que operaram na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ (Tabelas I.5 a I.8 do Apêndice I), foi possível observar que com esta concentração não houve entupimento da membrana nas condições testadas de tempos de operação (até 30 h) e de concentração de sacarose (até 1000 mM).

A Figura 4.3.13 mostra a influência da concentração de sacarose no grau de conversão do reator, sendo esta menor quanto maior for a concentração de sacarose na alimentação, resultado anteriormente previsto com as simulações de operação (item 4.2). A Figura 4.3.14 mostra que a vazão de alimentação, por influir diretamente no tempo de residência do substrato no interior do reator, influenciou no grau de conversão, sendo menor a conversão quanto maior a vazão, porém com indicação de que esta influência foi observada

somente acima de 0,4 mL/min. Porém, a Figura 4.3.15 mostra que o aumento da vazão tem influência positiva na produtividade, sendo maior a produtividade quanto maior a vazão. Devido a esta observação esta variável foi otimizada nos ensaios seguintes de otimização do reator com a invertase.

Com estes estudos iniciais foi possível planejar uma otimização das condições de operação do reator por meio de um planejamento experimental. Pôde-se fixar a concentração de invertase no reator e manipular simultaneamente as outras variáveis em conjunto, tais como o pH e a temperatura, objetivando o alcance de uma situação de conversão máxima da sacarose em glicose e frutose. Porém, anteriormente ao planejamento estudou-se a variação da concentração de sacarose na alimentação do reator, com experimentos seriais, de forma a se fixar esta variável em um valor adequado.

4.3.2. Experimentos com Variação da Concentração de Sacarose

Foram realizados três blocos de experimentos (I10, I12 e I13) de hidrólise da sacarose pela ação da invertase em reator enzimático com membrana (REM), operando em regime contínuo. O objetivo foi verificar a influência da concentração de sacarose da alimentação no grau de conversão da sacarose a frutose (X) e na velocidade de reação da hidrólise enzimática (r), e, com estes dados, estimar as constantes cinéticas da enzima.

A Tabela 4.3.6 apresenta um quadro resumo com os experimentos que foram realizados nesta etapa inicial do trabalho. Algumas condições no biorreator foram mantidas iguais em todos os ensaios e estão listadas na Tabela 4.3.5. Nestes ensaios a determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático de determinação de glicose (item 3.2.3.2).

Tabela 4.3.5. Condições Experimentais fixas para os ensaios I10, I12 e I13.

Volume do Reator.....	50 mL
Temperatura.....	37 °C
pH.....	4,6
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\phi_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Vazão de Alimentação	0,4 mL/min ($D=0,008 \text{ min}^{-1}$)
[invertase]	1000 $\mu\text{g/mL}$
Agitação.....	Vórtice de $1/3$ do volume útil do reator

Tabela 4.3.6. Condições empregadas nos ensaios I10, I12 e I13.

Ensaio	Duração do Ensaio	[Sacarose] (mM)	Vazão _{real} ⁽¹⁾ (mL/min)	Temperatura _{real} (°C)
I10	31 h	100 mM (até 5 h)	0,35 ± 0,05	36,6 ± 0,4
		250 mM (de 5 até 24 h)	0,35 ± 0,10	36,4 ± 0,5
		500 mM (de 24 até 31 h)	0,34 ± 0,06	36,3 ± 0,4
I12	5,5 h	100 mM	0,36 ± 0,05	36,0 ± 0,5
	10,5 h	1000 mM	0,40 ± 0,05	36,4 ± 0,7
	7,5 h	1500 mM	0,45 ± 0,03	36,4 ± 0,6
I13	21 h	250 mM (até 9 h)	0,40 ± 0,07	36,3 ± 0,4
		500 mM (de 9 até 21 h)	0,44 ± 0,05	36,8 ± 0,6

(1) Corresponde à média e o desvio padrão da vazão;

(2) O ensaio I11 não consta desta lista, pois foi cancelado. As mesmas condições experimentais foram repetidas no ensaio I12.

A seguir, nas Figuras 4.3.16 e 4.3.17, estão apresentados os principais resultados de cada um dos ensaios citados na Tabela 4.3.6. As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de **X** e **r** dos gráficos, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice I.

Um quadro resumo dos experimentos realizados encontra-se na Tabela 4.3.7.1. Com os experimentos foi possível levantar o comportamento do reator, quanto ao grau de conversão (**X**) da sacarose em glicose e frutose e à velocidade de reação da hidrólise enzimática (**r**), quando submetido a diferentes concentrações de sacarose na alimentação do reator (100, 250, 500, 1000 e 1500 mM).

Ensaio I10

(A)

(B)

Figura 4.3.16. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio I10 ($[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min ; $\text{pH}=4,6$; $100 \leq [S] \leq 500$ mM). Na Figura A a linha cheia representa a conversão média. Na Figura B a linha cheia representa o logaritmo da velocidade média de reação.

Ensaio I12 e I13

(A)

(B)

Figura 4.3.17. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo dos Ensaio I12 e I13 ($[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min ; $\text{pH}=4,6$; $100 \leq [S] \leq 1500$ mM). Na Figura A a linha cheia representa a conversão média. Na Figura B a linha cheia representa o logaritmo da velocidade média de reação.

Tabela 4.3.7.1. Quadro resumo dos ensaios I10 a I13.

Variáveis do Experimento							Resultados (valores médios)					
Ensaio	[Sacarose] (mM)	[invertase] ($\mu\text{g/mL}$)	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	Vazão (mL/min)	D (min^{-1})	Membrana	$t_{(1)}^{\text{RP}}$ (h)	$X_{\text{médio}}^{(2)}$ (%)	$r_{\text{médio}}$ $\left(\frac{\text{mmol}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}}\right)$	[G] (mM)	[S] _{saída} (mM)
I10	100	1000	4,6	$36,6 \pm 0,4$	$0,35 \pm 0,05$	0,007	HA 0,45 μm	1,5	$91,9 \pm 6,1$	$0,04 \pm 0,01$	92 ± 6	8 ± 6
	250			$36,4 \pm 0,5$	$0,35 \pm 0,10$	0,007		2,0	$82,9 \pm 9,8$	$0,09 \pm 0,03$	207 ± 25	43 ± 25
	500			$36,3 \pm 0,4$	$0,34 \pm 0,06$	0,008		1,5	$79,5 \pm 7,2$	$0,16 \pm 0,04$	398 ± 36	102 ± 36
I12	100	1000	4,6	$36,0 \pm 0,5$	$0,36 \pm 0,05$	0,007	HA 0,45 μm	2,0	$90,9 \pm 3,0$	$0,04 \pm 0,01$	91 ± 3	9 ± 3
	1000			$36,4 \pm 0,7$	$0,40 \pm 0,05$	0,008		2,0	$78,8 \pm 3,4$	$0,38 \pm 0,05$	788 ± 34	212 ± 34
	1500			$36,4 \pm 0,6$	$0,45 \pm 0,03$	0,009		2,0	$60,1 \pm 3,4$	$0,48 \pm 0,06$	901 ± 51	599 ± 51
I13	250	1000	4,6	$36,3 \pm 0,4$	$0,40 \pm 0,07$	0,008	HA 0,45 μm	2,0	$73,8 \pm 4,5$	$0,09 \pm 0,01$	184 ± 11	66 ± 11
	500			$36,8 \pm 0,6$	$0,44 \pm 0,05$	0,009		-	$97,9 \pm 4,4$	$0,26 \pm 0,01$	489 ± 22	11 ± 22
(1) t_{RP} = tempo para regime permanente ou estado estacionário;												
(2) $X_{\text{médio}}$ = grau de conversão médio.												

(1) t_{RP} = tempo para regime permanente ou estado estacionário;(2) $X_{\text{médio}}$ = grau de conversão médio.

A Figura 4.3.18 apresenta a variação do grau de conversão no reator em função da concentração de sacarose da alimentação (S_0), assim como a comparação dos valores experimentais com os valores estimados pela simulação matemática do comportamento ideal do reator. Os valores simulados de X estão apresentados na Tabela 4.3.7.2 e foram calculados com base na equação 4.2.4 (apresentada no item 4.2), assumindo-se a hipótese de estado estacionário ($dS/dt = 0$). Resolveu-se a equação 4.2.4, para o cálculo de S , pelo método de separação e busca de raízes, utilizando-se para isso o software matemático MatLab. Foram utilizados na equação 4.2.4 os seguintes parâmetros: $D=0,008 \text{ min}^{-1}$; $v_{\text{máx}}=69,375 \text{ (mmol sacarose/L.min)}$ $\square$ estimada para $[I]=1000 \text{ }\mu\text{g/mL}$ (segundo item 4.2.3) e $K_M=71 \text{ mM}$.

Tabela 4.3.7.2. Valores simulados e obtidos experimentalmente de grau de conversão (X) e concentração de substrato residual (S) em função da concentração de substrato na entrada do reator (S_0).

S_0 (mM)	Valores Simulados		Valores Experimentais	
	S (mM)	X (%)	S (mM)	X (%)
10	0,08	99,2	-	-
50	0,41	99,2	-	-
100	0,82	99,2	8,60	91,4
250	2,09	99,2	54,13	78,3
500	4,30	99,1	73,50	85,3
750	6,66	99,1	-	-
1000	9,16	99,1	259,00	74,1
1250	11,83	99,0	-	-
1500	14,67	99,0	598,50	60,1

Figura 4.3.18. Variação do Grau de Conversão em função da concentração de substrato alimentado no reator e comparação dos dados experimentais com a estimativa feita por simulação matemática.

Observa-se pela Figura 4.3.18 que, apesar da grande diferença dos valores obtidos pela simulação dos valores experimentais, quanto maior é a concentração do substrato na alimentação menor é o grau de conversão (a queda é muito maior nos valores experimentais do que nos simulados). O gráfico mostra que para concentração de sacarose inicial baixa (inferior a 200 mM) os valores experimentais se aproximam dos valores simulados. CUNHA e VITOLO (1984) demonstraram que com o aumento da concentração de sacarose e conseqüente aumento da viscosidade do meio ocorre redução na atividade específica da invertase. A atividade enzimática da invertase cai em concentrações de sacarose acima de 120 g/L e três fatores podem contribuir para este fato: o efeito inibitório do substrato; a redução de atividade de água no sistema e o efeito do aumento de viscosidade. CUNHA e VITOLO (1984) também concluíram que acima da concentração de sacarose de 1M a viscosidade é o fator predominante que interfere na atividade da invertase. Com base no exposto, o efeito da viscosidade pode ser um fator significativo para explicar esta diferença de comportamento entre os dados reais e os estimados pela simulação, incluindo a observação de que os valores simulados são sempre superiores aos obtidos experimentalmente.

A Tabela 4.3.8 apresenta os resultados que foram utilizados para o estudo cinético apresentado a seguir.

Tabela 4.3.8. Quadro resumo dos resultados de r e X dos ensaios I10, I12 e I13.

$[S_0]$ (mM)	$[S_{\text{saida}}]$ (mM)	$[S_{\text{saida}}]$ médio (mM)	r $\left(\frac{\text{mmol}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right)$	$r_{\text{médio}}$ $\left(\frac{\text{mmol}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right)$	X (%)	$X_{\text{médio}}$ (%)
100	8	8,5	0,04	0,04	91,9	91,4
	9		0,04		90,9	
250	43	54,5	0,09	0,09	82,9	78,4
	66		0,09		73,8	
500	102	-	0,16	-	79,5	-
1000	212	-	0,38	-	78,8	-
1500	599	-	0,48	-	60,1	-

A Figura 4.3.19 apresenta a taxa de reação (r) no reator em função da concentração de sacarose. A Figura 4.3.19 A apresenta a variação desta grandeza em função da concentração da alimentação (S_0) e a Figura 4.3.19 B a variação em função da concentração na saída do reator (S). O segundo caso reproduz mais precisamente a concentração real de sacarose no reator no momento em que foi medida a velocidade de reação, tendo em vista que a configuração deste reator é próxima à de um CSTR. Foram estimados os valores dos parâmetros cinéticos K_M (constante cinética de Michaelis-Menten) e $r_{\text{máx}}$ (produtividade máxima), pela linearização de Lineweaver-Burk apresentada na Figura 4.3.20, considerando-se que os dados de taxa de reação (r) em função da concentração de

sacarose obedeçam ao modelo cinético de Michaelis-Menten ($r = \frac{r_{\text{Máx}} S}{K_M + S}$).

Figura 4.3.19. Taxa de reação (r) em função da concentração de sacarose. (A) com os dados de concentração de sacarose na alimentação do reator $\square S_0$; (B) com os dados de concentração de sacarose na saída do reator $\square S_{saída}$.

Figura 4.3.20. Taxa de reao (r) em funo da concentrao de sacarose. (A) com os dados de concentrao de sacarose na alimentao do reator $[S]_o$; (B) com os dados de concentrao de sacarose na sada do reator $[S]_{saída}$.

Tabela 4.3.9. Quadro resumo dos valores obtidos para os parmetros cinticos.

	$r_{máx}$ $\left(\frac{\text{mmol}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right)$	K_M (mM)	k_{cat} (h ⁻¹)	t_R (s)
Com os dados de $[S]_o$	1,32	3237	237,6	15
Com os dados de $[S]_{saída}$	1,59	904	286,2	13

Como se verifica na Tabela 4.3.9, os valores de K_M so discrepantes e, para os dados de S_o , o valor de K_M no representa a realidade, tendo em vista que a saturao da sacarose em gua nesta temperatura de aproximadamente 2,8 M. Acredita-se que por causa da viscosidade da soluo de sacarose devem ter ocorrido no interior do reator efeitos difusionais que resultaram no elevado valor de K_M . Porm, os valores de r_{mx} obtidos foram concordantes. Considerando-se que para o modelo de Michaelis-Menten, aplica-se a equao 4.3.1, pode-se, atravs dos valores de r_{mx}, estimar o valor da constante cataltica desta reao, considerando-se para este clculo o valor da concentrao de enzima total no sistema de reao ($[E_T]$) igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

$$r_{m\acute{a}x} = k_{cat} \times [E_T] \quad (\text{Equa\c{c}\~ao 4.3.1})$$

Sendo: $r_{m\acute{a}x}$ o valor da velocidade m\~axima de rea\c{c}\~ao e k_{cat} o valor da constante catal\~itica ou n\~umero de "turn over". Um exemplo de c\~alculo da constante catal\~itica encontra-se no Ap\~endice G.

4.3.3. Experimento com Variação da Temperatura

Foi realizado um experimento (I14), de hidrólise da sacarose pela ação da invertase em reator enzimático de membranas (REM), operando em regime contínuo cujo objetivo foi verificar a influência do aumento da temperatura no grau de conversão da sacarose a frutose (X) e na velocidade de reação da hidrólise enzimática (r), pois os ensaios anteriores foram realizados a 37°C. Este experimento foi importante para verificar a estabilidade do sistema enzimático quando operado a 55 °C e para definir o nível superior da temperatura no planejamento experimental, a ser apresentado no próximo item.

Na Figura 4.3.21 estão apresentados os resultados obtidos para o ensaio realizado. As condições operacionais do biorreator estão listadas na Tabela 4.3.10. Neste ensaio a determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático (item 3.2.3.2). As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de X e r, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice J.

Tabela 4.3.10. Condições Experimentais do ensaio I14.

Volume do Reator.....	50 mL
Temperatura.....	55 °C
pH.....	4,5
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\varnothing_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Vazão de Alimentação	0,4 mL/min ($D=0,008 \text{ min}^{-1}$)
[invertase]	1000 $\mu\text{g/mL}$
[Sacarose].....	500 mM
Agitação.....	Vórtice de $\frac{1}{3}$ do volume útil do reator

Ensaio I14

(A)

(B)

Figura 4.3.21. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio I14 ($[S]=500$ mM; $[I]=1000$ $\mu\text{g/mL}$; $Q=0,4$ mL/min; $T=55^\circ\text{C}$). Na Figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 109,8\%$). Na Figura B a linha tracejada representa o logaritmo da velocidade média de reação ($r_{\text{médio}}=0,27$ mmol/h.mg).

A Tabela 4.3.11 apresenta a comparação dos resultados do ensaio I14 com os resultados do ensaio I09, apresentado no item 4.3.1, pois foram realizados em condições experimentais iguais apenas com temperaturas diferentes.

Tabela 4.3.11. Comparação dos resultados obtidos para ensaios realizados em duas diferentes temperaturas.

Temperatura	$X_{\text{médio}}$ (%)	$r_{\text{médio}}$ $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$
37°C (ensaio I09)	$91,0 \pm 6,6$	$0,21 \pm 0,04$
55°C (ensaio I14)	$109,8 \pm 3,0$	$0,27 \pm 0,04$

De acordo com a Tabela 4.3.11 os resultados de grau de conversão indicam que em temperatura maior o grau de conversão aumenta, assim como o valor da taxa de reação. Aparentemente o gráfico apresentado na Figura 4.3.21 B, do logaritmo da taxa de reação em função do tempo, mostra que não ocorre queda da atividade enzimática do sistema enzimático a 55°C durante as 8 horas de operação do biorreator. Como se pode observar na Figura 4.3.21, justifica-se a escolha desta temperatura pela estabilidade da enzima durante oito horas de operação do reator. Acredita-se que os valores de grau de conversão acima de 100% estejam relacionados ao erro analítico.

4.3.4. Otimização das Condições de Operação do Reator Enzimático com Membrana com Invertase

Foram utilizados planejamentos estatísticos experimentais como ferramenta para se estudar, simultaneamente, a influência das variáveis operacionais: *vazão*, *pH* e *temperatura*, no grau de conversão da sacarose a frutose (**X**) e na taxa de reação da hidrólise da sacarose (**r**), pela ação da invertase, em um reator enzimático com membrana (REM) operando em regime contínuo.

O objetivo da realização de um planejamento experimental estatístico é possibilitar o estudo de um grande número de variáveis simultaneamente, com reduzido número de experimentos. Pode-se com o estudo dos efeitos principais e dos secundários verificar inclusive a interação das variáveis. Com os dados obtidos desta análise estatística, as variáveis de operação estudadas foram otimizadas, de forma a se atingir o maior rendimento possível do biorreator nesta etapa do processo. O planejamento experimental global foi dividido em duas etapas:

- *Planejamento Experimental I* (Fatorial Completo 2^3)
- *Planejamento Experimental II* (Projeto Composto de 2^a ordem)

4.3.4.1. Planejamento Experimental I

Inicialmente, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo em dois níveis de variação (2^3) com 4 repetições no ponto central, de acordo com a metodologia descrita por BOX *et al.* (1978), perfazendo um total de doze experimentos (PI01 a PI12), apresentados na Tabela 4.3.14. As repetições no ponto central têm duas finalidades: fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista. Para isso o ideal é fazer de três a cinco ensaios repetidos. Estas repetições autênticas de todas as etapas do ensaio fornecem uma estimativa do erro experimental e quanto maior o número de repetições melhor. As condições experimentais que foram fixadas para todos os ensaios estão apresentadas na Tabela 4.3.12. As variáveis estudadas no planejamento foram codificadas em (-1), (0) e (+1), que correspondem ao menor nível, ao nível médio (ponto central) e ao maior nível de variação, respectivamente. Os níveis de variação e a matriz de planejamento contendo os experimentos que foram realizados nesta etapa do trabalho estão apresentados nas Tabelas 4.3.13 e 4.3.14, respectivamente. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória, de forma a minimizar a ocorrência de erros sistemáticos. Nestes ensaios a determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático (item 3.2.3.2).

Tabela 4.3.12. Condições experimentais dos ensaios PI01 a PI12.

Volume do Reator.....	50 mL
[Sacarose].....	500 mM
[Invertase].....	1000 µg/mL
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\phi_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Tempo de ensaio	7 a 8 horas
Agitação.....	Vórtice de $\frac{1}{3}$ do volume útil do reator

Tabela 4.3.13. Níveis de variação das variáveis estudadas no Planejamento Experimental I.

Variáveis Estudadas	Níveis de Variação		
	Mínimo (-1)	Ponto Central (0)	Máximo (+1)
(A) <i>Q</i> (mL/min)	0,4	1,0	1,6
(B) <i>pH</i>	3,5	4,5	5,5
(C) <i>Temperatura</i> (°C)	37	46	55

Tabela 4.3.14. Matriz do Planejamento Experimental I, utilizado para o estudo das variáveis: vazão (*Q*), *pH* e temperatura, na conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.

		Variáveis Independentes					
		Valores Reais			Valores Codificados		
		(A) <i>Q</i> (mL/min)	(B) <i>pH</i>	(C) <i>temperatura</i> (°C)	(A) <i>Q</i> (mL/min)	(B) <i>pH</i>	(C) <i>temperatura</i> (°C)
Ensaio	Ordem de execução						
PI 01	(12)	0,4	3,5	37	-1	-1	-1
PI 02	(10)	1,6	3,5	37	+1	-1	-1
PI 03	(5)	0,4	5,5	37	-1	+1	-1
PI 04	(3)	1,6	5,5	37	+1	+1	-1
PI 05	(2)	0,4	3,5	55	-1	-1	+1
PI 06	(11)	1,6	3,5	55	+1	-1	+1
PI 07	(8)	0,4	5,5	55	-1	+1	+1
PI 08	(1)	1,6	5,5	55	+1	+1	+1
PI 09	(9)	1,0	4,5	46	0	0	0
PI 10	(6)	1,0	4,5	46	0	0	0
PI 11	(4)	1,0	4,5	46	0	0	0
PI 12	(7)	1,0	4,5	46	0	0	0

A escolha das variáveis e dos níveis de variação foi baseada nos experimentos realizados anteriormente a este planejamento experimental (item 4.3.1 a 4.3.3) e em dados obtidos da literatura. As variáveis estudadas (pH, vazão e temperatura) são fundamentais para a otimização do reator e após fixá-las em um nível que confira melhor condição de operação do reator, outras variáveis poderão ser manipuladas, tais como: concentração de sacarose, concentração de invertase, tipo de membrana, tipo de reator e tempo de operação do reator.

A seguir, nos gráficos das Figuras 4.3.22 a 4.3.33, estão apresentados os principais resultados de cada um destes ensaios, citados na Tabela 4.3.14. As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de X e r dos gráficos, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice L.

Um quadro resumo dos principais resultados de todos os experimentos realizados no Planejamento Experimental I encontra-se na Tabela 4.3.15

Ensaio PI01

(A)

(B)

Figura 4.3.22. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio PI01* ($\text{pH} = 3,5$; $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 90,0\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,22\text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI02

(A)

(B)

Figura 4.3.23. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI02 (pH = 3,5; T = 37 °C; Q = 1,6 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 79,1$ %). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,73$ mmol/h.mg).

Ensaio PI03

(A)

(B)

Figura 4.3.24. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI03 (pH = 5,5; T = 37 °C; Q = 0,4 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 82,0 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,23 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI04

(A)

(B)

Figura 4.3.25. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI04 (pH = 5,5; T = 37 °C; Q = 1,6 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 81,1$ %). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,76$ mmol/h.mg).

Ensaio PI05

(A)

(B)

Figura 4.3.26. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI05 (pH = 3,5; T = 55 °C; Q = 0,4 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 94,7 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,22 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI06

(A)

(B)

Figura 4.3.27. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI06 (pH = 3,5; T = 55 °C; Q = 1,6 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 85,2 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,80 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI07

(A)

(B)

Figura 4.3.28. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio PI07* ($\text{pH} = 5,5$; $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 91,5\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,24\text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI08

(A)

(B)

Figura 4.3.29. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI08 (pH = 5,5; T = 55 °C; Q = 1,6 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 93,7 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,86 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI09

(A)

(B)

Figura 4.3.30. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI09 (pH = 4,5; T = 46 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 95,9 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,53 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI10

(A)

(B)

Figura 4.3.31. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI10 (pH = 4,5; T = 46 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 95,2 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,59 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI11

(A)

(B)

Figura 4.3.32. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI11 (pH = 4,5; T = 46 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 89,6\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,56$ mmol/h.mg).

Ensaio PI12

(A)

(B)

Figura 4.3.33. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI12 (pH = 4,5; T = 46 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 97,6 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,57 \text{ mmol/h.mg}$).

Tabela 4.3.15. Resultados do Planejamento Experimental I. Todos os ensaios foram realizados com [Sacarose]=500 mM e [invertase] = 1000 µg/mL.

Variáveis do Experimento								Resultados (valores médios)					
Ensaio	Duração do Ensaio	pH	T _{teórica} (°C)	T _{real} (°C)	Vazão teórica (mL/min)	Vazão real (mL/min)	D (mln ⁻¹)	Membrana	t _{ap} ⁽²⁾ (h)	X _{médio} ⁽³⁾ (%)	τ médio $\left(\frac{mmol_{\text{Pracet}}}{h \cdot mg_{\text{catina}}} \right)$	[G] (mM)	[S] _{saída} (mM)
PI01	8 h	3,5	37	36,0 ± 1,1	0,4	0,41 ± 0,04	0,008	HA 0,45 μm	2,0	90,0 ± 5,4	0,22 ± 0,02	450 ± 27	50 ± 27
PI02	7,5 h	3,5	37	36,9 ± 1,0	1,6	1,55 ± 0,13	0,031	HA 0,45 μm	0,5	79,1 ± 7,5	0,73 ± 0,10	395 ± 38	105 ± 38
PI03	8 h	5,5	37	36,7 ± 1,1	0,4	0,47 ± 0,10	0,009	HA 0,45 μm	2,0	82,0 ± 5,4	0,23 ± 0,05	410 ± 27	90 ± 27
PI04	6 h	5,5	37	36,7 ± 0,5	1,6	1,57 ± 0,13	0,031	HA 0,45 μm	0,5	81,1 ± 3,5	0,76 ± 0,07	405 ± 18	95 ± 18
PI05	8 h	3,5	55	55,3 ± 0,9	0,4	0,39 ± 0,07	0,008	HA 0,45 μm	2,0	94,7 ± 3,8	0,22 ± 0,04	474 ± 19	26 ± 19
PI06	7,5 h	3,5	55	55,1 ± 0,9	1,6	1,57 ± 0,15	0,031	HA 0,45 μm	0,5	85,2 ± 5,8	0,80 ± 0,07	426 ± 29	74 ± 29
PI07	8 h	5,5	55	54,9 ± 1,0	0,4	0,44 ± 0,08	0,009	HA 0,45 μm	2,0	91,5 ± 3,7	0,24 ± 0,04	457 ± 18	43 ± 18
PI08	8 h	5,5	55	54,4 ± 0,7	1,6	1,53 ± 0,08	0,030	HA 0,45 μm	0,5	93,7 ± 3,9	0,86 ± 0,05	468 ± 19	32 ± 19
PI09	8 h	4,5	46	45,9 ± 1,0	1,0	0,92 ± 0,11	0,018	HA 0,45 μm	0,5	95,9 ± 2,8	0,53 ± 0,06	479 ± 14	21 ± 14
PI10	7 h	4,5	46	45,6 ± 1,8	1,0	1,03 ± 0,05	0,021	HA 0,45 μm	0,5	95,2 ± 3,5	0,59 ± 0,04	476 ± 17	24 ± 17
PI11	7,5 h	4,5	46	46,3 ± 1,2	1,0	1,05 ± 0,12	0,021	HA 0,45 μm	0,5	89,6 ± 3,5	0,56 ± 0,06	448 ± 18	52 ± 18
PI12	8 h	4,5	46	46,1 ± 0,8	1,0	0,97 ± 0,04	0,019	HA 0,45 μm	0,5	97,6 ± 6,2	0,57 ± 0,04	488 ± 31	12 ± 31

(1) t_{RP} = tempo para regime permanente ou estado estacionário;(2) X_{médio} = grau de conversão médio;

Os valores médios de X e r foram calculados utilizando-se o seguinte critério: para os ensaios com vazão igual a 0,4 mL/min e tempo de residência no reator de 125 minutos, calcularam-se as médias utilizando-se os dados experimentais a partir de 2 horas de ensaio (pois considera-se que o reator passa a operar em regime estacionário a partir deste instante, e calcula-se a média dos valores experimentais obtidos ao longo do tempo de operação do reator). Para os ensaios com vazão de 1,0 mL/min e tempo de residência de 50 minutos, utilizaram-se os dados experimentais a partir de 30 ou 60 minutos de ensaio para o cálculo da média e, para os ensaios com vazão de 1,6 mL/min e tempo de residência de 31,25 minutos utilizaram-se os dados experimentais coletados a partir de 30 minutos de ensaio para o cálculo das médias.

Na Tabela 4.3.16 são apresentados os resultados referentes à conversão média (X) e taxa de reação média (r), para a hidrólise da sacarose pela ação da invertase no REM, decorrentes do planejamento experimental I, juntamente com os valores codificados das variáveis estudadas.

Tabela 4.3.16. Resultados ($X_{\text{médio}}$; $r_{\text{médio}}$) obtidos no Planejamento Experimental I, no estudo da conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.

Ensaio	Variáveis Independentes			Variáveis Respostas	
	(A) Q (mL/min)	(B) pH	(C) $temperatura$ (°C)	$X_{\text{médio}}$ (%)	$r_{\text{médio}}$ $\left[\frac{mmol_F}{h.mg_E} \right]$
PI 01	-1	-1	-1	90,0	0,22
PI 02	+1	-1	-1	79,1	0,73
PI 03	-1	+1	-1	82,0	0,23
PI 04	+1	+1	-1	81,1	0,76
PI 05	-1	-1	+1	94,7	0,22
PI 06	+1	-1	+1	85,2	0,80
PI 07	-1	+1	+1	91,5	0,24
PI 08	+1	+1	+1	93,7	0,86
PI 09	0	0	0	95,9	0,53
PI 10	0	0	0	95,2	0,59
PI 11	0	0	0	89,6	0,56
PI 12	0	0	0	97,6	0,57

Antes de se avaliar os resultados obtidos pela análise estatística, pode-se efetuar uma análise prévia dos resultados obtidos para um melhor entendimento do processo e é o que está apresentado neste parágrafo. Analisando-se a Tabela 4.3.16, pode-se verificar que

o aumento da temperatura de 37 para 46°C proporcionou aumento considerável no grau de conversão (X). Porém, o mesmo parece não ocorrer de forma tão acentuada quando se aumenta a temperatura de 46°C para 55°C. A temperatura pareceu ser a variável que mais influencia no aumento do grau de conversão (X). Para a taxa de reação (r), aparentemente, a temperatura não foi a variável mais significativa. Pode-se observar ainda que o aumento da vazão para valores superiores a 1,0 mL/min reduz o valor do grau de conversão. Mas, no intervalo de 0,4 a 1,0 mL/min, a vazão aparentemente não influi consideravelmente no grau de conversão (X). No entanto, para a velocidade de reação (r), verifica-se que quanto maior a vazão maior o seu valor. O pH, nos níveis de variação estudados, não aparentou ser uma variável significativa para nenhuma das respostas avaliadas.

A pergunta que fica é como explicar o efeito mais acentuado da temperatura sobre X do que sobre r, uma vez que são parâmetros intimamente relacionados, pois quanto maior é a conversão é de se esperar uma maior produtividade, visto que na expressão de r o termo relacionado à concentração de sacarose consumida expressa esta dependência. A conversão X é uma resposta que está intimamente ligada ao tempo de reação, ou seja, espera-se que quanto maior é o tempo de residência no reator mais tempo a enzima e o substrato poderão estar em contato e mais eficiente ocorrerá a reação. De acordo com os dados apresentados no item 4.3.2, a tabela 4.3.9 apresenta uma estimativa do valor da constante catalítica (K_{cat}) desta reação a 37°C. O valor de K_{cat} estimado é de aproximadamente 286 h⁻¹, o que corresponderia a um tempo de reação de 0,21 minuto ($t_{reação} = 1 / K_{cat}$). Como as vazões estudadas variaram de 0,4 a 1,6 mL/min, o que corresponde a tempos de residência variando de 31,25 a 125 minutos, o tempo de contato entre a enzima e o substrato é muito maior do que o tempo de reação e por isso a vazão não influenciou no grau de conversão tanto quanto a temperatura, já que quanto maior a temperatura maior é a energia cinética entre as moléculas (aumento do valor do K_{cat}), o que reduz mais ainda o tempo de reação. Porém, o aumento da vazão influencia diretamente na taxa de reação, pois a expressão de r é diretamente proporcional à vazão e quanto maior o seu valor maior a produção por unidade de tempo, sendo este efeito mais visível do que a temperatura para a resposta r.

Utilizando-se os valores de grau de conversão (X) e velocidade de reação (r), apresentados na Tabela 4.3.16, foi possível fazer uma análise estatística para verificar a influência das variáveis estudadas no comportamento do reator. A metodologia de análise dos resultados e determinação do modelo estatístico encontra-se descrita por BOX *et al.* (1978).

O método comumente usado para se avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo estatístico é a Análise de Variância, onde através do ajuste dos mínimos quadrados (análise de regressão) pode-se construir um modelo empírico e ajustar uma superfície de resposta aos dados do experimento. A metodologia de superfícies de resposta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais e tem sido usada com

grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A metodologia tem duas etapas distintas: a modelagem e o deslocamento, que são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) às respostas obtidas pelos planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho na qual a resposta varia de forma mais pronunciada no sentido desejado. Uma questão muito importante para a otimização é a escolha da faixa inicial de variação dos fatores, o que determina a dimensão do primeiro planejamento e a escala de codificação.

Os efeitos principais das variáveis, juntamente com suas interações, e a análise de variância são apresentados nas Tabelas 4.3.17 (para a resposta **X**) e 4.3.18 (para a resposta **r**). Uma descrição dos métodos para o cálculo e interpretação da Análise de Variância encontra-se no Anexo A.

Tabela 4.3.17. Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta grau de conversão da sacarose em frutose (X) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental I.

Efeito	Coeficientes de Regressão	Erro-padrão	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
Constante	89,633	$\pm 1,007$	—	—	—	—	—
A: Q	-4,775	$\pm 2,451$	45,601	1	45,601	3,80	0,147
B: pH	-0,175	$\pm 2,451$	0,061	1	0,0613	0,01	0,948
C: Temperatura	8,225	$\pm 2,451$	135,301	1	135,301	11,26	0,044
AB	5,425	$\pm 2,451$	58,861	1	58,861	4,90	0,114
AC	1,125	$\pm 2,451$	2,531	1	2,531	0,21	0,682
BC	2,825	$\pm 2,451$	15,961	1	15,961	1,33	0,333
Curvatura	—	—	146,520	1	146,520	12,19	0,039
Falta de ajuste	—	—	0,361	1	0,361	0,03	0,875
Erro puro	—	—	36,047	3	12,016	—	—
Total (corr.)	—	—	441,247	11	—	—	—

$R^2 = 0,92$ (Erro-padrão estimado do erro puro).

$F_{1,10}(p < 0,05)_{\text{tabelado}} = 4,965$; $F_{1,10}(p < 0,10)_{\text{tabelado}} = 3,285$, para 95% de confiança.

Tabela 4.3.18. Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta taxa ou velocidade de reação de hidrólise da sacarose (r) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental I.

Efeito	Coeficientes de Regressão	Erro-padrão	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
Constante	0,526	$\pm 0,007$	—	—	—	—	—
A: Q	0,560	$\pm 0,018$	0,62720	1	0,62720	1003,52	0,0001
B: pH	0,030	$\pm 0,018$	0,00180	1	0,00180	2,88	0,1883
C: Temperatura	0,045	$\pm 0,018$	0,00405	1	0,00405	6,48	0,0843
AB	0,015	$\pm 0,018$	0,00045	1	0,00045	0,72	0,4668
AC	0,040	$\pm 0,018$	0,00320	1	0,00320	5,12	0,1087
BC	0,010	$\pm 0,018$	0,00020	1	0,00020	0,32	0,6167
Curvatura	—	—	0,00807	1	0,00807	12,91	0,0370
Falta de ajuste	—	—	0,00005	1	0,00005	0,08	0,7985
Erro puro	—	—	0,00187	3	0,00063	—	—
Total (corr.)	—	—	0,64689	11	—	—	—

$R^2 = 0,997$ (Erro-padrão estimado do erro puro).

$F_{1,10}(p < 0,05)_{\text{tabelado}} = 4,965$; $F_{1,10}(p < 0,10)_{\text{tabelado}} = 3,285$, para 95% de confiança.

O planejamento experimental I foi útil no estudo dos efeitos de cada uma das variáveis estudadas e de suas interações, no conhecimento do erro experimental através das repetições e na verificação da presença de curvatura no modelo estatístico.

A análise das Tabelas 4.3.17 e 4.3.18 é feita observando-se o valor de p (probabilidade de ocorrência do efeito que equivale a $1-p$) que foi obtido pela análise de variância dos efeitos principais e secundários (interações). O efeito é significativo ao nível de 5% de significância (95% de confiança seguindo-se uma distribuição t de Student; BOX *et al*, 1978) se apresentar valor de p menor que 0,05. Em alguns casos, também podem se considerar significantes efeitos com 90% de confiança, ou seja, p menor que 0,1 (10% de significância).

Seguindo este critério, para a variável resposta X (Tabela 4.3.17), observa-se que a vazão e o pH são variáveis pouco significativas, porém a temperatura é significativa. A interação entre vazão e temperatura é um pouco significativa ao nível de 10% de

significância ($p=0,01$) e a curvatura é muito significativa, na análise desta variável resposta. Para a variável resposta **r** (Tabela 4.3.18), observa-se que a variável mais significativa é a vazão. A temperatura e a interação entre vazão e temperatura são pouco significativas ao nível de 10%. Isso indica que em temperaturas mais elevadas, têm-se maiores valores de velocidade de reação, como seria esperado. De acordo com essa mesma tabela verifica-se que o pH também não tem influência sobre esta resposta. A curvatura é significativa, mas não é acentuada, porque o modelo linear não teve falta de ajuste acentuada ($R^2=0,98$) para a variável resposta **r**. Portanto, o modelo deve possuir uma leve curvatura. Apesar de, para esta variável resposta, a curvatura ser leve, estudou-se a curvatura como consequência da resposta **X**. Portanto, a análise do grau de conversão mostrou que, para este processo, a variável mais significativa, ao nível de $p<5\%$, foi a **temperatura**, enquanto que a análise da velocidade de reação evidenciou que a variável mais significativa ($p<5\%$) foi a **vazão**. Porém, para a taxa de reação, verificou-se também que a temperatura e a interação vazão-temperatura mostram-se significativas ao nível de $p<10\%$.

Uma das conclusões extraídas deste primeiro planejamento experimental foi a de eliminar o pH do planejamento complementar porque não é uma variável significativa para nenhuma das variáveis resposta estudadas. Por isso, esta variável foi eliminada na continuidade deste estudo e fixada em um valor conveniente ao processo, dentro da faixa estudada, entre 3,5 e 5,5. Sabendo-se que o reator poderá estar ligado em série com um reator contendo a enzima glicose-oxidase, e que esta enzima apresenta melhores condições de reação em pH 5,5, este será o valor escolhido para os futuros experimentos com invertase. Sendo assim se evitaria uma etapa intermediária de correção do pH do efluente do reator contendo invertase, antes de se alimentar o reator com glicose-oxidase.

A Tabela 4.3.17 mostra que, a variável mais significativa para o grau de conversão é a temperatura. Através dos efeitos e dos coeficientes de regressão, pôde-se verificar que com a elevação da temperatura, aumentou-se a conversão. Existe também a evidência, apesar de não ser tão significativa como para a temperatura, de que se reduzindo a vazão de alimentação aumenta-se a conversão. Um outro fator significativo parece ser a interação entre a vazão e o pH, mostrando que em vazão maior o pH mais elevado pode levar a um maior grau de conversão. Mas esta interação não é tão significativa quanto o efeito da temperatura.

A análise de variância, tanto para o grau de conversão como para a taxa de reação mostra também que existe **curvatura** no modelo estatístico (significativa ao nível de $p<5\%$). Por isso este planejamento deve ser complementado, a fim de se construírem as superfícies de resposta. Verificou-se um baixo coeficiente de correlação ($R^2 = 0,61$) do modelo linear para a variável resposta o grau de conversão e uma significativa falta de ajuste do modelo linear ($p<0,05$). Portanto, o modelo linear não pode ser aplicado para estes dados. Para a taxa de reação não se observou falta de ajuste tão acentuada do modelo linear, porém o modelo para esta variável resposta também será estudado com curvatura devido à

necessidade de análise conjunta de ambas as variáveis resposta na otimização. A necessidade de complementação deste planejamento experimental surgiu exatamente da falta de ajuste do modelo linear, devido à significância da curvatura no modelo.

Quando um modelo linear não se ajusta aos dados deve-se partir para um modelo quadrático e para isso se amplia o nível de variação das variáveis através de um planejamento composto. Um planejamento composto central é formado por três partes: uma parte fatorial (contendo n pontos experimentais de coordenadas codificadas nos níveis +1 e -1 de variação), uma parte axial ou em estrela (formada por pontos com todas as coordenadas codificadas no nível 0 de variação, exceto uma que é igual a um valor α) e ensaios realizados no ponto central (onde todas as coordenadas estão codificadas no nível 0 de variação). O valor de α costuma ficar entre 1 e $\sqrt{k}$, sendo k o número de fatores ou variáveis em estudo. Como em alguns casos α pode levar a alguns experimentos inviáveis, podem-se definir novas condições experimentais para estes ensaios. Os planejamentos compostos centrais podem ser construídos seqüencialmente, conforme a necessidade. Por serem formados por três partes distintas, podem ser compostos conforme as dúvidas sobre a curvatura vão surgindo e exigindo os pontos axiais para a construção do modelo quadrático.

Foi mostrado com esta análise a necessidade de se complementar este planejamento com um segundo planejamento experimental, devido à significância da curvatura, apesar de a análise de variância mostrar uma forte evidência de que existe uma região de ótimo nos limites estudados. O planejamento fatorial inicial foi importante para sondar o espaço definido pelos fatores e demarcar uma região para estudo mais detalhado. Vale salientar que, vazões abaixo da mínima estudada (0,4 mL/min) não são obtidas facilmente com a bomba peristáltica disponível para os estudos. Por isso é difícil fazer estudos com valores de vazão inferiores a este, em regime permanente. Além disso, temperaturas acima de 55°C, não são convenientes para operação do reator, pois podem causar decaimento considerável da atividade enzimática ao longo do tempo de operação. Por esse motivo a otimização será feita dentro da região de vazão e temperatura estudada neste planejamento, prosseguindo-se com um planejamento composto.

4.3.4.2. Planejamento Experimental II

Foi realizado um complemento do planejamento experimental I, apresentado no item 4.3.4.1. Foram realizados seis experimentos novos (PI13 a PI18) e a matriz de planejamento desta etapa do trabalho está apresentada na Tabela 4.3.19. Estes experimentos complementam os pontos axiais e mais dois pontos centrais do planejamento anterior. As variáveis estudadas neste complemento foram a vazão e a temperatura, mas a codificação e os níveis de variação foram os mesmos do Planejamento I, e estão apresentados na Tabela 4.3.20. O pH foi fixado em 5,5 conforme justificativa do item anterior.

Esta matriz do segundo planejamento experimental acrescida de alguns pontos do primeiro planejamento experimental compõe um projeto composto de 2ª ordem, utilizado para a determinação do modelo estatístico e das curvas de superfície para este processo em estudo. A característica total deste projeto composto de 2ª ordem é a existência de 4 pontos fatoriais (PI03, PI04, PI07 e PI08), 4 pontos axiais (PI13 a PI16) e 6 pontos centrais (PI09 a PI12, PI17 e PI18). Os ensaios foram realizados em ordem aleatória, de forma a minimizar a ocorrência de erros sistemáticos.

Tabela 4.3.19. Condições experimentais fixas para os ensaios PI13 a PI18.

Volume do Reator.....	50 mL
[sacarose].....	500 mM
[invertase].....	1000 µg/mL
pH	5,5
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\phi_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Tempo de ensaio	7 a 8 horas
Agitação.....	Vórtice de $\frac{1}{3}$ do volume útil do reator

Tabela 4.3.20. Níveis de variação das variáveis estudadas no Planejamento Experimental II para o REM com invertase.

Variáveis Estudadas		Níveis de Variação		
		Mínimo (-1)	Ponto Central (0)	Máximo (+1)
(A)	Q (mL/min)	0,4	1,0	1,6
(B)	Temperatura (°C)	37	46	55

Tabela 4.3.21. Matriz do Planejamento Experimental II utilizado para o estudo das variáveis: vazão (Q) e temperatura, na conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.

Ensaio	Ordem De Execução	Variáveis Codificadas			
		Valores Reais		Valores Codificados	
		(A) Q (mL/min)	(B) temperatura (°C)	(A) Q (mL/min)	(B) temperatura (°C)
PI 13	(4)	0,4	46	-1	0
PI 14	(3)	1,6	46	+1	0
PI 15	(1)	1,0	37	0	-1
PI 16	(5)	1,0	55	0	+1
PI 17	(6)	1,0	46	0	0
PI 18	(2)	1,0	46	0	0

A seguir, nos gráficos das Figuras 4.3.34 a 4.3.39, estão apresentados os principais resultados de cada um destes ensaios, citados na Tabela 4.3.21. As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de X e r dos gráficos, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice M.

Um quadro resumo dos principais resultados de todos os experimentos realizados no Planejamento Experimental I encontra-se na Tabela 4.3.22.

Ensaio PI13

(A)

(B)

Figura 4.3.34 Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do *Ensaio PI13* ($\text{pH} = 5,5$; $T = 46\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 0,4\text{ mL/min}$). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 98,0\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,25\text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI14

(A)

(B)

Figura 4.3.35. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI14 (pH = 5,5; T = 46 °C; Q = 1,6 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 88,4\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,81$ mmol/h.mg).

Ensaio PI15

(A)

(B)

Figura 4.3.36. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI15 (pH = 5,5; T = 37 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 71,8\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,40$ mmol/h.mg).

Ensaio PI16

(A)

(B)

Figura 4.3.37. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI16 (pH = 5,5; T = 55 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 96,2 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,58 \text{ mmol/h.mg}$).

Ensaio PI17

(A)

(B)

Figura 4.3.38. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI17 (pH = 5,5; T = 46 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 89,5\%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,51$ mmol/h.mg).

Ensaio PI18

(A)

(B)

Figura 4.3.39. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio PI18 (pH = 5,5; T = 46 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 90,3 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,51 \text{ mmol/h.mg}$).

Tabela 4.3.22. Resultados do Planejamento Experimental II. Todos os ensaios foram realizados com [Sacarose]=500 mM e [invertase]=1000 µg/mL.

Variáveis do Experimento							Resultados (valores médios)						
Ensaio	Duração do Ensaio	pH	T isotérmica (°C)	T real (°C)	Vazão teórica (mL/min)	Vazão real (mL/min)	D (min ⁻¹)	Membrana	t ap ⁽¹⁾ (h)	X médio ⁽²⁾ (%)	r médio $\left(\frac{mmol_{Prod,ox}}{h.mg_{enzima}} \right)$	[G] (mM)	[S] isotérmica (mM)
PI13	7,5 h	5,5	46	46,5 ± 0,5	0,4	0,42 ± 0,11	0,008	HA 0,45 µm	2,0	98,0 ± 1,5	0,25 ± 0,07	490 ± 8	10 ± 8
PI14	9 h	5,5	46	45,5 ± 1,0	1,6	1,54 ± 0,16	0,031	HA 0,45 µm	0,5	88,4 ± 4,1	0,81 ± 0,08	442 ± 21	58 ± 21
PI15	9 h	5,5	37	37,2 ± 0,6	1,0	0,92 ± 0,07	0,018	HA 0,45 µm	1,0	71,8 ± 8,5	0,40 ± 0,06	359 ± 42	141 ± 42
PI16	8 h	5,5	55	55,3 ± 0,8	1,0	1,00 ± 0,07	0,020	HA 0,45 µm	1,0	96,2 ± 2,7	0,58 ± 0,04	481 ± 13	19 ± 13
PI17	8 h	5,5	46	45,8 ± 0,8	1,0	0,95 ± 0,08	0,019	HA 0,45 µm	0,5	89,5 ± 5,8	0,51 ± 0,05	447 ± 29	53 ± 29
PI18	7 h	5,5	46	45,8 ± 1,0	1,0	0,94 ± 0,07	0,019	HA 0,45 µm	0,5	90,3 ± 4,6	0,51 ± 0,05	451 ± 23	49 ± 23

(1) t_{ap} = tempo para regime permanente ou estado estacionário;(2) X_{médio} = grau de conversão médio;

A matriz de planejamento contendo os experimentos que foram realizados nesta etapa do trabalho e os resultados experimentais estão apresentados na tabela 4.3.23 e a matriz completa do planejamento composto está apresentada na tabela 4.3.24.

Tabela 4.3.23. Resultados ($X_{\text{médio}}$; $r_{\text{médio}}$) obtidos no Planejamento Experimental II, no estudo da conversão da sacarose em frutose em um reator enzimático com membrana.

Ensaio	Variáveis Independentes		Variáveis Respostas	
	(A) Q (mL/min)	(B) <i>temperatura</i> (°C)	$X_{\text{médio}}$ (%)	$r_{\text{médio}}$ $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$
PI 13	-1	0	98,0	0,25
PI 14	+1	0	88,4	0,81
PI 15	0	-1	71,8	0,40
PI 16	0	+1	96,2	0,58
PI 17	0	0	89,5	0,51
PI 18	0	0	90,3	0,51

Tabela 4.3.24. Matriz de planejamento e resultados ($X_{\text{médio}}$; $r_{\text{médio}}$) do projeto composto de 2ª ordem resultante da composição dos planejamentos experimentais I e II para o REM com invertase.

Ensaio	Variáveis Independentes		Variáveis Respostas	
	(A) Q (mL/min)	(B) <i>temperatura</i> (°C)	$X_{\text{médio}}$ (%)	$r_{\text{médio}}$ $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$
PI03	-1	-1	82,0	0,23
PI04	+1	-1	81,1	0,76
PI07	-1	+1	91,5	0,24
PI08	+1	+1	93,7	0,86
PI 13	-1	0	98,0	0,25
PI 14	+1	0	88,4	0,81
PI 15	0	-1	71,8	0,40
PI 16	0	+1	96,2	0,58
PI09	0	0	95,9	0,53
PI10	0	0	95,2	0,59
PI11	0	0	89,6	0,56
PI12	0	0	97,6	0,57
PI 17	0	0	89,5	0,51
PI 18	0	0	90,3	0,51

Utilizando-se os valores de grau de conversão e taxa de reação, apresentados na tabela 4.3.24, foi possível fazer uma nova análise estatística das variáveis respostas em estudo: o grau de conversão da sacarose em frutose (X) e a velocidade de reação de hidrólise da sacarose (r). A metodologia de análise dos resultados e a determinação do modelo estatístico encontram-se descritas por BOX *et al.* (1978). Esta nova análise serviu para se determinar os coeficientes do modelo quadrático que descreve a influência das variáveis temperatura e vazão nas variáveis resposta estudadas e construção das superfícies de resposta. Os efeitos principais das variáveis, juntamente com suas interações, e a análise de variância são apresentados nas Tabela 4.3.25 (para a resposta X) e 4.3.26 (para a resposta r), respectivamente. Uma descrição dos métodos para o cálculo e interpretação da Análise de Variância encontra-se no Anexo A.

Tabela 4.3.25. Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta grau de conversão da sacarose em frutose (**X**) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental composto de 2ª ordem.

Efeito	Coeficientes de Regressão	Erro-padrão	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
Constante	92,676	$\pm 1,388$	—	—	—	—	—
A: Q	-2,767	$\pm 2,955$	11,482	1	11,482	0,88	0,402
B: Temperatura	15,500	$\pm 2,955$	360,375	1	360,375	27,51	0,003
AB	1,550	$\pm 3,619$	2,403	1	2,403	0,18	0,691
AA	3,088	$\pm 4,301$	6,755	1	6,755	0,52	0,512
BB	-15,312	$\pm 4,301$	166,069	1	166,069	12,68	0,016
Falta de ajuste	—	—	100,331	3	33,443	2,55	0,169
Erro puro	—	—	65,508	5	13,102	—	—
Total (corr.)	—	—	715,454	13	—	—	—

$R^2 = 0,77$ (Erro-padrão estimado do erro puro).

$R^2 = 0,62$ (ajustado para os graus de liberdade)

$F_{1,12}(p < 0,05)_{\text{tabelado}} = 4,747$; $F_{1,12}(p < 0,10)_{\text{tabelado}} = 3,177$, para 95% de confiança.

Tabela 4.3.26. Estimativa dos efeitos (coeficientes de regressão e erros-padrão) e análise de variância para o modelo que representa a variável resposta taxa de reação de hidrólise da sacarose (r) no reator enzimático com membrana, dos ensaios realizados no planejamento experimental composto de 2ª ordem.

Efeito	Coeficientes de Regressão	Erro-padrão	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
Constante	0,539	$\pm 0,013$	—	—	—	—	—
A: Q	0,570	$\pm 0,027$	0,48735	1	0,48735	439,05	0,0000
B: Temperatura	0,097	$\pm 0,027$	0,01402	1	0,01402	12,63	0,0163
AB	0,045	$\pm 0,033$	0,00202	1	0,00202	1,82	0,2347
AA	0,015	$\pm 0,039$	0,00015	1	0,00015	0,14	0,7293
BB	-0,065	$\pm 0,039$	0,00302	1	0,00302	2,72	0,1600
Falta de ajuste	—	—	0,00688	3	0,00229	2,06	0,2236
Erro puro	—	—	0,00555	5	0,00111	—	—
Total (corr.)	—	—	0,51897	13	—	—	—

$R^2 = 0,97$ (Erro-padrão estimado do erro puro).

$R^2 = 0,96$ (ajustado para os graus de liberdade)

$F_{1,12}(p < 0,05)_{\text{tabelado}} = 4,747$; $F_{1,12}(p < 0,10)_{\text{tabelado}} = 3,177$, para 95% de confiança.

O modelo quadrático foi determinado utilizando-se os coeficientes obtidos da regressão linear, realizada pelo método dos mínimos quadrados, aplicada aos resultados experimentais. Estes modelos são representados como descreve a equação 4.3.2.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{1,2} AB + \beta_{1,3} AC + \beta_{2,3} BC + \beta_{1,1} A^2 + \beta_{2,2} B^2 + \beta_{3,3} C^2$$

(Equação 4.3.2)

Sendo:

Y = variável resposta;

A, B, C = variáveis independentes codificadas;

β_0 = constante;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = coeficientes lineares;

$\beta_{1,2}, \beta_{1,3}, \beta_{2,3}$ = coeficientes de interação;

$\beta_{1,1}, \beta_{2,2}, \beta_{3,3}$ = coeficientes quadráticos.

Com os coeficientes de regressão obtidos pela análise estatística da variável resposta **X**, obteve-se o modelo quadrático descrito na equação 4.3.3.

$$X = 92,676 - 1,383 \times A + 7,75 \times B + 0,775 \times AB + 1,544 \times A^2 - 7,656 \times B^2$$

(Equação 4.3.3)

Com os coeficientes de regressão obtidos pela análise estatística da variável resposta **r**, obteve-se o modelo quadrático descrito na equação 4.3.4.

$$r = 0,539 + 0,285 \times A + 0,0483 \times B + 0,0225 \times AB + 0,00735 \times A^2 - 0,0326 \times B^2$$

(Equação 4.3.4)

Como foram obtidos os modelos estatísticos para **X** e **r** é possível apresentar as superfícies de resposta ajustadas aos dados do experimento. As superfícies de resposta são fundamentais para a otimização do processo e facilitam a compreensão do efeito das variáveis sobre o processo na região de otimização.

Do modelo descrito pela equação 4.3.3 e da análise de variância apresentada na tabela 4.3.25 pode-se concluir que: para o grau de conversão (**X**) a temperatura é a variável mais significativa do modelo ao nível de 5% de significância; apesar da vazão não ser significativa, o modelo explica que vazões maiores diminuem levemente o grau de conversão; não há falta de ajuste e o modelo para **X** explica 77% dos resultados; a variabilidade neste processo é grande e isto pode ser verificado pelas repetições no ponto central e pelo erro-padrão estimado.

A superfície de resposta obtida para **X** é apresentada na figura 4.3.40 e através da sua análise conclui-se que para **X** a variável mais importante é mesmo a temperatura e esta curva tem o formato tipo *cela*, indicando a presença de um ponto ótimo de **X** no intervalo de temperatura estudado. Aparentemente, apesar da influência da vazão não ser tão forte, valores medianos de vazão não são favoráveis. A superfície de resposta de **X** mostra que a temperatura é bem mais importante que a vazão, isto porque o aumento de temperatura aumenta a velocidade de reação da enzima e portanto o tempo de residência no reator é satisfatório para se obter um grau de conversão conveniente, para o intervalo de vazões estudadas. Portanto, poderá se definir a melhor vazão a partir da superfície de resposta obtida com a resposta **r**.

Figura 4.3.40. Superfície de Resposta obtida para a análise estatística da variável resposta X no REM com invertase. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na tabela 4.3.20.

Do modelo descrito pela equação 4.3.4 e da análise de variância apresentada na tabela 4.3.26 pode-se concluir que: para a taxa de reação (r) a vazão é a variável mais significativa do modelo ao nível de 5% de significância, sendo a dependência de r em relação à vazão quase linear. Mas, apesar disso, a temperatura também é uma variável importante e influencia nos valores de r , conferindo uma leve curvatura ao modelo; não há falta de ajuste e o modelo para r explica 97% dos resultados. Observando-se a superfície de resposta para r apresentados na figura 4.3.41, observa-se que quando o reator é operado com vazão mínima, aparentemente, o aumento da temperatura influi menos na taxa de reação. A razão disso se deve ao maior tempo de residência dentro do reator.

Figura 4.3.41. Superfície de Resposta obtida para a análise estatística da variável resposta r no REM com invertase. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na tabela 4.3.20.

4.3.4.3. Otimização e Validação dos Modelos Estatísticos

Na otimização deste processo é importante analisar em conjunto as respostas conversão (X) e taxa de reação (r), de tal forma que se possam maximizar os valores de ambas, fornecendo um rendimento máximo do reator. Isso será possível somente com a análise conjunta dos modelos estatísticos e das superfícies de resposta, para a otimização conjunta dos dados. De forma geral, a vazão será definida pela análise do r desejado e a temperatura pela análise do X desejado.

Para efetuar a otimização, uma das possibilidades é sobrepor as superfícies de resposta e localizar a melhor região por inspeção visual. Porém se o objetivo for maximizar ou minimizar uma dada resposta mantendo-se as outras respostas sujeitas a determinadas restrições, pode-se recorrer a um método de programação linear comumente usado em engenharia ou então usar a metodologia de otimização simultânea proposta por G.C.Derringer e R.Suich (1980) que se baseia na definição de uma função desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo $[0,1]$, no qual zero significa um valor inaceitável e um o valor mais desejável. Uma vez que as funções desejabilidade tenham sido especificadas para todas as respostas, deve-se combiná-las numa desejabilidade global, normalmente dada pela média geométrica das desejabilidades individuais. Com este artifício a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global (NETO *et al.*, 2002). Uma breve descrição dos princípios do método de otimização baseado na função desejabilidade encontra-se no Anexo A.

Ao se usar esta metodologia para tentar otimizar simultaneamente várias respostas, deve-se ter cuidado para que não se aplique mecanicamente o algoritmo de busca, o que poderia levar a um conjunto de condições matematicamente otimizadas, porém sem viabilidade prática. Depois de se descobrir um conjunto de condições que maximize a desejabilidade global não se pode deixar de examinar o comportamento individual de cada uma das respostas para certificar-se de que são aceitáveis, além de se realizar experimentos confirmatórios nas condições selecionadas e, se possível, no seu entorno (NETO *et al.*, 2002).

A seguir são apresentadas três diferentes otimizações que foram realizadas.

OTIMIZAÇÃO 1

Foram conferidos pesos com importância igual (peso=1) para as variáveis respostas X e r . Fixou-se a variação da variável A (vazão) no intervalo codificado de (-1) a (0) . Esta otimização foi feita levando-se em conta a inclusão de um segundo reator contendo glicose-oxidase, e que será ligado em série ao reator contendo invertase. O segundo reator poderá não operar necessariamente na vazão máxima estudada para este reator, de 1,6 mL/min, e

esta diferença de vazão vai exigir a presença de um tanque pulmão entre os reatores, o que não foi levado em conta até o momento, neste estudo. Por isso, a restrição no intervalo de variação da vazão de 0,4 a 1,0 mL/min. A variável B foi simulada em seu intervalo global de (-1) a (+1). Fixou-se como desejável para X valores acima de 90%. Porém r pôde variar em toda a extensão de resultados previstos pelo modelo, mas colocou-se como desejável que ambos atinjam seu valor máximo. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na tabela 4.3.20. A tabela 4.3.27 resume as principais considerações para esta otimização.

Tabela 4.3.27. Considerações principais para a Otimização 1. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.

Nome da Variável	Limite Inferior	Limite Superior	Peso
(A) vazão	-1	0	1
(B) temperatura	-1	+1	1
X	90	98	1
r	0,23	0,86	1

Para esta otimização foram obtidas cinco soluções possíveis de 20 tentativas de otimização, que estão apresentadas na tabela 4.3.28. As otimizações foram calculadas utilizando-se os modelos descritos nas equações 4.3.3 e 4.3.4 através de um software estatístico. Os valores de X e r apresentados na tabela 4.3.28 são os valores preditos (X_{predito} e r_{predito}) pela otimização para as respostas em estudo. A função *desejabilidade* é um número puro de 0 a 1 e que informa o quanto se aproximou do valor desejado para X e r conjuntamente.

Tabela 4.3.28. Soluções para a Otimização 1. Os valores apresentados para A e B são codificados, e os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.

Solução	Variável Codificada		Variável Resposta		Desejabilidade
	(A) Q (mL/min)	(B) temperatura (°C)	X _{predito} (%)	r _{predito} $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$	
1	0	0,52	94,64	0,56	0,547
2	0	0,51	94,64	0,56	0,547
3	0	0,54	94,63	0,56	0,547
4	0	0,50	94,64	0,56	0,547
5	0	0,34	94,44	0,55	0,533

A figura 4.3.42 mostra os gráficos de rampas para a solução 3, com *desejabilidade* de 0,547. A *desejabilidade* ficou neste valor, pois tanto para r como para X não se obtiveram os valores máximos previstos pelos modelos e sim algo em torno de 55% do máximo desejável. Porém a faixa de variação especificada para X é estreita e por isso este valor de *desejabilidade* obtido é bastante satisfatório. Para a solução 3 previu-se que operando o reator com vazão codificada 0 (vazão real igual a 1,0 mL/min) e temperatura codificada 0,54 (temperatura real igual a 51°C) pode-se obter grau de conversão médio (X) igual a 94,63% e taxa de reação média (r) igual a 0,56 mmol/h.mg.

Figura 4.3.42. Gráfico de rampas para a solução 3 da otimização 1 (Tabela 4.3.28).

OTIMIZAÇÃO 2

Foi conferido peso igual em importância (peso=1) para as variáveis respostas X e r . As variáveis A e B foram simuladas em seu intervalo global de (-1) a (+1). Fixou-se como desejável para X valores acima de 90%, porém r pôde variar em toda a extensão de resultados previstos pelo modelo, mas colocou-se como desejável que ambos atinjam seu valor máximo. A tabela 4.3.29 resume as principais considerações para esta otimização.

Tabela 4.3.29. Considerações principais para a Otimização 2. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.

Nome da Variável	Limite Inferior	Limite Superior	Peso
(A) <i>vazão</i>	-1	+1	1
(B) <i>temperatura</i>	-1	+1	1
X	90	98	1
R	0,23	0,86	1

Para esta otimização foram obtidas duas soluções possíveis de 20 tentativas, que estão apresentadas na tabela 4.3.30. As otimizações foram calculadas utilizando-se os modelos descritos nas equações 4.3.3 e 4.3.4. Os valores de X e r apresentados na Tabela 4.3.30 são os valores preditos (X_{predito} e r_{predito}) pela otimização para as respostas em estudo.

Tabela 4.3.30. Soluções para a Otimização 2. Os valores apresentados para A e B são codificados, e os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.

Solução	Variável Codificada		Variável Resposta		Desejabilidade
	(A) <i>Q</i> (mL/min)	(B) <i>temperatura</i> (°C)	X_{predito} (%)	r_{predito} $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$	
1	1	0,56	95,21	0,86	0,807
2	1	0,36	94,92	0,85	0,780

A figura 4.3.43 mostra os gráficos de rampas para a solução 1, com desejabilidade de 0,807. A desejabilidade aumentou em relação à otimização 1 pois *r* se aproximou do valor máximo previsto pelo modelo, em torno de 81% do máximo desejável. Para a solução 1 previu-se que operando o reator com vazão codificada +1 (vazão real igual a 1,6 mL/min) e temperatura codificada 0,56 (temperatura real igual a 51 °C) pode-se obter grau de conversão médio (X) igual a 95,21% e taxa de reação média (r) igual a 0,86 mmol/h.mg.

Figura 4.3.43. Gráfico de rampas para a solução 1 da otimização 2 (Tabela 4.3.30).

OTIMIZAÇÃO 3

Foi conferido peso igual em importância (peso=1) para as variáveis respostas X e r . Fixou-se a variação da variável A (vazão) no intervalo codificado de (-1) a (0,5). Esta otimização foi feita levando-se em conta um segundo reator que deverá conter glicose-oxidase, como explicado para a otimização 1. Por isso, a restrição no intervalo de variação da vazão de 0,4 a 1,3 mL/min. A variável B foi simulada em seu intervalo global de (-1) a (+1). Fixou-se como desejável para X valores acima de 90%, porém r pôde variar em toda a extensão de resultados previstos pelo modelo, mas colocou-se como desejável que ambos atinjam seu valor máximo. A tabela 4.3.31 resume as principais considerações para esta otimização.

Tabela 4.3.31. Considerações principais para a Otimização 3. Os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.

Nome da Variável	Limite Inferior	Limite Superior	Peso
(A) <i>vazão</i>	-1	0,5	1
(B) <i>temperatura</i>	-1	+1	1
X	90	98	1
R	0,23	0,86	1

Para esta otimização foram obtidas duas soluções possíveis de 20 tentativas de otimização, que estão apresentadas na tabela 4.3.32. As otimizações foram calculadas utilizando-se os modelos descritos nas equações 4.3.3 e 4.3.4. Os valores de X e r apresentados na Tabela 4.3.32 são os valores preditos (X_{predito} e r_{predito}) pela otimização para as respostas em estudo.

Tabela 4.3.32. Soluções para a Otimização 3. Os valores apresentados para A e B são codificados, e os valores reais das variáveis codificadas estão apresentados na Tabela 4.3.20.

Solução	Variável Codificada		Variável Resposta		Desejabilidade
	(A) <i>Q</i> (mL/min)	(B) <i>temperatura</i> (°C)	X_{predito} (%)	r_{predito} $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$	
1	0,5	0,55	94,53	0,71	0,655
2	0,5	0,50	94,53	0,71	0,653

A figura 4.3.44 mostra os gráficos de rampas para a solução 1, com *desejabilidade* de 0,655. Para a solução 1 previu-se que operando o reator com vazão codificada 0,5 (vazão real igual a 1,3 mL/min) e temperatura codificada 0,55 (temperatura real igual a 51°C) pode-se obter grau de conversão médio (X) igual a 94,53% e taxa de reação média (r) igual a 0,71 mmol/h.mg.

Figura 4.3.44. Gráfico de rampas para a solução 1 da otimização 3 (Tabela 4.3.32).

A tabela 4.3.33 apresenta um quadro resumo das otimizações para que se possam tecer conclusões sobre a forma mais adequada de operação do reator enzimático de membranas com invertase.

Tabela 4.3.33. Quadro resumo das otimizações.

Otimização	Variável (valor real)		Variável Resposta		Desejabilidade
	(A) <i>Q</i> (mL/min)	(B) <i>temperatura</i> (°C)	X_{predito} (%)	r_{predito} $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$	
1	1,0	51	94,6	0,56	0,547
2	1,6	51	95,2	0,86	0,807
3	1,3	51	94,5	0,71	0,655

Da tabela 4.3.33 pode-se concluir que as três otimizações mostraram que a temperatura de 51°C resultou no melhor valor de temperatura para ser utilizado no reator e que, a variação de vazão pouco influi no grau de conversão e sim na taxa de reação. A partir desta conclusão pode-se fixar a vazão de acordo com as condições adequados ao processo global e com a taxa de reação desejada.

VALIDAÇÃO DA OTIMIZAÇÃO

Para a validação da otimização foi realizado um ensaio de hidrólise da sacarose por ação da invertase em reator enzimático de membranas com as condições de vazão e temperatura da Otimização 1 (Tabela 4.3.33). Este ensaio foi realizado por um tempo maior de operação do reator, de 57 horas, para se verificar também dados de estabilidade operacional da invertase e problemas de entupimento da membrana, além do objetivo principal de efetuar a comparação dos valores experimentais de grau de conversão (X) e velocidade de reação (r) com os preditos pelo modelo estatístico. Apresentam-se a seguir na Tabela 4.3.34 as condições experimentais do ensaio VI01, de validação do modelo estatístico.

Tabela 4.3.34. Condições experimentais do ensaio VI01.

Volume do Reator.....	50 mL
[Sacarose].....	500 mM
[Invertase].....	1000 $\mu\text{g/mL}$
Temperatura.....	51°C
pH.....	5,5
Vazão.....	1,0 mL/min
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\varnothing_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Tempo de ensaio	57 horas
Agitação.....	Vórtice de $1/3$ do volume útil do reator

A seguir, no gráfico da Figura 4.3.45, estão apresentados os principais resultados do ensaio VI01. As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de X e r dos gráficos, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice N. Na Tabela N.1 do Apêndice N e nas Figuras 4.3.48 e 4.3.49 estão apresentadas médias estatísticas para diferentes intervalos de operação do biorreator e as justificativas dos intervalos analisados estão apresentadas a seguir. A média estatística considerada para a comparação com os valores preditos pelo modelo estatístico foi a que considerou os valores até 32 horas de ensaio, período no qual não houve interferências por entupimento ou perda de estabilidade da enzima.

Ensaio VI01

(A)

(B)

Figura 4.3.45. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio VI01 (pH = 5,5; T = 51 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 96,8 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,58 \text{ mmol/h.mg}$).

De acordo com os dados obtidos experimentalmente para o ensaio VI01 foi possível comparar as médias experimentais de **X** e **r** com os valores preditos pelo modelo estatístico para a validação experimental do ponto otimizado. Experimentos confirmatórios são fundamentais para a validação da otimização obtida através dos modelos estatísticos. A comparação está apresentada na Tabela 4.3.35 e nas Figuras 4.3.46 e 4.3.47. A variação percentual entre o X_{predito} e o $X_{\text{experimental}}$ foi de 2,3% e entre o r_{predito} e o $r_{\text{experimental}}$ foi de 3,6%. Esta análise demonstrou que os valores experimentais confirmaram o que foi previsto pelo modelo estatístico.

Tabela 4.3.35. Comparação dos valores de **X** e **r** preditos pelos modelos estatísticos para o REM com Invertase.

Otimização	Variável (valor real)		Variável Resposta	
	Q (mL/min)	T (°C)	X (%)	r $\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$
Previsto pelo Modelo Estatístico	1,0	51	94,6	0,56
Média Experimental	1,0	50,8 ± 0,8	96,8	0,58

Figura 4.3.46. Comparação entre o grau de conversão predito e experimental.

Figura 4.3.47. Comparação entre a velocidade de reação predita e experimental.

Analisando-se as médias de X e r até 8 horas de ensaio, observa-se pela figura 4.3.48 e figura 4.3.49 que os valores experimentais estão acima dos preditos pelo modelo, sendo a conversão próxima à máxima, ou seja, de 100%.

Através dos dados apresentados na Tabela N.1 do Apêndice N e na figura 4.3.45 foi possível também observar o comportamento do reator quanto aos aspectos de estabilidade da enzima e entupimento da membrana. A partir das 46 horas de ensaio percebeu-se que o reator estava entupindo. Tentou-se verificar por mais um tempo se o volume voltaria a estabilizar em 50 mL, porém o nível do reator não parou de subir o que

significou que a membrana entupiu. Analisando-se os dados de vazão verifica-se uma ligeira queda na vazão de saída ao longo do ensaio, assim como após as 46 horas verificam-se valores positivos de variação da vazão de entrada e saída, indicando que a vazão de entrada ficou maior do que a vazão de saída.

Figura 4.3.48. Queda no grau de conversão médio em função do tempo.

Figura 4.3.49. Queda na velocidade de reação média em função do tempo.

As Figuras 4.3.48 e 4.3.49 mostram em gráficos de barras a tendência apresentada anteriormente na Figura 4.3.45 de queda no grau de conversão e na taxa de reação com o tempo. Porém, para facilitar esta verificação são apresentados os valores médios em três diferentes intervalos de operação do reator. Fica evidenciado o decaimento no grau de conversão e na velocidade de reação, ou seja, na eficiência do reator, o que pode ter ocorrido devido à falta de estabilidade térmica da enzima ao longo do tempo de operação a 51° C e ao entupimento do reator, porém o ponto otimizado foi validado com sucesso nas primeiras 32 horas de operação do reator.

4.3.4.4. Operação do Reator Enzimático com Açúcar Cristal

Foi realizado um ensaio de hidrólise da sacarose por ação da invertase em reator enzimático com membrana utilizando-se açúcar cristal comercial na alimentação, ao invés da sacarose P.A. utilizada em todos os ensaios apresentados anteriormente neste trabalho. As condições experimentais deste ensaio (VI02) estão apresentadas na Tabela 4.3.36.

Tabela 4.3.36. Condições experimentais do ensaio VI02.

Volume do Reator.....	50 mL
[Sacarose].....	500 mM
[Invertase].....	1000 µg/mL
Temperatura.....	55°C
pH.....	5.5
Vazão.....	1,0 mL/min
Membrana.....	(1) HA-éster de celulose $\phi_{\text{poro}} = 0,45\mu\text{m}$
Tempo de ensaio	36,5 horas
Agitação.....	Vórtice de $\frac{1}{3}$ do volume útil do reator

Para a comparação dos resultados, utilizaram-se os dados obtidos no ensaio PI16 (apresentado no item 4.3.4.2) e que foi feito nas mesmas condições experimentais deste ensaio. A única diferença foi que o ensaio VI02 foi feito com açúcar cristal comercial ao invés da sacarose PA utilizada no ensaio PI16. O objetivo foi verificar se o uso de açúcar comercial poderia influir no grau de conversão (X) e na velocidade de reação (r). O ensaio VI02, assim como o VI01 apresentado no item 4.3.4.3, também foi realizado por um tempo maior de operação do reator (36,5 horas) do que o ensaio PI16, que operou por apenas 8 horas.

A seguir, no gráfico da Figura 4.3.50, estão apresentados os principais resultados do ensaio VI02. As tabelas com os dados experimentais utilizados para o cálculo dos valores de **X** e **r** dos gráficos, incluindo os parâmetros para o cálculo dos valores médios destas variáveis resposta, estão apresentadas no Apêndice O. Na Tabela O.1 do Apêndice O estão apresentadas médias estatísticas para diferentes intervalos de operação do biorreator (8 e 36,5 horas). A média estatística considerada para a comparação com os valores obtidos no ensaio PI16 (sacarose PA) foi a que considerou os valores até 36,5 horas de ensaio.

Ensaio VI02

(A)

(B)

Figura 4.3.50. Grau de Conversão X (Fig. A) e logaritmo da velocidade de reação r (Fig. B) em função do tempo do Ensaio VI02 (pH = 5,5; T = 55 °C; Q = 1,0 mL/min). Na figura A a linha tracejada representa a conversão média ($X_{\text{médio}} = 93,9 \%$). Na figura B a linha tracejada representa o logaritmo da taxa de reação média ($r_{\text{médio}} = 0,58 \text{ mmol/h.mg}$).

No ensaio VI02 não se observou perda de eficiência do reator durante as 36 horas de operação em temperatura acima de 50°C, comportamento que também foi observado no ensaio VI01 (item 4.3.4.3), que teve maior queda de eficiência após 32 horas de operação. No ensaio VI02 o grau de conversão manteve-se oscilante em torno da média durante todo o tempo, como se pode observar pela Figura 4.3.50 A. Isso indica que a enzima é estável nesta temperatura de operação por pelo menos 30 a 36 horas de operação do reator. Pela Tabela O.1 do Apêndice O, pode-se observar também que os valores médios de grau de conversão do ensaio VI02 para os intervalos compreendidos entre 1 e 8 horas e 1 e 36,5 horas de ensaio são praticamente iguais, sendo respectivamente de $93,9 \pm 5,0$ e $94,0 \pm 4,9\%$, o que comprova o fato exposto anteriormente.

Porém, o mesmo não foi observado para a velocidade de reação. A vazão variou consideravelmente neste ensaio e exigiu mais atenção e ajustes para manter-se em torno de 1 mL/min (pode-se observar pelos dados apresentados na Tabela O.1 do Apêndice O que a variação da vazão de entrada e de saída foi maior que nos outros ensaios realizados). Isso pode ter acontecido devido ao fato do açúcar cristal ser menos puro que a sacarose P.A. e apesar de ter sido previamente filtrado em membrana 0,22 μm , a vazão de saída ficou dificultada. Como a vazão influencia diretamente na velocidade de reação, esta grandeza foi mais afetada que o grau de conversão. Por isso, para comparação dos valores de X e r , com os valores do ensaio PI16 utilizaram-se as médias calculadas de 1 a 36,5 horas do ensaio VI02, pois observou-se que somente a partir de 7 horas de ensaio a vazão ficou mais estável e o sistema entrou em regime de estado estacionário para a vazão. A Tabela 4.3.37 apresenta as comparações entre os resultados com açúcar cristal e sacarose P.A.

Tabela 4.3.37. Comparação dos resultados obtidos para ensaios VI02 e PI16.

Tipo de Substrato	$X_{\text{médio}}$ (%)	$r_{\text{médio}}$
		$\left[\frac{\text{mmol}_F}{\text{h.mg}_E} \right]$
Sacarose PA (Ensaio PI16)	$96,2 \pm 2,7$	$0,58 \pm 0,04$
Açúcar Cristal (Ensaio VI02)	$93,9 \pm 5,0$	$0,58 \pm 0,07$

Analisando-se os resultados médios apresentados na Tabela 4.3.37 pôde-se concluir que a diferença encontrada no grau de conversão não é estatisticamente significativa, sendo menor que 2,5% para os valores médios. Portanto o uso de açúcar cristal como substrato não modificou o comportamento do sistema quando estudado em relação à eficiência de hidrólise da sacarose, tendo ocorrido variações somente no comportamento fluidodinâmico do reator.

5. CONCLUSÕES

O estudo cinético da enzima invertase mostrou que o sistema enzimático em estudo segue o modelo cinético de Michaelis-Menten. Determinou-se a faixa de valores dos parâmetros cinéticos por uma análise estatística, obtendo-se para o K_M o valor de 74 ± 30 mM e para o $v_{m\acute{a}x}$ o valor de $0,96 \pm 0,31$ (mg_{AR}/mL.min). Pelas duas análises estatísticas efetuadas os valores de K_M médio (74 e 71 mM) e $v_{m\acute{a}x}$ médio (0,96 e 1,00 mg AR/mL.min) foram similares. O que chamou a atenção durante a execução do trabalho, e daí o número de repetições, foi a variabilidade encontrada nos resultados experimentais, observada pelo elevado desvio-padrão, por se tratar de um sistema enzimático não-homogêneo.

Foi possível também com este estudo cinético prever o comportamento do reator enzimático com membrana por meio de um modelo fenomenológico. As estimativas foram feitas por simulações matemáticas realizadas no *software* matemático MatLab, considerando-se o reator enzimático em estudo como um CSTR ideal e com o sistema enzimático seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten. Com as simulações foi possível observar que com o aumento da concentração de sacarose no reator ocorre queda no grau de conversão, sendo esta queda maior para taxas de diluição maiores. Este fato também foi observado experimentalmente, e comprovou a observação do modelo.

Realizou-se uma comparação entre os valores obtidos de grau de conversão pelo modelo fenomenológico com os obtidos experimentalmente em um ensaio no reator enzimático com membrana. Observou-se que os valores experimentais de grau de conversão foram 31% inferiores aos da simulação e essa diferença pode estar relacionada com as variações entre o comportamento ideal e real do reator. Outras simulações foram comparadas com novos valores experimentais e observou-se que os desvios entre o valor estimado e o valor real do grau de conversão foram da ordem de 10%. Esses resultados mostraram que a simulação foi eficiente para a previsão do comportamento do reator em diversas condições experimentais, o que pôde reduzir o trabalho experimental.

Foram realizados experimentos seriais de hidrólise da sacarose em um reator enzimático com membrana e se estudou a variação da concentração de sacarose, da concentração de enzima, da temperatura e da vazão. Nestes estudos, observou-se que o grau de conversão e a produtividade no reator foram independentes da concentração de enzima quando esta foi superior a 250 µg de invertase/mL; e, que outras variáveis deveriam ser estudadas a fim de se elevar o grau de conversão. Em função destas observações fixou-se a concentração de invertase em 1000 µg/mL, pois se considerou que nesta concentração o biocatalisador não seria limitante ao processo e que concentrações superiores a essas não aumentariam a produtividade ou a conversão no reator e, ainda, poderiam causar

problemas de entupimento da membrana devido à presença de maior concentração de sólidos em suspensão. A vazão de alimentação, por influir diretamente no tempo de residência do substrato no interior do reator, influenciou no grau de conversão, sendo menor a conversão quanto maior a vazão, porém com indicação de que esta influência foi observada somente acima de 0,4 mL/min. No entanto, o aumento da vazão tem influência positiva na produtividade, ou seja, quanto maior a vazão maior é a produtividade.

Com estes estudos foi possível planejar uma otimização das condições de operação do reator por meio de um planejamento experimental. Pôde-se fixar a concentração de invertase no reator e manipular simultaneamente as outras variáveis em conjunto, tais como o pH e a temperatura, com o objetivo de alcançar uma situação de conversão máxima da sacarose em glicose e frutose. Porém, antes do planejamento experimental estudou-se a variação da concentração de sacarose na alimentação do reator, com experimentos seriais, de forma a se fixar esta variável em um valor adequado. Com isso, a otimização por meio de modelos estatísticos é mais facilmente alcançada quando se conhecem faixas de variação mais adequadas e estreitas para o sistema em estudo.

Foram utilizados planejamentos estatísticos experimentais como ferramenta para se estudar, simultaneamente, a influência das variáveis operacionais: *vazão*, *pH* e *temperatura*, no grau de conversão da sacarose a frutose (**X**) e na taxa de reação da hidrólise da sacarose (**r**), pela ação da invertase, em um reator enzimático com membrana (REM) operando em regime contínuo. Com os dados obtidos da análise estatística, estas variáveis de operação estudadas foram otimizadas, de forma a se atingir o maior rendimento possível do biorreator nesta etapa do processo. Uma das primeiras conclusões obtidas no planejamento experimental foi que a faixa de valores de pH estudada (3,5 – 5,5) não influencia no grau de conversão e na produtividade. Portanto o pH pôde ser fixado no valor de 5,5. A temperatura que variou neste estudo de 37 a 55° C e a vazão que variou de 0,4 a 1,0 mL/min foram as variáveis mais significativas e, portanto, otimizadas. Os efeitos observados com o modelo estatístico mostraram que para o grau de conversão (**X**) a temperatura é a variável mais significativa do modelo ao nível de 5% de significância; e que apesar da vazão não ser significativa, o modelo explica que vazões maiores diminuem levemente o grau de conversão. A superfície de resposta obtida para **X** tem o formato tipo *cela*, indicando a presença de um ponto ótimo no intervalo de temperatura estudado. A superfície de resposta de **X** mostra que a temperatura é bem mais importante que a vazão para esta grandeza, isto porque o aumento de temperatura aumenta consideravelmente a velocidade de reação da enzima e, portanto o tempo de residência no reator é satisfatório para se obter um grau de conversão conveniente, para o intervalo de vazões estudadas. Pôde-se definir ainda a melhor vazão a partir da superfície de resposta obtida com a resposta produtividade (**r**), pois para esta resposta a vazão é a variável mais significativa do modelo ao nível de 5% de significância e a dependência de **r** em relação à vazão é quase linear. Mas, apesar disso, a temperatura também é uma variável importante e que influencia

positivamente nos valores de r , conferindo uma leve curvatura ao modelo. Observa-se que quando o reator é operado com vazão mínima, aparentemente, o aumento da temperatura influi menos na taxa de reação. A razão disso se deve ao maior tempo de residência dentro do reator.

Foram realizadas otimizações dos modelos estatísticos do grau de conversão e da produtividade. Estas demonstraram que a temperatura de 51°C resultou no melhor valor de temperatura para ser utilizado no reator e que, a variação da vazão pouco influi no grau de conversão e sim na taxa de reação. A partir desta conclusão pôde-se fixar a vazão de acordo com as condições adequadas ao processo global e com a taxa de reação desejada. Para a validação da otimização foi realizado um ensaio de hidrólise da sacarose por ação da invertase em reator enzimático com membrana com as condições experimentais do ponto ótimo obtido: vazão de 1,0 mL/min e temperatura de 51°C, para a comparação dos valores experimentais de grau de conversão (X) e velocidade de reação (r) com os preditos pelo modelo estatístico em 94,6% e 0,56 $\left[\frac{mmol_F}{h.mg_E} \right]$, respectivamente. De acordo com os

dados das médias experimentais de X e r e dos valores preditos pelo modelo estatístico para a validação experimental do ponto otimizado, a variação percentual entre o $X_{predito}$ e o $X_{experimental}$ foi de 2,3% e entre o $r_{predito}$ e o $r_{experimental}$ foi de 3,6%. Esta análise confirmou os valores previstos pelo modelo estatístico. No ponto otimizado o grau de conversão obtido foi próximo ao máximo, sendo o valor experimental médio nas primeiras oito horas de ensaio de 98,3%, com queda para 87,5% após 32 horas de operação do reator.

O reator manteve boas condições de vazão do permeado, e não apresentou sinais de entupimento na maioria dos ensaios, por até 40 horas de operação do reator. Em ensaio realizado com açúcar comercial na alimentação do reator não se observou influência significativa da pureza do substrato, no grau de conversão ou na produtividade do processo.

Perspectivas de continuidade do trabalho

A glicose-oxidase (E.C. 1.1.3.4) é uma enzima específica para a oxidação da glicose em ácido glicônico, e produzida principalmente por *Aspergillus niger*. Grande interesse tem sido demonstrado nas últimas décadas na utilização da glicose-oxidase em kits enzimáticos para determinação de glicose (disponíveis comercialmente) e imobilização para a construção de biossensores para dosagem de glicose. Estima-se um consumo mundial de ácido glicônico da ordem de 50.000 ton/ano. O uso de processo enzimático utilizando a glicose-oxidase para a produção de ácido glicônico ainda é pouco explorado, principalmente pela necessidade de oxigênio como cofator para a enzima, e a maior fonte produtora são os processos fermentativos utilizando células de *Aspergillus niger*. A conversão enzimática da sacarose pela ação sucessiva da invertase e da glicose-oxidase permite obter a frutose e o ácido glicônico, dois produtos de amplo uso nas indústrias dos setores alimentício (frutose), farmacêutico (ácido glicônico e frutose) e químico (ácido glicônico).

O xarope de açúcar invertido resultante da hidrólise da sacarose poderá ser utilizado como matéria-prima de partida para a conversão da glicose em ácido glicônico, utilizando reator com membrana. Inclusive, pode-se adiantar a possibilidade da conversão direta da sacarose em frutose e ácido glicônico pela ação das enzimas invertase e glicose-oxidase, através do uso de reatores com membrana dispostos em série. Dentro deste contexto, foi proposto no âmbito de intercâmbio científico entre o Departamento de Engenharia Química da FEI e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, um projeto de bioconversão simultânea da sacarose em uma mistura de frutose e ácido glicônico na proporção de 1:1, financiado na USP pela FAPESP e na FEI pela Fundação Educacional Inaciana.

ANEXO

ANEXO A – Modelos Estatísticos e Análise de Variância (ANOVA)

É apresentado a seguir um breve resumo das equações e cálculos utilizados para a análise de variância dos modelos estatísticos apresentados no item 4.3.4. Todas as equações foram consultadas em BOX *et al.* (1978) e NETO *et al.* (2002).

A análise dos resultados obtidos através da execução de experimentos por meio de planejamentos experimentais fatoriais (fracionários, completos, compostos, etc.) é feita com a estimativa dos coeficientes de correlação (efeitos principais e das interações entre as variáveis, obtidos pelo método rápido a partir dos coeficientes de contraste) e da análise de variância do modelo estatístico (BOX *et al.*, 1978). Os projetos fatoriais mais utilizados são os realizados em dois níveis de variação das variáveis, normalmente +1 e -1.

Por efeitos principais entende-se o efeito de cada variável, tal como: $X_1, X_2, \dots, X_n$ e por efeitos secundários, as interações entre as variáveis: $X_1X_2, X_1X_3, \dots, X_iX_j$. Neste trabalho, efetuou-se o cálculo dos efeitos (coeficientes de regressão) com o auxílio do software estatístico Statgraphics e o algoritmo está descrito por BOX *et al.* (1978). A comparação dos efeitos estipula as variáveis de maior importância no processo e a observação do sinal do efeito é muito importante e mostra se, com a variação de cada variável do nível mínimo para o máximo, o comportamento é de aumento ou diminuição no valor da resposta. Estes coeficientes de regressão estimados podem gerar um modelo estatístico linear ou quadrático, dependendo da adequação dos coeficientes estimados aos dados experimentais.

ESTIMATIVA DOS EFEITOS E ERRO PADRÃO

Os coeficientes de regressão de um modelo estatístico linear obtido a partir de um planejamento fatorial em dois níveis de variação, por exemplo para as variáveis X_1, X_2 e X_3 , pode ser descrito da seguinte forma:

$$Y_{\text{predito}} = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{12}.X_1X_2 + b_{13}.X_1X_3 + b_{23}.X_2X_3$$

onde: Y_{predito} é o valor previsto pelo modelo para a resposta estudada, y é o valor obtido experimentalmente no n ensaios do planejamento da resposta em estudo, n é o número de dados experimentais, X_i é a variável codificada de cada efeito (+1 ou -1), b_0 é igual à média e b_i são os demais coeficientes da equação, calculados como mostrado abaixo.

$$b_o = \frac{\sum_i^n y}{n} \quad \text{e} \quad b_i = \frac{\sum_i^n y.X_i}{\frac{1}{2} \sum_i^n X_i^2}, \text{ para } i \neq 0$$

O cálculo do erro-padrão é feito com os dados das repetições do ponto central.

Variância (s^2):

$$s^2 = \frac{\sum_i^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}$$

Erro padrão $V(b)$:

<u>Constante (b_0)</u>	<u>Efeitos ($b_i, i \neq 0$)</u>
$V(b) = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$	$V(b) = \sqrt{\frac{s^2}{\sum X_i^2}}$

Onde: n corresponde ao número de pontos centrais, X_i as variáveis codificadas e $\bar{y}$ a média das repetições.

ANÁLISE DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS

A validação dos modelos estatísticos pode ser feita pela análise de variância. Nesta, compara-se o valor de F (razão das variâncias) do modelo com o valor de F tabelado para um sistema de mesmo número de graus de liberdade para um intervalo de confiança de 95%.

Para fazer a análise de variância de um modelo, começa-se com uma decomposição algébrica dos desvios das respostas observadas em relação à resposta média global. A soma dos quadrados dos desvios costuma ser chamada de soma quadrática. A soma dos quadrados dos desvios em relação à média é composta pela soma dos quadrados em relação à regressão mais a soma dos quadrados residual. Dividindo-se as somas quadráticas pelos respectivos números de graus de liberdade obtém-se as chamadas médias quadráticas ou quadrado médio.

Quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo, o que pode-se quantificar pelo coeficiente de correlação (R^2) que é a razão da soma dos quadrados do modelo pela soma dos quadrados em torno da média. O valor máximo de R^2 é 1, e só ocorrerá se não houver residuo nenhum e portanto toda a variação em torno da média foi explicada pela regressão. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , melhor terá sido o ajuste do modelo às respostas observadas. Por exemplo, um R^2 de 0,9896 significa que 98,96% da variação em torno da média é explicada pela regressão. Para os resíduos sobra apenas 1,04%.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Modelo: $\hat{y} = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_n X_n$			
Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado Médio
Modelo	$SQ_R = \sum_i^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	$MQ_R = \frac{SQ_R}{(p-1)}$
Erro	$SQ_r = \sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	n-p	$MQ_r = \frac{SQ_r}{(n-p)}$
Total	$SQ_T = \sum_i^n (y_i - \bar{y})^2$	n-1	-

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T}$$

Onde:

$\hat{y}_i$ valor predito pelo modelo de y

$\bar{y}$ valor médio de todos os experimentos

y valor experimental

p número de coeficientes do modelo ($b_0, b_1, \dots, b_n$)

n número de dados experimentais

R^2 ... coeficiente de correlação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo

Já que se admite que os erros seguem uma distribuição normal, uma vez que o pesquisador faz um esforço para eliminar de suas experiências erros sistemáticos, pode-se usar o quadrado médio obtido da análise de variância para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa. A significância dos valores estimados para o coeficiente do modelo pode ser testada por um teste F, como mencionado acima. A razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos segue uma distribuição F. Pode-se adotar normalmente valores para 95% de confiança dos coeficientes do modelo, o que significa que há 95% de probabilidade de que o verdadeiro valor do coeficiente esteja dentro do intervalo de confiança.

Como critério de comparação para testar a significância estatística do modelo pode-se comparar o valor de F obtido com o de F tabelado no nível de confiança desejado. Normalmente utiliza-se $p < 0,05$, o que significa 95% de confiança, porém, em alguns casos também se usa $p < 0,1$, o que significa 90% de confiança ou significância no coeficiente do modelo. Quanto mais o valor de F obtido é maior que o valor de F tabelado melhor o modelo se ajusta e mais significativo é o coeficiente da equação.

$$F_{v1,v2 \text{ calculado}} > F_{v1,v2 \text{ tabelado}} (p < 0,05) \dots \dots \dots \text{MODELO VÁLIDO}$$

CÁLCULO DO FATOR F

$$F_{1,n-2} = \frac{MQ_R}{MQ_r}$$

CÁLCULO DO INTERVALO DE CONFIANÇA

Com os valores de erro padrão é possível construir intervalos de confiança para os efeitos usando a distribuição t de Student.

$$\text{Intervalo de confiança} = \pm \text{erro padrão} \times t_{n-2}$$

Onde t corresponde ao valor obtido da tabela da distribuição t de Student para 95% de confiança ou 5% de probabilidade ($p < 0,05$), e n é o número total de experimentos.

Os valores de erro padrão apresentados no item 4.3.4 foram calculadas pelo software estatístico Statgraphics, que utiliza para estimativa do erro, o erro total usando como número de graus de liberdade a diferença dos n dados experimentais com número de efeitos calculados (média, X_1, X_2 , etc.).

A falta de ajuste do modelo também é um parâmetro importante e que pode ser avaliado pela média quadrática do erro puro, que não depende do modelo e é uma estimativa da variância (s^2) para as respostas. Com isso, estima-se o erro médio cometido ao se usar a equação de regressão para prever a resposta.

FUNÇÃO DESEJABILIDADE e OTIMIZAÇÃO

A forma da função desejabilidade de uma dada resposta depende do tipo de processo estudado. Se a resposta tem um valor ótimo (A) situado em algum ponto dentro de uma faixa de aceitação, cujos limites inferior e superior representa-se por LI e LS, respectivamente. Nesse caso, a função desejabilidade da resposta y é definida por:

$$d = \left[\frac{\hat{y} - LI}{A - LI} \right]^s, \text{ para } LI \leq \hat{y} \leq A;$$

$$d = \left[\frac{\hat{y} - LS}{A - LS} \right]^t, \text{ para } A \leq \hat{y} \leq LS;$$

$$d = 0, \text{ para } \hat{y} \text{ fora do intervalo } (LI, LS).$$

O valor de d está restrito ao intervalo (0,1). Uma desejabilidade igual a 1 só será obtida se a resposta coincidir exatamente com o valor alvo. À medida que o valor de $\hat{y}$ (valor da resposta predito pelo modelo) se afasta do alvo A , o valor da desejabilidade irá caindo, tornando-se zero quando um dos limites da faixa de aceitação for alcançado (LI ou LS).

Os valores de s e t são expoentes (pesos) que definem a taxa de variação da desejabilidade com a resposta estimada pelo modelo estatístico. Fazendo-os variar podem-se atribuir diferentes desejabilidades aos diversos níveis de resposta. A escolha vai depender da prioridade ou da importância relativa que se resolve atribuir a cada resposta.

Muitas vezes não se tem um valor alvo e sim um limite unilateral, acima ou abaixo do qual deseja-se que a resposta fique. Para tratar desses casos, deve-se modificar uma parte da função desejabilidade, fazendo o valor alvo coincidir com um dos extremos considerando-se $d=1$ a partir desse valor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADISSON, L.; BOLTE, J.; DENUYNCK, C.; MARI, J.C. Enzymatic synthesis of aspartyl-containing dipeptides. **Tetrahedron**, Amsterdam, v.44, p.2185-2191, 1988.
- ALFANI, F.; CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; VITOLO, M. Biological upgrading of wastes from sucrose processing. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.542, p.346-350, 1988.
- AMBROSINO, G.; VAROTTO, S.; BASSO, M.M.S.; GALAVOTTI, D.; CECCHETTO, A.; CARRARO, P.; NASO, A.; DE SILVESTRO, G.; PLEBANI, M.; GIRON, G.; ABATANGELO, G.; CESTRONE, A.; MARRELLI, L.; TROMBETTA, M.; LORENZELLI, V.; PICARDI, A.; COLANTONI, A.; VAN THIEL, D.; RICORDI, C.; D'AMICO, F.D. Development of a new bioartificial liver using porcine autologous biomatrix as hepatocyte support. **Asaio J.**, Hagerstown, v.48, n.6, p.592-597, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **Anu. Ind. Quím.**, São Paulo, 1997.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2.ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986. 984p.
- BASSETTI, F.J.; BERGAMASCO, R.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Thermal stability and deactivation energy of free and immobilized invertase. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v.17, n.4-7, p.867-872, 2000.
- BEN AIM, R.M.; SEMMENS, M.J. Membrane bioreactors for wastewater treatment and reuse: a success story. **Water Sci. Technol.**, Colchester, v.47, n.1, p.1-5, 2003.
- BERKE, W.; SCHUZ, H.-J.; WANDREY, C.; MORR, M.; DENDA, G.; KULA, M.-R. Continuous regeneration of ATP in enzyme membrane reactor for enzymatic synthesis. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.32, p.130-139, 1988.
- BERNSTEIN, L.A.; REO, C.M.; LUND, C.R.F. A batch membrane reactor for laboratory studies. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.118, p.93-100, 1996.

- BÓDALO, A.; GÓMEZ, J.L.; GÓMEZ, E.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M.F.; MONTIEL, M.C. Ultrafiltration membrane reactors for enzymatic resolution of aminoacids: design model and optimization. **Enzyme Microb. Technol.**, Amsterdam, v.28, p.355-361, 2001.
- BOMMARIUS, A. Biotransformations and enzyme reactors. In: REHM, H.-J.; REED, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P., eds. **Biotechnology: bioprocessing**. 2.ed. Weinheim: VCH, 1993. v.3, p.427-466.
- CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; CIRIELLI, G.; GALLIFUOCO, A.; ALFANI, F. Sucrose bioconversion in membrane reactors. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.41, p.225-236, 1989.
- CASTELLAN, G. **Fundamentos de físico-química**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1986. 527p.
- COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. High fructose corn syrup. In: CHEREMISINOFF, P.N.; QUELLETTE, R.P., eds. **Biotechnology: applications and research**. Lancaster: Technomic, 1985a. cap.13, p.165-171.
- COKER, L.E.; VENKATASUBRAMANIAN, K. Starch conversion processes. In: MOO-YOUNG, M., ed. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon, 1985b. v.3, cap.39, p.777-787.
- CRUEGER, A.; CRUEGER, W. Carbohydrates. In: REHM, H.-J.; REED, G., eds. **Biotechnology: a comprehensive treatise**. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. cap.11, p.423-434. (Biotransformations, v.6a).
- CUNHA, B.C.A.; VITOLO, M. Effect of viscosity on sucrose hydrolysis catalysed by invertase obtained from *S. cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.26, p.811-813, 1984.
- ERZINGER, G.S. **Produção biotecnológica de sorbitol e ácido glicônico por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191: estudo da estabilidade da enzima glicose-frutose oxidoreductase**. São Paulo, 2000. 141p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- FANE, A.; CHANG, S. Membrane bioreactors: design & operational options. **Filtr. Sep.**, Amsterdam, v.39, n.5, p.26-29, 2002.

- GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. **Biochem. Eng. J.**, Amsterdam, v.12, p.223-229, 2002.
- GIORNO, L.; DRIOLI, E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Tibtech**, v.18, p.339-349, aug., 2000.
- HALPERN, M.G. Industrial enzymes from microbial sources (Recent Advances). **Chem. Technol. Rev.**, New Jersey, n.186, p.298-302, 1981.
- HASSMANN, F.A. **Extração Líquido-Líquido por Micelas Reversas de Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH)**. São Paulo, 2003. 117p. Exame de Qualificação de Doutorado– Programa de Pós-Graduação Inter-unidades em Biotecnologia USP-Butantã-IPT - Universidade de São Paulo.
- HERRMANN, G.; SCHWARZ, A.; WANDREY, C.; KULA, M.-R.; KNAUP, G.; DRAUZ, K.H.; BERNDT, H. Scale-up of enzymatic peptide synthesis in an enzyme membrane reactor. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Colchester, v.13, p.346-353, 1991.
- JUNGBUNZLAUER. Products. Gluconic acid/ Gluconates. Disponível em: <http://www.jungbunzlauer.com/products>. Acesso em: 12/07/2000.
- KESTON, A. Specific colorimetric enzymatic reagents for glucose. **Abstr. Pap.- Am. Chem. Soc.**, Washington, 129th Mtg, n. res.31c, 1956.
- KUNST, A.; DRAEGER, B.; ZIEGENHORN, J. D-glucose. In: BERGMAYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v.6, p.163-185.
- LÓPEZ, C.; MIELGO, I.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds: application to dye decolourisation. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.99, p.249-257, 2002.
- MERÇON, F.; SANT'ANNA-Jr., G.L.; NOBREGA, R. Enzymatic hydrolisis of babassu oil in a membrane bioreactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.77, n.10, p.1043-1048, 2000.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, Columbus, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MILLIPORE. Catálogo para Laboratório, 1999.

MILSOM, P.E.; MEERS, J.L. Gluconic and itaconic acids. In: MOO-YOUNG, M., ed. **Comprehensive biotechnology**: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Oxford: Pergamon, 1985. v.3, p.681-696.

NETO, B.B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2.ed. Campinas: Unicamp, 2002. 401p.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Bioreactors: description and modelling. In: REHM, H.-J.; REED, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P., eds. **Biotechnology**: bioprocessing. 2.ed. Weinheim: VCH, 1993. v.3, p.77-103.

NOBREGA, R.; HABERT, A.C.; BORGES, C.P. Processos de separação por membranas. In: PESSOA-Jr., A.; KILIKIAN, B.V., eds. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2003. [no prelo].

OWUSU, R.K.; MAKHZOUM, A. Heat inactivation of lipase from psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* P38: activation parameters and enzyme stability at low or ultra-high temperatures. **Food Chem.**, Amsterdam, v.44, p.261-268, 1992.

PAZUR, J.H. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.9, p.82-87, 1966.

PEPPLER, H.J.; REED, G. Enzymes in food and feed processing. In: REHM, H.-J.; REED, G., eds. In: **Biotechnology**: a comprehensive treatise. Weinheim: VCH, 1987. cap.11. (Enzyme technology, v.7a).

PESSOA-Jr., A.; VITOLO, M. Evaluation of cross-flow microfiltration membranes using a rotary disc-filter. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.33, n.1, p.39-45, 1998.

PIERACCI, J.; CRIVELLO, J.V.; BELFORT, G. Photochemical modification of 10 kDa polyethersulfone ultrafiltration membranes for reduction of biofouling. **J. Membr. Sci.**, Amsterdam, v.156, p.223-240, 1999.

PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. **Enzyme Microb. Technol.**, Amsterdam, v.16, p.738-749, 1994.

- RIBEIRO, R.R. **Caracterização cinética da invertase imobilizada em Dowex-1X8-50**. São Paulo, 1997. 62p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- ROBERTS, S.M. Enzymes in organic synthesis. In: FOGARTY, M.W.; KELLY, C.T., eds. **Microbial enzymes and biotechnology**. 2.ed. Londres: Elsevier Applied Science, 1990. p.395-424. (Elsevier Applied Biotechnology Series).
- ROCHA-FILHO, J.A.; VITOLO, M. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: Editora Autores, 1998. p.43.
- ROGERS, P.L. Principles and applications of bioprocess technology in the food industry. In: ROGERS, P.L.; FLEET, G.H., eds. **Biotechnology and the food industry**. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1989. p.228.
- SAKAKI, K.; HARA, S.; ITOH, N. Optical resolution of racemic 2-hydroxy octanoic acid using biphasic enzyme membrane reactor. **Desalination**, Amsterdam, v.149, p.247-252, 2002.
- SARACCO, G.; NEOMAGUS, H.W.J.P.; VERSTEEG, G.F.; VAN SWAAIJ, W.P.M. High-temperature membrane reactors: potential and problems. **Chem. Eng. Sci.**, Amsterdam, v.54, p.1997-2017, 1999.
- SCHELLER, F.W.; RENNEBERG, R.; SCHUBERT, F. Coupled enzyme reactions in enzyme electrodes using sequence, amplification, competition and antiinterference principles. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.137, p.29-44, 1988.
- SHI, Y.F.; JIN, F.X.; WU, Y.Y. Microfiltration membrane bioreactor in stirred backflush operation for biotransformation using intact cells. **Process Biochem.**, Amsterdam, v.32, n.5, p.387-390, 1997.
- SHIJIAZHANG SHINEWAY PHARMACEUTICAL SHARE. Zinc gluconic acid granules. Disponível em: www.shineway.com/zinc.htm. Acesso em: 12/07/2000.
- SOLMINSKA, L.; SZOSTEK, A.; GRZESKOWIAK, A. Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v.50, p.423-428, 2002.

- TREVISAN, H.C. **Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas**. Campinas, 1993. 205p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade de Campinas.
- U.S. EXPORTS AND IMPORTS BY 10-DIGIT HARMONIZED CODE. Disponível em: <http://www.ita.doc.gov/industry/otea/Trade-Detail/about.html>. Acesso em: 30/12/1998.
- VASIC-RACKI, Dj.; JONAS, M.; WANDREY, C.; HUMMEL, W.; KULA, M-R. Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.31, p.215-222, 1989.
- VITOLO, M. **Atividade invertásica de células intactas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) obtidas por cultivo contínuo**. São Paulo, 1983. 219p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- VITOLO, M. **Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*)**. São Paulo, 1979. 136p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugar cane molasses. I. Steady-state continuous culture tests. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.27, n.8, p.1229-1235, 1985.
- VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugar cane molasses. II. Unsteady-state continuous culture tests. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.30, n.1, p.9-14, 1987.
- VOGELBUSCH GmbH. Products. Disponível em: <http://www.vogelbusch.com/technology.htm>. Acesso em: 12/07/2000.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. **Fermentation and enzyme technology**. New York: Wiley, 1979. 374p.
- WOODWARD, J.R.; SPOKANE, R.B. Analytical enzymes: biosensors. In: GODFREY, T.; WEST, S., eds. **Industrial enzymology**. 2.ed. London: MacMillan, 1996. p.51-59.
- WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. Disponível em: <http://www.worthington-biochem.com>. Acesso em: 05/09/1999.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Constatação de que a Invertase Sigma® utilizada neste trabalho trata-se de células de levedura seca e não da enzima isolada.

A.1. Determinação da atividade enzimática de suspensões de “pó invertásico” preparadas em diferentes concentrações.

Foram preparadas diferentes concentrações de suspensões do pó invertásico (conforme Materiais e Métodos item 3.1.1.1) e foi realizada a medida da atividade enzimática destas suspensões (conforme Materiais e Métodos item 3.2.1). Foi observado que as suspensões eram turvas e não-homogêneas, e decidiu-se centrifugar uma alíquota das mesmas suspensões, para verificar se a fração insolúvel era a enzima ou apenas material inerte do preparado comercializado pela SIGMA®, sob o número de catálogo I-9253 e descrito como sendo invertase obtida de levedura de panificação liofilizada e apresentada na forma de pó. Uma parte das suspensões foi centrifugada a 3000g por 10 minutos, sob refrigeração, e apenas o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. Pode-se comparar os dados de atividade enzimática obtidos na Tabela A.1, que mostram os resultados de atividade enzimática das suspensões que não foram submetidas à centrifugação em comparação ao sobrenadante obtido após separação do resíduo insolúvel. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela A.1. Atividade enzimática das suspensões de invertase que não foram submetidas à centrifugação e do sobrenadante obtido após separação do resíduo insolúvel das suspensões de invertase por centrifugação.

[enzima] (µg/ml)	Suspensão sem centrifugação	Sobrenadante após centrifugação
	Atividade _{média} $\left(\frac{mg}{ml \cdot min} \right)$	Atividade _{média} $\left(\frac{mg}{ml \cdot min} \right)$
10	0,11	0,00
20	0,19	0,02
30	0,27	0,03
40	0,37	0,04
50	0,44	0,05

Com os resultados apresentados na Tabela A.1 constatou-se que a atividade enzimática estava presente na sua maioria no resíduo insolúvel. Observando-se ao microscópio (Figura A.1) o resíduo insolúvel verificou-se que este tratava-se então de células de levedura (provavelmente *Saccharomyces cerevisiae*, pois na embalagem do produto em questão consta o termo levedura de pão – Baker's yeast). Foi utilizada uma suspensão 100 µg/ml de pó invertásico. A observação foi feita em um microscópio Olympus, utilizando a técnica de observação a fresco (lâmina/laminula), com aumento de 400 vezes e utilizando coloração vital de azul de metileno.

Figura A.1. Observação microscópica do resíduo insolúvel da suspensão de invertase Sigma® (aumento 400x; coloração com azul de metileno, Microscópio Olympus).

Com a fotografia mostrada na Figura A.1 é possível observar a presença de grumos, o que traz restrições difusionais e falta de reprodutibilidade nos experimentos para a determinação da atividade enzimática. Porém estas células não cresceram quando expostas a um meio glicosado (item A.2).

Optou-se por moer esse material (em condições que preservem a atividade enzimática – sob refrigeração, conforme Materiais e Métodos item 3.1.1.1) e realizar a separação granulométrica das células de levedura para melhorar a homogeneidade da suspensão de invertase, assim como a reprodutibilidade dos experimentos (Tabela A.2). Utilizaram-se frações de granulometria -32 a +325 Tyler/Mesh, ou seja, diâmetro de partícula compreendido entre 45 e 500 μm . A moagem e o peneiramento foram feitos sob refrigeração e não causaram perda de atividade enzimática da invertases, que se manteve-se entre 10 a 12 mg de açúcares redutores formados por minuto e por miligrama de pó invertásico utilizado. A suspensão preparada com a amostra de partícula de menor diâmetro foi mais homogênea e causou maior reprodutibilidade no ensaio de atividade enzimática, como pode-se observar pelos resultados de absorvância obtidos após o ensaio de determinação da atividade enzimática, apresentados na Tabela A.2.

Tabela A.2. Reprodutibilidade nos ensaios de determinação da atividade enzimática da invertase Sigma® original com o mesmo preparado que passou pela moagem e separação granulométrica (-32; +325 Tyler/Mesh).

Amostra	Abs _{540 nm} Invertase comercial Suspensão 40 µg/ml	Abs _{540 nm} Invertase (-32; +325 Tyler/Mesh) Suspensão 50 µg/ml
1	0,056	0,607
2	0,062	0,650
3	0,061	0,670
4	0,055	0,674
5	0,053	0,708
6	0,054	0,571
7	0,140	0,520
8	0,079	0,585
9	0,051	0,627
10	0,055	0,600
11	0,057	-
12	0,207	-
13	0,253	-
14	0,083	-
15	0,136	-
16	0,056	-
17	0,061	-
18	0,062	-
19	0,317	-
20	0,205	-
	Média = 0,105	Média = 0,621
	Desvio padrão = 0,079	Desvio padrão = 0,056

A.2. Cultivo das células do preparado invertásico SIGMA® em estudo

Foram realizados dois cultivos para verificar se as células do preparado invertásico SIGMA®, utilizado neste trabalho, tratava-se de células viáveis ou não-viáveis. Um dos cultivos utilizou o preparado em questão como inóculo e o outro, para efeito de comparação, utilizou fermento biológico marca ITAIQUARA®. Ambos seguiram as mesmas condições de cultivo e meio de cultura, que foram:

- Inóculo = 50 mg de células liofilizadas contendo invertase (SIGMA® Grade V I9253) ou 0,15 g de fermento fresco com 66% de umidade;
- $\text{pH}_{\text{inicial}} = 4,5$;
- Temperatura = 37 °C;
- Tempo de ensaio = 21 e 18 horas;
- Meios esterilizados em auto-clave a 121 °C x 20 minutos;
- Determinação da concentração celular por densidade ótica, ou seja, leituras de absorvância a 600 nm (curva de calibração: $\text{DO} = 2,417.X + 0,0184$, $R^2 = 0,994$) – após centrifugação de 20 mL de mosto inicial ou fermentado, ressuspendia-se o precipitado em água destilada, centrifugava-se novamente, ressuspendia-se em 20 mL de água destilada e procedia-se à leitura de absorvância. Se necessário diluía-se novamente o sobrenadante;
- Agitação de 200 rpm em incubador rotativo.

Os meios de cultura consistiam de 17 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 2,4 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,075 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5,1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os cultivos foram feitos em Erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de meio de cultura. Mediu-se a concentração celular (X, expressa em g/L de massa seca) no início e no final da fermentação. O consumo da fonte de carbono foi determinado pela análise de açúcares redutores pelo método do DNS (Materiais e Métodos, item).

Tabela A.3. Concentração celular após o cultivo das células de levedura presentes no preparado enzimático comercializado pela SIGMA® em comparação ao mesmo cultivo com células de levedura de fermento biológico.

Inóculo	X (g/L) Início	X (g/L) Após 21 horas	ΔX (g/L)
células do preparado invertásico SIGMA®	0,36	0,41	0,05
fermento biológico marca ITAIQUARA	0,52	3,01	2,49

Tabela A.4. Consumo de fonte de carbono no cultivo das células de levedura presentes no preparado enzimático comercializado pela SIGMA® em comparação ao mesmo cultivo com células de levedura de fermento biológico.

Inóculo	[Glicose] (g/L) Início	[Glicose] (g/L) Após 21 horas	$\Delta[\text{Glicose}]$ (g/L)
células do preparado invertásico SIGMA®	16,2	14,9	1,3
fermento biológico marca ITAIQUARA	11,1	0,00	11,1

Como pode-se observar as células do preparado enzimático da SIGMA® devem estar inativadas, provavelmente devido à uma permeabilização à qual foi submetida a membrana celular, para esta apresentar maior facilidade de interação com o substrato, pois não apresentaram crescimento celular significativo, assim como consumo de substrato, quando comparadas às células do fermento fresco.

APÊNDICE B – Linearizações dos Dados de Velocidade em Função da Concentração de Sacarose, Obtidos para a Invertase nos Experimentos de Cinética Enzimática (item 4.1.2)

(a) Ensaio I

(b) Ensaio II

(c) Ensaio III

(d) Ensaio IV

(e) Ensaio V

(f) Ensaio VI

Figura B.1. Linearizações da curva de Michaelis-Menten, segundo o método preconizado por Lineweaver-Burk, para os ensaios realizados de determinação da cinética enzimática da invertase (I a XI).

(g) Ensaio VII

(h) Ensaio VIII

(i) Ensaio IX

(j) Ensaio X

(l) Ensaio XI

Figura B.1.(continuação) Linearizações da curva de Michaelis-Menten, segundo o método preconizado por Lineweaver-Burk, para os ensaios realizados de determinação da cinética enzimática da invertase (I a XI).

APÊNDICE C – Estudo da Variação do tempo de reação para a hidrólise da sacarose pela invertase presente em células de *S. cerevisiae*

O objetivo destes ensaios foi o de quantificar a queda da velocidade de reação com o tempo, para a invertase, de tal forma que se pudesse ter dados que justificassem os 10 minutos de reação como sendo um valor de velocidade de reação próximo da velocidade inicial máxima. Este estudo seguiu o procedimento padrão para determinação de atividade enzimática da invertase conforme descrito em Materiais e Métodos no item 3.2.1. Foram mantidas fixas as seguintes condições de ensaio: concentração de enzima em 40 µg/mL, pH 4,6, temperatura de 37°C e concentração de sacarose no meio de reação de 100 mM. Foram feitos ensaios nos seguintes tempos de reação: 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. A tendência de queda da velocidade com o tempo de reação é ilustrada pela Figura C.1.

Tabela C.1. Resultados de velocidade de reação da Invertase (v) em diferentes tempos de reação.

	Velocidade de Reação (v) ^(1,2) $\left(\frac{mg \ AR}{ml \cdot min}\right)$		
tempo (minutos)	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
1	0,853	0,906	0,880
3	0,502	0,786	0,644
5	0,814	0,868	0,841
10	0,684	0,738	0,711
15	0,483	0,308	0,396
30	0,379	0,252	0,316
45	0,335	0,354	0,345
60	0,266	0,279	0,273

Figura C.1. Queda da velocidade de reação da invertase com o tempo de reação.

Calculou-se a porcentagem de substrato consumido para cada tempo e estes dados estão apresentados na Tabela C.2. O cálculo da porcentagem de substrato consumido é feito de acordo com a Equação C.1.

$$\%substrato_{consumido} = \frac{[AR]_F \times fator}{[S]_{total}} \times 100 \quad (\text{Equação C.1})$$

Sendo: $[AR]_F$ igual à quantidade de açúcar redutor (mg/ml) formado durante a hidrólise da sacarose; *fator* igual a uma constante que considera as transformações de unidade de concentração de (mg/mL) para mM, e vale neste caso 2,778, conforme exemplo de cálculo a seguir; e, $[S]_{total}$ é a concentração de sacarose no meio inicial de reação, igual a 100 mM neste caso.

Dados para o exemplo de cálculo:

- $t=1$ minuto;
- $[AR]_F = 0,176$ mg/mL;
- Massa Molar da glicose = 180 g/mol
- Estequiometria da reação:

1 mol sacarose $\rightarrow$ 2 moles de açúcar redutor (glicose + frutose)

$[AR]_F = 0,176$ mg/mL $\div$ 180 mg/mmol $\times$ 1000 (mL/L) = 0,978 mM de açúcar redutor

0,978 mM AR $\div$ 2 = 0,49 mM de sacarose consumida

$$\%substrato_{consumido} = \frac{0,49 \times 100}{100} = 0,49\%.$$

Tabela C.2. Porcentagem de sacarose consumida durante a reação enzimática, com a concentração de sacarose inicial de 100mM para todos os ensaios.

tempo (minutos)	$[AR]_F$ (mg/mL)	%sacarose _{consumida}	% V _{residual} ⁽¹⁾
1	0,176	0,49 %	100,0 %
3	0,386	1,07 %	73,2 % ⁽²⁾
5	0,841	2,34 %	95,6 %
10	1,422	3,95 %	80,8 %
15	1,188	3,30 %	45,0 %
30	1,894	5,26 %	35,9 %
45	3,102	8,62 %	39,2 %
60	3,270	9,08 %	31,0 %

(1) corresponde à porcentagem de atividade residual em relação à inicial (para tempo = 1 minuto, $v=0,88$ mg AR/mL.min). ex. para $t = 3$ minutos, $\% V_{residual} = (0,644/0,880) \times 100$

(2) este ponto não está compatível com a tendência apresentada.

Figura C.2. Concentração de Açúcares Redutores formados em função do tempo após adição da invertase.

Como pode-se observar pela Tabela C.2, conforme o consumo de substrato ultrapassa 3% ocorre uma grande variação na velocidade da reação. É possível observar com a Figura C.2 que acima de 10 minutos de reação não se tem mais um aumento linear da concentração de açúcar redutor formado e por isso não se está mais no trecho de velocidades máximas de reação enzimática, sendo também o consumo de substrato maior que 5%, o que costuma ser indicado como consumo máximo de substrato para os ensaios de determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

APÊNDICE D – Simulações do Biorreator com Invertase.

D.1. Estimativa da Influência da Taxa de Diluição (D) e da Concentração de Substrato na Alimentação (S_0) no Grau de Conversão da Sacarose (X)

Estão apresentados nas Tabelas D.1 a D.9 os valores obtidos de S (concentração de substrato na saída do reator) em função do tempo, para diferentes valores de concentração de substrato inicial (S_0) e vazão de diluição (D), conforme apresentado no item 4.2.1.

[illegible]

[illegible]

Tabela D.3. Simulação para $D=0,016 \text{ min}^{-1}$ ($v = 2,775 \text{ mmol sacarose/L.min}$; $K_m=71 \text{ mM}$).

$S_0=10 \text{ mM}$		$S_0=50 \text{ mM}$		$S_0=100 \text{ mM}$		$S_0=250 \text{ mM}$		$S_0=600 \text{ mM}$		$S_0=750 \text{ mM}$		$S_0=1000 \text{ mM}$	
$t \text{ (min)}$	$E=3$	$t \text{ (min)}$	$E=3$	$t \text{ (min)}$	$E=3$	$t \text{ (min)}$	$E=3$	$t \text{ (min)}$	$E=3$	$t \text{ (min)}$	$E=3$	$t \text{ (min)}$	$E=3$
0	0,0100	0	0,0500	0	0,1000	0	0,2500	0	0,5000	0	0,7500	0	1,0000
0,0039	0,0082	0,0088	0,0412	0,0124	0,0825	0,0200	0,2137	0,0200	0,4587	0,0200	0,7067	0,0200	0,9557
0,0243	0,0051	0,0288	0,0283	0,0324	0,0635	0,0400	0,1886	0,0400	0,3635	0,0400	0,6755	0,0400	0,9237
0,0423	0,0038	0,0488	0,0220	0,0524	0,0523	0,0600	0,1714	0,0600	0,4079	0,0600	0,6530	0,0600	0,9005
0,0623	0,0033	0,0688	0,0191	0,0724	0,0461	0,0800	0,1598	0,0800	0,4398	0,0800	0,6388	0,0800	0,8838
0,0823	0,0031	0,0888	0,0178	0,0924	0,0426	0,1000	0,1519	0,1000	0,4620	0,1000	0,6251	0,1000	0,8717
0,1023	0,0030	0,1088	0,0173	0,1124	0,0408	0,1200	0,1466	0,1200	0,4743	0,1200	0,6167	0,1200	0,8629
0,1223	0,0030	0,1288	0,0170	0,1324	0,0398	0,1400	0,1430	0,1400	0,4869	0,1400	0,6106	0,1400	0,8566
0,1423	0,0030	0,1488	0,0169	0,1524	0,0393	0,1600	0,1407	0,1600	0,4995	0,1600	0,6063	0,1600	0,8520
0,1623	0,0030	0,1688	0,0168	0,1724	0,0391	0,1800	0,1391	0,1800	0,5122	0,1800	0,6031	0,1800	0,8487
0,1823	0,0030	0,1888	0,0168	0,1924	0,0389	0,2000	0,1381	0,2000	0,5250	0,2000	0,6009	0,2000	0,8463
0,2023	0,0030	0,2088	0,0168	0,2124	0,0388	0,2200	0,1374	0,2200	0,5379	0,2200	0,5989	0,2200	0,8446
0,2223	0,0030	0,2288	0,0168	0,2324	0,0388	0,2400	0,1369	0,2400	0,5508	0,2400	0,5981	0,2400	0,8433
0,2423	0,0030	0,2488	0,0168	0,2524	0,0388	0,2600	0,1366	0,2600	0,5637	0,2600	0,5972	0,2600	0,8424
0,2623	0,0030	0,2688	0,0168	0,2724	0,0388	0,2800	0,1364	0,2800	0,5766	0,2800	0,5966	0,2800	0,8418
0,2823	0,0030	0,2888	0,0168	0,2924	0,0388	0,3000	0,1363	0,3000	0,5895	0,3000	0,5962	0,3000	0,8413
0,3023	0,0030	0,3088	0,0168	0,3124	0,0388	0,3200	0,1362	0,3200	0,6024	0,3200	0,5959	0,3200	0,8410
0,3223	0,0030	0,3288	0,0168	0,3324	0,0388	0,3400	0,1362	0,3400	0,6153	0,3400	0,5956	0,3400	0,8407
0,3423	0,0030	0,3488	0,0168	0,3524	0,0388	0,3600	0,1361	0,3600	0,6282	0,3600	0,5955	0,3600	0,8405
0,3623	0,0030	0,3688	0,0168	0,3724	0,0388	0,3800	0,1361	0,3800	0,6411	0,3800	0,5954	0,3800	0,8404
0,3823	0,0030	0,3888	0,0168	0,3924	0,0388	0,4000	0,1361	0,4000	0,6540	0,4000	0,5953	0,4000	0,8403
0,4023	0,0030	0,4088	0,0168	0,4124	0,0388	0,4200	0,1361	0,4200	0,6669	0,4200	0,5952	0,4200	0,8403
0,4223	0,0030	0,4288	0,0168	0,4324	0,0388	0,4400	0,1361	0,4400	0,6798	0,4400	0,5952	0,4400	0,8402
0,4423	0,0030	0,4488	0,0168	0,4524	0,0388	0,4600	0,1360	0,4600	0,6927	0,4600	0,5951	0,4600	0,8402
0,4623	0,0030	0,4688	0,0168	0,4724	0,0388	0,4800	0,1360	0,4800	0,7056	0,4800	0,5951	0,4800	0,8401
0,4823	0,0030	0,4888	0,0168	0,4924	0,0388	0,5000	0,1360	0,5000	0,7185	0,5000	0,5951	0,5000	0,8401
0,5023	0,0030	0,5088	0,0168	0,5124	0,0388	0,5200	0,1360	0,5200	0,7314	0,5200	0,5951	0,5200	0,8401
0,5223	0,0030	0,5288	0,0168	0,5324	0,0388	0,5400	0,1360	0,5400	0,7443	0,5400	0,5951	0,5400	0,8401
0,5423	0,0030	0,5488	0,0168	0,5524	0,0388	0,5600	0,1360	0,5600	0,7572	0,5600	0,5951	0,5600	0,8401
0,5623	0,0030	0,5688	0,0168	0,5724	0,0388	0,5800	0,1360	0,5800	0,7701	0,5800	0,5951	0,5800	0,8401
0,5823	0,0030	0,5888	0,0168	0,5924	0,0388	0,6000	0,1360	0,6000	0,7830	0,6000	0,5951	0,6000	0,8401
0,6023	0,0030	0,6088	0,0168	0,6124	0,0388	0,6200	0,1360	0,6200	0,7959	0,6200	0,5951	0,6200	0,8401
0,6223	0,0030	0,6288	0,0168	0,6324	0,0388	0,6400	0,1360	0,6400	0,8088	0,6400	0,5951	0,6400	0,8401
0,6423	0,0030	0,6488	0,0168	0,6524	0,0388	0,6600	0,1360	0,6600	0,8217	0,6600	0,5951	0,6600	0,8401
0,6623	0,0030	0,6688	0,0168	0,6724	0,0388	0,6800	0,1360	0,6800	0,8346	0,6800	0,5951	0,6800	0,8401
0,6823	0,0030	0,6888	0,0168	0,6924	0,0388	0,7000	0,1360	0,7000	0,8475	0,7000	0,5951	0,7000	0,8401
0,7023	0,0030	0,7088	0,0168	0,7124	0,0388	0,7200	0,1360	0,7200	0,8604	0,7200	0,5951	0,7200	0,8401
0,7223	0,0030	0,7288	0,0168	0,7324	0,0388	0,7400	0,1360	0,7400	0,8733	0,7400	0,5951	0,7400	0,8401
0,7423	0,0030	0,7488	0,0168	0,7524	0,0388	0,7600	0,1360	0,7600	0,8862	0,7600	0,5951	0,7600	0,8401
0,7623	0,0030	0,7688	0,0168	0,7724	0,0388	0,7800	0,1360	0,7800	0,8991	0,7800	0,5951	0,7800	0,8401
0,7823	0,0030	0,7888	0,0168	0,7924	0,0388	0,8000	0,1360	0,8000	0,9120	0,8000	0,5951	0,8000	0,8401
0,8023	0,0030	0,8088	0,0168	0,8124	0,0388	0,8200	0,1360	0,8200	0,9249	0,8200	0,5951	0,8200	0,8401
0,8223	0,0030	0,8288	0,0168	0,8324	0,0388	0,8400	0,1360	0,8400	0,9378	0,8400	0,5951	0,8400	0,8401
0,8423	0,0030	0,8488	0,0168	0,8524	0,0388	0,8600	0,1360	0,8600	0,9507	0,8600	0,5951	0,8600	0,8401
0,8623	0,0030	0,8688	0,0168	0,8724	0,0388	0,8800	0,1360	0,8800	0,9636	0,8800	0,5951	0,8800	0,8401
0,8823	0,0030	0,8888	0,0168	0,8924	0,0388	0,9000	0,1360	0,9000	0,9765	0,9000	0,5951	0,9000	0,8401
0,9023	0,0030	0,9088	0,0168	0,9124	0,0388	0,9200	0,1360	0,9200	0,9894	0,9200	0,5951	0,9200	0,8401
0,9223	0,0030	0,9288	0,0168	0,9324	0,0388	0,9400	0,1360	0,9400	1,0023	0,9400	0,5951	0,9400	0,8401
0,9423	0,0030	0,9488	0,0168	0,9524	0,0388	0,9600	0,1360	0,9600	1,0152	0,9600	0,5951	0,9600	0,8401
0,9623	0,0030	0,9688	0,0168	0,9724	0,0388	0,9800	0,1360	0,9800	1,0281	0,9800	0,5951	0,9800	0,8401
0,9823	0,0030	0,9888	0,0168	0,9924	0,0388	1,0000	0,1360	1,0000	1,0410	1,0000	0,5951	1,0000	0,8401
1,0000	0,0030	1,0000	0,0168	1,0000	0,0388	1,0000	0,1360	1,0000	0,3554	1,0000	0,5951	1,0000	0,8401

Tabela D.4. Simulação para $D=0,02 \text{ min}^{-1}$ ($v = 2,775 \text{ mmol sacarose/L.min}$; $K_m=71 \text{ mM}$).

$S_0=10 \text{ mM}$		$S_0=50 \text{ mM}$		$S_0=100 \text{ mM}$		$S_0=250 \text{ mM}$		$S_0=500 \text{ mM}$		$S_0=750 \text{ mM}$		$S_0=1000 \text{ mM}$	
$t \text{ (min)}$	$E-3$	$t \text{ (min)}$	$E-3$	$t \text{ (min)}$	$E-3$	$t \text{ (min)}$	$E-3$	$t \text{ (min)}$	$E-3$	$t \text{ (min)}$	$E-3$	$t \text{ (min)}$	$E-3$
0	0,0100	0	0,0500	0	0,1000	0	0,2500	0	0,5000	0	0,7500	0	1,0000
0,0059	0,0083	0,0088	0,0413	0,0124	0,0829	0,0200	0,2151	0,0200	0,4602	0,0200	0,7083	0,0200	0,9574
0,0231	0,0034	0,0288	0,0293	0,0324	0,0634	0,0400	0,1927	0,0400	0,4339	0,0400	0,6806	0,0400	0,9289
0,0401	0,0042	0,0488	0,0239	0,0524	0,0559	0,0600	0,1786	0,0600	0,4165	0,0600	0,6621	0,0600	0,9099
0,0601	0,0037	0,0688	0,0215	0,0724	0,0509	0,0800	0,1697	0,0800	0,4050	0,0800	0,6498	0,0800	0,8972
0,0801	0,0036	0,0888	0,0205	0,0924	0,0483	0,1000	0,1641	0,1000	0,3975	0,1000	0,6416	0,1000	0,8887
0,1001	0,0035	0,1088	0,0201	0,1124	0,0470	0,1200	0,1606	0,1200	0,3925	0,1200	0,6362	0,1200	0,8830
0,1201	0,0035	0,1288	0,0199	0,1324	0,0464	0,1400	0,1584	0,1400	0,3892	0,1400	0,6326	0,1400	0,8793
0,1401	0,0035	0,1488	0,0198	0,1524	0,0460	0,1600	0,1571	0,1600	0,3871	0,1600	0,6302	0,1600	0,8768
0,1601	0,0035	0,1688	0,0198	0,1724	0,0458	0,1800	0,1562	0,1800	0,3857	0,1800	0,6286	0,1800	0,8751
0,1801	0,0035	0,1888	0,0198	0,1924	0,0458	0,2000	0,1557	0,2000	0,3847	0,2000	0,6275	0,2000	0,8740
0,2001	0,0035	0,2088	0,0198	0,2124	0,0457	0,2200	0,1554	0,2200	0,3841	0,2200	0,6268	0,2200	0,8732
0,2201	0,0035	0,2288	0,0198	0,2324	0,0457	0,2400	0,1552	0,2400	0,3837	0,2400	0,6263	0,2400	0,8727
0,2401	0,0035	0,2488	0,0198	0,2524	0,0457	0,2600	0,1551	0,2600	0,3835	0,2600	0,6260	0,2600	0,8724
0,2601	0,0035	0,2688	0,0198	0,2724	0,0457	0,2800	0,1550	0,2800	0,3833	0,2800	0,6258	0,2800	0,8721
0,2801	0,0035	0,2888	0,0198	0,2924	0,0457	0,3000	0,1549	0,3000	0,3832	0,3000	0,6257	0,3000	0,8720
0,3001	0,0035	0,3088	0,0198	0,3124	0,0457	0,3200	0,1549	0,3200	0,3831	0,3200	0,6256	0,3200	0,8719
0,3201	0,0035	0,3288	0,0198	0,3324	0,0457	0,3400	0,1549	0,3400	0,3830	0,3400	0,6255	0,3400	0,8718
0,3401	0,0035	0,3488	0,0198	0,3524	0,0457	0,3600	0,1549	0,3600	0,3830	0,3600	0,6255	0,3600	0,8718
0,3601	0,0035	0,3688	0,0198	0,3724	0,0457	0,3800	0,1549	0,3800	0,3830	0,3800	0,6254	0,3800	0,8718
0,3801	0,0035	0,3888	0,0198	0,3924	0,0457	0,4000	0,1549	0,4000	0,3830	0,4000	0,6254	0,4000	0,8717
0,4001	0,0035	0,4088	0,0198	0,4124	0,0457	0,4200	0,1549	0,4200	0,3830	0,4200	0,6254	0,4200	0,8717
0,4201	0,0035	0,4288	0,0198	0,4324	0,0457	0,4400	0,1549	0,4400	0,3830	0,4400	0,6254	0,4400	0,8717
0,4401	0,0035	0,4488	0,0198	0,4524	0,0457	0,4600	0,1549	0,4600	0,3830	0,4600	0,6254	0,4600	0,8717
0,4601	0,0035	0,4688	0,0198	0,4724	0,0457	0,4800	0,1549	0,4800	0,3830	0,4800	0,6254	0,4800	0,8717
0,4801	0,0035	0,4888	0,0198	0,4924	0,0457	0,5000	0,1549	0,5000	0,3830	0,5000	0,6254	0,5000	0,8717
0,5001	0,0035	0,5088	0,0198	0,5124	0,0457	0,5200	0,1549	0,5200	0,3830	0,5200	0,6254	0,5200	0,8717
0,5201	0,0035	0,5288	0,0198	0,5324	0,0457	0,5400	0,1549	0,5400	0,3830	0,5400	0,6254	0,5400	0,8717
0,5401	0,0035	0,5488	0,0198	0,5524	0,0457	0,5600	0,1549	0,5600	0,3830	0,5600	0,6254	0,5600	0,8717
0,5601	0,0035	0,5688	0,0198	0,5724	0,0457	0,5800	0,1549	0,5800	0,3830	0,5800	0,6254	0,5800	0,8717
0,5801	0,0035	0,5888	0,0198	0,5924	0,0457	0,6000	0,1549	0,6000	0,3830	0,6000	0,6254	0,6000	0,8717
0,6001	0,0035	0,6088	0,0198	0,6124	0,0457	0,6200	0,1549	0,6200	0,3830	0,6200	0,6254	0,6200	0,8717
0,6201	0,0035	0,6288	0,0198	0,6324	0,0457	0,6400	0,1549	0,6400	0,3830	0,6400	0,6254	0,6400	0,8717
0,6401	0,0035	0,6488	0,0198	0,6524	0,0457	0,6600	0,1549	0,6600	0,3830	0,6600	0,6254	0,6600	0,8717
0,6601	0,0035	0,6688	0,0198	0,6724	0,0457	0,6800	0,1549	0,6800	0,3830	0,6800	0,6254	0,6800	0,8717
0,6801	0,0035	0,6888	0,0198	0,6924	0,0457	0,7000	0,1549	0,7000	0,3830	0,7000	0,6254	0,7000	0,8717
0,7001	0,0035	0,7088	0,0198	0,7124	0,0457	0,7200	0,1549	0,7200	0,3830	0,7200	0,6254	0,7200	0,8717
0,7201	0,0035	0,7288	0,0198	0,7324	0,0457	0,7400	0,1549	0,7400	0,3830	0,7400	0,6254	0,7400	0,8717
0,7401	0,0035	0,7488	0,0198	0,7524	0,0457	0,7600	0,1549	0,7600	0,3830	0,7600	0,6254	0,7600	0,8717
0,7601	0,0035	0,7688	0,0198	0,7724	0,0457	0,7800	0,1549	0,7800	0,3830	0,7800	0,6254	0,7800	0,8717
0,7801	0,0035	0,7888	0,0198	0,7924	0,0457	0,8000	0,1549	0,8000	0,3830	0,8000	0,6254	0,8000	0,8717
0,8001	0,0035	0,8088	0,0198	0,8124	0,0457	0,8200	0,1549	0,8200	0,3830	0,8200	0,6254	0,8200	0,8717
0,8201	0,0035	0,8288	0,0198	0,8324	0,0457	0,8400	0,1549	0,8400	0,3830	0,8400	0,6254	0,8400	0,8717
0,8401	0,0035	0,8488	0,0198	0,8524	0,0457	0,8600	0,1549	0,8600	0,3830	0,8600	0,6254	0,8600	0,8717
0,8601	0,0035	0,8688	0,0198	0,8724	0,0457	0,8800	0,1549	0,8800	0,3830	0,8800	0,6254	0,8800	0,8717
0,8801	0,0035	0,8888	0,0198	0,8924	0,0457	0,9000	0,1549	0,9000	0,3830	0,9000	0,6254	0,9000	0,8717
0,9001	0,0035	0,9088	0,0198	0,9124	0,0457	0,9200	0,1549	0,9200	0,3830	0,9200	0,6254	0,9200	0,8717
0,9201	0,0035	0,9288	0,0198	0,9324	0,0457	0,9400	0,1549	0,9400	0,3830	0,9400	0,6254	0,9400	0,8717
0,9401	0,0035	0,9488	0,0198	0,9524	0,0457	0,9600	0,1549	0,9600	0,3830	0,9600	0,6254	0,9600	0,8717
0,9601	0,0035	0,9688	0,0198	0,9724	0,0457	0,9800	0,1549	0,9800	0,3830	0,9800	0,6254	0,9800	0,8717
0,9801	0,0035	0,9888	0,0198	0,9924	0,0457	1,0000	0,1549	1,0000	0,3830	1,0000	0,6254	1,0000	0,8717
1,0000	0,0035	1,0000	0,0198	1,0000	0,0457								

Tabela D.5. Simulação para $D=0,03 \text{ min}^{-1}$ ($v = 2,775 \text{ mmol sacarose/L.min}$; $K_m=71 \text{ mM}$).

S=10 mM		S=50 mM		S=100 mM		S=250 mM		S=500 mM		S=750 mM		S=1000 mM	
t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)
0	0,0100	0	0,0500	0	0,1000	0	0,2500	0	0,5000	0	0,7500	0	1,0000
0,0059	0,0083	0,0088	0,0417	0,0124	0,0839	0,0200	0,2181	0,0200	0,4637	0,0200	0,7120	0,0200	0,9611
0,0208	0,0060	0,0288	0,0316	0,0324	0,0697	0,0400	0,2014	0,0400	0,4440	0,0400	0,6912	0,0400	0,9398
0,0358	0,0051	0,0488	0,0277	0,0524	0,0633	0,0600	0,1927	0,0600	0,4334	0,0600	0,6799	0,0600	0,9282
0,0537	0,0047	0,0688	0,0263	0,0724	0,0605	0,0800	0,1882	0,0800	0,4276	0,0800	0,6738	0,0800	0,9218
0,0737	0,0045	0,0888	0,0258	0,0924	0,0592	0,1000	0,1858	0,1000	0,4245	0,1000	0,6704	0,1000	0,9184
0,0937	0,0045	0,1088	0,0256	0,1124	0,0587	0,1200	0,1846	0,1200	0,4228	0,1200	0,6686	0,1200	0,9165
0,1137	0,0045	0,1288	0,0256	0,1324	0,0585	0,1400	0,1840	0,1400	0,4219	0,1400	0,6676	0,1400	0,9154
0,1337	0,0045	0,1488	0,0255	0,1524	0,0584	0,1600	0,1837	0,1600	0,4214	0,1600	0,6671	0,1600	0,9149
0,1537	0,0045	0,1688	0,0255	0,1724	0,0583	0,1800	0,1835	0,1800	0,4212	0,1800	0,6668	0,1800	0,9145
0,1737	0,0045	0,1888	0,0255	0,1924	0,0583	0,2000	0,1834	0,2000	0,4210	0,2000	0,6666	0,2000	0,9144
0,1937	0,0045	0,2088	0,0255	0,2124	0,0583	0,2200	0,1834	0,2200	0,4209	0,2200	0,6665	0,2200	0,9143
0,2137	0,0045	0,2288	0,0255	0,2324	0,0583	0,2400	0,1833	0,2400	0,4209	0,2400	0,6665	0,2400	0,9142
0,2337	0,0045	0,2488	0,0255	0,2524	0,0583	0,2600	0,1833	0,2600	0,4209	0,2600	0,6664	0,2600	0,9142
0,2537	0,0045	0,2688	0,0255	0,2724	0,0583	0,2800	0,1833	0,2800	0,4209	0,2800	0,6664	0,2800	0,9142
0,2737	0,0045	0,2888	0,0255	0,2924	0,0583	0,3000	0,1833	0,3000	0,4209	0,3000	0,6664	0,3000	0,9142
0,2937	0,0045	0,3088	0,0255	0,3124	0,0583	0,3200	0,1833	0,3200	0,4209	0,3200	0,6664	0,3200	0,9142
0,3137	0,0045	0,3288	0,0255	0,3324	0,0583	0,3400	0,1833	0,3400	0,4209	0,3400	0,6664	0,3400	0,9142
0,3337	0,0045	0,3488	0,0255	0,3524	0,0583	0,3600	0,1833	0,3600	0,4209	0,3600	0,6664	0,3600	0,9142
0,3537	0,0045	0,3688	0,0255	0,3724	0,0583	0,3800	0,1833	0,3800	0,4209	0,3800	0,6664	0,3800	0,9142
0,3737	0,0045	0,3888	0,0255	0,3924	0,0583	0,4000	0,1833	0,4000	0,4209	0,4000	0,6664	0,4000	0,9142
0,3937	0,0045	0,4088	0,0255	0,4124	0,0583	0,4200	0,1833	0,4200	0,4209	0,4200	0,6664	0,4200	0,9142
0,4137	0,0045	0,4288	0,0255	0,4324	0,0583	0,4400	0,1833	0,4400	0,4209	0,4400	0,6664	0,4400	0,9142
0,4337	0,0045	0,4488	0,0255	0,4524	0,0583	0,4600	0,1833	0,4600	0,4209	0,4600	0,6664	0,4600	0,9142
0,4537	0,0045	0,4688	0,0255	0,4724	0,0583	0,4800	0,1833	0,4800	0,4209	0,4800	0,6664	0,4800	0,9142
0,4737	0,0045	0,4888	0,0255	0,4924	0,0583	0,5000	0,1833	0,5000	0,4209	0,5000	0,6664	0,5000	0,9142
0,4937	0,0045	0,5088	0,0255	0,5124	0,0583	0,5200	0,1833	0,5200	0,4209	0,5200	0,6664	0,5200	0,9142
0,5137	0,0045	0,5288	0,0255	0,5324	0,0583	0,5400	0,1833	0,5400	0,4209	0,5400	0,6664	0,5400	0,9142
0,5337	0,0045	0,5488	0,0255	0,5524	0,0583	0,5600	0,1833	0,5600	0,4209	0,5600	0,6664	0,5600	0,9142
0,5537	0,0045	0,5688	0,0255	0,5724	0,0583	0,5800	0,1833	0,5800	0,4209	0,5800	0,6664	0,5800	0,9142
0,5737	0,0045	0,5888	0,0255	0,5924	0,0583	0,6000	0,1833	0,6000	0,4209	0,6000	0,6664	0,6000	0,9142
0,5937	0,0045	0,6088	0,0255	0,6124	0,0583	0,6200	0,1833	0,6200	0,4209	0,6200	0,6664	0,6200	0,9142
0,6137	0,0045	0,6288	0,0255	0,6324	0,0583	0,6400	0,1833	0,6400	0,4209	0,6400	0,6664	0,6400	0,9142
0,6337	0,0045	0,6488	0,0255	0,6524	0,0583	0,6600	0,1833	0,6600	0,4209	0,6600	0,6664	0,6600	0,9142
0,6537	0,0045	0,6688	0,0255	0,6724	0,0583	0,6800	0,1833	0,6800	0,4209	0,6800	0,6664	0,6800	0,9142
0,6737	0,0045	0,6888	0,0255	0,6924	0,0583	0,7000	0,1833	0,7000	0,4209	0,7000	0,6664	0,7000	0,9142
0,6937	0,0045	0,7088	0,0255	0,7124	0,0583	0,7200	0,1833	0,7200	0,4209	0,7200	0,6664	0,7200	0,9142
0,7137	0,0045	0,7288	0,0255	0,7324	0,0583	0,7400	0,1833	0,7400	0,4209	0,7400	0,6664	0,7400	0,9142
0,7337	0,0045	0,7488	0,0255	0,7524	0,0583	0,7600	0,1833	0,7600	0,4209	0,7600	0,6664	0,7600	0,9142
0,7537	0,0045	0,7688	0,0255	0,7724	0,0583	0,7800	0,1833	0,7800	0,4209	0,7800	0,6664	0,7800	0,9142
0,7737	0,0045	0,7888	0,0255	0,7924	0,0583	0,8000	0,1833	0,8000	0,4209	0,8000	0,6664	0,8000	0,9142
0,7937	0,0045	0,8088	0,0255	0,8124	0,0583	0,8200	0,1833	0,8200	0,4209	0,8200	0,6664	0,8200	0,9142
0,8137	0,0045	0,8288	0,0255	0,8324	0,0583	0,8400	0,1833	0,8400	0,4209	0,8400	0,6664	0,8400	0,9142
0,8337	0,0045	0,8488	0,0255	0,8524	0,0583	0,8600	0,1833	0,8600	0,4209	0,8600	0,6664	0,8600	0,9142
0,8537	0,0045	0,8688	0,0255	0,8724	0,0583	0,8800	0,1833	0,8800	0,4209	0,8800	0,6664	0,8800	0,9142
0,8737	0,0045	0,8888	0,0255	0,8924	0,0583	0,9000	0,1833	0,9000	0,4209	0,9000	0,6664	0,9000	0,9142
0,8937	0,0045	0,9088	0,0255	0,9124	0,0583	0,9200	0,1833	0,9200	0,4209	0,9200	0,6664	0,9200	0,9142
0,9137	0,0045	0,9288	0,0255	0,9324	0,0583	0,9400	0,1833	0,9400	0,4209	0,9400	0,6664	0,9400	0,9142
0,9337	0,0045	0,9488	0,0255	0,9524	0,0583	0,9600	0,1833	0,9600	0,4209	0,9600	0,6664	0,9600	0,9142
0,9537	0,0045	0,9688	0,0255	0,9724	0,0583	0,9800	0,1833	0,9800	0,4209	0,9800	0,6664	0,9800	0,9142
0,9737	0,0045	0,9888	0,0255	0,9924	0,0583	1,0000	0,1833	1,0000	0,4209	1,0000	0,6664	1,0000	0,9142
0,9937	0,0045	1,0000	0,0255	1,0000	0,0583								

Tabela D.6. Simulação para $D=0,04 \text{ min}^{-1}$ ($v = 2,775 \text{ mmol sacarose/L.min}$; $K_m=71 \text{ mM}$).

S ₀ =10 mM	S ₀ =50 mM		S ₀ =100 mM		S ₀ =250 mM		S ₀ =500 mM		S ₀ =750 mM		S ₀ =1000 mM	
	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)
0.0100	0.0050	0.0084	0.0088	0.0420	0.0124	0.0848	0.0200	0.2208	0.0200	0.4667	0.0200	0.9644
0.0190	0.0064	0.0136	0.0262	0.0341	0.0324	0.0733	0.0400	0.2082	0.0400	0.4520	0.0400	0.9484
0.0326	0.0057	0.0126	0.0441	0.0312	0.0524	0.0690	0.0600	0.2029	0.0600	0.6927	0.0600	0.9413
0.0487	0.0054	0.0081	0.0841	0.0301	0.0724	0.0674	0.0800	0.2006	0.0800	0.6896	0.0800	0.9381
0.0681	0.0053	0.0068	0.0841	0.0297	0.0924	0.0668	0.1000	0.1956	0.1000	0.6882	0.1000	0.9367
0.0881	0.0052	0.0081	0.1041	0.0296	0.1124	0.0666	0.1200	0.1992	0.1200	0.6876	0.1200	0.9360
0.1081	0.0052	0.1241	0.0296	0.1441	0.1324	0.0665	0.1400	0.1990	0.1400	0.6873	0.1400	0.9358
0.1281	0.0052	0.1601	0.0296	0.1524	0.1524	0.0665	0.1600	0.1989	0.1600	0.6872	0.1600	0.9356
0.1481	0.0052	0.1641	0.0296	0.1724	0.1724	0.0665	0.1800	0.1969	0.1800	0.6872	0.1800	0.9356
0.1681	0.0052	0.1841	0.0296	0.1924	0.1924	0.0665	0.2000	0.1989	0.2000	0.6871	0.2000	0.9355
0.1881	0.0052	0.2041	0.0296	0.2124	0.2124	0.0665	0.2200	0.1989	0.2200	0.6871	0.2200	0.9355
0.2081	0.0052	0.2241	0.0296	0.2324	0.2324	0.0665	0.2400	0.1989	0.2400	0.6871	0.2400	0.9355
0.2281	0.0052	0.2441	0.0296	0.2524	0.2524	0.0665	0.2600	0.1989	0.2600	0.6871	0.2600	0.9355
0.2481	0.0052	0.2641	0.0296	0.2724	0.2724	0.0665	0.2800	0.1989	0.2800	0.6871	0.2800	0.9355
0.2681	0.0052	0.2841	0.0296	0.2924	0.2924	0.0665	0.3000	0.1989	0.3000	0.6871	0.3000	0.9355
0.2881	0.0052	0.3241	0.0296	0.3124	0.3124	0.0665	0.3200	0.1989	0.3200	0.6871	0.3200	0.9355
0.3081	0.0052	0.3324	0.0296	0.3324	0.3324	0.0665	0.3400	0.1989	0.3400	0.6871	0.3400	0.9355
0.3281	0.0052	0.3441	0.0296	0.3524	0.3524	0.0665	0.3600	0.1989	0.3600	0.6871	0.3600	0.9355
0.3481	0.0052	0.3641	0.0296	0.3724	0.3724	0.0665	0.3800	0.1989	0.3800	0.6871	0.3800	0.9355
0.3681	0.0052	0.3841	0.0296	0.3924	0.3924	0.0665	0.4000	0.1989	0.4000	0.6871	0.4000	0.9355
0.3881	0.0052	0.4041	0.0296	0.4124	0.4124	0.0665	0.4200	0.1989	0.4200	0.6871	0.4200	0.9355
0.4081	0.0052	0.4241	0.0296	0.4324	0.4324	0.0665	0.4400	0.1989	0.4400	0.6871	0.4400	0.9355
0.4281	0.0052	0.4441	0.0296	0.4524	0.4524	0.0665	0.4600	0.1989	0.4600	0.6871	0.4600	0.9355
0.4481	0.0052	0.4641	0.0296	0.4724	0.4724	0.0665	0.4800	0.1989	0.4800	0.6871	0.4800	0.9355
0.4681	0.0052	0.4841	0.0296	0.4924	0.4924	0.0665	0.5000	0.1989	0.5000	0.6871	0.5000	0.9355
0.4881	0.0052	0.5041	0.0296	0.5124	0.5124	0.0665	0.5200	0.1989	0.5200	0.6871	0.5200	0.9355
0.5081	0.0052	0.5241	0.0296	0.5324	0.5324	0.0665	0.5400	0.1989	0.5400	0.6871	0.5400	0.9355
0.5281	0.0052	0.5441	0.0296	0.5524	0.5524	0.0665	0.5600	0.1989	0.5600	0.6871	0.5600	0.9355
0.5481	0.0052	0.5641	0.0296	0.5724	0.5724	0.0665	0.5800	0.1989	0.5800	0.6871	0.5800	0.9355
0.5681	0.0052	0.5841	0.0296	0.5924	0.5924	0.0665	0.6000	0.1989	0.6000	0.6871	0.6000	0.9355
0.5881	0.0052	0.6041	0.0296	0.6124	0.6124	0.0665	0.6200	0.1989	0.6200	0.6871	0.6200	0.9355
0.6081	0.0052	0.6241	0.0296	0.6324	0.6324	0.0665	0.6400	0.1989	0.6400	0.6871	0.6400	0.9355
0.6281	0.0052	0.6441	0.0296	0.6524	0.6524	0.0665	0.6600	0.1989	0.6600	0.6871	0.6600	0.9355
0.6481	0.0052	0.6641	0.0296	0.6624	0.6624	0.0665	0.6800	0.1989	0.6800	0.6871	0.6800	0.9355
0.6681	0.0052	0.6841	0.0296	0.6924	0.6924	0.0665	0.7000	0.1989	0.7000	0.6871	0.7000	0.9355
0.6881	0.0052	0.7041	0.0296	0.7124	0.7124	0.0665	0.7200	0.1989	0.7200	0.6871	0.7200	0.9355
0.7081	0.0052	0.7241	0.0296	0.7324	0.7324	0.0665	0.7400	0.1989	0.7400	0.6871	0.7400	0.9355
0.7281	0.0052	0.7441	0.0296	0.7524	0.7524	0.0665	0.7600	0.1989	0.7600	0.6871	0.7600	0.9355
0.7481	0.0052	0.7641	0.0296	0.7724	0.7724	0.0665	0.7800	0.1989	0.7800	0.6871	0.7800	0.9355
0.7681	0.0052	0.7841	0.0296	0.7924	0.7924	0.0665	0.8000	0.1989	0.8000	0.6871	0.8000	0.9355
0.7881	0.0052	0.8041	0.0296	0.8124	0.8124	0.0665	0.8200	0.1989	0.8200	0.6871	0.8200	0.9355
0.8081	0.0052	0.8241	0.0296	0.8324	0.8324	0.0665	0.8400	0.1989	0.8400	0.6871	0.8400	0.9355
0.8281	0.0052	0.8441	0.0296	0.8524	0.8524	0.0665	0.8600	0.1989	0.8600	0.6871	0.8600	0.9355
0.8481	0.0052	0.8641	0.0296	0.8724	0.8724	0.0665	0.8800	0.1989	0.8800	0.6871	0.8800	0.9355
0.8681	0.0052	0.8841	0.0296	0.8924	0.8924	0.0665	0.9000	0.1989	0.9000	0.6871	0.9000	0.9355
0.8881	0.0052	0.9041	0.0296	0.9124	0.9124	0.0665	0.9200	0.1989	0.9200	0.6871	0.9200	0.9355
0.9081	0.0052	0.9241	0.0296	0.9324	0.9324	0.0665	0.9400	0.1989	0.9400	0.6871	0.9400	0.9355
0.9281	0.0052	0.9441	0.0296	0.9524	0.9524	0.0665	0.9600	0.1989	0.9600	0.6871	0.9600	0.9355
0.9481	0.0052	0.9641	0.0296	0.9724	0.9724	0.0665	0.9800	0.1989	0.9800	0.6871	0.9800	0.9355
0.9681	0.0052	0.9841	0.0296	0.9924	0.9924	0.0665	1.0000	0.1989	1.0000	0.6871	1.0000	0.9355
0.9881	0.0052	1.0000	0.0296	1.0000	1.0000	0.0665						
1.0000	0.0052											

[illegible]

Tabela D.8. Simulação para $D=0,1 \text{ min}^{-1}$ ($v = 2,775 \text{ mmol sacarose/L.min}$; $K_m=71 \text{ mM}$).

So=10 mM		So=50 mM		So=100 mM		So=250 mM		So=500 mM		So=750 mM		So=1000 mM	
t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)	t (min)	S (M)
0	0,0100	0	0,0500	0	0,1000	0	0,2500	0	0,5000	0	0,7500	0	1,0000
0,0059	0,0086	0,0088	0,0437	0,0124	0,0889	0,0116	0,2353	0,0132	0,4823	0,0143	0,7309	0,0150	0,9800
0,0137	0,0078	0,0181	0,0412	0,0227	0,0862	0,0232	0,2308	0,0264	0,4776	0,0285	0,7262	0,0301	0,9755
0,0227	0,0075	0,0293	0,0403	0,0362	0,0852	0,0387	0,2292	0,0444	0,4762	0,0481	0,7250	0,0501	0,9744
0,0336	0,0074	0,0431	0,0401	0,0527	0,0849	0,0578	0,2289	0,0644	0,4759	0,0681	0,7248	0,0701	0,9742
0,0471	0,0074	0,0605	0,0400	0,0727	0,0849	0,0778	0,2288	0,0844	0,4759	0,0881	0,7247	0,0901	0,9741
0,0647	0,0074	0,0805	0,0400	0,0927	0,0849	0,0978	0,2288	0,1044	0,4759	0,1081	0,7247	0,1101	0,9741
0,0847	0,0074	0,1005	0,0400	0,1127	0,0849	0,1178	0,2288	0,1244	0,4759	0,1281	0,7247	0,1301	0,9741
0,1047	0,0074	0,1205	0,0400	0,1327	0,0849	0,1378	0,2288	0,1444	0,4759	0,1481	0,7247	0,1501	0,9741
0,1247	0,0074	0,1405	0,0400	0,1527	0,0849	0,1578	0,2288	0,1644	0,4759	0,1681	0,7247	0,1701	0,9741
0,1447	0,0074	0,1605	0,0400	0,1727	0,0849	0,1778	0,2288	0,1844	0,4759	0,1881	0,7247	0,1901	0,9741
0,1647	0,0074	0,1805	0,0400	0,1927	0,0849	0,1978	0,2288	0,2044	0,4759	0,2081	0,7247	0,2101	0,9741
0,1847	0,0074	0,2005	0,0400	0,2127	0,0849	0,2178	0,2288	0,2244	0,4759	0,2281	0,7247	0,2301	0,9741
0,2047	0,0074	0,2205	0,0400	0,2327	0,0849	0,2378	0,2288	0,2444	0,4759	0,2481	0,7247	0,2501	0,9741
0,2247	0,0074	0,2405	0,0400	0,2527	0,0849	0,2578	0,2288	0,2644	0,4759	0,2681	0,7247	0,2701	0,9741
0,2447	0,0074	0,2605	0,0400	0,2727	0,0849	0,2778	0,2288	0,2844	0,4759	0,2881	0,7247	0,2901	0,9741
0,2647	0,0074	0,2805	0,0400	0,2927	0,0849	0,2978	0,2288	0,3044	0,4759	0,3081	0,7247	0,3101	0,9741
0,2847	0,0074	0,3005	0,0400	0,3127	0,0849	0,3178	0,2288	0,3244	0,4759	0,3281	0,7247	0,3301	0,9741
0,3047	0,0074	0,3205	0,0400	0,3327	0,0849	0,3378	0,2288	0,3444	0,4759	0,3481	0,7247	0,3501	0,9741
0,3247	0,0074	0,3405	0,0400	0,3527	0,0849	0,3578	0,2288	0,3644	0,4759	0,3681	0,7247	0,3701	0,9741
0,3447	0,0074	0,3605	0,0400	0,3727	0,0849	0,3778	0,2288	0,3844	0,4759	0,3881	0,7247	0,3901	0,9741
0,3647	0,0074	0,3805	0,0400	0,3927	0,0849	0,3978	0,2288	0,4044	0,4759	0,4081	0,7247	0,4101	0,9741
0,3847	0,0074	0,4005	0,0400	0,4127	0,0849	0,4178	0,2288	0,4244	0,4759	0,4281	0,7247	0,4301	0,9741
0,4047	0,0074	0,4205	0,0400	0,4327	0,0849	0,4378	0,2288	0,4444	0,4759	0,4481	0,7247	0,4501	0,9741
0,4247	0,0074	0,4405	0,0400	0,4527	0,0849	0,4578	0,2288	0,4644	0,4759	0,4681	0,7247	0,4701	0,9741
0,4447	0,0074	0,4605	0,0400	0,4727	0,0849	0,4778	0,2288	0,4844	0,4759	0,4881	0,7247	0,4901	0,9741
0,4647	0,0074	0,4805	0,0400	0,4927	0,0849	0,4978	0,2288	0,5044	0,4759	0,5081	0,7247	0,5101	0,9741
0,4847	0,0074	0,5005	0,0400	0,5127	0,0849	0,5178	0,2288	0,5244	0,4759	0,5281	0,7247	0,5301	0,9741
0,5047	0,0074	0,5205	0,0400	0,5327	0,0849	0,5378	0,2288	0,5444	0,4759	0,5481	0,7247	0,5501	0,9741
0,5247	0,0074	0,5405	0,0400	0,5527	0,0849	0,5578	0,2288	0,5644	0,4759	0,5681	0,7247	0,5701	0,9741
0,5447	0,0074	0,5605	0,0400	0,5727	0,0849	0,5778	0,2288	0,5844	0,4759	0,5881	0,7247	0,5901	0,9741
0,5647	0,0074	0,5805	0,0400	0,5927	0,0849	0,5978	0,2288	0,6044	0,4759	0,6081	0,7247	0,6101	0,9741
0,5847	0,0074	0,6005	0,0400	0,6127	0,0849	0,6178	0,2288	0,6244	0,4759	0,6281	0,7247	0,6301	0,9741
0,6047	0,0074	0,6205	0,0400	0,6327	0,0849	0,6378	0,2288	0,6444	0,4759	0,6481	0,7247	0,6501	0,9741
0,6247	0,0074	0,6405	0,0400	0,6527	0,0849	0,6578	0,2288	0,6644	0,4759	0,6681	0,7247	0,6701	0,9741
0,6447	0,0074	0,6605	0,0400	0,6727	0,0849	0,6778	0,2288	0,6844	0,4759	0,6881	0,7247	0,6901	0,9741
0,6647	0,0074	0,6805	0,0400	0,6927	0,0849	0,6978	0,2288	0,7044	0,4759	0,7081	0,7247	0,7101	0,9741
0,6847	0,0074	0,7005	0,0400	0,7127	0,0849	0,7178	0,2288	0,7244	0,4759	0,7281	0,7247	0,7301	0,9741
0,7047	0,0074	0,7205	0,0400	0,7327	0,0849	0,7378	0,2288	0,7444	0,4759	0,7481	0,7247	0,7501	0,9741
0,7247	0,0074	0,7405	0,0400	0,7527	0,0849	0,7578	0,2288	0,7644	0,4759	0,7681	0,7247	0,7701	0,9741
0,7447	0,0074	0,7605	0,0400	0,7727	0,0849	0,7778	0,2288	0,7844	0,4759	0,7881	0,7247	0,7901	0,9741
0,7647	0,0074	0,7805	0,0400	0,7927	0,0849	0,7978	0,2288	0,8044	0,4759	0,8081	0,7247	0,8101	0,9741
0,7847	0,0074	0,8005	0,0400	0,8127	0,0849	0,8178	0,2288	0,8244	0,4759	0,8281	0,7247	0,8301	0,9741
0,8047	0,0074	0,8205	0,0400	0,8327	0,0849	0,8378	0,2288	0,8444	0,4759	0,8481	0,7247	0,8501	0,9741
0,8247	0,0074	0,8405	0,0400	0,8527	0,0849	0,8578	0,2288	0,8644	0,4759	0,8681	0,7247	0,8701	0,9741
0,8447	0,0074	0,8605	0,0400	0,8727	0,0849	0,8778	0,2288	0,8844	0,4759	0,8881	0,7247	0,8901	0,9741
0,8647	0,0074	0,8805	0,0400	0,8927	0,0849	0,8978	0,2288	0,9044	0,4759	0,9081	0,7247	0,9101	0,9741
0,8847	0,0074	0,9005	0,0400	0,9127	0,0849	0,9178	0,2288	0,9244	0,4759	0,9281	0,7247	0,9301	0,9741
0,9047	0,0074	0,9205	0,0400	0,9327	0,0849	0,9378	0,2288	0,9444	0,4759	0,9481	0,7247	0,9501	0,9741
0,9247	0,0074	0,9405	0,0400	0,9527	0,0849	0,9578	0,2288	0,9644	0,4759	0,9681	0,7247	0,9701	0,9741
0,9447	0,0074	0,9605	0,0400	0,9727	0,0849	0,9778	0,2288	0,9844	0,4759	0,9881	0,7247	0,9901	0,9741
0,9647	0,0074	0,9805	0,0400	0,9927	0,0849	0,9978	0,2288	1,0000	0,4759	1,0000	0,7247	1,0000	0,9741
0,9847	0,0074	1,0000	0,0400	1,0000	0,0849	1,0000	0,2288						

Soc=10 mM t (min)E-3	Soc=60 mM		Soc=100 mM		Soc=260 mM		Soc=500 mM		Soc=760 mM		Soc=1000 mM	
	t (min)E-3	S (M)	t (min)E-3	S (M)	t (min)E-3	S (M)	t (min)E-3	S (M)	t (min)E-3	S (M)	t (min)E-3	S (M)
0	0.0100	0.0500	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0059	0.0087	0.0088	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0128	0.0081	0.0169	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0210	0.0078	0.0271	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0310	0.0078	0.0436	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0435	0.0077	0.0557	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0599	0.0077	0.0757	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0799	0.0077	0.0957	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.0999	0.0077	0.1157	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.1199	0.0077	0.1357	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.1399	0.0077	0.1557	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.1599	0.0077	0.1757	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.1799	0.0077	0.1957	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.1999	0.0077	0.2157	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.2199	0.0077	0.2357	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.2399	0.0077	0.2557	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.2599	0.0077	0.2757	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.2799	0.0077	0.2957	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.2999	0.0077	0.3157	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.3199	0.0077	0.3357	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.3399	0.0077	0.3557	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.3599	0.0077	0.3757	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.3799	0.0077	0.3957	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.3999	0.0077	0.4157	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.4199	0.0077	0.4357	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.4399	0.0077	0.4557	0.0088	0.0441	0.0088	0.0914	0.0098	0.2377	0.0112	0.4852	0.0120	0.7340
0.4599	0.0077	0.4757	0.0088									

D.2. Simulação do Comportamento do Reator e validação Experimental das Estimativas (Parte I)

Estão apresentados nas Tabelas D.10 a D.12 os valores obtidos de S (concentração de substrato na saída do reator) em função do tempo, para os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ encontrados experimentalmente, conforme apresentado no item 4.2.2.

Tabela D.10. Valores de S (concentração de substrato na saída do reator) e t (tempo) obtidos para as simulações efetuadas com $S_0 = 500 \text{ mM}$, $D=0,008 \text{ min}^{-1}$ e $K_M=71 \text{ mM}$.

Simulação 01

Km=71 mM

Vmáx=2,4975 (mmol/L.min)

t(min) S(M)
(*) t x 10E-3

0	0.5000
0.0200	0.4598
0.0400	0.4260
0.0600	0.3976
0.0800	0.3737
0.1000	0.3538
0.1200	0.3371
0.1400	0.3232
0.1600	0.3117
0.1800	0.3020
0.2000	0.2940
0.2200	0.2874
0.2400	0.2819
0.2600	0.2773
0.2800	0.2736
0.3000	0.2704
0.3200	0.2679
0.3400	0.2657
0.3600	0.2640
0.3800	0.2625
0.4000	0.2613
0.4200	0.2603
0.4400	0.2595
0.4600	0.2588
0.4800	0.2583
0.5000	0.2578
0.5200	0.2574
0.5400	0.2571
0.5600	0.2569
0.5800	0.2567
0.6000	0.2565
0.6200	0.2563
0.6400	0.2562
0.6600	0.2561
0.6800	0.2560
0.7000	0.2560
0.7200	0.2559
0.7400	0.2559
0.7600	0.2558
0.7800	0.2558
0.8000	0.2558
0.8200	0.2558
0.8400	0.2557
0.8600	0.2557
0.8800	0.2557
0.9000	0.2557
0.9200	0.2557
0.9400	0.2557
0.9600	0.2557
0.9800	0.2557
1.0000	0.2557

Simulação 02

Km=71 mM

Vmáx=2,775 (mmol/L.min)

t(min) S(M)
(*) t x 10E-3

0	0.5000
0.0200	0.4554
0.0400	0.4179
0.0600	0.3864
0.0800	0.3602
0.1000	0.3382
0.1200	0.3200
0.1400	0.3048
0.1600	0.2922
0.1800	0.2819
0.2000	0.2733
0.2200	0.2662
0.2400	0.2604
0.2600	0.2556
0.2800	0.2517
0.3000	0.2484
0.3200	0.2458
0.3400	0.2436
0.3600	0.2419
0.3800	0.2404
0.4000	0.2392
0.4200	0.2382
0.4400	0.2375
0.4600	0.2368
0.4800	0.2363
0.5000	0.2358
0.5200	0.2355
0.5400	0.2352
0.5600	0.2350
0.5800	0.2348
0.6000	0.2346
0.6200	0.2345
0.6400	0.2344
0.6600	0.2343
0.6800	0.2342
0.7000	0.2342
0.7200	0.2341
0.7400	0.2341
0.7600	0.2340
0.7800	0.2340
0.8000	0.2340
0.8200	0.2340
0.8400	0.2340
0.8600	0.2340
0.8800	0.2339
0.9000	0.2339
0.9200	0.2339
0.9400	0.2339
0.9600	0.2339
0.9800	0.2339
1.0000	0.2339

Simulação 03

Km=71 mM

Vmáx=3,0803 (mmol/L.min)

t(min) S(M)
(*) t x 10E-3

0	0.5000
0.0200	0.4505
0.0400	0.4090
0.0600	0.3743
0.0800	0.3453
0.1000	0.3213
0.1200	0.3014
0.1400	0.2849
0.1600	0.2714
0.1800	0.2603
0.2000	0.2512
0.2200	0.2437
0.2400	0.2377
0.2600	0.2327
0.2800	0.2287
0.3000	0.2255
0.3200	0.2228
0.3400	0.2207
0.3600	0.2190
0.3800	0.2176
0.4000	0.2164
0.4200	0.2155
0.4400	0.2148
0.4600	0.2142
0.4800	0.2137
0.5000	0.2133
0.5200	0.2130
0.5400	0.2127
0.5600	0.2125
0.5800	0.2124
0.6000	0.2122
0.6200	0.2121
0.6400	0.2120
0.6600	0.2120
0.6800	0.2119
0.7000	0.2119
0.7200	0.2118
0.7400	0.2118
0.7600	0.2118
0.7800	0.2118
0.8000	0.2117
0.8200	0.2117
0.8400	0.2117
0.8600	0.2117
0.8800	0.2117
0.9000	0.2117
0.9200	0.2117
0.9400	0.2117
0.9600	0.2117
0.9800	0.2117
1.0000	0.2117

Tabela D.11. Valores de S (concentração de substrato na saída do reator) e t (tempo) obtidos para as simulações efetuadas com $S_0 = 500 \text{ mM}$, $D=0,008 \text{ min}^{-1}$ e $K_M=82 \text{ mM}$.

Simulação 04

Km=82 mM

Vmáx=2,4975 (mmol/L.min)

t(min)	S(M)
(*) t x 10E-3	
0	0.5000
0.0200	0.4606
0.0400	0.4275
0.0600	0.3997
0.0800	0.3764
0.1000	0.3570
0.1200	0.3408
0.1400	0.3273
0.1600	0.3160
0.1800	0.3067
0.2000	0.2990
0.2200	0.2926
0.2400	0.2872
0.2600	0.2829
0.2800	0.2792
0.3000	0.2762
0.3200	0.2738
0.3400	0.2717
0.3600	0.2701
0.3800	0.2687
0.4000	0.2675
0.4200	0.2666
0.4400	0.2658
0.4600	0.2652
0.4800	0.2646
0.5000	0.2642
0.5200	0.2639
0.5400	0.2636
0.5600	0.2633
0.5800	0.2631
0.6000	0.2630
0.6200	0.2628
0.6400	0.2627
0.6600	0.2626
0.6800	0.2625
0.7000	0.2625
0.7200	0.2624
0.7400	0.2624
0.7600	0.2623
0.7800	0.2623
0.8000	0.2623
0.8200	0.2623
0.8400	0.2623
0.8600	0.2622
0.8800	0.2622
0.9000	0.2622
0.9200	0.2622
0.9400	0.2622
0.9600	0.2622
0.9800	0.2622
1.0000	0.2622

Simulação 05

Km=82 mM

Vmáx=2,775 (mmol/L.min)

t(min)	S(M)
(*) t x 10E-3	
0	0.5000
0.0200	0.4562
0.0400	0.4195
0.0600	0.3888
0.0800	0.3632
0.1000	0.3418
0.1200	0.3241
0.1400	0.3093
0.1600	0.2972
0.1800	0.2871
0.2000	0.2788
0.2200	0.2720
0.2400	0.2664
0.2600	0.2618
0.2800	0.2581
0.3000	0.2550
0.3200	0.2524
0.3400	0.2504
0.3600	0.2487
0.3800	0.2473
0.4000	0.2462
0.4200	0.2452
0.4400	0.2445
0.4600	0.2439
0.4800	0.2434
0.5000	0.2430
0.5200	0.2426
0.5400	0.2424
0.5600	0.2421
0.5800	0.2420
0.6000	0.2418
0.6200	0.2417
0.6400	0.2416
0.6600	0.2415
0.6800	0.2414
0.7000	0.2414
0.7200	0.2413
0.7400	0.2413
0.7600	0.2413
0.7800	0.2413
0.8000	0.2412
0.8200	0.2412
0.8400	0.2412
0.8600	0.2412
0.8800	0.2412
0.9000	0.2412
0.9200	0.2412
0.9400	0.2412
0.9600	0.2412
0.9800	0.2412
1.0000	0.2412

Simulação 06

Km=82 mM

Vmáx=3,0803 (mmol/L)

t(min)	S(M)
(*) t x 10E-3	
0	0.5000
0.0200	0.4515
0.0400	0.4108
0.0600	0.3769
0.0800	0.3487
0.1000	0.3253
0.1200	0.3060
0.1400	0.2900
0.1600	0.2769
0.1800	0.2662
0.2000	0.2574
0.2200	0.2503
0.2400	0.2444
0.2600	0.2397
0.2800	0.2359
0.3000	0.2328
0.3200	0.2302
0.3400	0.2282
0.3600	0.2265
0.3800	0.2252
0.4000	0.2241
0.4200	0.2233
0.4400	0.2226
0.4600	0.2220
0.4800	0.2215
0.5000	0.2212
0.5200	0.2209
0.5400	0.2206
0.5600	0.2204
0.5800	0.2203
0.6000	0.2202
0.6200	0.2201
0.6400	0.2200
0.6600	0.2199
0.6800	0.2199
0.7000	0.2198
0.7200	0.2198
0.7400	0.2198
0.7600	0.2197
0.7800	0.2197
0.8000	0.2197
0.8200	0.2197
0.8400	0.2197
0.8600	0.2197
0.8800	0.2197
0.9000	0.2197
0.9200	0.2197
0.9400	0.2196
0.9600	0.2196
0.9800	0.2196
1.0000	0.2196

Tabela D.12. Valores de S (concentração de substrato na saída do reator) e t (tempo) obtidos para as simulações efetuadas com $S_0 = 500 \text{ mM}$, $D=0,008 \text{ min}^{-1}$ e $K_M=65 \text{ mM}$.

Simulação 07		Simulação 08		Simulação 09	
Km=65 mM		Km=65 mM		Km=65 mM	
Vmáx=2,4975 (mmol/L.min)		Vmáx=2,775 (mmol/L.min)		Vmáx=3,0803 (mmol/L)	
t(min)	S(M)	t(min)	S(M)	t(min)	S(M)
(*) t x 10E-3		(*) t x 10E-3		(*) t x 10E-3	
0	0.5000	0.0200	0.4549	0	0.5000
0.0200	0.4594	0.0400	0.4169	0.0200	0.4499
0.0400	0.4251	0.0600	0.3851	0.0400	0.4079
0.0600	0.3964	0.0800	0.3584	0.0600	0.3728
0.0800	0.3722	0.1000	0.3362	0.0800	0.3434
0.1000	0.3520	0.1200	0.3176	0.1000	0.3190
0.1200	0.3351	0.1400	0.3022	0.1200	0.2987
0.1400	0.3209	0.1600	0.2894	0.1400	0.2820
0.1600	0.3092	0.1800	0.2788	0.1600	0.2682
0.1800	0.2993	0.2000	0.2701	0.1800	0.2569
0.2000	0.2912	0.2200	0.2628	0.2000	0.2475
0.2200	0.2844	0.2400	0.2569	0.2200	0.2399
0.2400	0.2788	0.2600	0.2520	0.2400	0.2337
0.2600	0.2741	0.2800	0.2480	0.2600	0.2287
0.2800	0.2703	0.3000	0.2446	0.2800	0.2246
0.3000	0.2671	0.3200	0.2419	0.3000	0.2212
0.3200	0.2644	0.3400	0.2397	0.3200	0.2185
0.3400	0.2622	0.3600	0.2379	0.3400	0.2163
0.3600	0.2604	0.3800	0.2364	0.3600	0.2145
0.3800	0.2589	0.4000	0.2352	0.3800	0.2131
0.4000	0.2577	0.4200	0.2342	0.4000	0.2119
0.4200	0.2567	0.4400	0.2333	0.4200	0.2110
0.4400	0.2558	0.4600	0.2327	0.4400	0.2102
0.4600	0.2551	0.4800	0.2321	0.4600	0.2096
0.4800	0.2546	0.5000	0.2317	0.4800	0.2091
0.5000	0.2541	0.5200	0.2313	0.5000	0.2087
0.5200	0.2537	0.5400	0.2310	0.5200	0.2083
0.5400	0.2534	0.5600	0.2307	0.5400	0.2081
0.5600	0.2531	0.5800	0.2305	0.5600	0.2079
0.5800	0.2529	0.6000	0.2304	0.5800	0.2077
0.6000	0.2527	0.6200	0.2302	0.6000	0.2076
0.6200	0.2526	0.6400	0.2301	0.6200	0.2074
0.6400	0.2524	0.6600	0.2300	0.6400	0.2074
0.6600	0.2523	0.6800	0.2300	0.6600	0.2073
0.6800	0.2523	0.7000	0.2299	0.6800	0.2072
0.7000	0.2522	0.7200	0.2299	0.7000	0.2072
0.7200	0.2521	0.7400	0.2298	0.7200	0.2071
0.7400	0.2521	0.7600	0.2298	0.7400	0.2071
0.7600	0.2520	0.7800	0.2298	0.7600	0.2071
0.7800	0.2520	0.8000	0.2297	0.7800	0.2071
0.8000	0.2520	0.8200	0.2297	0.8000	0.2070
0.8200	0.2520	0.8400	0.2297	0.8200	0.2070
0.8400	0.2519	0.8600	0.2297	0.8400	0.2070
0.8600	0.2519	0.8800	0.2297	0.8600	0.2070
0.8800	0.2519	0.9000	0.2297	0.8800	0.2070
0.9000	0.2519	0.9200	0.2297	0.9000	0.2070
0.9200	0.2519	0.9400	0.2297	0.9200	0.2070
0.9400	0.2519	0.9600	0.2297	0.9400	0.2070
0.9600	0.2519	0.9800	0.2297	0.9600	0.2070
0.9800	0.2519	1.0000	0.2297	0.9800	0.2070
1.0000	0.2519			1.0000	0.2070

D.3. Simulação do Comportamento do Reator e validação Experimental das Estimativas (Parte II)

Estão apresentados nas Tabelas D.13 e D.14 os valores obtidos de S (concentração de substrato na saída do reator) em função do tempo, para os valores de $V_{máx}$ estimados pelo valor da constante catalítica (K_{cat}), conforme apresentado no item 4.2.3.

Tabela D.13. Valores de S (concentração de substrato na saída do reator) e t (tempo) obtidos para as simulações efetuadas com $S_0 = 500 \text{ mM}$, $D=0,008 \text{ min}^{-1}$ e $K_M=71 \text{ mM}$ e $[E_T]=500 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

Simulação 010

$K_M=71 \text{ mM}$

$V_{\text{máx}}=34,687 \text{ (mmol/L.min)}$

t(min)	S(mM)	t(min)	S(mM)
0	500.0000	402.0134	9.3974
3.3080	402.2261	408.8855	9.1775
13.3080	149.7194	415.7577	9.1023
17.9058	69.4504	425.2404	9.1455
22.5037	25.9062	435.2404	9.3322
25.6570	14.6652	442.3908	9.1758
28.8103	10.7701	449.5412	9.1097
33.9136	9.3440	458.9845	9.1599
39.5801	9.1156	468.9845	9.3887
47.7045	9.1066	475.8900	9.1772
57.7045	9.1934	482.7956	9.1031
67.7045	9.5326	492.2751	9.1471
74.1581	9.1843	500.0000	9.1156
80.6118	9.0954		
90.0845	9.1295		
100.0845	9.2726		
107.5672	9.1754		
115.0500	9.1220		
124.4172	9.1818		
134.4172	9.4808		
141.0126	9.1812		
147.6079	9.0972		
157.0958	9.1342		
167.0958	9.2899		
174.4718	9.1754		
181.8478	9.1176		
191.2420	9.1741		
201.2420	9.4477		
207.9388	9.1796		
214.6356	9.0988		
224.1264	9.1381		
234.1264	9.3040		
241.4221	9.1755		
248.7178	9.1146		
258.1310	9.1688		
268.1310	9.4252		
274.9029	9.1786		
281.6749	9.1002		
291.1641	9.1411		
301.1641	9.3155		
308.3985	9.1756		
315.6329	9.1124		
325.0594	9.1649		
335.0594	9.4091		
341.8881	9.1779		
348.7169	9.1014		
358.2030	9.1436		
368.2030	9.3248		
375.3901	9.1757		
382.5771	9.1109		
392.0134	9.1620		

Tabela D.14. Valores de S (concentração de substrato na saída do reator) e t (tempo) obtidos para as simulações efetuadas com $S_0 = 500 \text{ mM}$, $D=0,008 \text{ min}^{-1}$ e $K_M=71 \text{ mM}$ e $[E_T]=1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

Simulação 11

$K_m=71 \text{ mM}$

$V_{\text{máx}}=69,375(\text{mmol /L.min})$

t(min)	S(mM)	t(min)	S(mM)	t(min)	S(mM)
0	500.0000	183.3028	4.4003	380.8724	4.7037
1.6540	401.5831	187.1898	4.4298	384.1625	4.5110
4.6454	236.9228	191.0768	4.4732	387.3214	4.3834
7.6368	101.3925	195.0079	4.5622	391.0275	4.3791
9.3382	48.0978	198.6685	4.5615	395.4235	4.5245
11.0397	18.7698	202.0558	4.4552	398.7474	4.4174
12.5032	8.8621	205.5260	4.4025	402.0713	4.3605
13.9668	5.6229	209.4093	4.4321	406.2410	4.4163
16.3114	4.5203	213.5604	4.5780	410.8466	4.8040
18.9687	4.3468	217.4017	4.7016	413.6297	4.4151
22.7678	4.3500	220.6829	4.5061	416.4129	4.3291
27.7521	4.6056	223.8486	4.3824	420.7379	4.3643
30.6545	4.3821	227.5721	4.3803	424.9367	4.4303
33.5569	4.3244	231.9761	4.5313	429.1355	4.5963
38.1744	4.3782	235.2789	4.4168	432.9763	4.7369
42.1091	4.4068	238.5817	4.3582	436.2040	4.5046
46.0438	4.4507	242.7616	4.4131	439.3225	4.3759
50.1424	4.5980	247.4057	4.8174	443.0642	4.3758
53.8785	4.6564	250.1596	4.4142	447.5452	4.5435
57.1361	4.4720	252.9135	4.3281	450.7885	4.4112
60.4005	4.3806	257.2535	4.3632	454.0317	4.3505
64.2494	4.3960	261.4595	4.4292	458.2721	4.4060
68.6431	4.5820	265.6656	4.5970	463.0543	4.8908
71.8317	4.4180	269.5120	4.7432	465.6812	4.4149
75.0202	4.3493	272.7360	4.5065	468.3082	4.3257
79.2201	4.3969	275.8449	4.3755	472.6747	4.3592
84.0409	4.8577	279.5815	4.3748	476.9205	4.4275
86.6819	4.4099	284.0696	4.5421	481.1663	4.6126
89.3229	4.3250	287.3138	4.4107	485.0134	4.7761
93.7265	4.3602	290.5580	4.3504	488.1940	4.5061
97.9436	4.4245	294.8025	4.4062	491.2631	4.3709
102.1608	4.5893	299.5870	4.8952	495.0119	4.3714
106.0383	4.7555	302.2091	4.4152	500.0000	4.7808
109.2738	4.5181	304.8313	4.3257		
112.3584	4.3767	309.1961	4.3590		
116.0569	4.3716	313.4446	4.4277		
120.5380	4.5274	317.6931	4.6145		
123.8225	4.4111	321.5383	4.7782		
127.1069	4.3538	324.7145	4.5054		
131.3374	4.4120	327.7817	4.3704		
136.0528	4.8723	331.5338	4.3713		
138.7244	4.4157	336.0879	4.5528		
141.3960	4.3267	339.2811	4.4061		
145.7443	4.3601	342.4743	4.3448		
149.9849	4.4289	346.7708	4.4006		
154.2255	4.6138	350.6538	4.4294		
158.0645	4.7707	354.5368	4.4715		
161.2446	4.5032	358.4715	4.5608		
164.3223	4.3708	362.1398	4.5636		
168.0803	4.3724	365.5294	4.4573		
172.6273	4.5546	368.9923	4.4027		
175.8189	4.4066	372.8660	4.4302		
179.0104	4.3449	377.0182	4.5737		

APÊNDICE E – Planilhas do Biorreator**E.1. Tabela de Controle do Biorreator**

Tabela de Controle do Biorreator

Hora	Amostra	tempo de ensaio (h)	T (oC)	Volume célula (mL)	Agitação	Massa Inicial entrada(g)	Massa Final entrada(g)	Massa Saída (g)	Tempo Coleta cronometro	Tempo Coleta (min)	Volume Coletado (mL)
	0										
	1										
	2										
	3										
	4										
	5										
	6										
	7										
	8										
	9										
	10										
	11										
	12										
	13										
	14										
	15										
	16										

Figura E.1. Tabela utilizada para Contole do Biorreator.

E.2. Planilhas de Cálculos

Para os cálculos foram utilizadas planilhas de cálculos no Microsoft Excel, conforme mostram as Figuras E.2 e E.3.

RELATÓRIO DE RESULTADOS

EXPERIMENTO PI01

Planejamento Experimental (12)

(Método GOD)

Início 16/3/2001

Término 16/3/2001

Parâmetros do Experimento

[invertase] 1000 microgramas/mL

V reator 50 mL

massa invertase pesada no reator 0,050 ± 0,0001 g (50 mg)

[sacarose] na alimentação 500 mM

pH 3,5

número bomba 7

Membrana HÁ

0,45 micra

temperatura do banho 37°C

Ensaio PI01

Tabela de Controle do Bioreator

Data	Hora	Amostra	tempo de ensaio (h)	T (°C)	Volume célula (mL)	Agitação	Massa Inicial entrada(g)	Massa Final entrada(g)	Massa Saída (g)	Tempo Coleta (min)	Vazão Entrada (g/min)	Vazão Saída (g/min)	Varição da Vazão**
16/03/	09:00	0	0	38	50	OK	336,28	333,28	3,52	10	0,30	0,35	-0,05
	09:30	1	0,5	36	50	OK	418,36	414,23	4,29	10	0,41	0,43	-0,02
	10:00	2	1	36	50	OK	405,77	403,04	2,65	8	0,34	0,33	0,01
	11:00	3	2	35	50	OK	380,9	376,2	4,59	10	0,47	0,46	0,01
	11:30	4	2,5	36	50	OK	364,17	360	4,16	10	0,42	0,42	0,00
	12:00	5	3	36	50	OK	350,5	345,73	4,72	10	0,48	0,47	0,00
	12:30	6	3,5	35	50	OK	341,42	336,51	5,05	10	0,49	0,51	-0,01
	13:00	7	4	35	50	OK	329,12	324,17	4,95	11	0,45	0,45	0,00
	13:30	8	4,5	37	50	OK	317,39	312,55	5,25	12	0,40	0,44	-0,03
	14:00	9	5	35	50	OK	305,15	301,41	3,53	10	0,37	0,35	0,02
	14:30	10	5,5	38	50	OK	292,45	290,61	4,11	10	0,18	0,41	-0,23
	15:00	11	6	38	50	OK	283,89	279,99	4,24	10	0,39	0,42	-0,03
	15:30	12	6,5	36	50	OK	271,6	267,64	3,8	11	0,36	0,35	0,01
	16:00	13	7	35	50	OK	262,98	258,99	4,39	10	0,40	0,44	-0,04
	16:30	14	7,5	36	50	OK	251,18	246,46	4,66	11	0,43	0,42	0,01
	17:00	15	8	36	50	OK	233,76	229,94	3,94	10	0,38	0,39	-0,01

Amostra	Massa Saída (g)	Volume Coletado (mL)	Tempo Coleta (min)	Vazão Saída (mL/min)	Vazão Saída (g/min)	Varição Vazão massica (g/mL)	Vazão volume (mL/min)	Densidade (g/mL)
0	3,52	3,2	10	0,32	0,35		0,03	1,10
1	4,29	4	10	0,40	0,43		0,03	1,07
2	2,65	2,5	8	0,31	0,33		0,02	1,06
3	4,59	4,4	10	0,44	0,46		0,02	1,04
4	4,16	4	10	0,40	0,42		0,02	1,04
5	4,72	4,5	10	0,45	0,47		0,02	1,05
6	5,05	4,9	10	0,49	0,51		0,02	1,03
7	4,95	4,6	11	0,42	0,45		0,03	1,08
8	5,25	5	12	0,42	0,44		0,02	1,05
9	3,53	3,4	10	0,34	0,35		0,01	1,04
10	4,11	3,8	10	0,38	0,41		0,03	1,08
11	4,24	4	10	0,40	0,42		0,02	1,06
12	3,80	3,6	11	0,33	0,35		0,02	1,06
13	4,39	4,2	10	0,42	0,44		0,02	1,05
14	4,66	4,4	11	0,40	0,42		0,02	1,06
15	3,94	3,8	10	0,38	0,39		0,01	1,04

Figura E.2. Planilha de cálculo da variação mássica de vazão, da vazão volumétrica e controle do bioreator.

P101 Curva de Calibração Média (método GCD) Abs=0.2913*(G)+0.005

Amostra	Abs1	Abs2	Abs média	Diluição	[G] (mg/mL)	[G] (mmol/mL)	[G] (mM)	[S]o (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X(%)	tempo (h)	r (mmol/h.mg)	log r	Vazão (°) (mL/min)
0	0.0641	0.103	0.097	100	31.427	0.175	174.592	500	174.592	375.406	34.92	0	0.067	-1.174	0.32
1	0.295	0.264	0.265	100	89.927	0.494	494.041	500	494.041	5.969	98.81	0.5	0.237	-0.625	0.40
2	0.256	0.255	0.261	100	87.554	0.486	486.413	500	486.413	13.587	97.28	1	0.182	-0.739	0.31
3	0.25	0.247	0.249	100	83.435	0.464	463.527	500	463.527	36.473	92.71	2	0.245	-0.611	0.44
4	0.262	0.254	0.258	100	86.696	0.482	481.645	500	481.645	18.355	96.33	2.5	0.231	-0.636	0.40
5	0.224	0.257	0.241	100	80.688	0.448	448.269	500	448.269	51.731	89.65	3	0.242	-0.616	0.45
6	0.224	0.217	0.221	100	73.823	0.410	410.126	500	410.126	89.874	82.03	3.5	0.241	-0.618	0.49
7	0.226	0.252	0.239	100	80.174	0.445	445.409	500	445.409	54.591	89.08	4	0.224	-0.651	0.42
8	0.227	0.244	0.239	100	79.972	0.433	438.734	500	438.734	61.266	87.75	4.5	0.219	-0.653	0.42
9	0.221	0.217	0.219	100	73.308	0.407	407.265	500	407.265	92.735	81.45	5	0.186	-0.779	0.34
10	0.263	0.243	0.253	100	84.980	0.472	472.109	500	472.109	27.891	94.42	5.5	0.215	-0.667	0.38
11	0.242	0.23	0.236	100	79.144	0.440	439.687	500	439.687	60.313	87.94	6	0.211	-0.676	0.40
12	0.263	0.271	0.267	100	89.786	0.499	498.809	500	498.809	1.191	98.76	6.5	0.196	-0.708	0.33
13	0.223	0.247	0.235	100	79.800	0.438	437.780	500	437.780	62.220	87.56	7	0.221	-0.656	0.42
14	0.238	0.254	0.246	100	82.577	0.459	458.759	500	458.759	41.241	91.75	7.5	0.220	-0.657	0.40
15	0.204	0.207	0.206	100	68.673	0.382	381.519	500	381.519	118.481	76.30	8	0.174	-0.760	0.38
Sacarose	0.053	0.048	0.051	1	0.156										

Valores médios para início de Regime Permanente (de t=2 h até t=7,5 h)

[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	[G] (mM)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
450.18	49.82	90.04	450.18	0.22	0.41
26.89	26.89	5.36	26.89	0.02	0.04
					MÉDIA
					DESVIO

Figura E.3. Planilha de cálculo do grau de conversão (X) e da taxa de reação (r).

APÊNDICE F – Calibração da Bomba Peristáltica

Tendo em vista a importância deste equipamento para o bom andamento do processo, foi necessário proceder à calibração do mesmo. Apresenta-se na Figura F.1 a curva de calibração da bomba peristáltica utilizada neste trabalho nos ensaios com o biorreator REM 01. A Tabela F.1 contém os dados de vazão que foram levantados utilizando-se água destilada previamente filtrada em membrana de acetato de celulose 0,22 μ m. A seguir apresentam-se algumas características da bomba:

- Marca: Milan – Modelo: 20 / série 130 (FCA: 18580);
- Tensão: 110 – 220 V / 60 Hz;
- Mangueira de Silicone com diâmetro externo de 4,5 mm e diâmetro interno de 1,5 mm.

Tabela F.1. Dados de vazão para a mangueira de silicone de diâmetro interno de 1,5 mm.

Número da Bomba	t1 (min)	t2 (min)	V1 (mL)	V2 (mL)	Q1 (mL/min)	Q2 (mL/min)	Q _{média} (mL/min)
0	0	0	0	0	0	0	0
5	23,78	23,55	10	10	0.42	0.42	0.42
10	20,02	11,18	11	10	0.55	0.89	0.72
15	7,65	7,90	10	10	1.31	1.27	1.29
20	8,90	8,98	15	15	1.69	1.67	1.68
25	7,43	7,58	15	15	2.02	1.98	2.00
30	6,38	6,42	15	15	2.35	2.34	2.34
35	7,47	7,43	20	20	2.68	2.69	2.68
40	6,73	6,83	20	20	2.97	2.93	2.95
45	6,47	6,05	20	20	3.09	3.31	3.20
50	5,47	5,52	20	20	3.66	3.62	3.64
55	5,17	4,83	20	20	3.87	4.14	4.00
60	4,72	4,70	20	21	4.24	4.47	4.35
65	4,37	4,37	20	20	4.58	4.58	4.58
70	4,01	4,05	20	20	4.99	4.94	4.96
75	3,83	3,82	20	20	5.22	5.24	5.23
80	3,53	3,57	20	20	5.67	5.60	5.63
85	3,38	3,40	20	20	5.92	5.88	5.90
90	3,18	3,20	20	20	6.29	6.25	6.27
95	3,11	3,10	20	20	6.43	6.45	6.44
100	3,10	3,01	20	20	6.45	6.64	6.55

Figura F.1. Curva de Calibração com água da Bomba Peristáltica dosadora marca Milan.

APÊNDICE G – Cálculo da Constante Catalítica (k_{cat})

A seguir apresenta-se um exemplo de cálculo da constante catalítica (k_{cat}) apresentada na Tabela 4.3.25 do item 4.3.2.

1. Transformação da unidade da taxa de reação:

$$1,32 \left(\frac{\text{mmol}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right) \times 180 \left(\frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right) = 237,6 \left(\frac{\text{mg}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right)$$

2. Transformação da unidade da taxa de reação de $\left(\frac{\text{mg}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right)$ para $\left(\frac{\text{mg}_{\text{Frutose}}}{\text{h.L}} \right)$, considerando-se que a concentração de enzima dentro do reator é de 1000 mg/L:

$$237,6 \left(\frac{\text{mg}_{\text{Frutose}}}{\text{h.mg}_{\text{enzima}}} \right) \times 1000 \left(\frac{\text{mg}_{\text{enzima}}}{\text{L}} \right) = 237.600 \left(\frac{\text{mg}_{\text{Frutose}}}{\text{h.L}} \right)$$

3. Cálculo da constante catalítica (k_{cat}):

$$237.600 \left(\frac{\text{mg}_{\text{Frutose}}}{\text{h.L}} \right) = k_{cat} \times 1000 \left(\frac{\text{mg}_{\text{enzima}}}{\text{L}} \right) \therefore k_{cat} = 237,6 \text{ h}^{-1}$$

4. Cálculo do tempo de reação (t_R):

$$t_R = \frac{1}{k_{cat}} \therefore t_R = \frac{1}{237,6} = 0,0042 \text{ hora ou 15 segundos.}$$

**APÊNDICE H – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.1 de Resultados e Discussão**

Tabela H.1. Resultados Experimentais do Ensaio I01 (referentes à Figura 4.3.1).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
0	37	50	39,4	218,6	109,3	390,7	21,9	0,26	1,00
0,25	38	50	68,8	382,3	191,2	308,8	38,2	0,48	1,04
0,5	37	50	80,8	449,1	224,5	275,5	44,9	0,56	1,04
0,75	37	50	101,5	563,7	281,9	218,1	56,4	0,68	1,01
1	37	50	84,1	467,2	233,6	266,4	46,7	0,50	0,90
1,5	37	50	105,6	586,9	293,5	206,5	58,7	0,61	0,86
2	37	50	100,3	557,2	278,6	221,4	55,7	0,68	1,02
2,5	37	50	138,3	768,3	384,2	115,8	76,8	0,89	0,97
3	35	50	140,5	780,3	390,1	109,9	78,0	0,85	0,91
3,5	37	50	125,4	696,9	348,5	151,5	69,7	0,65	0,77
4	37	50	142,0	788,8	394,4	105,6	78,9	0,83	0,88
4,5	37	50	148,0	822,0	411,0	89,0	82,2	0,88	0,89
5	37	50	135,0	750,2	375,1	124,9	75,0	0,79	0,87
5,5	37	50	147,9	821,6	410,8	89,2	82,2	0,81	0,83
6	37	50	132,2	734,4	367,2	132,8	73,4	0,74	0,84
6,5	39	50	136,4	757,5	378,8	121,2	75,8	0,77	0,85
7	36	50	148,7	826,2	413,1	86,9	82,6	0,75	0,76
7,5	40	50	134,1	745,2	372,6	127,4	74,5	0,70	0,78
8	37,5	50	145,5	808,1	404,0	96,0	80,8	0,79	0,81
8,5	37	>50	149,6	831,2	415,6	84,4	83,1	0,79	0,79
9	37	>50	152,9	849,4	424,7	75,3	84,9	0,90	0,88
9,5	36	>50	115,5	641,7	320,9	179,1	64,2	0,62	0,81
média ⁽¹⁾	37,1	ND	139,5	774,8	387,4	112,6	77,5	0,78	0,84
desvio padrão	1,2	ND	10,1	56,3	28,2	28,2	5,6	0,08	0,06

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 9,5 horas;
(2) ND...valor não determinado.

Tabela H.2. Resultados Experimentais do Ensaio I02 (referentes à Figura 4.3.2).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
0	38	50	18,8	104,6	52,3	447,7	10,5	0,52	0,33
0,67	36	50	27,3	151,6	75,8	424,2	15,2	0,94	0,41
1	38	50	39,8	221,4	110,7	389,3	22,1	1,30	0,39
1,5	37	50	47,7	264,8	132,4	367,6	26,5	1,41	0,35
2	35	50	57,7	320,6	160,3	339,7	32,1	1,72	0,36
2,5	36	50	62,9	349,5	174,8	325,2	35,0	1,84	0,35
3	37	50	63,1	350,6	175,3	324,7	35,1	1,67	0,32
3,5	37	50	65,8	365,6	182,8	317,2	36,6	1,86	0,34
4	37	50	70,3	390,4	195,2	304,8	39,0	1,85	0,32
4,5	37	50	69,0	383,1	191,6	308,4	38,3	1,89	0,33
5	36,5	50	69,2	384,2	192,1	307,9	38,4	2,06	0,36
5,5	36,5	50	69,4	385,7	192,9	307,1	38,6	1,97	0,34
6	37	50	70,9	394,0	197,0	303,0	39,4	2,01	0,34
6,5	37	50	68,5	380,6	190,3	309,7	38,1	1,81	0,32
7	36	50	66,5	369,7	184,9	315,1	37,0	1,93	0,35
7,5	36	50	68,4	380,0	190,0	310,0	38,0	1,88	0,33
8	36	50	68,9	382,6	191,3	308,7	38,3	1,83	0,32
8,5	37	50	57,9	321,6	160,8	339,2	32,2	1,57	0,33
9,5	37	50	55,3	307,2	153,6	346,4	30,7	1,50	0,33
22,33	38	47	58,7	326,3	163,1	336,9	32,6	1,74	0,35
24	38	52	54,2	301,0	150,5	349,5	30,1	1,40	0,31
26	36	50	38,8	215,7	107,8	392,2	21,6	1,06	0,33
27	37	50	53,3	296,3	148,2	351,8	29,6	1,51	0,34
28	37	50	61,0	338,7	169,3	330,7	33,9	1,66	0,33
29	36,5	50	66,9	371,8	185,9	314,1	37,2	2,09	0,37
30	36,5	50	67,8	376,9	188,5	311,5	37,7	2,04	0,36
31	35,5	50	65,6	364,5	182,3	317,7	36,5	1,98	0,36
32	38	50	65,2	362,5	181,2	318,8	36,2	1,76	0,32

Tabela H.2. (continuação) Resultados Experimentais do Ensaio I02 (referentes à Figura 4.3.2).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
33	37	50	70,3	390,4	195,2	304,8	39,0	1,84	0,31
47	38	50	71,0	394,5	197,3	302,7	39,5	2,11	0,36
48	38	50	67,8	376,9	188,5	311,5	37,7	1,83	0,32
49	36	50	73,6	409,0	204,5	295,5	40,9	2,15	0,35
50	37	50	71,6	397,6	198,8	301,2	39,8	1,84	0,31
51	36	50	70,1	389,3	194,7	305,3	38,9	2,02	0,35
52	36	50	67,2	373,3	186,7	313,3	37,3	2,11	0,38
53	38	50	70,4	390,9	195,4	304,6	39,1	2,16	0,37
54	37	50	69,8	387,8	193,9	306,1	38,8	2,12	0,36
55	36,5	50	69,6	386,8	193,4	306,6	38,7	2,06	0,35
média ⁽¹⁾	36,8	ND	65,4	363,5	181,7	318,3	36,3	1,85	0,34
desvio padrão	0,7	ND	7,1	39,3	19,7	19,7	3,9	0,24	0,02

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 55 horas

(2) ND...valor não determinado.

Tabela H.3. Resultados Experimentais do Ensaio I03 (referentes à Figura 4.3.3).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
0	35	50	90,1	500,3	250,2	249,8	50,0	0,51	0,43
0,5	36	50	112,7	626,1	313,1	186,9	62,6	0,74	0,49
1	37	50	137,1	761,6	380,8	119,2	76,2	0,89	0,48
1,5	37	50	147,2	817,8	408,9	91,1	81,8	0,97	0,50
2	36	50	144,8	804,4	402,2	97,8	80,4	0,92	0,48
2,5	36	50	155,7	865,1	432,5	67,5	86,5	0,94	0,45
3	36,5	50	153,6	853,5	426,7	73,3	85,3	0,92	0,45
3,5	36	50	150,7	837,4	418,7	81,3	83,7	0,90	0,45
4	34	50	157,0	872,2	436,1	63,9	87,2	0,94	0,45
4,5	33	50	149,0	827,6	413,8	86,2	82,8	0,93	0,47
5	36,5	50	152,3	846,3	423,2	76,8	84,6	0,82	0,41
5,5	36	<50	136,9	760,7	380,3	119,7	76,1	0,73	0,40
6	36,5	50	126,2	700,9	350,4	149,6	70,1	0,63	0,38
7	37	50	141,3	784,8	392,4	107,6	78,5	0,71	0,38
8	36	50	151,4	841,0	420,5	79,5	84,1	0,69	0,34
21,25	38	50	170,6	948,0	474,0	26,0	94,8	0,86	0,38
22,25	38	50	160,2	890,0	445,0	55,0	89,0	0,66	0,31
23,25	35	50	164,7	915,0	457,5	42,5	91,5	0,66	0,30
24,25	35	50	165,7	920,4	460,2	39,8	92,0	0,99	0,45
26,25	37	50	127,6	708,9	354,5	145,5	70,9	1,58	0,93
27,25	39	50	112,0	622,4	311,2	188,8	62,2	1,11	0,74
média ⁽¹⁾	36,0	ND	152,5	847,3	423,7	76,3	84,7	0,81	0,40
desvio padrão	1,4	ND	11,8	65,8	32,9	32,9	6,6	0,13	0,06

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 24,25 horas

(2) ND...valor não determinado

Tabela H.4. Resultados Experimentais do Ensaio I04 (referentes à Figura 4.3.4).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
0	36,5	50	47,9	266,3	133,2	366,8	26,6	0,16	0,50
0,5	37,5	50	86,5	480,4	240,2	259,8	48,0	0,24	0,42
1	37	50	101,0	561,2	280,6	219,4	56,1	0,28	0,42
1,5	37	50	106,9	594,0	297,0	203,0	59,4	0,32	0,45
2	38	50	107,1	595,1	297,5	202,5	59,5	0,32	0,45
2,5	38,5	50	125,6	697,7	348,9	151,1	69,8	0,36	0,43
3	38,5	50	136,4	757,8	378,9	121,1	75,8	0,37	0,41
3,5	36,5	50	143,1	794,9	397,5	102,5	79,5	0,37	0,39
4	36	50	145,2	806,9	403,5	96,5	80,7	0,35	0,36
4,5	37	50	143,7	798,2	399,1	100,9	79,8	0,34	0,36
5	35	50	150,6	836,4	418,2	81,8	83,6	0,40	0,40
5,5	36	50	153,3	851,7	425,9	74,1	85,2	0,38	0,37
6	37	50	119,3	662,8	331,4	168,6	66,3	0,32	0,40
6,5	35	50	148,8	826,6	413,3	86,7	82,7	0,37	0,37
7	37	50	144,9	804,7	402,4	97,6	80,5	0,30	0,31
7,5	38	50	162,2	900,8	450,4	49,6	90,1	0,33	0,30
8	39	50	154,5	858,3	429,1	70,9	85,8	ND	ND
8,5	37	50	169,4	941,3	470,6	29,4	94,1	0,52	0,46
9	38,5	50	187,3	1040,6	520,3	-20,3	104,1	0,50	0,40
9,5	36	50	181,4	1007,9	503,9	-3,9	100,8	0,47	0,39
10	37	50	160,7	892,5	446,3	53,7	89,3	0,45	0,42
22,5	36,5	50	181,5	1008,3	504,2	-4,2	100,8	0,48	0,39
23	36	50	168,7	937,3	468,7	31,3	93,7	0,44	0,39
23,5	36	50	179,7	998,5	499,2	0,8	99,8	0,49	0,41
24,5	37	50	181,9	1010,5	505,2	-5,2	101,0	0,52	0,43
25,5	36	50	188,2	1045,4	522,7	-22,7	104,5	0,56	0,45
26,5	35	50	172,6	959,2	479,6	20,4	95,9	0,39	0,34
27,5	36	50	156,7	870,7	435,4	64,6	87,1	0,43	0,41

Tabela H.4 (continuação) Resultados Experimentais do Ensaio I04 (referentes à Figura 4.3.4).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)
28,5	34	50	168,9	938,4	469,2	30,8	93,8	0,46	0,41
29,5	35	50	174,0	966,8	483,4	16,6	96,7	0,50	0,43
30,5	35	50	151,8	843,4	421,7	78,3	84,3	0,42	0,41
31,5	36	50	158,7	881,6	440,8	59,2	88,2	0,42	0,40
32,5	36	50	152,2	845,6	422,8	77,2	84,6	0,41	0,40
48	36,5	50	135,9	755,1	377,5	122,5	75,5	0,40	0,45
49	34	50	151,4	841,1	420,6	79,4	84,1	0,46	0,46
50	34	50	140,0	777,8	388,9	111,1	77,8	0,40	0,42
51	35	50	141,6	786,7	393,4	106,6	78,7	0,35	0,37
52	36	50	144,5	802,6	401,3	98,7	80,3	0,43	0,44
53	37	50	144,1	800,6	400,3	99,7	80,1	0,39	0,41
54	37	50	157,6	875,8	437,9	62,1	87,6	0,44	0,42
55	36	50	158,9	882,7	441,3	58,7	88,3	0,44	0,42
56	35,5	50	139,5	774,9	387,4	112,6	77,5	0,36	0,38
média ⁽¹⁾	36,3	ND	156,1	867,1	433,5	66,5	86,7	0,42	0,40
desvio padrão	1,3	ND	17,1	94,9	47,5	47,5	9,5	0,06	0,04

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 56 horas

(2) ND...valor não determinado.

Tabela H.5. Resultados Experimentais do Ensaio I05 (referentes à Figura 4.3.5).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] salda (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão (Q _{entrada} -Q _{salda}) (g/min)
0	35,5	50	160,2	889,8	444,9	555,1	44,5	0,23	0,44	0,05
0,5	36,5	50	158,2	878,8	439,4	560,6	43,9	0,24	0,45	0,04
1	37	50	182,4	1013,6	506,8	493,2	50,7	0,33	0,54	-0,04
1,5	36	50	197,6	1097,5	548,8	451,2	54,9	0,32	0,48	0,03
2	35,5	50	206,7	1148,3	574,2	425,8	57,4	0,36	0,52	-0,03
2,5	38	50	240,5	1336,1	668,0	332,0	66,8	0,36	0,45	0,03
3	37,5	50	257,2	1428,9	714,4	285,6	71,4	0,40	0,47	0,04
4	36	50	250,0	1389,1	694,6	305,4	69,5	0,37	0,45	-0,02
5	36	50	253,2	1406,8	703,4	296,6	70,3	0,45	0,54	-0,01
18,5	39	50	256,0	1422,2	711,1	288,9	71,1	0,30	0,35	0,04
19,5	38	50	249,2	1384,7	692,3	307,7	69,2	0,33	0,40	0,01
20,5	39	50	240,9	1338,3	669,1	330,9	66,9	0,34	0,43	0,02
21,5	38,5	50	249,6	1386,9	693,5	306,5	69,3	0,27	0,33	0,00
23,5	40,5	50	273,9	1521,7	760,8	239,2	76,1	0,31	0,35	-0,02
24,5	39	50	251,6	1397,9	699,0	301,0	69,9	0,30	0,35	-0,02
25,5	39	50	240,5	1336,1	668,0	332,0	66,8	0,22	0,28	0,11
26,5	35,5	50	238,1	1322,8	661,4	338,6	66,1	0,34	0,43	-0,01
28	36,5	50	249,2	1384,7	692,3	307,7	69,2	0,31	0,37	0,05
média ⁽¹⁾	37,9	ND	250,0	1388,9	694,5	305,5	69,4	0,33	0,40	
desvio padrão	1,5	ND	9,5	52,7	26,3	26,3	2,6	0,06	0,07	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 28 horas

(2) ND...valor não determinado.

Tabela H.6. Resultados Experimentais do Ensaio I06 (referentes à Figura 4.3.6).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
0	ND	50	94,0	522,1	261,0	239,0	52,2	0,14	0,46	0,06
0,5	ND	50	114,0	633,4	316,7	183,3	63,3	0,20	0,52	0,26
1	ND	50	134,1	744,7	372,4	127,6	74,5	0,22	0,48	-0,03
1,5	ND	50	134,7	748,3	374,1	125,9	74,8	0,19	0,42	-0,01
2	ND	50	135,8	754,5	377,2	122,8	75,4	0,20	0,44	0,00
2,5	ND	50	134,4	746,5	373,3	126,7	74,7	0,16	0,37	0,00
3	ND	50	149,2	828,7	414,3	85,7	82,9	0,21	0,42	0,00
3,5	ND	50	150,0	833,1	416,6	83,4	83,3	0,19	0,37	-0,01
4	ND	50	150,9	838,4	419,2	80,8	83,8	0,19	0,38	-0,01
5	ND	50	146,8	815,4	407,7	92,3	81,5	0,18	0,37	0,01
6	ND	50	147,4	819,0	409,5	90,5	81,9	0,18	0,37	-0,03
7	ND	50	150,0	833,1	416,6	83,4	83,3	0,17	0,34	-0,03
8	ND	50	153,1	850,8	425,4	74,6	85,1	0,16	0,31	0,02
10	ND	50	150,8	837,5	418,8	81,2	83,8	0,20	0,39	-0,01
11	ND	50	152,7	848,1	424,1	75,9	84,8	0,19	0,37	-0,04
24,5	ND	50	136,0	755,4	377,7	122,3	75,5	0,22	0,48	-0,03
25,5	ND	50	161,7	898,5	449,3	50,7	89,9	0,24	0,44	-0,02
26,5	ND	50	149,0	827,8	413,9	86,1	82,8	0,20	0,40	0,02
27,8	ND	50	141,4	785,4	392,7	107,3	78,5	0,22	0,47	-0,02
28	ND	50	152,3	846,4	423,2	76,8	84,6	0,25	0,49	-0,04
média ⁽¹⁾	ND	ND	148,4	824,3	412,1	87,9	82,4	0,20	0,40	
desvio padrão	ND	ND	6,8	38,0	19,0	19,0	3,8	0,03	0,05	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 28 horas

(2) ND...valor não determinado.

Tabela H.7. Resultados Experimentais do Ensaio I07 (referentes à Figura 4.3.7).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	37	50	84,4	468,8	234,4	265,6	46,9	0,09	0,33	0,07
0,5	36	50	126,6	703,4	351,7	148,3	70,3	0,13	0,30	0,04
1	38	50	137,3	762,8	381,4	118,6	76,3	0,11	0,23	0,03
1,5	36	50	120,1	667,0	333,5	166,5	66,7	0,08	0,20	0,06
2	38	<50	147,3	818,4	409,2	90,8	81,8	0,09	0,18	0,07
2,5	36	50	150,6	836,6	418,3	81,7	83,7	0,11	0,22	0,06
3	37	50	177,5	986,0	493,0	7,0	98,6	0,13	0,22	0,02
3,5	38	50	174,4	968,8	484,4	15,6	96,9	0,26	0,44	-0,01
4	36	50	115,6	642,1	321,1	178,9	64,2	0,07	0,19	0,02
4,5	36,5	50	165,1	917,0	458,5	41,5	91,7	0,09	0,16	0,01
6	36	50	171,3	951,5	475,8	24,2	95,2	0,08	0,15	0,05
7	36	<50	152,5	847,1	423,6	76,4	84,7	0,06	0,12	0,05
8	38	50	169,7	942,9	471,5	28,5	94,3	0,15	0,26	0,01
9	37	50	172,7	959,2	479,6	20,4	95,9	0,11	0,19	0,05
10	36,5	50	169,6	942,0	471,0	29,0	94,2	0,14	0,24	0,04
11	37	50	155,2	862,5	431,2	68,8	86,2	0,11	0,21	0,04
26,5	37	50	169,9	943,9	471,9	28,1	94,4	0,17	0,29	0,05
média ⁽¹⁾	36,8	ND	162,0	900,0	450,0	50,0	90,0	0,12	0,22	
desvio padrão	0,7	ND	17,1	94,8	47,4	47,4	9,5	0,05	0,08	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2,5 e 28 horas

(2) ND...valor não determinado.

Tabela H.8. Resultados Experimentais do Ensaio I09 (referentes à Figura 4.3.8).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saida}$) (g/min)
0	36,5	50	146,5	813,7	406,9	93,1	81,4	0,27	0,56	0,08
0,50	36,5	50	159,6	886,8	443,4	56,6	88,7	0,14	0,26	0,04
1,5	37	50	165,8	921,4	460,7	39,3	92,1	0,21	0,38	0,03
2	35	50	167,1	928,1	464,1	35,9	92,8	0,19	0,34	0,02
2,5	35	<50	170,2	945,4	472,7	27,3	94,5	0,22	0,38	0,03
3	36	50	166,4	924,3	462,1	37,9	92,4	0,22	0,40	0,02
3,5	37	50	169,1	939,6	469,8	30,2	94,0	0,18	0,32	0,01
4	38	50	167,8	931,9	466,0	34,0	93,2	0,17	0,30	0,00
4,5	38	<50	153,4	852,2	426,1	73,9	85,2	0,17	0,34	0,00
5	37	<50	147,0	816,6	408,3	91,7	81,7	0,15	0,31	0,00
5,5	38	<50	163,4	907,9	454,0	46,0	90,8	0,14	0,26	0,05
6	39	50	164,6	914,6	457,3	42,7	91,5	0,15	0,27	0,01
6,5	37	50	150,6	836,8	418,4	81,6	83,7	0,24	0,47	-0,01
7	38	50	163,4	907,9	454,0	46,0	90,8	0,24	0,44	0,02
7,5	38	50	160,1	889,7	444,8	55,2	89,0	0,20	0,38	0,02
8	37,5	50	163,1	906,0	453,0	47,0	90,6	0,20	0,38	0,01
8,5	37	50	157,9	877,2	438,6	61,4	87,7	0,20	0,38	0,03
19,5	37	50	172,9	960,8	480,4	19,6	96,1	0,26	0,45	0,00
20	38	50	173,8	965,6	482,8	17,2	96,6	0,24	0,42	0,06
21	37	50	172,8	959,8	479,9	20,1	96,0	0,31	0,54	-0,01
22	38	50	173,8	965,6	482,8	17,2	96,6	0,23	0,40	0,03
23	37	50	167,6	931,0	465,5	34,5	93,1	0,21	0,38	0,03
23,5	39	50	117,1	650,3	325,2	174,8	65,0	0,16	0,42	0,03
24,5	37	50	163,8	909,8	454,9	45,1	91,0	0,24	0,44	0,03
25,5	37	50	171,6	953,1	476,5	23,5	95,3	0,32	0,56	0,00
26,5	39	50	173,5	963,7	481,8	18,2	96,4	0,22	0,38	0,13
28,5	37	50	173,3	962,7	481,4	18,6	96,3	0,16	0,28	0,09
31	37	50	170,2	945,4	472,7	27,3	94,5	0,23	0,40	0,01
média ⁽¹⁾	37,3	ND	163,9	910,3	455,1	44,9	91,0	0,21	0,39	
desvio padrão	1,0	ND	11,9	66,4	33,2	33,2	6,6	0,04	0,07	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 1,5 e 31 horas

(2) ND :valor não determinado.

Tabela H.9. Resultados Experimentais do Ensaio Descontínuo (referentes à Figura 4.3.9).

tempo (h)	[AR] (mg/mL)	[AR] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)
0	0,0	0,0	0,0	500,0	0,0	0
0,17	51,7	287,2	143,6	356,4	28,7	0,86
0,5	111,6	620,0	310,0	190,0	62,0	0,50
1	153,5	852,6	426,3	73,7	85,3	0,23
1,5	160,0	889,0	444,5	55,5	88,9	0,04
2	172,0	955,8	477,9	22,1	95,6	0,07
2,5	164,0	911,3	455,6	44,4	91,1	0,00
3	170,6	947,7	473,8	26,2		0,04
3,5	167,1	928,5	464,2	35,8	92,8	0,00
4	168,0	933,5	466,8	33,2	93,4	0,01
4,5	169,1	939,6	469,8	30,2	94,0	0,01
6	180,6	1003,3	501,6	-1,6	100,3	0,02
6,5	174,5	969,4	484,7	15,3	96,9	0,00
7	167,1	928,1	464,1	35,9	92,8	0,00
21	191,1	1061,6	530,8	-30,8	106,2	0,00
25	193,8	1076,8	538,4	-38,4	107,7	0,00

**APÊNDICE I – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.2 de Resultados e Discussão**

Tabela I.1. Resultados Experimentais do Ensaio 10 (So=100 mM - referentes à Figura 4.3.16).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
0	36,5	50	18,2	101,0	101,0	-1,0	101,0	0,08	0,66	-0,01
0,5	36	50	18,0	100,0	100,0	0,0	100,0	0,03	0,25	0,03
1	36	50	19,0	105,4	105,4	-5,4	105,4	0,05	0,39	0,11
1,5	37	50	17,5	97,5	97,5	2,5	97,5	0,04	0,34	0,14
2	37	50	16,6	92,0	92,0	8,0	92,0	0,04	0,32	0,05
2,5	36	50	17,1	95,0	95,0	5,0	95,0	0,04	0,35	0,04
3	36,5	50	15,3	85,0	85,0	15,0	85,0	0,04	0,40	0,44
3,5	36,5	50	16,6	92,0	92,0	8,0	92,0	0,03	0,27	0,05
4	37	50	14,9	82,5	82,5	17,5	82,5	0,04	0,38	0,04
5	36	50	17,8	99,0	99,0	1,0	99,0	0,05	0,41	0,07
média ⁽¹⁾	36,6	ND	16,5	91,9	91,9	8,1	91,9	0,04	0,35	
desvio padrão	0,4	ND	1,1	6,1	6,1	6,1	6,1	0,01	0,05	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 1,5 e 5 horas;

Tabela I.2. Resultados Experimentais do Ensaio 110 (So=250 mM - referentes à Figura 4.3.16).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
5,5	36	50	17,5	97,0	97,0	153,0	38,8	0,04	0,34	0,08
6	35	50	18,2	101,0	101,0	149,0	40,4	0,05	0,42	0,07
6,5	35	50	20,8	115,4	115,4	134,6	46,2	0,05	0,37	0,03
7	36	50	28,9	160,8	160,8	89,2	64,3	0,06	0,33	0,10
7,5	37	50	30,4	168,7	168,7	81,3	67,5	0,08	0,37	0,07
8,5	36	50	33,1	183,7	183,7	66,3	73,5	0,07	0,33	0,03
9,5	36	50	38,1	211,6	211,6	38,4	84,6	0,08	0,33	0,02
10	36	50	37,0	205,6	205,6	44,4	82,2	0,07	0,28	0,04
23,25	37	50	40,7	226,0	226,0	24,0	90,4	0,15	0,56	0,08
23,5	37	50	38,7	215,0	215,0	35,0	86,0	0,07	0,27	0,04
24	36	50	43,4	240,9	240,9	9,1	96,4	0,10	0,35	0,08
média ⁽¹⁾	36,4	ND	37,3	207,4	207,4	42,6	82,9	0,09	0,35	
desvio padrão	0,5	ND	4,4	24,5	24,5	24,5	9,8	0,03	0,10	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 7,5 e 24 horas;

(2) ND...valor não determinado.

Tabela I.3. Resultados Experimentais do Ensaio I10 (So=500 mM - referentes à Figura 4.3.16)

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
25	36	50	40,9	227,5	227,5	272,5	45,5	0,10	0,35	0,05
25,5	38	50	55,6	309,0	309,0	191,0	61,8	0,11	0,30	0,03
26	36,5	50	64,3	357,2	357,2	142,8	71,4	0,12	0,27	0,09
26,5	36	50	66,9	371,6	371,6	128,4	74,3	0,12	0,28	0,02
27	36	50	74,1	411,6	411,6	88,4	82,3	0,12	0,24	0,09
27,5	37	50	66,1	367,3	367,3	132,7	73,5	0,17	0,39	0,02
29	36	50	74,5	413,8	413,8	86,2	82,8	0,19	0,38	0,01
30	36,5	50	65,7	365,2	365,2	134,8	73,0	0,16	0,36	0,04
31	36,5	50	82,1	456,0	456,0	44,0	91,2	0,21	0,38	0,13
média ⁽¹⁾	36,3	ND	71,6	397,6	397,6	102,4	79,5	0,16	0,34	
desvio padrão	0,4	ND	6,5	36,1	36,1	36,1	7,2	0,04	0,06	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 26,5 e 31 horas;

(2) ND...valor não determinado.

Tabela I.4. Resultados Experimentais do Ensaio I12 (So=100 mM - referentes à Figura 4.3.17).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
0	36	50	17,6	97,5	97,5	2,5	97,5	0,05	0,46	-0,02
0,5	36	<50	16,5	91,8	91,8	8,2	91,8	0,03	0,28	0,06
1	36	50	18,1	100,6	100,6	-0,6	100,6	0,05	0,38	0,06
1,5	36	50	21,9	121,9	121,9	-21,9	121,9	0,06	0,44	0,02
2	36	50	17,2	95,7	95,7	4,3	95,7	0,05	0,46	0,05
2,5	36	50	16,4	91,3	91,3	8,7	91,3	0,04	0,36	0,05
3	36	50	16,6	92,1	92,1	7,9	92,1	0,04	0,37	0,05
3,5	36	50	16,1	89,7	89,7	10,3	89,7	0,03	0,32	0,05
4	36	50	16,9	94,1	94,1	5,9	94,1	0,04	0,31	0,04
4,5	37	50	16,0	88,7	88,7	11,3	88,7	0,03	0,30	0,03
5	35	50	16,0	88,7	88,7	11,3	88,7	0,04	0,38	0,00
5,5	36	50	15,6	86,6	86,6	13,4	86,6	0,04	0,34	0,02
média ⁽¹⁾	36,0	ND	16,4	90,9	90,9	9,1	90,9	0,04	0,36	
desvio padrão	0,5	ND	0,5	3,0	3,0	3,0	3,0	0,01	0,05	

(1) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 2 e 5,5 horas;

Tabela I.5. Resultados Experimentais do Ensaio I12 (So=1000 mM - referentes à Figura 4.3.17).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	37	50	57,5	319,4	319,4	680,6	31,9	0,20	0,52	0,63
0,5	37	50	107,8	598,8	598,8	401,2	59,9	0,27	0,38	0,06
1	37	50	120,1	667,3	667,3	332,7	66,7	0,32	0,40	0,06
1,5	37,5	50	120,9	671,4	671,4	328,6	67,1	0,22	0,27	0,05
2	38	50	146,8	815,8	815,8	184,2	81,6	0,44	0,45	0,07
2,5	37,5	50	133,8	743,1	743,1	256,9	74,3	0,36	0,40	0,09
3	37,5	50	136,7	759,7	759,7	240,3	76,0	0,44	0,48	0,05
4	36	50	148,3	824,1	824,1	175,9	82,4	0,34	0,34	0,11
4,5	36	50	145,3	807,5	807,5	192,5	80,7	0,38	0,40	0,05
5	36	50	146,7	814,7	814,7	185,3	81,5	0,42	0,43	0,07
5,5	36	50	146,7	814,7	814,7	185,3	81,5	0,41	0,42	0,07
6	36	50	142,5	791,9	791,9	208,1	79,2	0,32	0,34	0,06
6,5	36	50	153,4	852,1	852,1	147,9	85,2	0,35	0,34	0,06
7	36	50	134,9	749,3	749,3	250,7	74,9	0,27	0,30	0,11
7,5	36	50	149,6	831,4	831,4	168,6	83,1	0,41	0,42	0,06
8	37	50	139,4	774,2	774,2	225,8	77,4	0,38	0,41	0,06
8,5	36,5	50	138,2	768,0	768,0	232,0	76,8	0,35	0,38	0,06
9	36,5	50	141,6	786,7	786,7	213,3	78,7	0,38	0,40	0,07
9,5	36	50	140,9	782,6	782,6	217,4	78,3	0,39	0,42	0,06
10	36	50	132,4	735,8	735,8	264,2	73,6	0,34	0,38	0,06
10,5	35,5	50	135,1	750,4	750,4	249,6	75,0	0,43	0,48	0,00
média ⁽¹⁾	36,4	ND	141,9	788,4	788,4	211,6	78,8	0,38	0,40	
desvio padrão	0,7	ND	6,2	34,4	34,4	34,4	3,4	0,05	0,05	

(1) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 2 e 10,5 horas;

(2) ND...valor não determinado.

Tabela I.6. Resultados Experimentais do Ensaio I12 (So=1500 mM - referentes à Figura 4.3.17).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	37	50	130,8	726,5	726,5	773,5	48,4	0,37	0,42	0,08
0,5	36	50	117,1	650,7	650,7	849,3	43,4	0,28	0,36	0,08
1	36	50	146,3	812,7	812,7	687,3	54,2	0,42	0,43	0,04
1,5	37	50	161,0	894,7	894,7	605,3	59,6	0,52	0,48	0,03
2	37	50	145,9	810,6	810,6	689,4	54,0	0,42	0,43	0,07
2,5	36,5	50	152,1	844,9	844,9	655,1	56,3	0,46	0,45	0,06
3	36,5	50	146,5	813,7	813,7	686,3	54,2	0,36	0,37	0,03
3,5	36	50	171,5	952,9	952,9	547,1	63,5	0,54	0,47	-
4	36	50	166,8	926,9	926,9	573,1	61,8	0,47	0,42	0,09
4,5	36	50	165,9	921,7	921,7	578,3	61,4	0,46	0,42	0,05
5	35	50	168,3	935,2	935,2	564,8	62,3	0,49	0,44	0,04
5,5	37	50	171,1	950,8	950,8	549,2	63,4	0,55	0,48	-0,03
6	37	50	161,0	894,7	894,7	605,3	59,6	0,52	0,48	0,01
6,5	37	50	166,1	922,7	922,7	577,3	61,5	0,49	0,44	0,03
7	36,5	50	168,3	935,2	935,2	564,8	62,3	0,56	0,50	0,05
7,5	36	50	162,4	902,0	902,0	598,0	60,1	0,48	0,44	0,07
média ⁽¹⁾	36,4	ND	162,2	900,9	900,9	599,1	60,1	0,48	0,45	
desvio padrão	0,6	ND	9,1	50,5	50,5	50,5	3,4	0,06	0,03	

(1) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 2 e 7,5 horas;

(2) ND...valor não determinado

Tabela I.7. Resultados Experimentais do Ensaio I13 (So=250 mM - referentes à Figura 4.3.17).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	36	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	36	50	35,7	198,2	198,2	51,8	79,3	0,10	0,40	0,04
2,5	36	50	34,1	189,4	189,4	60,6	75,8	0,09	0,48	0,06
3	36	50	33,8	187,6	187,6	62,4	75,0	0,09	0,40	0,04
3,5	36	50	31,1	172,8	172,8	77,2	69,1	0,08	0,34	0,04
4	36	50	34,7	192,7	192,7	57,3	77,1	0,09	0,35	0,04
4,5	36	50	34,6	192,2	192,2	57,8	76,9	0,09	0,32	0,02
5	36,5	50	29,5	164,0	164,0	86,0	65,6	0,08	0,32	0,02
5,5	36,5	50	35,0	194,5	194,5	55,5	77,8	0,09	0,30	0,03
6	36	50	33,7	187,1	187,1	62,9	74,9	0,09	0,30	0,02
6,5	36	50	35,4	196,9	196,9	53,1	78,7	0,09	0,43	0,01
7	36	50	30,4	168,6	168,6	81,4	67,4	0,08	0,48	0,00
7,5	36	50	29,9	166,3	166,3	83,7	66,5	0,08	0,44	0,01
8	37	50	33,2	184,4	184,4	65,6	73,7	0,09	0,44	0,04
8,5	37	50	33,7	187,1	187,1	62,9	74,9	0,09	0,51	0,03
9	37	50	33,3	184,8	184,8	65,2	73,9	0,09	0,48	0,04
média ⁽¹⁾	36,3	ND	33,2	184,4	184,4	65,6	73,8	0,09	0,40	
desvio padrão	0,4	ND	2,0	11,2	11,2	11,2	4,5	0,01	0,07	

(1) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 2 e 9 horas;

Tabela I.8. Resultados Experimentais do Ensaio I13 (So=500 mM - referentes à Figura 4.3.17).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
14	37	50	86,4	479,8	479,8	20,2	96,0	0,25	0,46	0,04
14,5	38	50	91,7	509,4	509,4	-9,4	101,9	0,27	0,42	0,04
15	37,5	50	91,2	506,7	506,7	-6,7	101,3	0,27	0,48	0,05
15,5	37	50	92,7	515,0	515,0	-15,0	103,0	0,27	0,44	0,05
16	37	50	92,0	511,3	511,3	-11,3	102,3	0,27	0,50	0,07
16,5	36,5	50	81,9	454,8	454,8	45,2	91,0	0,24	0,49	0,06
17	36,5	50	93,2	517,8	517,8	-17,8	103,6	0,27	0,47	0,04
17,5	37	50	91,2	506,7	506,7	-6,7	101,3	0,27	0,44	0,05
18,5	36,5	50	84,7	470,6	470,6	29,4	94,1	0,25	0,40	0,06
19	37	50	83,9	465,9	465,9	34,1	93,2	0,25	0,31	0,05
19,5	37	<50	86,7	481,7	481,7	18,3	96,3	0,25	0,47	0,03
20,5	36	50	84,0	466,9	466,9	33,1	93,4	0,25	0,38	0,01
21	36	50	85,7	476,1	476,1	23,9	95,2	0,25	0,48	0,03
média ⁽¹⁾	36,8	ND	88,1	489,4	489,4	10,6	97,9	0,26	0,44	
desvio padrão	0,6	ND	4,0	22,1	22,1	22,1	4,4	0,01	0,05	

(1) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 14 e 21 horas;

(2) ND...valor não determinado.

**APÊNDICE J – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.3 de Resultados e Discussão**

Tabela J.1. Resultados Experimentais do Ensaio 14 (referentes à Figura 4.3.21).

tempo (h)	Temperatura (oC)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saida}$) (g/min)
0	54	50	37,5	208,6	208,6	291,4	41,7	0,16	0,65	-0,16
0,5	55	50	95,6	530,9	530,9	-30,9	106,2	0,31	0,48	-0,04
1	55	50	95,2	528,9	528,9	-28,9	105,8	0,26	0,41	-0,01
1,5	54	50	94,9	527,0	527,0	-27,0	105,4	0,27	0,43	0,02
2	55	50	100,7	559,5	559,5	-59,5	111,9	0,27	0,41	-0,05
2,5	55	50	98,8	548,7	548,7	-48,7	109,7	0,28	0,42	-0,03
3	56	50	97,3	540,8	540,8	-40,8	108,2	0,27	0,42	-0,08
3,5	55	50	96,3	534,9	534,9	-34,9	107,0	0,27	0,42	-0,02
4	55	50	98,0	544,7	544,7	-44,7	108,9	0,27	0,42	-0,02
4,5	55	50	102,7	570,3	570,3	-70,3	114,1	0,24	0,35	-0,01
5	56	50	101,2	562,5	562,5	-62,5	112,5	0,35	0,52	-0,08
5,5	54	50	101,2	562,5	562,5	-62,5	112,5	0,28	0,42	-0,05
6	55	50	100,9	560,5	560,5	-60,5	112,1	0,24	0,36	-0,05
6,5	54	50	94,9	527,0	527,0	-27,0	105,4	0,25	0,40	-0,05
7	55	50	98,8	548,7	548,7	-48,7	109,7	0,16	0,24	-0,03
7,5	55	50	100,2	556,5	556,5	-56,5	111,3	0,29	0,44	-0,01
8	55	50	93,6	520,1	520,1	-20,1	104,0	0,29	0,46	-0,31
média ⁽¹⁾	55,0	ND	98,8	549,0	549,0	-49,0	109,8	0,27	0,41	
desvio padrão	0,6	ND	2,7	15,1	15,1	15,1	3,0	0,04	0,06	

(1) média e desvio-padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2 e 8 horas;

(2) ND...valor não determinado.

**APÊNDICE L – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.4.1 de Resultados e Discussão**

Tabela L.1. Resultados Experimentais do Ensaio PI01 (referentes à Figura 4.3.22).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	38	50	31,4	174,6	174,6	325,4	34,9	0,07	0,32	-0,05
0,5	36	50	88,9	494,0	494,0	6,0	98,8	0,24	0,40	-0,02
1	36	50	87,6	486,4	486,4	13,6	97,3	0,18	0,31	0,01
2	35	50	83,4	463,5	463,5	36,5	92,7	0,24	0,44	0,01
2,5	36	50	86,7	481,6	481,6	18,4	96,3	0,23	0,40	0,00
3	36	50	80,7	448,3	448,3	51,7	89,7	0,24	0,45	0,00
3,5	35	50	73,8	410,1	410,1	89,9	82,0	0,24	0,49	-0,01
4	35	50	80,2	445,4	445,4	54,6	89,1	0,22	0,42	0,00
4,5	37	50	79,0	438,7	438,7	61,3	87,7	0,22	0,42	-0,03
5	35	50	73,3	407,3	407,3	92,7	81,5	0,17	0,34	0,02
5,5	38	50	85,0	472,1	472,1	27,9	94,4	0,22	0,38	-0,23
6	38	50	79,1	439,7	439,7	60,3	87,9	0,21	0,40	-0,03
6,5	36	50	89,8	498,8	498,8	1,2	99,8	0,20	0,33	0,01
7	35	50	78,8	437,8	437,8	62,2	87,6	0,22	0,42	-0,04
7,5	36	50	82,6	458,8	458,8	41,2	91,8	0,22	0,40	0,01
8	36	50	68,7	381,5	381,5	118,5	76,3	0,17	0,38	-0,01
média ⁽¹⁾	36,0	ND	81,0	450,2	450,2	49,8	90,0	0,22	0,41	
desvio padrão	1,1	ND	4,8	26,9	26,9	26,9	5,4	0,02	0,04	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2 e 7,5 horas

Tabela L.2. Resultados Experimentais do Ensaio P102 (referentes à Figura 4.3.23).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	38	50	15,5	86,3	86,3	413,7	17,3	0,15	1,48	-0,20
0,5	36	50	72,8	404,4	404,4	95,6	80,9	0,74	1,52	-0,15
1	38	50	72,3	401,6	401,6	98,4	80,3	0,69	1,44	0,01
1,5	39	50	76,4	424,6	424,6	75,4	84,9	0,72	1,42	0,00
2	37	50	78,3	435,1	435,1	64,9	87,0	0,75	1,44	-0,01
2,5	38	50	75,2	417,9	417,9	82,1	83,6	0,82	1,64	0,00
3	38	50	64,5	358,4	358,4	141,6	71,7	0,74	1,72	-0,09
3,5	37	50	60,4	335,5	335,5	164,5	67,1	0,51	1,27	0,01
4	37	50	65,7	365,2	365,2	134,8	73,0	0,64	1,46	-0,02
4,5	36	50	69,0	383,4	383,4	116,6	76,7	0,79	1,72	-0,13
5	36	50	71,6	397,7	397,7	102,3	79,5	0,71	1,48	0,01
5,5	37	50	60,0	333,5	333,5	166,5	66,7	0,61	1,52	0,68
6	37	50	80,0	444,7	444,7	55,3	88,9	0,84	1,58	-0,07
6,5	36	50	65,4	363,2	363,2	136,8	72,6	0,71	1,64	0,01
7	37	50	81,1	450,4	450,4	49,6	90,1	0,89	1,64	0,01
7,5	35	50	75,0	416,9	416,9	83,1	83,4	0,85	1,70	-0,09
média ⁽¹⁾	36,9	ND	71,2	395,5	395,5	104,5	79,1	0,73	1,55	
desvio padrão	1,0	ND	6,8	37,7	37,7	37,7	7,5	0,10	0,13	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7,5 horas

Tabela L.3. Resultados Experimentais do Ensaio PI03 (referentes à Figura 4.3.24).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{entrada} - Q_{saída}$) (g/min)
0	37	50	36,1	200,5	200,5	299,5	40,1	0,19	0,80	0,00
0,5	38	50	81,0	450,2	450,2	49,8	90,0	0,24	0,45	-0,08
1	36	50	78,8	437,9	437,9	62,1	87,6	0,23	0,43	-0,03
1,5	37	50	70,9	393,9	393,9	106,1	78,8	0,16	0,34	-0,04
2	37	50	75,5	419,5	419,5	80,5	83,9	0,19	0,38	-0,07
2,5	38	50	80,7	448,1	448,1	51,9	89,6	0,28	0,52	-0,07
3,5	37	50	71,5	397,0	397,0	103,0	79,4	0,24	0,50	0,17
4	36	50	68,1	378,6	378,6	121,4	75,7	0,25	0,54	-0,15
5	37	50	71,1	394,9	394,9	105,1	79,0	0,26	0,54	-0,22
5,5	38	50	75,9	421,5	421,5	78,5	84,3	0,25	0,50	-0,06
6	37	50	80,7	448,1	448,1	51,9	89,6	0,22	0,40	0,44
6,5	35	50	77,5	430,7	430,7	69,3	86,1	0,29	0,56	-0,17
7	35	50	75,0	416,4	416,4	83,6	83,3	0,25	0,50	-0,12
7,5	36	50	67,0	372,4	372,4	127,6	74,5	0,11	0,24	-0,07
8	38	50	68,5	380,6	380,6	119,4	76,1	0,24	0,52	-0,04
média ⁽¹⁾	36,7	ND	73,8	409,8	409,8	90,2	82,0	0,23	0,47	
desvio padrão	1,1	ND	4,9	27,0	27,0	27,0	5,4	0,05	0,10	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2 e 8 horas

Tabela L.4. Resultados Experimentais do Ensaio PI04 (referentes à Figura 4.3.25).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	37	50	32,3	179,3	179,3	320,7	35,9	0,38	1,76	-0,24
0,5	37	50	70,3	390,4	390,4	109,6	78,1	0,66	1,40	0,19
1	37	50	77,3	429,2	429,2	70,8	85,8	0,82	1,60	-0,12
1,5	36	50	75,9	421,6	421,6	78,4	84,3	0,80	1,58	-0,10
2	37	50	73,3	407,3	407,3	92,7	81,5	0,77	1,59	-0,05
2,5	37	50	73,9	410,7	410,7	89,3	82,1	0,65	1,32	0,04
3	37	50	70,3	390,4	390,4	109,6	78,1	0,74	1,58	-0,05
3,5	36	50	73,5	408,1	408,1	91,9	81,6	0,73	1,50	-0,02
4	37	50	73,5	408,1	408,1	91,9	81,6	0,83	1,70	-0,24
4,5	36	50	66,5	369,3	369,3	130,7	73,9	0,75	1,68	-0,08
5	37	50	75,4	419,1	419,1	80,9	83,8	0,87	1,72	-0,15
5,5	37	50	58,9	327,1	327,1	172,9	65,4	0,65	1,66	-0,07
6,5	35	50	40,5	224,9	224,9	275,1	45,0	0,44	1,63	-0,04
média ⁽¹⁾	36,7	ND	73,0	405,4	405,4	94,6	81,1	0,76	1,57	
desvio padrão	0,5	ND	3,2	17,7	17,7	17,7	3,5	0,07	0,13	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 5 horas

Tabela L.5. Resultados Experimentais do Ensaio PI05 (referentes à Figura 4.3.26).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	56	50	64,3	357,5	357,5	142,5	71,5	0,24	0,56	0,05
0,5	54	50	88,0	488,9	488,9	11,1	97,8	0,29	0,49	-0,07
1	54	50	86,4	479,9	479,9	20,1	96,0	0,24	0,42	0,00
1,5	56	50	86,5	480,7	480,7	19,3	96,1	0,26	0,45	-0,02
2	56	50	84,1	467,2	467,2	32,8	93,4	0,27	0,48	-0,03
2,5	54	50	85,8	476,5	476,5	23,5	95,3	0,29	0,50	-0,09
3	54	50	86,5	480,7	480,7	19,3	96,1	0,25	0,44	-0,10
3,5	56	50	89,7	498,5	498,5	1,5	99,7	0,22	0,36	-0,11
5	54	50	90,9	505,2	505,2	-5,2	101,0	0,19	0,32	-0,01
5,5	55	50	87,6	486,7	486,7	13,3	97,3	0,21	0,36	-0,08
6	55	50	86,2	478,6	478,6	21,4	95,7	0,21	0,36	-0,04
6,5	56	50	79,5	441,5	441,5	58,5	88,3	0,21	0,39	-0,06
7	56	50	82,2	456,7	456,7	43,3	91,3	0,15	0,28	-0,07
7,5	56	50	83,1	461,7	461,7	38,3	92,3	0,24	0,44	-0,08
8	56	50	82,1	456,3	456,3	43,7	91,3	0,22	0,40	-0,02
média ⁽¹⁾	55,3	ND	85,2	473,6	473,6	26,4	94,7	0,22	0,39	
desvio padrão	0,9	ND	3,5	19,2	19,2	19,2	3,8	0,04	0,07	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2 e 8 horas

Tabela L.6. Resultados Experimentais do Ensaio PI06 (referentes à Figura 4.3.27).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	53	50	41,4	229,8	229,8	270,2	46,0	0,49	1,76	-0,30
0,5	54	50	80,7	448,2	448,2	51,8	89,6	0,75	1,40	-0,07
1	55	50	77,6	431,0	431,0	69,0	86,2	0,70	1,36	0,03
1,5	55	50	83,1	461,5	461,5	38,5	92,3	0,83	1,49	-0,01
2	54	50	80,8	449,1	449,1	50,9	89,8	0,86	1,60	-0,04
3	56	50	81,7	453,9	453,9	46,1	90,8	0,78	1,44	-0,06
3,5	54	50	78,1	433,9	433,9	66,1	86,8	0,67	1,28	0,02
4	55	50	78,1	433,9	433,9	66,1	86,8	0,89	1,70	-0,07
4,5	54	50	77,1	428,1	428,1	71,9	85,6	0,84	1,64	-0,07
5	56	50	77,4	430,1	430,1	69,9	86,0	0,89	1,72	-0,08
5,5	56	50	78,4	435,8	435,8	64,2	87,2	0,86	1,64	-0,11
6	55	50	74,0	411,0	411,0	89,0	82,2	0,79	1,60	0,01
6,5	56	50	75,5	419,6	419,6	80,4	83,9	0,81	1,60	-1,66
7	55	50	64,7	359,5	359,5	140,5	71,9	0,79	1,84	-0,36
7,5	57	50	66,8	370,9	370,9	129,1	74,2	0,73	1,64	-0,25
média ⁽¹⁾	55,1	ND	76,7	426,2	426,2	73,8	85,2	0,80	1,57	
desvio padrão	0,9	ND	5,2	29,2	29,2	29,2	5,8	0,07	0,15	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7,5 horas

Tabela L.7. Resultados Experimentais do Ensaio PI07 (referentes à Figura 4.3.28).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	53	50	68,1	378,4	378,4	121,6	75,7	0,32	0,70	-0,18
0,5	55	50	76,6	425,8	425,8	74,2	85,2	0,16	0,32	-0,08
1	53	50	79,8	443,2	443,2	56,8	88,6	0,31	0,58	-0,11
1,5	54	50	74,0	411,3	411,3	88,7	82,3	0,10	0,20	-0,02
2	56	50	78,9	438,4	438,4	61,6	87,7	0,20	0,38	0,05
2,5	54	50	81,0	450,0	450,0	50,0	90,0	0,27	0,50	0,04
3	56	50	77,2	428,7	428,7	71,3	85,7	0,26	0,50	-0,03
3,5	56	50	82,0	455,8	455,8	44,2	91,2	0,13	0,24	0,03
4	55	50	76,1	422,9	422,9	77,1	84,6	0,26	0,52	-0,06
4,5	55	50	83,3	462,6	462,6	37,4	92,5	0,28	0,50	-0,02
5	56	50	85,9	477,1	477,1	22,9	95,4	0,21	0,37	-0,04
5,5	56	50	82,6	458,7	458,7	41,3	91,7	0,21	0,38	0,03
6	54	50	84,3	468,4	468,4	31,6	93,7	0,29	0,51	-0,02
6,5	54	50	82,9	460,7	460,7	39,3	92,1	0,26	0,46	-0,02
7	54	50	87,4	485,8	485,8	14,2	97,2	0,29	0,49	-0,02
7,5	55	50	84,8	471,3	471,3	28,7	94,3	0,23	0,40	-0,05
8	56	50	84,1	467,4	467,4	32,6	93,5	0,24	0,44	-0,01
média ⁽¹⁾	54,9	ND	82,4	457,5	457,5	42,5	91,5	0,24	0,44	
desvio padrão	1,0	ND	3,3	18,4	18,4	18,4	3,7	0,04	0,08	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2 e 8 horas

Tabela L.8. Resultados Experimentais do Ensaio PI08 (referentes à Figura 4.3.29).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	54	50	34,5	191,9	191,9	308,1	38,4	0,48	2,10	-0,54
0,5	53	50	84,3	468,4	468,4	31,6	93,7	0,79	1,40	-0,18
1	55	50	85,3	473,9	473,9	26,1	94,8	0,80	1,40	-0,17
1,5	55	50	88,1	489,2	489,2	10,8	97,8	0,85	1,46	-0,82
2	54	50	88,7	492,6	492,6	7,4	98,5	0,84	1,43	-0,06
2,5	54	50	85,0	472,3	472,3	27,7	94,5	0,85	1,50	0,24
3	54	50	86,2	479,0	479,0	21,0	95,8	0,85	1,48	0,10
3,5	54	50	81,5	452,9	452,9	47,1	90,6	0,79	1,45	0,02
4	55	50	83,2	462,2	462,2	37,8	92,4	0,84	1,52	-0,05
4,5	55	50	84,9	471,4	471,4	28,6	94,3	0,91	1,60	-0,05
5	54	50	85,9	477,4	477,4	22,6	95,5	0,92	1,61	-0,04
5,5	54	50	86,5	480,7	480,7	19,3	96,1	0,92	1,60	-0,07
6	55	50	82,4	457,9	457,9	42,1	91,6	0,87	1,58	-0,04
6,5	56	50	84,4	468,9	468,9	31,1	93,8	0,90	1,60	-0,10
7	54	50	88,1	489,2	489,2	10,8	97,8	0,92	1,57	-0,02
7,5	55	50	75,1	417,4	417,4	82,6	83,5	0,82	1,63	-0,07
8	54	50	79,1	439,4	439,4	60,6	87,9	0,84	1,60	-0,11
média ⁽¹⁾	54,4	ND	84,3	468,3	468,3	31,7	93,7	0,86	1,53	
desvio padrão	0,7	ND	3,5	19,5	19,5	19,5	3,9	0,05	0,08	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 8 horas

Tabela L.9. Resultados Experimentais do Ensaio P109 (referentes à Figura 4.3.30).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada} - Q_{saída}$) (g/min)
0	45	50	64,7	359,5	359,5	140,5	71,9	0,40	0,92	-0,21
0,5	44	50	88,8	493,5	493,5	6,5	98,7	0,47	0,80	-0,10
1	45	50	89,7	498,6	498,6	1,4	99,7	0,50	0,84	-0,08
1,5	45	50	88,5	491,5	491,5	8,5	98,3	0,54	0,92	-0,08
2	46	50	88,8	493,5	493,5	6,5	98,7	0,54	0,92	-0,11
2,5	46	50	89,0	494,5	494,5	5,5	98,9	0,55	0,92	0,00
3	47	50	86,1	478,4	478,4	21,6	95,7	0,56	0,98	0,03
3,5	48	50	82,7	459,3	459,3	40,7	91,9	0,66	1,20	-0,08
4	46	50	86,3	479,4	479,4	20,6	95,9	0,51	0,88	-0,01
4,5	46	50	82,3	457,2	457,2	42,8	91,4	0,47	0,86	-0,03
5	46	50	87,0	483,4	483,4	16,6	96,7	0,48	0,82	-0,09
5,5	45	50	84,3	468,3	468,3	31,7	93,7	0,46	0,82	-0,03
6	46	50	83,2	462,3	462,3	37,7	92,5	0,51	0,92	0,01
6,5	47	50	86,7	481,4	481,4	18,6	96,3	0,60	1,04	-0,04
7	46	50	84,8	471,4	471,4	28,6	94,3	0,54	0,96	-0,04
7,5	46	50	83,8	465,3	465,3	34,7	93,1	0,54	0,96	-0,04
8	45	50	89,4	496,6	496,6	3,4	99,3	0,56	0,93	-0,01
média ⁽¹⁾	45,9	ND	86,3	479,5	479,5	20,5	95,9	0,53	0,92	
desvio padrão	1,0	ND	2,5	14,0	14,0	14,0	2,8	0,06	0,11	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7 horas

Tabela L.10. Resultados Experimentais do Ensaio PI10 (referentes à Figura 4.3.31).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	48	50	81,5	453,0	453,0	47,0	90,6	0,55	1,02	-0,16
0,5	47	50	86,2	479,1	479,1	20,9	95,8	0,54	0,94	-0,06
1	47	50	87,9	488,4	488,4	11,6	97,7	0,56	0,96	-0,03
1,5	46	50	87,6	486,6	486,6	13,4	97,3	0,61	1,04	-0,12
2	46	50	80,5	447,4	447,4	52,6	89,5	0,55	1,02	-0,06
2,5	40	50	88,4	491,2	491,2	8,8	98,2	0,66	1,12	-0,14
3	45	50	87,9	488,4	488,4	11,6	97,7	0,61	1,04	-0,05
3,5	45	50	82,7	459,5	459,5	40,5	91,9	0,57	1,04	-0,14
4	46	50	81,2	451,1	451,1	48,9	90,2	0,54	1,00	0,05
4,5	45	50	83,5	464,2	464,2	35,8	92,8	0,58	1,03	0,02
5	47	50	82,2	456,7	456,7	43,3	91,3	0,58	1,06	-0,13
5,5	47	50	86,9	482,8	482,8	17,2	96,6	0,56	0,96	-0,02
6	46	50	88,4	491,2	491,2	8,8	98,2	0,61	1,04	-0,01
6,5	45	50	90,4	502,4	502,4	-2,4	100,5	0,61	1,01	-0,06
7	46	50	85,1	472,6	472,6	27,4	94,5	0,62	1,10	-0,02
média ⁽¹⁾	45,6	ND	85,6	475,8	475,8	24,2	95,2	0,59	1,03	
desvio padrão	1,8	ND	3,1	17,3	17,3	17,3	3,5	0,04	0,05	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7 horas

Tabela L.11. Resultados Experimentais do Ensaio P111 (referentes à Figura 4.3.32).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	47	50	57,9	321,8	321,8	178,2	64,4	0,53	1,36	-0,15
0,5	47	50	78,0	433,3	433,3	66,7	86,7	0,62	1,20	-0,05
1	46	50	73,5	408,3	408,3	91,7	81,7	0,51	1,04	-0,10
1,5	45	50	81,2	451,2	451,2	48,8	90,2	0,54	1,00	-0,01
2	44	50	78,8	437,8	437,8	62,2	87,6	0,59	1,12	-0,16
2,5	48	50	78,2	434,2	434,2	65,8	86,8	0,48	0,92	-0,03
3	48	50	80,9	449,4	449,4	50,6	89,9	0,56	1,04	-0,10
3,5	47	50	86,6	481,1	481,1	18,9	96,2	0,58	1,00	-0,03
4	47	50	80,7	448,6	448,6	51,4	89,7	0,58	1,08	-0,05
4,5	45	50	81,6	453,2	453,2	46,8	90,6	0,65	1,20	-0,16
5	46	50	85,3	473,7	473,7	26,3	94,7	0,48	0,84	-0,03
5,5	45	50	79,9	443,9	443,9	56,1	88,8	0,47	0,88	0,07
6	47	50	81,4	452,3	452,3	47,7	90,5	0,64	1,19	0,04
6,5	46	50	82,8	459,7	459,7	40,3	91,9	0,64	1,16	-0,03
7	47	50	79,9	443,9	443,9	56,1	88,8	0,55	1,04	-0,05
7,5	46	50	76,6	425,3	425,3	74,7	85,1	0,52	1,02	0,10
média ⁽¹⁾	46,3	ND	80,6	447,9	447,9	52,1	89,6	0,56	1,05	
desvio padrão	1,2	ND	3,2	17,7	17,7	17,7	3,5	0,06	0,12	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7 horas

Tabela L.12. Resultados Experimentais do Ensaio P12 (referentes à Figura 4.3.33).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{entrada}-Q_{saída}$) (g/min)
0	46	50	86,2	478,9	478,9	21,1	95,8	0,68	1,18	-0,15
0,5	47	50	91,7	509,6	509,6	-9,6	101,9	0,62	1,02	-0,10
1	46	50	91,0	505,7	505,7	-5,7	101,1	0,58	0,96	0,00
1,5	46	50	89,1	494,8	494,8	5,2	99,0	0,57	0,96	-0,01
2	45	50	98,5	547,3	547,3	-47,3	109,5	0,63	0,96	-0,08
2,5	45	50	90,8	504,7	504,7	-4,7	100,9	0,61	1,00	0,00
3	45	50	84,9	471,9	471,9	28,1	94,4	0,50	0,88	0,01
3,5	46	50	82,6	459,0	459,0	41,0	91,8	0,51	0,92	0,01
4	47	50	79,4	441,2	441,2	58,8	88,2	0,56	1,06	-0,05
4,5	46	50	79,2	440,2	440,2	59,8	88,0	0,51	0,97	0,04
5	47	50	81,4	452,1	452,1	47,9	90,4	0,54	1,00	-0,03
5,5	47	50	91,9	510,6	510,6	-10,6	102,1	0,59	0,96	-0,02
6	46	50	89,9	499,7	499,7	0,3	99,9	0,58	0,96	-0,02
6,5	46	50	88,2	489,8	489,8	10,2	98,0	0,56	0,96	-0,04
7	47	50	91,2	506,7	506,7	-6,7	101,3	0,56	0,92	0,03
7,5	46	50	89,9	499,7	499,7	0,3	99,9	0,65	1,08	-0,08
8	46	50	88,7	492,8	492,8	7,2	98,6	0,60	1,02	-0,01
média ⁽¹⁾	46,1	ND	87,9	488,1	488,1	11,9	97,6	0,57	0,97	
desvio padrão	0,8	ND	5,6	31,0	31,0	31,0	6,2	0,04	0,04	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7 horas

**APÊNDICE M – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.4.2 de Resultados e Discussão**

Tabela M.1. Resultados Experimentais do Ensaio P13 (referentes à Figura 4.3.34)

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] salda (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saida}) (g/min)
0	46	50	39,3	218,4	218,4	281,6	43,7	0,12	0,45	-0,11
0,5	46	50	84,6	470,2	470,2	29,8	94,0	0,37	0,66	-0,09
1	46	50	84,5	469,2	469,2	30,8	93,8	0,25	0,45	-0,07
1,5	47	50	83,2	462,0	462,0	38,0	92,4	0,26	0,46	-0,03
2	47	50	85,9	477,4	477,4	22,6	95,5	0,14	0,25	-0,04
2,5	46	50	89,6	498,0	498,0	2,0	99,6	0,23	0,38	-0,03
3	46	50	88,7	492,8	492,8	7,2	98,6	0,33	0,56	0,00
3,5	47	50	87,0	483,6	483,6	16,4	96,7	0,34	0,59	-0,02
4	47	50	87,6	486,7	486,7	13,3	97,3	0,28	0,48	-0,02
4,5	47	50	87,0	483,6	483,6	16,4	96,7	0,28	0,48	0,02
5	46	50	87,8	487,7	487,7	12,3	97,5	0,28	0,48	-0,02
6	46	50	88,5	491,8	491,8	8,2	98,4	0,26	0,44	-0,03
6,5	47	50	87,4	485,6	485,6	14,4	97,1	0,17	0,30	0,00
7	46	50	89,3	495,9	495,9	4,1	99,2	0,18	0,30	-0,01
7,5	46	50	90,7	504,2	504,2	-4,2	100,8	0,20	0,33	0,02
média ⁽¹⁾	46,5	ND	88,2	489,8	489,8	10,2	98,0	0,25	0,42	
desvio padrão	0,5	ND	1,4	7,7	7,7	7,7	1,5	0,07	0,11	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 2 e 7,5 horas

Tabela M.2. Resultados Experimentais do Ensaio PI14 (referentes à Figura 4.3.35).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
0	46	50	79,1	439,7	439,7	60,3	87,9	0,82	1,56	-0,21
0,5	45	<50	88,0	489,1	489,1	10,9	97,8	0,80	1,36	-0,07
1	45	50	80,4	446,7	446,7	53,3	89,3	0,78	1,46	-0,09
1,5	46	50	86,8	482,1	482,1	17,9	96,4	0,89	1,54	-0,02
2	44	50	80,1	444,7	444,7	55,3	88,9	0,73	1,36	-0,10
2,5	45	50	81,9	454,8	454,8	45,2	91,0	0,72	1,32	-0,15
3	45	50	79,9	443,7	443,7	56,3	88,7	0,83	1,55	-0,05
3,5	44	50	76,6	425,5	425,5	74,5	85,1	0,81	1,58	-0,09
4	44	50	81,9	454,8	454,8	45,2	91,0	0,87	1,60	-0,15
4,5	46	50	78,6	436,7	436,7	63,3	87,3	0,90	1,72	-0,14
5	46	50	77,9	432,6	432,6	67,4	86,5	0,93	1,80	0,01
5,5	46	50	73,9	410,4	410,4	89,6	82,1	0,84	1,70	-0,27
6	45	50	78,3	435,3	435,3	64,7	87,1	0,94	1,80	-0,09
6,5	45	50	79,1	439,4	439,4	60,6	87,9	0,90	1,70	-0,10
7	46	50	75,9	421,9	421,9	78,1	84,4	0,71	1,40	-0,05
8	47	50	78,9	438,4	438,4	61,6	87,7	0,79	1,50	-0,05
8,5	47	50	80,6	447,6	447,6	52,4	89,5	0,73	1,36	0,18
9	47	50	74,5	413,7	413,7	86,3	82,7	0,68	1,36	-0,21
média ⁽¹⁾	45,5	ND	79,6	442,2	442,2	57,8	88,4	0,81	1,54	
desvio padrão	1,0	ND	3,7	20,7	20,7	20,7	4,1	0,08	0,16	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 9 horas

Tabela M.3. Resultados Experimentais do Ensaio P115 (referentes à Figura 4.3.36).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	37	50	61,7	342,7	342,7	157,3	68,5	0,30	0,74	-0,07
0,5	37	50	78,4	435,5	435,5	64,5	87,1	0,47	0,90	-0,11
1	37	<50	75,6	420,2	420,2	79,8	84,0	0,45	0,90	-0,06
1,5	37	50	78,8	437,7	437,7	62,3	87,5	0,55	1,04	-0,04
2	36	50	68,4	379,8	379,8	120,2	76,0	0,47	1,04	-0,08
2,5	37	50	71,5	397,3	397,3	102,7	79,5	0,43	0,90	-0,13
3	38	50	65,8	365,6	365,6	134,4	73,1	0,35	0,80	-0,10
3,5	38	50	63,9	354,7	354,7	145,3	70,9	0,38	0,90	-0,05
4	38	50	57,0	316,5	316,5	183,5	63,3	0,36	0,96	0,05
4,5	38	50	61,1	339,4	339,4	160,6	67,9	0,37	0,90	0,02
5	37	50	58,5	325,3	325,3	174,7	65,1	0,34	0,88	0,06
5,5	37	50	71,3	396,2	396,2	103,8	79,2	0,46	0,96	0,03
6	37	50	56,6	314,3	314,3	185,7	62,9	0,36	0,96	0,03
6,5	37	50	64,8	360,2	360,2	139,8	72,0	0,43	1,00	0,02
7	37	50	61,1	339,4	339,4	160,6	67,9	0,39	0,96	0,05
7,5	37	50	67,0	372,2	372,2	127,8	74,4	0,40	0,90	-0,08
8	37	50	52,8	293,6	293,6	206,4	58,7	0,28	0,80	0,02
8,5	37	50	71,3	396,2	396,2	103,8	79,2	0,41	0,86	-0,06
9	38	50	53,2	295,8	295,8	204,2	59,2	0,32	0,90	-0,07
média ⁽¹⁾	37,2	ND	64,6	359,1	359,1	140,9	71,8	0,40	0,92	
desvio padrão	0,6	ND	7,6	42,4	42,4	42,4	8,5	0,06	0,07	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 1 e 9 horas

Tabela M.4. Resultados Experimentais do Ensaio PI16 (referentes à Figura 4.3.37).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	54	50	49,7	276,1	276,1	223,9	55,2	0,41	1,24	-0,29
0,5	53	50	80,8	449,1	449,1	50,9	89,8	0,52	0,96	-0,09
1	55	50	82,3	457,1	457,1	42,9	91,4	0,55	1,00	-0,07
1,5	55	50	88,8	493,1	493,1	6,9	98,6	0,57	0,96	-0,08
2	55	50	89,7	498,1	498,1	1,9	99,6	0,57	0,96	0,01
2,5	54	50	86,4	480,1	480,1	19,9	96,0	0,51	0,88	-0,06
3	55	50	89,8	499,1	499,1	0,9	99,8	0,60	1,01	0,01
3,5	56	50	90,7	504,1	504,1	-4,1	100,8	0,60	1,00	0,03
4	55	50	86,1	478,2	478,2	21,8	95,6	0,60	1,04	-0,08
4,5	56	50	85,0	472,2	472,2	27,8	94,4	0,53	0,94	-0,07
5	55	50	83,7	465,2	465,2	34,8	93,0	0,54	0,96	-0,04
5,5	57	50	86,3	479,2	479,2	20,8	95,8	0,61	1,07	-0,04
6	54	50	87,7	487,2	487,2	12,8	97,4	0,63	1,08	-0,01
6,5	56	50	84,3	468,2	468,2	31,8	93,6	0,56	1,00	-0,02
7	55	50	85,9	477,2	477,2	22,8	95,4	0,62	1,08	-0,05
7,5	56	50	85,9	477,2	477,2	22,8	95,4	0,53	0,92	-0,03
8	55	50	85,9	477,2	477,2	22,8	95,4	0,64	1,12	0,01
média ⁽¹⁾	55,3	ND	86,6	480,9	480,9	19,1	96,2	0,58	1,00	
desvio padrão	0,8	ND	2,4	13,3	13,3	13,3	2,7	0,04	0,07	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 1 e 8 horas

Tabela M.5. Resultados Experimentais do Ensaio PI17 (referentes à Figura 4.3.38).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
0	46	50	22,1	122,6	122,6	377,4	24,5	0,18	1,24	-0,31
0,5	46	50	81,9	455,2	455,2	44,8	91,0	0,44	0,80	-0,11
1	46	50	85,7	476,2	476,2	23,8	95,2	0,55	0,96	-0,14
1,5	46	50	88,2	490,2	490,2	9,8	98,0	0,53	0,90	-0,09
2	45	50	74,9	416,1	416,1	83,9	83,2	0,45	0,90	-0,02
2,5	44	50	71,8	399,1	399,1	100,9	79,8	0,50	1,04	-0,11
3	45	50	77,6	431,1	431,1	68,9	86,2	0,54	1,04	-0,07
3,5	46	50	73,8	410,1	410,1	89,9	82,0	0,51	1,04	-0,01
4	45	50	84,5	469,2	469,2	30,8	93,8	0,61	1,08	-0,18
5	46	50	74,7	415,1	415,1	84,9	83,0	0,45	0,90	0,01
5,5	46	50	84,1	467,2	467,2	32,8	93,4	0,51	0,91	-0,05
6	46	50	86,3	479,2	479,2	20,8	95,8	0,54	0,94	-0,07
6,5	47	50	78,7	437,2	437,2	62,8	87,4	0,47	0,90	0,00
7,5	47	50	82,7	459,2	459,2	40,8	91,8	0,52	0,94	-0,05
8	46	50	82,8	460,2	460,2	39,8	92,0	0,55	1,00	-0,07
média ⁽¹⁾	45,8	ND	80,6	447,5	447,5	52,5	89,5	0,51	0,95	
desvio padrão	0,8	ND	5,2	29,1	29,1	29,1	5,8	0,05	0,08	

(1) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 8 horas

Tabela M.6. Resultados Experimentais do Ensaio PI18 (referentes à Figura 4.3.39).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Varição da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	44	50	27,7	153,9	153,9	346,1	30,8	0,22	1,20	-0,20
0,5	45	50	83,7	465,0	465,0	35,0	93,0	0,54	0,96	-0,08
1	44	<50	85,9	477,0	477,0	23,0	95,4	0,57	1,00	-0,19
1,5	45	50	82,9	460,6	460,6	39,4	92,1	0,49	0,88	0,03
2	45	50	85,1	472,6	472,6	27,4	94,5	0,51	0,90	0,01
2,5	47	50	79,6	442,0	442,0	58,0	88,4	0,49	0,92	-0,09
3	45	50	78,4	435,5	435,5	64,5	87,1	0,50	0,96	-0,16
4	45	50	79,8	443,1	443,1	56,9	88,6	0,51	0,96	-0,13
4,5	47	50	84,2	467,9	467,9	32,1	93,6	0,45	0,80	-0,06
5	47	50	79,9	444,0	444,0	56,0	88,8	0,50	0,94	0,01
5,5	46	50	78,1	434,0	434,0	66,0	86,8	0,54	1,04	-0,11
6	46	50	70,6	392,1	392,1	107,9	78,4	0,40	0,84	0,03
6,5	46	50	84,2	467,9	467,9	32,1	93,6	0,53	0,94	-0,03
7	47	50	84,0	466,9	466,9	33,1	93,4	0,60	1,07	-0,08
média ⁽¹⁾	45,8	ND	81,3	451,4	451,4	48,6	90,3	0,51	0,94	
desvio padrão	1,0	ND	4,2	23,2	23,2	23,2	4,6	0,05	0,07	

(¹) média e desvio padrão calculados para o intervalo compreendido entre 0,5 e 7 horas

**APÊNDICE N – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.4.3 de Resultados e Discussão**

Tabela N.1. Resultados Experimentais do Ensaio V101 (referentes à Figura 4.3.45).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{e,entrada}-Q_{e,saida}$) (g/min)
0	50	50	78,7	437,1	437,1	62,9	87,4	0,63	1,20	-0,06
0,5	51	50	87,1	484,0	484,0	16,0	96,8	0,58	1,00	-0,11
1	51	50	83,7	465,2	465,2	34,8	93,0	0,56	1,00	-0,53
1,5	51	50	89,1	495,3	495,3	4,7	99,1	0,59	1,00	-0,09
2	51	50	86,6	481,2	481,2	18,8	96,2	0,60	1,04	-0,08
2,5	51	50	87,8	487,8	487,8	12,2	97,6	0,55	0,94	-0,08
3	51	50	89,0	494,3	494,3	5,7	98,9	0,59	1,00	-0,02
3,5	50	50	87,1	484,0	484,0	16,0	96,8	0,63	1,08	-0,08
4	51	50	85,4	474,6	474,6	25,4	94,9	0,55	0,96	0,00
4,5	50	50	90,8	504,6	504,6	-4,6	100,9	0,64	1,06	-0,11
5	51	50	88,3	490,6	490,6	9,4	98,1	0,53	0,90	0,03
5,5	51	50	91,7	509,3	509,3	-9,3	101,9	0,70	1,14	-0,17
6	52	50	90,5	502,8	502,8	-2,8	100,6	0,72	1,20	0,03
6,5	49	50	90,5	502,8	502,8	-2,8	100,6	0,64	1,06	-0,11
7	52	50	91,5	508,4	508,4	-8,4	101,7	0,68	1,12	-0,11
7,5	50	50	90,8	504,6	504,6	-4,6	100,9	0,56	0,92	-0,08
8	50	50	84,3	468,1	468,1	31,9	93,6	0,67	1,20	-0,12
8,5	51	50	84,3	468,1	468,1	31,9	93,6	0,49	0,88	-0,08
9	51	50	84,4	469,0	469,0	31,0	93,8	0,56	1,00	0,00
9,5	52	50	84,6	469,9	469,9	30,1	94,0	0,54	0,96	-0,03
22,5	50	50	84,9	471,8	471,8	28,2	94,4	0,48	0,84	-0,19
24	52	50	85,1	472,8	472,8	27,2	94,6	0,54	0,96	-0,05
26	50	50	86,1	478,4	478,4	21,6	95,7	0,60	1,04	-0,09
29	50	50	85,1	472,8	472,8	27,2	94,6	0,48	0,84	-0,07
30	50	50	83,9	466,2	466,2	33,8	93,2	0,54	0,96	0,02
32	51	50	85,4	474,6	474,6	25,4	94,9	0,55	0,96	0,02
34	51	50	82,6	458,7	458,7	41,3	91,7	0,64	1,16	-0,11
46	49	>50	76,1	423,0	423,0	77,0	84,6	0,37	0,72	0,03
48	51	>50	75,5	419,3	419,3	80,7	83,9	0,47	0,94	0,10
51	50	>50	77,3	429,6	429,6	70,4	85,9	0,41	0,80	0,22
52	50	>50	70,7	393,0	393,0	107,0	78,6	0,42	0,90	0,11

Tabela N.1. (continuação) Resultados Experimentais do Ensaio VI01 (referentes à Figura 4.3.45).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
54	51	>50	80,4	446,5	446,5	53,5	89,3	0,57	1,06	0,08
56	49	>50	81,2	451,2	451,2	48,8	90,2	0,54	1,00	0,03
57	49	>50	79,9	443,7	443,7	56,3	88,7	0,55	1,04	0,11

(1) média e desvio-padrão para o Intervalo compreendido entre 1 e 32 horas

média ⁽¹⁾	50,8	ND	87,1	484,0	484,0	16,0	96,8	0,58	1,00	
desvio padrão	0,8	ND	2,7	15,2	15,2	15,2	3,0	0,07	0,10	

(2) média e desvio-padrão para o Intervalo compreendido entre 1 e 8 horas

média ⁽¹⁾	50,7	ND	88,5	491,6	491,6	8,4	98,3	0,61	1,04	
desvio padrão	0,8	ND	2,6	14,5	14,5	14,5	2,9	0,06	0,09	

(3) média e desvio-padrão para o Intervalo compreendido entre 8 e 32 horas

média ⁽¹⁾	50,7	ND	84,8	471,2	471,2	28,8	94,2	0,55	0,96	
desvio padrão	0,8	ND	0,7	3,6	3,6	3,6	0,7	0,06	0,11	

(4) média e desvio-padrão para o Intervalo compreendido entre 32 e 57 horas

média ⁽¹⁾	50,1	ND	78,8	437,7	437,7	62,3	87,5	0,50	0,95	
desvio padrão	0,9	ND	4,4	24,3	24,3	24,3	4,9	0,09	0,13	

**APÊNDICE O – Tabelas dos Resultados Experimentais dos Ensaios
Apresentados no Item 4.3.4.4 de Resultados e Discussão.**

Tabela O.1. Resultados Experimentais do Ensaio VI02 (referentes à Figura 4.3.50).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão ($Q_{\text{entrada}} - Q_{\text{saída}}$) (g/min)
0	56	50	85,1	472,9	472,9	27,1	94,6	0,73	1,28	19,91
0,5	53	50	87,9	488,5	488,5	11,5	97,7	0,73	1,24	-0,06
1	55	50	81,9	455,3	455,3	44,7	91,1	0,48	0,88	0,03
2	55	50	89,2	495,4	495,4	4,6	99,1	0,64	1,08	0,01
2,5	55	50	87,2	484,6	484,6	15,4	96,9	0,60	1,04	-0,20
3	58	50	85,1	472,9	472,9	27,1	94,6	0,68	1,20	-0,12
3,5	55	50	83,4	463,1	463,1	36,9	92,6	0,49	0,88	0,19
4	56	50	89,9	499,3	499,3	0,7	99,9	0,48	0,80	-0,07
4,5	58	50	87,4	485,6	485,6	14,4	97,1	0,47	0,80	-0,01
5	56	50	82,5	458,2	458,2	41,8	91,6	0,57	1,04	-0,17
5,5	56	50	87,4	485,6	485,6	14,4	97,1	0,58	1,00	-0,14
6,5	59	50	84,9	471,9	471,9	28,1	94,4	0,54	0,96	0,08
7	59	50	83,2	462,1	462,1	37,9	92,4	0,35	0,64	0,39
8	53	50	73,1	406,4	406,4	93,6	81,3	0,50	1,02	0,03
9	53	50	87,1	483,6	483,6	16,4	96,7	0,60	1,04	0,03
10	54	50	80,4	446,5	446,5	53,5	89,3	0,64	1,20	0,01
11	53	50	77,4	429,8	429,8	70,2	86,0	0,56	1,08	0,01
12	53	50	85,3	473,8	473,8	26,2	94,8	0,66	1,16	-0,17
21	53	50	78,2	434,7	434,7	65,3	86,9	0,54	1,04	-0,03
21,5	56	50	84,8	470,9	470,9	29,1	94,2	0,54	0,96	0,05
22	56	50	83,4	463,1	463,1	36,9	92,6	0,58	1,04	-0,03
22,5	55	50	93,4	518,8	518,8	-18,8	103,8	0,67	1,08	-0,13
23,5	55	50	94,1	522,8	522,8	-22,8	104,6	0,63	1,00	-0,10
24,5	56	50	87,1	483,6	483,6	16,4	96,7	0,58	1,00	-0,03
25,5	56	50	89,5	497,3	497,3	2,7	99,5	0,53	0,88	-0,01
26,5	57	50	88,3	490,5	490,5	9,5	98,1	0,68	1,16	-0,27
27,5	56	50	83,5	464,1	464,1	35,9	92,8	0,67	1,20	-0,09
28,5	56	50	81,2	451,3	451,3	48,7	90,3	0,63	1,16	-0,13
29,5	58	50	82,8	460,2	460,2	39,8	92,0	0,57	1,04	-0,01
30,5	57	50	76,7	425,9	425,9	74,1	85,2	0,55	1,08	-0,02
31,5	58	< 50	84,9	471,9	471,9	28,1	94,4	0,59	1,04	-0,02

Tabela O.1. (continuação) Resultados Experimentais do Ensaio VI02 (referentes à Figura 4.3.50).

tempo (h)	Temperatura (°C)	Volume (mL)	[G] (mg/mL)	[G] (mM)	[S] consumida (mM)	[S] saída (mM)	Conversão X (%)	r (mmol/h.mg)	Vazão (mL/min)	Variação da Vazão (Q _{entrada} -Q _{saída}) (g/min)
32,5	57	< 50	87,8	487,5	487,5	12,5	97,5	0,70	1,20	-0,06
33,5	58	< 50	80,7	448,4	448,4	51,6	89,7	0,56	1,04	0,00
34,5	59	< 50	83,5	464,1	464,1	35,9	92,8	0,60	1,08	-0,04
35,5	60	< 50	85,3	473,8	473,8	26,2	94,8	0,61	1,08	0,01
36,5	60	< 50	82,3	457,2	457,2	42,8	91,4	0,64	1,16	-0,09

(1) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 1 e 36,5 horas

média ⁽¹⁾	56,2	ND	84,6	469,4	469,4	30,6	93,9	0,68	1,03	
desvio padrão	2,0	ND	4,6	24,8	24,8	24,8	6,0	0,07	0,13	

(2) média e desvio-padrão para o intervalo compreendido entre 1 e 8 horas

média ⁽¹⁾	56,3	ND	84,6	470,0	470,0	30,0	94,0	0,63	0,96	
desvio padrão	1,9	ND	4,6	24,7	24,7	24,7	4,9	0,09	0,15	