

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA PARA PROTEÓLISE DE**  
**SORO DE QUEIJO, VISANDO À PRODUÇÃO DE CONCENTRADO**  
**PROTÉICO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA**

**Rebeca Yndira Cabrera Padilla**

**SÃO CARLOS – SP**

**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA PARA PROTEÓLISE DE  
SORO DE QUEIJO, VISANDO À PRODUÇÃO DE CONCENTRADO  
PROTÉICO COM BAIXO TEOR DE FENILALANINA**

**Autor: Rebeca Yndira Cabrera Padilla**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e desenvolvimento de Processos Químicos

**Orientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano**

**SÃO CARLOS – SP**

**2007**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P123re

Padilla, Rebeca Yndira Cabrera.

Reator enzimático de membrana para proteólise de soro de queijo, visando à produção de concentrado protéico com baixo teor de fenilalanina / Rebeca Yndira Cabrera Padilla. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

197 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Proteólise. 2. Soro de queijo. 3. Quimotripsina. 4. Carboxipeptidase A. 5. Reator enzimático de membrana. 6. Concentrado protéico. 7. Fenilcetonúricos. I. Título.

CDD: 660.634 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **REBECA YNDIRA CABRERA PADILLA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 07 DE DEZEMBRO DE 2007.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano  
**Presidente, UFSCar**



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Beatriz Vahan Kilikian  
**EPUSP**



Prof. Dr. Cristiano Piacsek Borges  
**COPPE/UFRJ**



Dr<sup>a</sup> Célia Maria Araújo Galvão  
**CTC**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel de Lima Camargo Giordano  
**UFSCar**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar-me as forças necessárias para suportar estar longe de minha família e conseguir meu objetivo

A meus pais, irmãos e demais familiares pelo seu constante apoio e carinho incondicional durante o decorrer de meu doutorado.

Agradeço todas as pessoas e instituições que fizeram possível a culminação satisfatória deste trabalho.

Ao orientador, Dr. Roberto de Campos Giordano, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela sua confiança em meu trabalho e principalmente pela sua paciência, dedicação e incansável orientação.

À professora Raquel de Lima Camargo Giordano, pela sua contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPQ, pela bolsa e ao PADCT/CNPQ e FAPESP, pelo suporte financeiro.

Aos técnicos de laboratório Amadeus e Tiago Martins, pela sua ajuda nas análises e pela sua amizade.

A Taiwo O. Oladeinde, que entrou em minha vida em um momento difícil, pelo seu carinho, apoio, paciência escutando minhas lamentações e decepções cada vez que as coisas não deram certo no laboratório, e pela sua ajuda. Você sempre será alguém muito especial e importante em minha vida, que sempre lembrarei com muito carinho.

A meu colega e amigo Gilson A. Pinto, pela sua ajuda e paciência, já que boa parte do trabalho foi realizado em conjunto.

A meu colega e amigo Wellington Adriano pela sua amizade e ajuda nas medidas das atividades das enzimas.

A meus amigos e colegas de laboratório, Maressa, Juliana Steffens, Cássia, Oldair, Adriano, e especialmente a meus grandes amigos Edson e Geisa, pela sua amizade, seu apoio e por me suportar em meus momentos difíceis no laboratório.

A minha amiga Miriam Resende pela sua amizade, seu apoio total e pelos seus conselhos acertados, nos momentos que eu mais precisei.

Assim mesmo as minhas amigas que sempre me brindaram sua amizade, seu carinho e seu apoio incondicional e que são minha família em este país. Daniela Pereira, Patrícia Vieira, e Sirlene Gonçalvez, que guardarei sempre em meu coração e nunca esquecerei.

# SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Índice de Tabelas.....	iii
Índice de Figuras.....	vi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	6
2.1. O Soro Láctico.....	6
2.1.1. Proteínas do Soro.....	8
2.1.1.1. $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg).....	8
2.1.1.2. $\alpha$ -Lactalbumina ( $\alpha$ -La).....	9
2.2.1.3. Soroalbumina Bovina (BSA).....	9
2.2.1.4. Imunoglobulinas (Ig).....	10
2.1.2. Utilização do soro.....	10
2.1.3. Hidrólise enzimática das proteínas do soro.....	13
2.1.4. Fenilcetonúria.....	16
2.1.5. Características dos aminoácidos.....	19
2.2. Enzimas Proteolíticas.....	20
2.2.1. Quimotripsina.....	22
2.2.2. Carboxipeptidase A.....	23
2.2.3. Mecanismo catalítico da carboxipeptidase A.....	24
2.3. Imobilização de Enzimas.....	26
2.3.1. Suportes para imobilização de enzimas.....	28
2.3.1.1. Gel de agarose.....	29
2.3.2. Imobilização Multipontual de Enzimas.....	30
2.4. Modelos Cinéticos da Hidrólise Enzimática de Proteínas.....	32
2.5. Técnicas de Separação.....	35
2.5.1. Processos de separação com membrana (PSM).....	35
2.5.1.1. Membranas.....	36
2.5.1.2. Ultrafiltração.....	37
2.5.1.3. Parâmetros importantes para a análise do desempenho e eficiência do processo de ultrafiltração.....	38
2.5.1.4. Diafiltração.....	40

2.5.1.5. Fenômenos envolvidos nos PSM.....	41
2.5.1.6. Limpeza da membrana e vida útil.....	43
2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	44
2.5.2.1. Cromatografia de exclusão por tamanho (Análise de Peptídeos).....	44
2.5.2.2. Cromatografia de troca iônica (Análise de Aminoácidos).....	45
2.5.3. Separação de Phe – hidrolisados protéicos	46
2.6. Reator Enzimático de Membrana.....	48
<b>3. Reator Enzimático de Membrana (REM) para Proteólise de Hidrolisado de Soro de Queijo Catalisada com CPA: Cinética da Reação e Modelo Matemático do Reator.....</b>	<b>53</b>
3.1. Cinética da hidrólise de soro de queijo com Carboxipeptidase A imobilizada em glioxil-agarose.....	54
3.2. Modelagem do REM.....	58
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>64</b>
4.1. Materiais.....	64
4.1.1. Enzimas.....	64
4.1.2. Substratos.....	64
4.1.3. Suportes para imobilização .....	64
4.1.4. Padrões de Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas.....	65
4.1.5. Reagentes.....	65
4.2. Metodologia Experimental.....	65
4.2.1. Preparação do Substrato.....	65
4.2.2. Determinação das propriedades físicas do soro concentrado.....	66
4.2.3. Dosagem de proteínas – método de Kjeldahl.....	66
4.2.3.1. Digestão das amostras.....	66
4.2.3.2. Destilação das amostras.....	67
4.2.3.3. Titulação das amostras.....	67
4.2.4. Dosagem de Lactose: método DNS .....	68
4.2.5. Preparação de suporte para imobilização.....	69
4.2.5.1. Preparação de gel de agarose com alta densidade de grupos aldeído.....	69
4.2.6. Imobilização multipontual de enzimas .....	71
4.2.7. Hidrólise das proteínas do soro catalisadas por quimotripsina imobilizada.....	72
4.2.7.1. Preparação de substrato.....	73
4.2.8. Ensaio para a determinação da distribuição de massas molares dos	

peptídeos ao longo da hidrólise com quimotripsina e após hidrólise com CPA: calibração da coluna de peptídeos.....	73
4.2.9. Hidrolisados obtidos pela ação de Carboxipeptidase A (CPA): levantamento da cinética da reação enzimática.....	77
4.2.9.1. Ensaio de velocidades iniciais.....	77
4.2.9.2. Ensaio de longa duração.....	77
4.2.10. Análise de aminoácidos por HPLC.....	78
4.2.11. Hidrólise ácida.....	79
4.3. Sistemas utilizados para os ensaios de hidrólise com CPA .....	80
4.3.1. Reator com membrana de placa plana ( <i>flat Sheet</i> ).....	80
4.3.2. Reator com membrana de fibra oca ( <i>hollow fiber</i> ).....	81
4.3.3. Caracterização dos módulos de membrana.....	83
4.3.3.1. Determinação da permeabilidade da membrana limpa.....	83
4.3.3.2. Determinação dos valores de $R_m$ e $R_g$ .....	84
4.4. Ensaio de Hidrólise com CPA .....	84
4.4.1. Primeira etapa de ensaios de hidrólise com CPA.....	84
4.4.1.1. Ensaio (1) em reator com membrana de placa plana (REM-PP).....	84
4.4.1.2. Ensaio (2) em reator com membrana de placa plana (REM-PP).....	85
4.4.2. Segunda etapa de ensaios de hidrólise com CPA.....	85
4.4.2.1. Ensaio (3) em reator com membrana de placa plana (REM-PP) .....	85
4.4.2.2. Ensaio (4) em batelada seguida de diafiltração com membrana de placa plana (Bat-PP).....	85
4.4.3. Preparação de substrato com soro de queijo Minas Frescal.....	86
4.4.4. Terceira etapa de ensaios.....	86
4.4.4.1. Ensaio (5) em batelada seguida de diafiltração com membrana de placa plana (Bat-PP).....	86
4.4.4.2. Ensaio (6) em batelada seguida de diafiltração com membrana de placa plana (Bat-PP).....	86
4.4.5. Quarta etapa de ensaios.....	87
4.4.5.1. Ensaio (7) em reator com membrana de placa plana (REM-PP) .....	87
4.4.5.2. Ensaio (8) em reator com membrana de placa plana (REM-PP) .....	87
4.4.6. Quinta etapa de ensaios.....	87
4.4.6.1. Ensaio (9) em reator com membrana de placa plana (REM-PP) .....	88
4.4.6.2. Ensaio (10) em reator com membrana de placa plana (REM-PP).....	88



4.4.7. Sexta etapa de ensaios.....	88
4.4.7.1. Ensaio (11) em reator com membrana de fibra oca (REM-FO)	88
4.4.7.2. Ensaio (12) em batelada seguida de diafiltração com membrana de fibra oca (Bat-FO).....	89
<b>5. Resultados E Discussão</b> .....	90
5.1. Propriedades físicas e composição do concentrado de soro de queijo.....	92
5.2. Distribuição de peptídeos nos hidrolisados de quimotripsina.....	92
5.3. Sistemas Utilizados para Hidrólise com CPA.....	94
5.3.1. Caracterização das membranas.....	94
5.3.1.1. Determinação da permeabilidade das membranas limpas.....	94
5.3.1.2 Determinação dos valores de $R_m$ e $R_g$ .....	96
5.3.2. Ensaio de hidrólise com CPA.....	98
5.3.2.1. Primeira etapa de ensaios.....	98
5.3.2.2. Segunda etapa de ensaios.....	105
5.3.2.3. Terceira etapa de ensaios.....	114
5.3.3. Ensaio cinéticos de hidrólise com CPA em novas condições: grau de pré-hidrólise com quimotripsina de 15,3% e carga enzimática de 135 $U_{H-Phc}/g_{gel}$ .....	117
5.3.3.1 Quarta etapa de ensaios.....	117
5.3.3.2 Quinta etapa de ensaios.....	125
5.3.4. Ensaio no REM com nova membrana de <i>fibra oca</i> .....	134
5.3.4.1. Sexta etapa de ensaios.....	134
5.3.5 Simulações do REM e Análise da Sensibilidade Paramétrica.....	143
5.3.6 Comparação do desempenho dos três sistemas.....	154
<b>6. Conclusões</b> .....	159
<b>7. Sugestões para Trabalhos Futuros</b> .....	161
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	162
<b>Anexo I:</b> Curvas de Calibração dos Peptídeos .....	170
<b>Anexo II:</b> Seqüência de Aminoácidos das Principais Proteínas.....	176
<b>Anexo III:</b> Hidrólise com Carboxipeptidase A no Reator Enzimático com Membrana de <i>Placa Plana</i> .....	179
<b>Anexo IV:</b> Hidrólise com Carboxipeptidase A no Reator Enzimático com Membrana de <i>Fibra Oca</i> .....	189

## RESUMO

Os hidrolisados protéicos via enzimática apresentam algumas vantagens, em relação à mistura de aminoácidos livres obtida pela hidrólise química: menor osmolalidade (e, portanto, maior facilidade de absorção pelo organismo) e características sensoriais mais agradáveis. Por sua vez, a remoção da fenilalanina (Phe) desses hidrolisados permite a utilização dos hidrolisados na dieta de fenilcetonúricos.

Nesta Tese foi estudada a hidrólise enzimática seqüencial de proteínas de soro de queijo, processo proposto para obtenção de um hidrolisado protéico, com reduzido teor de Phe, e constituído de duas etapas reacionais: na primeira, as proteínas do soro de queijo concentrado são hidrolisadas pela endoprotease quimotripsina, imobilizada em gel de agarose. A segunda etapa, cujo substrato é o produto da primeira proteólise, é o foco central desta Tese, e consiste na hidrólise do substrato prehidrolisado utilizando-se a exoprotease carboxipeptidase A (CPA), imobilizada na mesma matriz.

Como o escopo do trabalho era o processo para obtenção de um hidrolisado protéico com baixo teor de Phe para pacientes fenilcetonúricos foi necessário incorporar outra etapa: ultrafiltração, para separar os aminoácidos liberados por ação da CPA, principalmente Phe (além de outros aminoácidos inibidores da reação). Para isso, propõe-se trabalhar com reator enzimático de membrana (REM).

Destaque-se que a concepção de reator aqui apresentada é, até onde vai nosso conhecimento, inédita. Estudou-se um reator de membrana com a enzima imobilizada em partículas esféricas de gel de agarose, retidas no volume reacional propriamente dito por meio de um filtro de aço (400 Tyler). Assim, a membrana de ultrafiltração ficou a cargo apenas da separação dos aminoácidos presentes no hidrolisado, que era reciclado continuamente para o frasco contendo a enzima imobilizada.

Foram realizados ensaios para caracterização das membranas utilizadas, para posteriormente serem realizados ensaios em diferentes condições experimentais no processo integrado (reação com enzima imobilizada acoplada à ultrafiltração), utilizando como substratos soro de queijo tipo *Prato* e *Minas Frescal*.

Foram testadas duas configurações de unidades de ultrafiltração: placa plana e fibra oca, ambas com corte de 1 kDa. As razões volume de reator/área de membrana testadas foram de  $7,5 \times 10^{-2}$  e  $76,9 \times 10^{-2}$  cm, respectivamente.

Foi desenvolvido um modelo matemático do REM, e suas predições foram comparados com dados experimentais de hidrólise com CPA para ambos os sistemas.

Finalmente, foi comparado o desempenho de três sistemas: reator com membrana de placa plana, reator com membrana de fibra oca e reator em batelada, seguido por diafiltração com membrana de fibra oca. O REM tipo fibra oca apresentou o melhor desempenho (85% de conversão, uma produtividade de  $275,2 \times 10^{-7}$  g<sub>hidrolisado</sub>/mg<sub>Phe</sub>/U<sub>H-Phe</sub>/h e apenas 1% de retenção de Phe na membrana, em ensaios de 10 h. O produto resultante desse sistema apresentou características próprias para ser utilizado como complemento protéico para pacientes fenilcetonúricos, com um alto conteúdo protéico (53,4 g/L) constituído majoritariamente por pequenos peptídeos ( $\leq 5,8$  kDa) e com 19,9 mg<sub>Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub> valor que se encontra dentro da faixa tolerada para pacientes de fenilcetonúria.

## ABSTRACT

Enzymatic hydrolyzed proteins present some advantages over the pool of amino acids obtained after a chemical hydrolysis: lower osmolality (easier absorption by the organism) and better sensorial characteristics. The removal of phenylalanine (Phe) from these hydrolysates allows their use in the diet of phenylketonuria (PKU) patients.

This Thesis studies the sequential hydrolysis of cheese whey proteins. This process aims at producing a protein hydrolysate with low contents of Phe, after two reaction stages: in the first one, concentrated cheese whey proteins are hydrolyzed by the endoprotease chymotrypsin, immobilized on agarose gel. The substrate of the second stage is the product of the first one. This reaction is the central focus of this Thesis, and consists in a hydrolysis using the exoprotease carboxipeptidase A (CPA), immobilized on the same matrix.

Since the scope of this work was a process for obtaining a protein hydrolysate with low contents of Phe for phenylketonurics, another stage had to be incorporated: ultrafiltration, to separate the amino acids released by the action of CPA, mainly Phe (and other amino acids that inhibit the reaction). With this purpose, an enzymatic membrane reactor (EMR) is proposed.

It should be noticed that, to the best of our knowledge, the reactor design presented here has not been published yet. The EMR had spherical agarose particles within the reaction space, retained by a stainless steel mesh (400 Tyler). Hence, the ultrafiltration membrane was in charge only of the separation of the amino acids in the hydrolysate, which was continuously recycled to the flask containing the immobilized enzyme.

Assays to characterize the membranes were performed. These membranes were then used in the integrated process (reaction with immobilized enzyme coupled to the ultrafiltration), for different experimental conditions. The substrates were *Prato* and *Minas Frescal* cheese whey.

Two set-ups of the ultrafiltration unit were tested: flat plate and hollow fiber, both with 1 kDa cut-off. The reactor volume/membrane area ratios were  $7.5 \times 10^{-2}$  cm and  $76.9 \times 10^{-2}$  cm, respectively.

Finally, the performance of three systems was compared: EMR with flat plane and hollow fiber and a batch reactor, followed by diafiltration. The hollow fiber EMR showed the best performance (85% conversion, productivity of  $275.2 \times 10^{-7}$  g<sub>hidrolisado</sub>/mg<sub>Phe</sub>/U<sub>H-PHE</sub>/h and only 1% retention of Phe in the membrane, after assays of 10 h). The resulting product was appropriate for phenylketonurics, with high protein contents (53.4 g/L), mainly constituted by small peptides ( $\leq 5.8$  kDa) and with 19.9 mg<sub>Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub>, within the admissible range for PKU.

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>Tabela 2.1:</b> Composição típica de soro láctico.....	7
<b>Tabela 2.2:</b> Composição de aminoácidos em concentrados de proteínas do soro e número de resíduos nas principais proteínas.....	12
<b>Tabela 2.3:</b> Usos dietéticos dos hidrolisados de proteínas na nutrição humana.....	15
<b>Tabela 2.4:</b> Recomendação diária de proteína e de fenilalanina na dieta.....	18
<b>Tabela 2.5:</b> Propriedades e convenções associadas com os 20 aminoácidos naturais..	20
<b>Tabela 2.6:</b> Classes de enzimas proteolíticas.....	22
<b>Tabela 2.7:</b> Relação de importantes artigos sobre REM.....	51
<b>REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA (REM) PARA PROTEÓLISE DE HIDROLISADO DE SORO DE QUEIJO CATALISADA COM CPA: CINÉTICA DA REAÇÃO E MODELO MATEMÁTICO DO REATOR</b>	
<b>Tabela 3.1:</b> Parâmetros cinéticos ajustados para sistema de EDOs na hidrólise com CPA de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% e 15,3% (equações 3.2 a 3.7).....	56
<b>Tabela 3.2:</b> Relação entre o rendimento individual de cada aminoácido $Y_i$ e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais para ( $\text{GH}_Q=12,4\%$ ). $V=V_p/E_0$ , onde $E_0$ = carga enzimática no reator ( $U_{\text{H-Phe}} \text{ L}^{-1}$ ).....	57
<b>Tabela 3.3:</b> Relação entre o rendimento individual de cada aminoácido $Y_i$ e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais. $V=V_p/E_0$ , onde $E_0$ = carga enzimática no reator ( $U_{\text{H-Phe}} \text{ L}^{-1}$ ).....	58
<b>METODOLOGIA</b>	
<b>Tabela 4.1:</b> Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide10/300 GL para análise de peptídeos no HPLC (LC-10AD).....	74
<b>Tabela 4.2:</b> Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide10/300 GL para análise de peptídeos no HPLC (LC-6AD).....	76
<b>Tabela 4.3:</b> Ensaios de hidrólise com CPA realizados nos dois sistemas.....	89
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
<b>Tabela 5.1:</b> Propriedades físicas e composição do soro de queijo (Prato) concentrado ( $\pm$ desvio padrão de triplicatas).....	92
<b>Tabela 5.2:</b> Condições operacionais dos ensaios 1 e 2 (substrato: HSQ, queijo prato).....	100
<b>Tabela 5.3:</b> Conteúdo ( $\text{g}_{\text{Aminoácido}}/100\text{g}_{\text{Proteína}}$ ), determinado após hidrólise ácida de soro de queijo <i>prato</i> utilizado como substrato. Condições de hidrólise ácida (conforme item 4.2.11) HCl 6 N, 110 °C e 24 horas de incubação. Comparação com	

os valores teóricos previstos por Adler-Nissen (1986).....	105
<b>Tabela 5.4:</b> Condições operacionais dos sistemas comparados. Ensaio (3): REM. Ensaio (4): batelada seguida de ultrafiltração. Substrato: HSQ <i>prato</i> .....	106
<b>Tabela 5.5:</b> Comparação das produtividades para REM e batelada.....	111
<b>Tabela 5.6:</b> Resultados obtidos no ensaio (3) em reator com membrana (REM), com pré-hidrolisado de soro de queijo <i>prato</i> com quimotripsina. Todos os valores em mol <sub>Phe</sub> .....	112
<b>Tabela 5.7:</b> Principais características do soro de queijo <i>Minas Frescal</i> concentrado ( $\pm$ desvio padrão de triplicatas).....	113
<b>Tabela 5.8:</b> Condições operacionais para os dois ensaios em batelada seguida de diafiltração. Substrato HSQ <i>Minas Frescal</i> .....	115
<b>Tabela 5.9:</b> Phe nos hidrolisados com quimotripsina e após diafiltração nos ensaios (5) e (6).....	116
<b>Tabela 5.10:</b> Condições operacionais do ensaio (7) de hidrólise com CPA no REM. Substrato; HSQ <i>Minas frescal</i> .....	118
<b>Tabela 5.11:</b> Resultados obtidos do ensaio (7) no REM. Todos os valores em mol <sub>Phe</sub> . Substrato: HSQ <i>Minas frescal</i> .....	121
<b>Tabela 5.12:</b> Condições operacionais do ensaio (8) de hidrólise com CPA no REM. Substrato: HSQ <i>Minas frescal</i> .....	122
<b>Tabela 5.13:</b> Resultados obtidos do ensaio (8) no REM. Todos os valores em mol <sub>Phe</sub>	124
<b>Tabela 5.14:</b> Condições operacionais dos ensaios de hidrólise com CPA no REM. Substrato: HSQ <i>Minas frescal</i> .....	126
<b>Tabela 5.15:</b> Resultados do balanço de massa dos ensaios (9) e (10) no REM. Todos os valores em mol <sub>Phe</sub> .....	131
<b>Tabela 5.16:</b> Resultados principais dos ensaios (9) e (10) no REM.....	132
<b>Tabela 5.17:</b> Condições operacionais do ensaio (11) no REM de <i>fibra oca</i> . Substrato: HSQ <i>Minas frescal</i> .....	134
<b>Tabela 5.18:</b> Resultados do balanço de massa da Phe do ensaio (11) no REM. Todos os valores em mol <sub>Phe</sub> . ....	140
<b>Tabela 5.19:</b> Condições operacionais do ensaio 12 em reator de batelada. Substrato: HSQ <i>Minas Frescal</i> .....	142
<b>Tabela 5.20:</b> Valores das constantes do ajuste do $Re_N$ para os ensaios (10) <i>placa plana</i> e (11) <i>fibra oca</i> no REM.....	145
<b>Tabela 5.21:</b> Valores das constantes do ajuste de $Re_{Phe}$ utilizados para as simulações.....	145
<b>Tabela 5.22:</b> Comparação do desempenho de três sistemas de reatores.....	155
<b>Tabela 5.23:</b> Distribuição da massa molar dos peptídeos antes e depois da reação com CPA (produto final) dos três sistemas.....	157

**ANEXOS II e III**

<b>Tabela A2.1:</b> Conteúdo teórico de cada aminoácido para as principais proteínas do soro de queijo.....	178
<b>Tabela A3.1:</b> Constantes do ajuste do Re da Tyr dos ensaios (9) e (10).....	179
<b>Tabela A3.2:</b> Constantes do ajuste do Re da Leu dos ensaios (9) e (10).....	182
<b>Tabela A3.3:</b> Constantes do ajuste do Re da Ileu dos ensaios (9) e (10).....	185

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>Figura 2.1:</b> Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease (Tardioli, 2003).....	21
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura tridimensional da quimotripsina com destaque para o substrato posicionado no sítio ativo da enzima e dois dos resíduos (Ser-195 e His-57) que compõem sua tríade catalítica (Lehninger & Cox, 2000).....	23
<b>Figura 2.3:</b> Estrutura tridimensional da carboxipeptidase A com destaque para o íon zinco e resíduos que participam do processo catalítico desta enzima (Lehninger & Cox, 2000).....	24
<b>Figura 2.4:</b> Complexo enzima-substrato (carboxipeptidase A-peptídeo com tirosina carboxi-terminal), mostrando as interações entre os resíduos do sítio ativo da enzima e o substrato a ser clivado (Suckling, 1985 <i>apud</i> Tardioli, 2003).....	26
<b>Figura 2.5:</b> Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a carboxipeptidase A. O glutamato-270 ataca o carbono da carbonila da ligação cindível, formando um intermediário covalente anidrido misto (Stryer, 1992 <i>apud</i> Tardioli, 2003).....	26
<b>Figura 2.6:</b> Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado (Galvão, 2004).....	28
<b>Figura 2.7:</b> Sistema de imobilização/estabilização proposto por Guisán <i>et al.</i> (1992). Ligação da enzima via seus grupos aminos a grupos aldeídos alifáticos moderadamente separados da superfície do suporte).....	32
<b>Figura 2.8:</b> Valores típicos de fluxo permeado de solvente puro em função da pressão. MF = microfiltração, UF = ultrafiltração, NF = nanofiltração e OI = osmose inversa (Nóbrega <i>et al.</i> , 2005).....	40
<b>Figura 2.9:</b> Variação esquemática no fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por polarização de concentração e incrustação. Operação em escoamento tangencial, baseada em Habert <i>et al.</i> (2006).....	41
<b>REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA (REM) PARA PROTEÓLISE DE HIDROLISADO DE SORO DE QUEIJO CATALISADA COM CPA: CINÉTICA DA REAÇÃO E MODELO MATEMÁTICO DO REATOR</b>	
<b>Figura 3.1:</b> Esquema do processo de hidrólise de CPA no REM.....	54
<b>Figura 3.2:</b> Esquema do processo (REM).....	59
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>Figura 4.1:</b> Coeficiente angular em função do tempo de retenção média para a calibração da coluna Superdex Peptide10/300 GL para análise de peptídeos no HPLC (LC-10AD).....	75
<b>Figura 4.2:</b> Coeficiente angular em função do tempo de retenção médio para a calibração da coluna Superdex Peptide10/300 GL para análise de peptídeos no	

HPLC (LC-6AD).....	76
<b>Figura 4.3:</b> Diagrama de blocos da metodologia de análise de aminoácidos.....	79
<b>Figura 4.4:</b> Diagrama de blocos da metodologia de hidrólise ácida.....	80
<b>Figura 4.5:</b> Fotos do sistema REM (Reator + Membrana placa plana) para hidrólise com CPA.....	81
<b>Figura 4.6:</b> Fotos do REM (Reator + Membrana fibra oca) para processo de hidrólise com CPA.....	82
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
<b>Figura 5.1:</b> Distribuição de peptídeos durante hidrólise com quimotripsina, pH 8,0, 55°C, utilizando 25ml de soro prato (50 g <sub>Proteína</sub> /L) com 0,08 g <sub>catalisador</sub> /g <sub>proteína</sub> (40mg <sub>enzima</sub> /g <sub>Gel</sub> ). Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.....	93
<b>Figura 5.2:</b> Cromatogramas de exclusão por tamanho para hidrolisado com quimotripsina e hidrolisado com CPA (razão inicial Enzima/Substrato 60 U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> , e carga de 101 U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> ) no REM de <i>fibra oca</i> . As setas indicam os tempos de retenção para os marcadores utilizados.....	93
<b>Figura 5.3:</b> Fluxo do permeado em função da pressão da água destilada para a determinação da permeabilidade da membrana de placa plana (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm <sup>2</sup> , Millipore Pellicon <sup>TM</sup> -2 Mini Holder, modelo: XX42PMINI).....	95
<b>Figura 5.4:</b> Fluxo do permeado em função da pressão da água destilada para a determinação da permeabilidade das membranas de fibra oca (polissulfona, 1 kDa, 56 cm <sup>2</sup> , Amersham Biosciences Co., modelo: UFP-1-C-MM01).....	95
<b>Figura 5.5:</b> Relação entre o fluxo da vazão do permeado ( $Q_P$ ) e a pressão transmembrana ( $P_T$ ) no módulo da membrana de placa plana (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm <sup>2</sup> ).....	96
<b>Figura 5.6:</b> Evolução da vazão do permeado ( $Q_P$ ) no sistema com membrana de placa plana (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm <sup>2</sup> ).....	97
<b>Figura 5.7:</b> Evolução da resistência devido ao <i>fouling</i> ( $R_f$ ) da membrana de placa plana. (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm <sup>2</sup> ).....	98
<b>Figura 5.8:</b> Pressão média trans-membrana ao longo de uma reação (6h) de hidrólise com CPA no sistema com membrana de placa plana com vazão de recirculação de 3 L/h.....	98
<b>Figura 5.9:</b> Conversão de Phe (%) na proteólise com CPA (previamente hidrolisada com quimotripsina 12,4% ) em função do tempo. T = 45 °C, pH 7 para os dois ensaios.....	101
<b>Figura 5.10:</b> Evolução da concentração de fenilalanina livre no reator a longo da proteólise com CPA. T = 45 °C, pH 7 para os dois ensaios. HSQ = hidrolisado de soro de queijo prato. SD = solução dialisante.....	102
<b>Figura 5.11:</b> Relação mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> no reator ao longo do tempo da operação (6 horas) para o ensaio (2).....	102



<b>Figura 5.12:</b> Perfil de alimentação do reator no ensaio (2).....	103
<b>Figura 5.13:</b> Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (2).....	104
<b>Figura 5.14:</b> Concentração de aminoácidos livres no meio reacional, durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo prato pré-hidrolisada com quimotripsina ( $GH_Q = 12,4\%$ ) catalisada por CPA com $1120 U_{H-Phe}/L$ no REM. Ensaio (2).....	104
<b>Figura 5.15:</b> Perfil de alimentação do reator com Membrana, Ensaio (3).....	107
<b>Figura 5.16:</b> Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (3).....	107
<b>Figura 5.17:</b> Conversão da Phe ao longo da hidrólise catalisada por CPA a pH 7 e $45^\circ C$ . Ensaio 3 (REM) e 4 (batelada). Substrato: HSQ <i>prato</i> .....	108
<b>Figura 5.18:</b> Perfis de Phe liberada durante as reações catalisadas com CPA no reator em batelada e no REM (reator e permeado). Substrato: HSQ <i>prato</i> .....	109
<b>Figura 5.19:</b> Velocidades de liberação de Phe por unidade da enzima. Hidrolisados por CPA, pH 7,0 e $45^\circ C$ . Substrato: HSQ <i>prato</i> .....	110
<b>Figura 5.20:</b> Concentração dos aminoácidos livres durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo pre-hidrolisada com quimotripsina ( $GH_Q = 12,3\%$ ) catalisada por CPA com $895 U_{H-Phe}/L$ no REM. Ensaio (3): REM, substrato HSQ <i>prato</i> .....	111
<b>Figura 5.21:</b> Phe liberada após a ação seqüencial da quimotripsina ( $55^\circ C$ , pH 8.0 e graus de hidrólise de 12,3 e de 15,3%) e de CPA ( $45^\circ C$ , pH 7,0 e 600 min de reação).....	116
<b>Figura 5.22:</b> Perfil de alimentação do REM (ensaio 7).....	118
<b>Figura 5.23:</b> Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (7).....	119
<b>Figura 5.24:</b> Concentração de aminoácidos livres durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo pré-hidrolisada com quimotripsina ( $GH_Q = 15,3\%$ ) catalisada por CPA com $3000 U_{H-Phe}/L$ . Substrato: HSQ <i>Minas frescal</i> .....	120
<b>Figura 5.25:</b> Perfil de alimentação do REM no ensaio (8).....	122
<b>Figura 5.26:</b> Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (8).....	123
<b>Figura 5.27:</b> Concentração de aminoácidos livres durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo pre-hidrolisada com quimotripsina ( $GH_Q = 15,3\%$ ) catalisada por CPA com $3000 U_{H-Phe}/L$ no REM. Ensaio (8). Substrato: HSQ <i>Minas frescal</i> .....	124
<b>Figura 5.28:</b> Vazão de alimentação do REM dos ensaios (9) e (10).....	126
<b>Figura 5.29:</b> Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para os ensaios (9) e (10).....	127

<b>Figura 5.30:</b> Evolução da pressão média trans-membrana (bar) ao longo do tempo de reação para os ensaios (9) e (10).....	128
<b>Figura 5.31:</b> Evolução da Phe livre e ligada no reator ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).....	128
<b>Figura 5.32:</b> Evolução da Phe livre e ligada no permeado ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).....	129
<b>Figura 5.33:</b> Evolução da Phe total no reator e permeado ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).....	130
<b>Figura 5.34:</b> Evolução da concentração das proteínas ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).....	130
<b>Figura 5.35:</b> Evolução da concentração de $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).....	131
<b>Figura 5.36:</b> Distribuição dos peptídeos antes e depois da reação com CPA no reator com membrana de Placa plana do ensaio (10).....	133
<b>Figura 5.37:</b> Perfil de alimentação do REM <i>fibra oca</i> para ensaio (11).....	135
<b>Figura 5.38:</b> Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (11).....	136
<b>Figura 5.39:</b> Concentração de Phe livre e ligada (a peptídeos) no reator e permeado ao longo do tempo de reação com CPA para o ensaio (11).....	136
<b>Figura 5.40:</b> Concentração de Phe total no reator e permeado ao longo do tempo de reação com CPA para o ensaio (11).....	137
<b>Figura 5.41:</b> Evolução da concentração de proteínas no reator ao longo do tempo de reação com CPA para o ensaio (11).....	138
<b>Figura 5.42:</b> Evolução da concentração de $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ ao longo do tempo da reação com CPA para o ensaio (11).....	139
<b>Figura 5.43:</b> Distribuição de peptídeos antes e depois da reação com CPA no reator com membrana de fibra oca (ensaio 11).....	141
<b>Figura 5.44:</b> Concentração de Phe livre ao longo do tempo de reação em reator de batelada com CPA: valores experimentais e previstos pelo modelo. As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicata.....	142
<b>Figura 5.45:</b> Distribuição de peptídeos antes e depois da reação com CPA no reator de batelada + diafiltração com membrana <i>fibra oca</i> (ensaio 12).....	143
<b>Figura 5.46:</b> Coeficiente de rejeição $\text{Re}_N$ baseado na concentração protéica total e ajustado por decaimento exponencial de segunda ordem para a ensaio (10) no REM <i>placa plana</i> .....	144
<b>Figura 5.47:</b> Coeficiente de rejeição $\text{Re}_N$ baseado na concentração protéica total e ajustado por decaimento exponencial de segunda ordem para a ensaio (10) no REM <i>fibra oca</i> .....	144
<b>Figura 5.48:</b> Coeficiente de rejeição da Phe livre ao longo do tempo de reação ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem para os	

ensaios (7), (9) e (10) no REM <i>placa plana</i> .....	146
<b>Figura 5.49:</b> Coeficiente de rejeição da Phe livre ao longo do tempo de reação ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem para o ensaio (11) no REM <i>fibra oca</i> .....	146
<b>Figura 5.50:</b> Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações do Re para o ensaio (7) no REM <i>placa plana</i> .....	147
<b>Figura 5.51:</b> Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações do Re para o ensaio (8) no REM <i>placa plana</i> .....	148
<b>Figura 5.52:</b> Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações do Re para o ensaio (11) no REM <i>fibra oca</i> .....	148
<b>Figura 5.53:</b> Ajustes polinomiais da vazão do permeado para o ensaio (7) no REM <i>placa plana</i> .....	149
<b>Figura 5.54:</b> Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações da vazão do permeado para o ensaio (7) no REM <i>placa plana</i> .....	151
<b>Figura 5.55:</b> Ajustes polinomiais da vazão do permeado para o ensaio (8) no REM <i>placa plana</i> .....	151
<b>Figura 5.56:</b> Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações da vazão do permeado para o ensaio (8) no REM <i>placa plana</i> .....	152
<b>Figura 5.57:</b> Ajustes polinomiais da vazão do permeado para o ensaio (11) no REM <i>fibra oca</i> .....	153
<b>Figura 5.58:</b> Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações da vazão do permeado para o ensaio (11) no REM <i>fibra oca</i> .....	153
<b>Figura 5.59:</b> Comparação da evolução da concentração de proteínas do produto final ao longo do tempo da reação para os três sistemas.....	156
<b>Figura 5.60:</b> Comparação da evolução do teor de Phe ( $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ ) ao longo do tempo da reação para os três sistemas.....	157
<b>Figura 5.61:</b> Phe livre ao longo do tempo de reação com CPA: comparação entre modelo e dados experimentais dos três sistemas. As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicata.....	158
<b>ANEXOS I, III e IV</b>	
<b>Figura A1.1:</b> Ajuste linear de Leucine (0,56 kDa) (padrão de peptídeo).....	170
<b>Figura A1.2:</b> Ajuste linear de Angiotensin (1 kDa) (padrão de peptídeo).....	171
<b>Figura A1.3:</b> Ajuste linear de Insulina (5,8 kDa) .....	171
<b>Figura A1.4:</b> Ajuste linear da $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa).....	172
<b>Figura A1.5:</b> Ajuste linear da $\beta$ -Lactoglobulina (18,3 kDa).....	172
<b>Figura A1.6:</b> Ajuste linear de Soro Albumina Bovina (67 kDa).....	173
<b>Figura A1.7:</b> Ajuste linear de Leucine (0,56 kDa) (padrão de peptídeo).....	173

<b>Figura A1.8:</b> Ajuste linear de Neurotensin ( 1,7 kDa) (padrão de peptídeo).....	174
<b>Figura A1.9:</b> Ajuste linear de Insulina (5,8 kDa).....	174
<b>Figura A1.10:</b> Ajuste linear da $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa).....	175
<b>Figura A1.11:</b> Ajuste linear de Soro Albumina Bovina (67 kDa).....	175
<b>Figura A3.1:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr livre dos ensaios (9) e (10), ajustados a uma equação de decaimento exponencial de Segundo ordem.....	179
<b>Figura A3.2:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr Total dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	180
<b>Figura A3.3:</b> Concentração de Tyr livre e ligada no reator dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	180
<b>Figura A3.4:</b> Concentração de Tyr livre e ligada no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	181
<b>Figura A3. 5:</b> Concentração de Tyr Total no reator e permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	181
<b>Figura A3.6:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Leu livre dos ensaios (9) e (10), ajustados a uma equação de decaimento exponencial de Segundo ordem.....	182
<b>Figura A3.7:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Leu total dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	183
<b>Figura A3.8:</b> Concentração de Leu livre e ligada no reator dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	183
<b>Figura A3.9:</b> Concentração de Leu livre e ligada no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	184
<b>Figura A3.10:</b> Concentração de Leu total no reator e permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	184
<b>Figura A3.11:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Ileu livre dos ensaios (9) e (10), ajustados a uma equação de decaimento exponencial de segundo ordem.....	185
<b>Figura A3.12:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Ileu total dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	186
<b>Figura A3.13:</b> Concentração de Ileu livre e ligada no reator dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	186
<b>Figura A3.14:</b> Concentração de Ileu livre e ligada no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	187
<b>Figura A3.15:</b> Concentração de Ileu total no reator e no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> .....	187
<b>Figura A3.16:</b> Concentração de aminoácidos livre do modelo predito (linhas) e dados experimentais (símbolos) do ensaio (10) da hidrólise com CPA no REM de <i>placa plana</i> . As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicatas.....	188

<b>Figura A4.1:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr livre do ensaio (11), ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem.....	189
<b>Figura A4.2:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr Total do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	190
<b>Figura A4.3:</b> Concentração de Tyr livre e ligada no reator do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	190
<b>Figura A4.4:</b> Concentração de Tyr livre e ligada no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	191
<b>Figura A4.5:</b> Concentração de Tyr total no reator e no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	191
<b>Figura A4.6:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Leu livre do ensaio (11), ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem.....	192
<b>Figura A4.7:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Leu total do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	192
<b>Figura A4.8:</b> Concentração de Leu livre e ligada no reator do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	193
<b>Figura A4.9:</b> Concentração de Leu livre e ligada no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	193
<b>Figura A4.10:</b> Concentração de Leu total no reator e no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	194
<b>Figura A4.11:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Ileu livre do ensaio (11), ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem.....	194
<b>Figura A4.12:</b> Coeficiente de rejeição (Re) da Ileu total do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	195
<b>Figura A4.13:</b> Concentração de Ileu livre e ligada no reator do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	195
<b>Figura A4.14:</b> Concentração de Ileu livre e ligada no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	196
<b>Figura A4.15:</b> Concentração de Ileu total no reator e no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> .....	196
<b>Figura A4.16:</b> Concentração de aminoácidos livres do modelo predito (linhas) e dados experimentais (símbolos) do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de <i>fibra oca</i> . As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicatas...	197

## CAPITULO 1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo é a porção aquosa que se separa do coágulo durante a manufatura de queijos e retém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite. Com uma produção de  $5,5 \times 10^6$  toneladas/ano apenas no Brasil, segundo dados da Associação Brasileira da manufatura de queijo (Abiq) (2005), este subproduto tem recebido considerável atenção devido à sua composição nutricional e ao volume anual produzido.

O soro é um importante agente poluente, e apresenta demanda bioquímica de oxigênio entre 30000 e 40000  $\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$ , cerca de cem vezes maior que a do esgoto doméstico (Richards, 1997). Seu alto teor de proteínas solúveis, lactose, além de outros micronutrientes como vitaminas e sais minerais, o tornam em uma matéria-prima atraente para produtos de maior valor agregado. Esses fatos motivam inúmeras pesquisas com fins de aproveitamento deste subproduto nas áreas da indústria de alimentos, farmacêutica e química.

Dentre as diversas formas de aproveitamento do soro de queijo destaca-se a produção de hidrolisados de proteínas. A hidrólise enzimática (proteólise), de forma controlada, do soro de queijo, torna possível evidenciar e/ou alterar as propriedades funcionais dos polipeptídeos produzidos, incrementando assim suas aplicações. Um processo de hidrólise controlada do soro, utilizando proteases específicas, permite, por exemplo, gerar um hidrolisado composto de pequenos peptídeos e com teor reduzido de aminoácidos aromáticos, em especial fenilalanina. Esse produto pode ser usado na dieta de fenilcetonúricos. Ele possui melhor sabor que o de produtos obtidos por rota química (hidrólise ácida, por exemplo), que são maioritariamente constituídos por aminoácidos livres e de sabor desagradável.

A hidrólise controlada pode ser feita utilizando proteases com elevada especificidade como por exemplo tripsina, alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase A. Tais processos vêm sendo estudados há algum tempo no DEQ/UFSCar (Silva, 2000, Resende, 2002; Tardioli, 2003; Sousa Jr, 2003; Vieira, 2004; Galvão, 2004).

As aplicações de hidrolisados de proteínas distribuem-se principalmente em três grupos: (i) formulações especiais para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou erro genético no metabolismo de aminoácidos, como os pacientes fenilcetonúricos e de fibrose cística; (ii) formulações especiais para adultos com função

digestiva prejudicada ou doenças em órgãos específicos e (iii) suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (Mahmoud, 1994). Portanto, é facilmente justificável o desenvolvimento de processos que permitam agregar valor ao soro, transformando-o em produto comercializável.

Fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética autossomática recessiva, devida a um erro inato do metabolismo do aminoácido essencial fenilalanina (Phe). É caracterizada por uma deficiência no sistema de hidroxilação do aminoácido que é causada pela ausência ou redução da atividade da enzima hepática fenilalanina hidroxilase, responsável pela conversão de Phe em tirosina. (Guimarães & Lanfer-Marquez, 2005).

Após o diagnóstico de PKU, o tratamento deve seguir uma dieta com baixo teor de Phe, procurando manter os níveis plasmáticos de Phe perto da concentração de uma criança saudável. Crianças fenilcetonúricas não tratadas apresentam níveis de fenilalanina de aproximadamente 20 mg/100 mL do plasma, enquanto a concentração em crianças saudáveis variam na faixa de 1 a 3 mg/100 mL do plasma (Lanfer-Marquez et al., 1997). Uma dieta com índices baixos de Phe pode ser usada para controlar a ingestão deste aminoácido, tendo como resultado o desenvolvimento normal das crianças, evitando assim doenças neurológicas (Lara, 1997). A proteólise seqüencial e controlada de proteínas do soro de queijo pode fornecer produtos alimentícios e farmacêuticos com as propriedades funcionais específicas (Clemente, 2000). Estes hidrolisados podem ser usados no gerenciamento da dieta de pacientes com fenilcetonúria (PKU) quando seus índices de Phe obedecem a limites de tolerância requeridos.

Em geral, hidrolisados de proteína comerciais para pacientes de PKU são basicamente um conjunto de aminoácidos sem Phe. Entretanto, a presença de outros aminoácidos aromáticos resulta em sabor desagradável. Se os hidrolisados forem constituídos de pequenos peptídeos, por sua vez, resultam duas vantagens: baixa osmolalidade (Saha e Hayashi, 2001), tornando mais fácil sua absorção; e melhor sabor da mistura dos peptídeos quando comparada aos aminoácidos livres (Pedersen, 1994 *apud* Clemente, 2000).

Os hidrolisados enzimáticos das proteínas são produzidos geralmente em indústrias de alimentos e farmacêuticas após processos tipo batelada, devido a sua simplicidade e fácil controle (Adler-Nissen, 1986). A inviabilidade econômica de recuperação das enzimas quando estas são utilizadas na forma solúvel aumenta os custos do processo. Além disso, a estabilidade térmica dessas biomoléculas é muito limitada, tendo curto tempo de meia-vida quando utilizadas a temperaturas mais altas. Por outro lado, em se tratando de proteases, a inativação por autólise é outro inconveniente que surge ao se utilizarem enzimas

livres. Enfim, o elevado custo relacionado a essas questões pode tornar o processo enzimático inviável (Rios et al., 2004).

Neste contexto, buscam-se processos mais rentáveis com auxílio de técnicas de imobilização de enzimas em suportes altamente ativadas. Paralelamente, sistemas combinados de reação e separação de produtos, por exemplo, com o auxílio de reatores acoplados a sistemas de ultrafiltração, podem ser importantes para reduzir tempos de processamento, diminuindo a concentração, no meio reacional, de produtos que têm efeito inibitório sobre as enzimas. Dentro desta classe, a literatura reporta que reatores de mistura contínuos com membrana (CSTMR) foram bem sucedidos, e particularmente reatores de membrana com reciclo.

No reator de membrana o principal objetivo é assegurar a completa rejeição da enzima, a fim de manter a atividade total dentro do volume de reação. Na literatura, encontram-se inúmeros exemplos de aplicação de reatores enzimáticos com a enzima livre retida pela membrana e, também, alguns trabalhos utilizando a enzima imobilizada sobre a própria membrana. Segundo Bouhallab (1998) *apud* Rios et al (2004) as vantagens de um reator de membrana são: operação em modo contínuo (alimentando substrato); retenção e reutilização do biocatalisador; redução da inibição pelo produto na cinética da reação; produto final livre de enzima; dois graus de liberdade para controle das propriedades do produto, a ação da enzima (especificidade) e a seletividade da membrana; processo integrado (uma etapa com reação e separação).

O objetivo principal deste trabalho de doutorado é a proposição de uma configuração não-convencional de reator de membrana, até onde vai nosso conhecimento não reportada pela literatura, com a enzima imobilizada em partículas suspensas no interior do reator. Esse reator será utilizado para obtenção de hidrolisados protéicos, a partir de soro de queijo, com teor reduzido de Phe, para utilização em dietas de fenilcetonúricos. Para isso, utilizam-se duas enzimas imobilizadas multipontualmente em gel de agarose, de acordo com protocolos estabelecidos pelo grupo de Engenharia Enzimática do DEQ/UFSCar, coordenado pela Profa. Raquel Giordano: quimotripsina e carboxipeptidase A (CPA). O produto final será composto por pequenos polipeptídeos com baixo teor de resíduos aromáticos, principalmente fenilalanina (Phe).

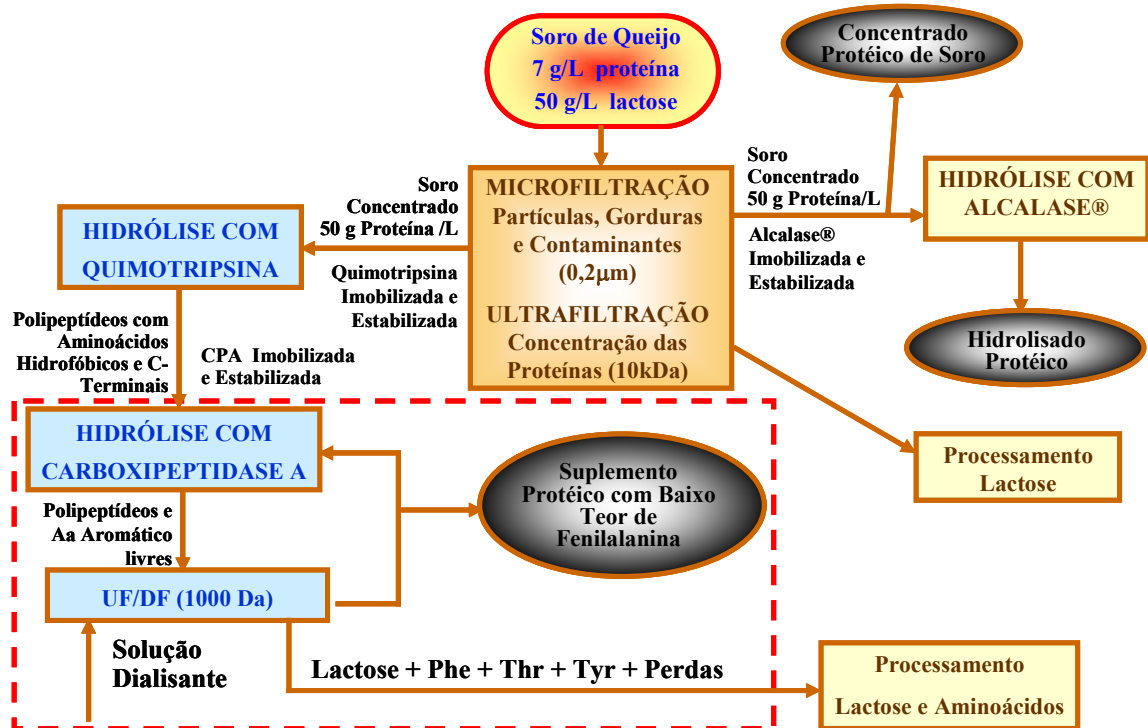
Como segundo objetivo, desenvolve-se um modelo matemático simplificado do sistema (reator acoplado a uma unidade de ultrafiltração) para hidrólise de soro de queijo com CPA.



Esta tese, assim, é parte de uma linha de pesquisa mais ampla, que visa à proposição de uma biorefinaria de soro de queijo para produção controlada de hidrolisados protéicos.

A unidade multi-propósito para modificação do soro e aproveitamento de seu conteúdo protéico (e de lactose) é aqui denominada Biorefinaria de soro de queijo. As etapas do processo global para a obtenção de hidrolisados protéicos estão esquematizadas na Figura 1.1. O soro *in natura*, com aproximadamente 7 g<sub>Proteína</sub>/L de e 50 g<sub>lactose</sub> /L é submetido a micro-filtração em membrana de 0,2 µm, para esterilização da matéria-prima e posterior concentração da mesma por ultrafiltração em membrana com corte de 10kDa. A partir desse ponto, o processo segue duas rotas: a primeira, onde Silva (2000) propôs um processo de recuperação de proteína de soro láctico na forma de concentrado protéico de soro (CPS) e de hidrolisados protéicos de soro (HPS). Esse hidrolisado é obtido por ação da catalise de alcalase imobilizada, tendo como produto principalmente di e tri-peptídeos. Esta rota já foi amplamente estudada por Resende (2002) e Sousa (2004). Na segunda, o soro, após as etapas de microfiltração e ultrafiltração, é hidrolisado com quimotripsina imobilizada e estabilizada em gel de agarose 6%, obtendo-se polipeptídeos com aminoácidos carboxil-terminais hidrofóbicos. A etapa subsequente compreende a hidrólise com carboxipeptidase A imobilizada em glioxil agarose 6%. Esta rota foi estudada por Tardioli (2003) e Galvão (2004).

Esta tese enfocou a segunda rota apresentada (hidrólise com CPA), porque a cinética da hidrólise de resíduos carboxi-terminais é complexa, tendo um grande número de substratos presentes simultaneamente. Num dado momento, o sítio ativo da enzima pode estar livre, ligado a inibidores competitivos (Tyr e Phe), ligado ao peptídeo contendo Tyr, Phe, Trp e a outros resíduos, que ela também ataca – embora em menor velocidade. O produto dessa etapa é constituído por polipeptídios e aminoácidos livres, e como o objetivo principal é a redução desses aminoácidos no produto final, optou-se por utilizar um sistema de ultrafiltração/diafiltração tangencial com reciclo acoplado ao reator de mistura.



**Figura 1.1:** Biorefinaria de soro de queijo: diagrama de blocos das etapas de hidrólises sequenciais.

## CAPITULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados e referenciados alguns dos fenômenos ou processos importantes para proposta desta tese.

### 2.1. O Soro Láctico

O soro, um subproduto da produção de queijo, é um fluido opaco, de coloração amarelo-esverdeada e, como a maioria dos produtos derivados do leite, perecível. É a porção aquosa que se separa após a coagulação da caseína durante a fabricação do queijo. Retém 55% dos nutrientes do leite e representa o subproduto mais abundante na indústria láctea, contendo de 85 a 95% do volume de leite inicial utilizado.

A composição do soro depende dos tipos de queijos fabricados e dos processos tecnológicos utilizados na produção (Marwaha e Kennedy, 1988). Fator determinante é o pH no qual o coalho é separado do queijo e, portanto, seu conteúdo em proteínas, sais minerais, ácidos graxos, lactose e ácido pode variar (Scott, 1986).

Alguns tipos de soro de queijo, segundo Richards (1997) e Soares (1995), são:

- **Soro doce;** obtido a partir da fabricação de queijo tipo “Cheddar”, Suíço, Minas Frescal e similares, que são feitos com leite coagulado por renina. Esse soro apresenta acidez relativamente baixa (pH entre 5,8 e 6,5). No Brasil, a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, provindo da fabricação de queijos de coagulação enzimática (Minas Frescal, Meia, Cura, Prato e Mussarela dentre outros).

- **Soro ácido;** obtido a partir da fabricação de queijo tipo “Cottage”, produzido a partir de leite coagulado por ácido. Possui pH entre 4,5 e 4,8. No Brasil, a quantidade de soro ácido gerado pela produção de queijo é insignificante (Viotto, 1993).

- **Soro desproteínizado;** obtido pela coagulação das proteínas, com temperaturas próximas de 90 °C.

- **Soro desmineralizado;** obtido por eletrodialise ou troca iônica, com processo de secagem por atomização. Isento de gosto salgado e com lactoproteínas na sua constituição, encontra grandes aplicações em formulações infantis, na fabricação de chocolates, de cremes, etc.

- **Soro deslactosado;** contém um baixo teor de lactose e possui um campo de aplicação muito variado na alimentação humana.

Segundo Morr e Ha (1993), de maneira geral, o soro de queijo é composto fundamentalmente por água (87,0% p/p), lactose (4,60% p/p) e proteínas (0,62% p/p). O restante são gorduras, vitaminas, sais e ácidos, como pode ser verificado na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Composição típica de soro láctico

	Composição (g/L)	
	Soro doce	Soro ácido
Sólidos Totais	66	64
Proteína Total (N x 6,38)	6,57	6,2
Nitrogênio não Protéico	0,37	0,4
Lactose	52,3	44,3
Gordura	0,2	0,3
Minerais	5,0	7,5
Cálcio	0,5	1,6
Fosfato	1,0	2,0
Sódio	0,53	0,51
Lactato	-	6,4
PH	6,4	4,6

(Ponsano *et al.*, 1992)

Além de seus componentes possuírem um elevado valor nutritivo, o soro apresenta aptidões funcionais muito interessantes para a indústria alimentar. Em relação à tecnologia alimentar, a utilização de soro apresenta aspectos positivos como: obtenção de proteínas de alto valor nutritivo e de excelentes propriedades funcionais; e alto teor de lactose (Soares, 1995).

Segundo Neves (1993), o soro de queijo pode ser analisado sob dois diferentes aspectos: i) como agente poluidor, se descartado diretamente como efluente, pois a descarga de soro em cursos de água pode provocar a destruição da flora e fauna devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que varia de 30.000 a 40.000 mg de O<sub>2</sub> por litro de soro; e ii) como produto nobre, pelo seu teor de proteínas solúveis (ricas em aminoácidos essenciais), vitaminas do grupo B e elevados teores de lactose e de sais.

No Brasil, o consumo de queijo tem atingido níveis recordes nos últimos anos e continua em ascensão. Por conseguinte, aumentam-se a produção e a necessidade de se criar

alternativas para a reutilização do soro, pois o tratamento de efluentes dessa natureza é dispendioso. A produção nacional anual de soro de queijo em 2003 foi de 4.644.000 toneladas ([http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe\\_art.asp?id=5834](http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe_art.asp?id=5834), matéria publicada em 17/06/2004).

Diante deste dado, percebe-se que descartar soro sem um tratamento preliminar eficiente não é só um crime previsto por lei, mas constitui prática antieconômica e até mesmo anti-social, não só devido à carência mundial de alimentos, mas também pelo caráter sazonal e inconstante da produção de leite (Juliano *et al.*, 1987; Richards, 1997; Santos e Ferreira, 2001).

Diversos métodos podem ser aplicados para o aproveitamento do soro. Dentre eles, as técnicas de filtração com membranas permite a separação de frações de componentes de diversos tamanhos molares e cargas químicas presentes em alimentos líquidos como leite ou soro. Essas técnicas são satisfatoriamente empregadas, por exemplo, na obtenção de produtos funcionais como os peptídeos bioativos, que são obtidos pela modificação enzimática ou microbiológica dos componentes lácteos tradicionais. A concentração das proteínas do soro pode ser eficientemente realizada utilizando-se a técnica de ultrafiltração, onde o soro é separado em duas partes: permeado e retentado. O permeado é composto basicamente por lactose e a massa seca de retentado é constituída por aproximadamente 85% de proteína (p/p) e 15% de lactose (p/p), além de quantidades vestigiais de minerais e vitaminas (Galvão, 2004).

### 2.1.1 Proteínas do soro

As principais proteínas do soro são a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La), a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), a soro albumina bovina (SAB) e as imunoglobulinas (Ig). Além dessas, existem ainda várias outras proteínas, coletivamente denominadas “proteose-peptonas” (Morr e Ha, 1993; Ponsano *et al.*, 1992).

#### 2.1.1.1. $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg)

A  $\beta$ -Lg é a proteína mais abundante no soro de queijo, estando presente em concentrações de 2 a 4g/L, o que corresponde a aproximadamente 50% do total das proteínas do soro. É constituída de 162 resíduos de aminoácidos e tem um massa molar de 18,3 kDa. Acima do seu ponto isoelétrico (pH 5,2) esta proteína é encontrada na forma de um dímero

(36,7 kDa) e abaixo do pH 3,5 e acima do pH 7,5 o dímero se dissocia lentamente. Entre o pH 3,5 e 5,2 é encontrada na forma de um octômero (147 kDa). Esta proteína desnatura-se com o tempo e temperaturas acima de 65°C, sofrendo grandes transições conformacionais com a exposição dos grupos SH e  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> altamente reativos (Morr e Ha, 1993).

A  $\beta$ -Lg é resistente à digestão por pepsina e quimotripsina, devido a sua conformação estável. A temperaturas acima de 70°C a  $\beta$ -Lg sofre desnaturação irreversível e polimerização (formação de ligações dissulfeto intermoleculares). As quatro ligações dissulfeto por dímero de  $\beta$ -Lg reagem para formar as ligações intermoleculares que mantêm a integridade estrutural do polímero e aumentam a estabilidade da proteína pela diminuição de sua entropia. A quebra das ligações dissulfeto ou o aquecimento aumentam a susceptibilidade da  $\beta$ -Lg ao ataque pela pepsina e quimotripsina (Morr e Ha, 1993).

#### **2.1.1.2. $\alpha$ -Lactoalbumina ( $\alpha$ -La)**

A  $\alpha$ -La, com massa molar de aproximadamente 14 kDa (123 resíduos de aminoácidos), está presente no soro de queijo em concentrações na faixa de 1,0-1,5g/L e representa aproximadamente 20% do total das proteínas. É uma proteína esferoidal e tem uma estrutura globular altamente compacta com quatro ligações dissulfeto intramoleculares (Morr e Ha, 1993).

Até 1977 a  $\alpha$ -La era considerada como a proteína do soro mais estável ao calor. No entanto, pesquisas subseqüentes revelaram que esta estabilidade era aparente, pois a proteína tinha a capacidade de se renaturar quase que completamente mediante resfriamento ou ajuste de pH, após sua exposição à alta temperatura (acima de 62°C). A porcentagem de renaturação dependia do tempo e da temperatura de exposição.

Esta proteína liga-se a íons Ca<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> e outros metais. A  $\alpha$ -La ligada ao íon Ca<sup>+2</sup> estabiliza sua conformação em uma estrutura complexa. A remoção deste íon torna-a mais susceptível à desnaturação pelo calor, e reduz sua habilidade de renaturação por resfriamento (Morr e Ha, 1993).

#### **2.1.1.3. Soro Albumina Bovina (SAB)**

A proteína soro albumina, com massa molar de 66 kDa, é constituída por 582 resíduos de aminoácidos, estando presente no soro em concentrações de 0,1 a 0,4g/L.

Esta proteína possui 17 ligações dissulfeto intramoleculares e um grupo SH livre no resíduo 34. É uma proteína de transporte de ácidos graxos insolúveis do sistema circulatório sanguíneo. A ligação a ácidos graxos estabiliza a molécula de proteína contra a desnaturação térmica. A quebra das ligações dissulfeto expõe os grupos hidrofóbicos para a fase aquosa, melhorando sua habilidade de emulsificação. A temperaturas de 40 a 45°C já se observa precipitação desta proteína, devido ao desdobramento parcial da molécula, e em pH 4 desnatura-se totalmente, devido à repulsão mútua dos resíduos de aminoácidos positivamente carregados ao longo da cadeia polipeptídica. A molécula de SAB é mais compacta na região carboxi-terminal do que na região amino-terminal, diferenciando-se em hidrofobicidade, carga líquida e habilidade de formar ligações com ligantes (Morr e Ha, 1993).

#### **2.1.1.4. Imunoglobulinas (Ig)**

As imunoglobulinas pertencem à família heterogênea das glicoproteínas, alcançando uma massa molar de 15 a 1000 kDa. As Ig têm sido identificadas no leite e no plasma sanguíneo. Todas as imunoglobulinas são monômeros ou oligômeros de moléculas constituídas por quatro cadeias polipeptídicas: duas leves (MM 20kDa) e duas pesadas (MM 50-70KDa), que estão ligadas por pontes dissulfeto. A estrutura contém ainda um número variável de pontes dissulfeto intramolecular. Existem três classes gerais de imunoglobulinas: IgG (G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>); IgA e IgM (Sgarbieri, 1996).

O soro do leite bovino contém de 0,6 a 1,0 g/L de Ig. Em comparação com a  $\alpha$ -La e a  $\beta$ -Lg, as imunoglobulinas desnaturam-se em temperaturas mais elevadas, mas na presença de outras proteínas do soro são extremamente termolábeis, devido à interação com  $\beta$ -Lg e SAB por meio de ligações dissulfeto (Morr e Ha, 1993).

#### **2.1.2. Utilização do soro**

Proteínas do soro são brandas quanto ao sabor e, comparadas às caseínas, têm menos *flavour* de leite e menor tendência a mascarar sabores adicionados a iogurtes e a bebidas lácteas, por exemplo. Melhorias adicionais no sabor resultam quando as proteínas do soro substituem o amido ou outro emulsificante adicionado a estes produtos. Tradicionalmente, derivados do soro têm sido utilizados por motivo de redução de custos, mas também se deve levar em conta o real benefício da adição dos derivados do soro em

certos alimentos: enriquecimento do valor nutricional e melhorias na textura, *flavour*, viscosidade e propriedades nutricionais.

Elas possuem aminoácidos essenciais, são facilmente digeridas e são consideradas altamente nutricionais e fisiologicamente completas. O alto conteúdo de aminoácidos essenciais as torna de interesse para a indústria alimentícia, por poderem ser utilizadas para aumentar o valor nutricional de alimentos (Ponsano *et al.*, 1992).

Na Tabela 2.2 apresenta-se a composição de aminoácidos em concentrados de proteínas do soro e o número de resíduos nas principais proteínas.

As proteínas do soro possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas, tais como ovos, leite, carne bovina, soja e caseína. O uso dessas proteínas como ingredientes em alimentos funcionais lácteos e não-lácteos está aumentando progressivamente, conforme tem aumentado a capacidade tecnológica das indústrias de produzir concentrados de proteínas do soro (CPS), isolados de proteínas totais ou, mais recentemente, concentrados ricos em frações específicas de proteínas de soro. Essas proteínas vêm sendo usadas em larga escala em países desenvolvidos.

No Brasil, isso ainda não é freqüente em razão da falta de sofisticação dos laticínios. Para produzir o queijo, a maioria das fábricas promove a coagulação do leite por intermédio de um tratamento térmico, que também tem a função de combater as bactérias. Após a coagulação, obtém-se a caseína e o soro. No entanto, esse aquecimento praticamente elimina as propriedades funcionais das proteínas do soro, situação agravada pela adição de sal no início do processo. Em países economicamente mais desenvolvidos, a coagulação do leite é feita sem aquecimento e, deste modo, toda a funcionalidade das propriedades fisiológicas das proteínas nativas é preservada (Galvão, 2004).

As proteínas do soro possuem um alto valor nutricional, solubilidade numa larga escala de pH, ação gelificante e, estruturalmente, propriedades de retenção de água, ação emulsificante e capacidade de formação de “espumas”, o que lhes permite ampla aplicação na indústria alimentar.

Algumas alternativas de processo estão sendo estudadas, buscando uma maior valorização da parte protéica, que possui ótimas propriedades funcionais e nutricionais, com aproveitamento simultâneo de lactose. Silva (2000) fez um levantamento sobre o aproveitamento do soro láctico em varias formas: integral, concentrados e isolados não hidrolisados bem como modificados–hidrolisados. Esses últimos podem ser utilizados por incorporação em dietas para atletas e para pacientes fenilcetonúricos.



**Tabela 2.2:** Composição de aminoácidos em concentrados de proteínas do soro e número de resíduos nas principais proteínas (Adler-Nissen, 1986; Morr e Ha, 1993 *apud* Tardioli 2003).

	Composição de aminoácidos livres, g por 100 g de proteínas (N x 6,38)	Número de resíduos na $\beta$ -Lg	Número de resíduos na $\alpha$ -La	Número de resíduos na SAB
<b>Resíduos ácidos</b>				
Asp/Asn	12,30	15	21	54
Glu/Gln	20,41	25	13	79
<b>Resíduos hidrofóbicos volumosos</b>				
Val <sup>E</sup>	6,42	9	6	36
Leu <sup>E</sup>	14,01	22	13	61
Ileu <sup>E</sup>	6,92	10	8	14
Phe <sup>E</sup>	3,82	4	4	27
Tyr	3,50	4	4	19
Trp <sup>E</sup>	2,60	2	4	2
Pro	5,18	8	2	28
<b>Resíduos contendo enxofre</b>				
Met <sup>E</sup>	2,64	4	1	4
Cys	2,51	5	8	35
<b>Resíduos básicos</b>				
Lys <sup>E</sup>	11,20	15	12	59
Arg <sup>E</sup>	3,01	3	1	23
His <sup>E</sup>	2,05	2	3	17
<b>Resíduos neutros pequenos</b>				
Gly	1,92	4	6	16
Ala	6,11	15	3	46
Ser	4,76	7	7	28
Thr <sup>E</sup>	6,18	8	7	34
<b>No. De resíduos</b>	115,54	162	123	582

O sobrescrito *E* se refere aos aminoácidos essenciais

O soro líquido atualmente é muito utilizado no Brasil como alimentação animal, particularmente para suínos e bovinos. É um método prático para solucionar o problema de tratamento do efluente quando a área rural é próxima à indústria; caso contrário, o custo do transporte torna inviável essa aplicação (Silva, 2000). Quando concentrado, o soro

pode ser utilizado também para a produção de fermentados, e no cultivo de microrganismos em escala industrial e laboratorial (Ponsano *et al.*, 1992). Segundo Silva (2000), a indústria tem se esforçado muito durante os últimos 30 anos para desenvolver processos para a produção em escala comercial de concentrado protéico de soro (CPS) e de isolado protéico de soro (IPS) como ingredientes em alimentação para o homem e animais. Bhave (1991) comenta que a principal diferença entre CPS e IPS é a composição e afirma que IPS contém maiores concentrações de proteínas e proporcionalmente menores concentrações de lactose e de cinzas que CPS. Na produção deste, geralmente, emprega-se ultrafiltração como processo de separação de proteínas e lactose, enquanto para o IPS a cromatografia de troca iônica é utilizada após o processo de pré-concentração por microfiltração ou ultrafiltração. CPS e IPS, que contêm mais de 70% de proteínas (base mássica) são usados geralmente para fins farmacêuticos, médicos e alimentares (Hoch, 1997). Segundo esse autor, estudos têm mostrado que uma dieta de proteínas de soro pode reduzir a incidência de câncer de cólon. Missick (2000) apresenta algumas considerações sobre a redução de câncer de mama.

Os produtos hidrolisados derivados do soro láctico são melhor absorvidos pelo organismo do que as proteínas, já que os peptídeos resultantes da hidrólise são menores. Além disso, as proteínas do soro são ricas em aminoácidos essenciais. Quando combinadas com hidrolisados da albumina do ovo, por exemplo, fornecem uma fórmula ideal para desportistas que necessitam de reposição rápida de proteínas (Silva, 2000).

### **2.1.3 Hidrólise enzimática das proteínas do soro**

Aminoácidos livres e pequenos peptídeos com composições pré-definidas são desejáveis do ponto de vista nutricional. Podem ser obtidos sinteticamente ou a partir de hidrólise de proteínas. Tradicionalmente, emprega-se a hidrólise ácida, em reatores batelada, mas esse processo conduz a um produto de massa molar variado (Adler-Nissen, 1986).

Assim, quando se deseja obter um hidrolisado com perfil de tamanhos de peptídeos pré-definido, a hidrólise ácida convencional não é adequada. Para uma hidrólise controlada do soro é preciso recorrer à catálise enzimática.

A hidrólise enzimática apresenta grandes vantagens, pelas condições suaves de reação e pela especificidade das enzimas, que permite controlar a funcionalidade do produto final. Todavia, o alto custo e a baixa estabilidade operacional das proteases são problemas clássicos na implementação industrial de processos enzimáticos de proteólise. Esses problemas, contudo, podem ser superados pelo uso de enzimas imobilizadas.

Os hidrolisados das proteínas geralmente têm sabor amargo, o que pode ser um dos fatores limitantes para sua utilização na alimentação. A tendência para a proteína formar peptídeos amargos está relacionada com seu conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e a redução de sua concentração nos hidrolisados produzidos melhora o sabor do produto final (Adachi *et al.*, 1991).

Matoba e Hata (1972) *apud* Fitzgerald e O’Cuinn (2006) reportaram que a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos situados internamente conduz a um sabor amargo maior do que quando os resíduos hidrofóbicos estão localizados em uma posição N- ou C-terminal em peptídeos. A quantificação de amargor dos hidrolisados é usualmente feita através de um painel de avaliação sensorial (Spellman *et al.*, 2005).

A proteólise do soro leva a modificações que alteram ou evidenciam suas propriedades funcionais, aumentando assim suas aplicações. Essas modificações podem ser feitas por técnicas químicas, físicas ou enzimáticas. Nas modificações enzimáticas, as enzimas mais frequentemente utilizadas são as proteases, que hidrolisam ligações peptídicas seletivamente para promover a redução da massa molar, possíveis alterações na conformação e aumento da hidrofiliidade devido à exposição de grupos aminos e carboxílicos. Em geral os efeitos da proteólise no tamanho, estrutura e polaridade podem resultar em alterações drásticas nas capacidades funcionais da proteína. Propriedades específicas do hidrolisado vão depender do grau de hidrólise (que é influenciado pela atividade específica da protease), do caráter físico-químico do substrato protéico e das condições de reação (Soares, 1995).

A qualidade nutricional do hidrolisado protéico depende da proteína inicial, a qual determina a sua composição de aminoácidos, e também o conteúdo dos pequenos peptídeos (Silvestre, 1994). Além disso, para uma boa nutrição é desejável que os aminoácidos não estejam livres na composição, uma vez que eles tornam os produtos dietéticos hiperosmóticos, o que pode causar secreções intestinais e conseqüentemente diarreia. Os di- e tri-peptídeos são menos hipertônicos que as misturas de aminoácidos livres, e seu uso na alimentação enteral aumenta a eficácia de absorção e reduz os problemas osmóticos. Dessa forma, torna-se clara a importância do desenvolvimento de tecnologia para obtenção de um hidrolisado protéico constituído por pequenos peptídeos e com quantidades controladas de aminoácidos aromáticos (Soares, 1995). Assim, o conhecimento da seqüência dos aminoácidos na cadeia é importante para previsão dos possíveis produtos da hidrólise de proteínas por enzimas específicas.

A hidrólise controlada e sequencial de proteínas por enzimas como quimotripsina e carboxipeptidase A promove a liberação de aminoácidos aromáticos na solução, dentre os quais está a fenilalanina (Phe).

A remoção de aminoácidos aromáticos do hidrolisado protéico apresenta vantagens. A retirada de Phe, em especial, é de grande importância para produção de suplementos protéicos para fenilcetonúricos, que toleram apenas pequenas quantidades deste aminoácido na dieta (Lara, 1997).

Hidrolisados protéicos têm grande importância no tratamento de pacientes com distúrbios estomacais ou problemas na mucosa intestinal, bem como em lactentes desnutridos, com quadro alérgico na maioria dos casos. Nesses casos, deve-se ressaltar que as dietas não devem ser constituídas apenas por aminoácidos livres, pois, como já se mencionou, estas se tornariam hiperosmóticas, provocando secreção intestinal e diarreia, enquanto que di- e tripeptídeos seriam mais facilmente absorvidos.

Outros fatos já amplamente conhecidos relacionam-se a problemas de alergenicidade devido à presença no hidrolisado protéico, de proteínas e peptídeos de massa molar elevada e ao sabor amargo evidenciado durante a hidrólise (Saha e Hayashi, 2001), associado à hidrofobicidade das cadeias laterais e à fonte de proteína utilizada.

A inclusão de hidrolisados de proteínas em formulações específicas é uma área de interesse crescente. Os usos incluem aplicações clínicas, tais como produtos geriátricos, suplementos energéticos, controle de peso e dietas terapêuticas ou entéricas. Por causa de sua reduzida atividade antigênica, (Clemente, 2000), o uso de hidrolisados de proteínas para tratamento clínico de pacientes com distúrbios específicos de digestão, absorção e metabolismo de aminoácidos têm sido estendidos para pacientes desnutridos, em quadros de câncer, traumas e queimaduras, e encefalopatias hepáticas.

Na Tabela 2.3 apresenta-se o resumo dos principais usos dietéticos de hidrolisados de proteínas na nutrição humana.

**Tabela 2.3:** Usos dietéticos dos hidrolisados de proteínas na nutrição humana

<b>Suplementação de proteínas</b>	<b>Uso clínico</b>
Bebidas energéticas Produtos geriátricos Produtos para nutrição de esportistas Produtos dietéticos para controle de peso	Fenilcetonúria Formulas infantis hipoalérgicas Doença aguda e crônica de fígado Síndrome de Bowel Doença de Crohn Pancreatite Colite ulcerativa

(Clemente, 2000)

#### 2.1.4. Fenilcetonúria

A Fenilcetonúria, PKU (abreviatura de *Phenylketonuria* em inglês) como é mundialmente conhecida, é uma doença metabólica, transmitida geneticamente de forma autossômica recessiva, é o mais comum dos erros congênitos do metabolismo de aminoácidos e afeta aproximadamente 1 em cada 12.000 recém-nascidos no Brasil (<http://www.fcf.usp.br/fenilcetonuricos/>, 25/11/06). Essa doença é causada pela deficiência, em diferentes graus, da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase hepática, que converte a fenilalanina (Phe) em tirosina, sendo o acúmulo de Phe no sangue o responsável por danos no cérebro. Por enquanto, a PKU não é curável por via medicamentosa, mas é possível tratá-la por meio de dieta específica, desde que o diagnóstico seja feito precocemente, evitando assim as graves conseqüências sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central da criança.

Após triagem realizada nos recém-nascidos, o chamado "Teste do Pezinho", os bebês acometidos são diagnosticados e submetidos imediatamente a uma dieta especial, pobre em Phe. Com o programa de triagem, obrigatório em todo o Brasil desde 1990, (Lei 8069 de 13/07/90 - Estatuto da Criança e do Adolescente), a PKU pode ser diagnosticada e tratada, possibilitando à criança fenilcetonúrica um desenvolvimento normal, sem as seqüelas neurológicas graves causadas por esta doença (<http://www.fcf.usp.br/fenilcetonuricos/>, 25/09/06).

Atualmente, um grande número de países realiza teste de triagem neonatal para fenilcetonúria, e os primeiros pacientes tratados desde o período neonatal já atingiram a idade adulta. O tratamento dietético adequado permite que os indivíduos afetados tenham um desenvolvimento normal.

O portador de PKU raramente apresenta sinais ou sintomas ao nascimento, sendo, portanto, quase impossível o diagnóstico pelo exame médico. Geralmente, a PKU se manifesta nas primeiras semanas ou nos primeiros meses de vida, quando o tratamento precoce não é realizado.

Os sinais e sintomas gerais mais freqüentes da doença não tratadas são: vômitos, eczemas, dermatites, *rash* cutâneo, cheiro característico na urina e no suor (urina de rato), pele mais branca com olhos e cabelos mais claros que os da família.

Entre as manifestações neurológicas destacam-se: irritabilidade, choro freqüente, hiperatividade, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e linguagem, convulsões, hipertonia, hipotonia, microcefalia, tremores e principalmente deficiência mental.

Três formas de apresentação metabólicas são reconhecidas e classificadas de acordo com o percentual de atividade enzimática encontrado:

- Fenilcetonúria Clássica: quando a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase é praticamente inexistente (atividade inferior a 1%) e, conseqüentemente, os níveis plasmáticos encontrados de Phe são superiores a 20 mg/dl.

- Fenilcetonúria Leve: quando a atividade da enzima é de 1 a 3% e os níveis plasmáticos de Phe encontram-se entre 10 e 20 mg/dl.

- Hiperfenilalaninemia Transitória ou Permanente: quando a atividade enzimática é superior a 3% e os níveis de Phe encontram-se entre 4 e 10 mg/dl; esta situação é considerada benigna, não ocasionando qualquer sintomatologia clínica (Scriver *et al.*, 2001).

O tratamento consiste basicamente de uma dieta com baixo teor de Phe, porém com níveis suficientes deste aminoácido para promover crescimento e desenvolvimento adequados. Se instituída uma dieta isenta de Phe, poder-se-ia causar uma "Síndrome da Deficiência", caracterizada por eczema grave, prostração, ganho de peso insuficiente levando à desnutrição, além de deficiência mental e crises convulsivas (Martins *et al.*, 1993).

Além da fórmula de aminoácidos, os pacientes recebem as seguintes orientações:

- Os lactentes recebem fórmulas especiais e a elas pode ser adicionado leite integral modificado com a menor quantidade de Phe possível.

- Amamentação materna pode ocorrer desde que exista controle semanal da Phe sangüínea.

- A introdução de outros alimentos deve ocorrer aos quatro meses de idade, utilizando-se alimentos que contenham baixos teores de Phe, tais como vegetais e frutas, sempre com controle diário da quantidade permitida de ingestão de Phe.

O tratamento dietoterápico evita o retardo cerebral se introduzido até o terceiro mês de vida do recém-nascido (Trefz *et al.*, 1993), e previne o estabelecimento do retardo em fetos de mães portadoras de hiperfenilalaninemias. Este tipo de tratamento foi proposto por Bickel *et al.* (1953), que utilizaram hidrolisado ácido de caseína com baixo teor de Phe como dietoterapia para os portadores de PKU.

Os produtos utilizados no tratamento da fenilcetonúria são complementos alimentares - fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. A característica básica dos produtos é a muito baixa concentração de fenilalanina - não superior a 0,1 g de fenilalanina por 100g de produto. São fórmulas lácteas, ou soluções que permitem a formulação láctea, cujo propósito é a reposição dos aminoácidos essenciais (todos, com exceção da Phe) que são

retirados da dieta instituída para o paciente. Alimentos ricos em Phe são eliminados da dieta e as fontes de aminoácidos essenciais passam a ser controladas através do fornecimento dessa fórmula especial de aminoácidos (Tierney Jr., 2001). Essa reposição permite que o paciente mantenha o desenvolvimento somático e neurológico adequados apesar da importante restrição dietética que lhe será imposta.

Os produtos normalmente são liofilizados e devem ser reconstituídos com água de acordo com a quantidade a ser consumida (a cada consumo, deve ser preparado conforme as orientações do nutricionista que acompanha o caso).

Diversas pesquisas confirmam a necessidade de haver um controle rigoroso da dieta até no mínimo a adolescência. Mas, atualmente, recomenda-se a continuidade do tratamento pela vida inteira, conforme documento publicado em outubro de 2000 pelo *National Institute of Health* dos EUA (<http://www.fcf.usp.br/fenilcetonuricos/>, 25/09/06). Nele recomenda-se a manutenção dos níveis de Phe plasmáticos entre 2-6 mg/100 mL até a criança atingir 12 anos de idade. Após essa idade, sugerem-se níveis de Phe entre 2-10 mg/100mL durante toda a vida.

Segundo a Portaria N° 847 de 31/10/2002 da Secretaria de Assistência à Saúde do Brasil, essa dieta deve ser individualizada, sendo calculada para cada paciente, pois a tolerância à Phe varia de acordo com a idade, peso e grau de deficiência enzimática. O cálculo inicial baseia-se na quantidade de proteínas necessárias para a faixa etária, de acordo com a Tabela 2.4. Usualmente a dieta deve conter entre 250 e 500 mg de Phe/dia.

**Tabela 2.4:** Recomendação diária de proteína e de fenilalanina na dieta

Idade Anos	Recomendação de Proteína		Recomendação de Phe	
	g/kg	g/dia	mg/kg	mg/g <sub>proteína</sub>
0 - 0,5	2,5	-	20 - 70	8 - 28
0,5 - 1	2,2	-	15 - 50	7 - 23
1 - 4	-	25	15 - 40	10 - 20*
4 - 7	-	30	15 - 35	8 - 17*
7 - 11	-	35	15 - 30	7 - 14*
11 - 15	-	45 - 50	15 - 30	5 - 11*
15 - 19	-	45 - 55	15 - 30	5 - 11*

\* Valores calculados segundo a faixa 250 - 500 mg<sub>Phe</sub>/dia

Esse tratamento dietético é caro e atualmente são poucos os produtos disponíveis no mercado. Por exemplo, dois produtos (misturas de aminoácidos livres de Phe), da Mead e Johnson Ltda., importados, mas com representantes no Brasil são: Lofenalac e

Phenylfree, custando nos EUA, respectivamente, US\$ 293,00/Kg e 312,00/Kg ([www.meadjohnson.com](http://www.meadjohnson.com), 03/09/06).

### 2.1.5. Características dos aminoácidos

Aminoácidos são os monômeros constituintes das moléculas de proteínas, que desempenham um papel importante no metabolismo dos organismos vivos, e são essenciais na promoção do crescimento. Têm papel relevante no valor nutritivo dos alimentos, uma vez que contribuem diretamente para seu sabor e são precursores de vários compostos que se formam durante a preparação, armazenagem e confecção culinária. Aminoácidos são moléculas com superfícies ativas, sendo que cada aminoácido tem uma cadeia de hidrocarboneto e dois (ou três) grupos hidrofílicos (um grupo amina e um carboxílico). Ele pode ser catiônico, a pH baixo, isoeletrico a pH próximo do neutro e aniônico a pH alto.

Em soluções aquosas os aminoácidos estão ionizados e podem agir como ácidos ou bases. O conhecimento das propriedades ácido-base dos aminoácidos é extremamente importante no entendimento das propriedades físicas e químicas das proteínas. Além disso, a tecnologia de identificar, separar e quantificar os diferentes aminoácidos, passos necessários na determinação da composição e seqüência de aminoácidos das moléculas protéicas, está baseada no seu característico comportamento ácido-base.

Através da hidrólise das proteínas obtêm-se 20 aminoácidos diferentes, dos quais dezenove são  $\alpha$ -aminoácidos, ou seja, o grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) está ligado ao átomo de carbono adjacente ao grupo carboxila. A fórmula geral é  $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ , em que R (cadeia lateral) é um H, no caso da glicina, ou um grupo alifático, aromático ou heterocíclico nos aminoácidos restantes. A única exceção a esta fórmula geral é a prolina, pois o grupo  $\text{NH}_2$  é incorporado em uma estrutura cíclica de cinco carbonos. Cada aminoácido é designado, em regra, abreviadamente por três letras – com base nas primeiras três letras do seu nome.

De acordo com Lehninger *et al.* (1995), os aminoácidos podem ser classificados de acordo com as características de seus grupos R em: *alifáticos não polares* (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e prolina), *polares não carregados* (serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina e glutamina), *aromáticos* (fenilalanina, tirosina, e triptofano), *carregados positivamente* (lisina, arginina e histidina) e *carregados negativamente* (aspartato e glutamato).

Na tabela 2.5 apresentam-se as propriedades e convenções associadas aos 20 aminoácidos naturais.



**Tabela 2.5:** Propriedades e convenções associadas aos 20 aminoácidos naturais

Aminoácido	KJ/mol <sup>(1)</sup>	Massa Molar	pK <sub>1</sub> (-COOH)	pK <sub>2</sub> (-NH <sub>3</sub> )	pK <sub>R</sub> (grupo R)	pI <sup>(2)</sup>
Triptofano, Trp, W	15,83	204	2,38	9,39	-	5,89
Isoleucina, Ileu, I,	13,23	131	2,36	9,68	-	6,02
Fenilalanina, Phe, F	12,05	165	1,83	9,13	-	5,48
Prolina, Pro, P	11,63	115	1,99	10,96	-	6,48
Tyrosina, Tyr, Y	11,21	181	2,20	9,11	10,07	5,66
Leucina, Leu, L	9,11	131	2,36	9,60	-	5,98
Valina, Val, V	7,85	117	2,32	9,62	-	5,97
Metionina, Met, M	7,01	149	2,28	9,21	-	5,74
Lisina, Lys, K	6,89	146	2,18	8,95	10,53	9,74
Cisteína, Cys, C	6,38	121	1,96	8,18	10,28	5,07
Alanina, Ala, A	3,65	89	2,34	9,69	-	6,01
Histidina, His, H	3,65	155	1,82	9,17	6,00	7,59
Arginina, Arg, R	3,57	174	2,17	9,04	12,48	10,76
Glutamato, Glu, E	2,84	147	2,19	9,67	4,25	3,22
Aspartato, Asp, D	2,77	133	1,88	9,60	3,65	2,77
Glicina, Gly, G	0,42	75	2,34	9,60	-	5,97
Asparagina, Asn, N	0,38	132	2,02	8,80	-	5,41
Serina, Ser, S	0,29	105	2,21	9,15	13,60	5,68
Treonina, Thr, T	0,29	119	2,11	9,62	13,60	5,87
Glutamina, Gln, Q	0,00	146	2,17	9,13	-	5,65

<sup>1</sup>Escala de hidrofobicidade de aminoácidos expressa como a energia livre de transferência destes, a partir de etanol ou dioxano, para a água (Rehm e Reed, 1993).

<sup>2</sup>Posto isoelétrico.

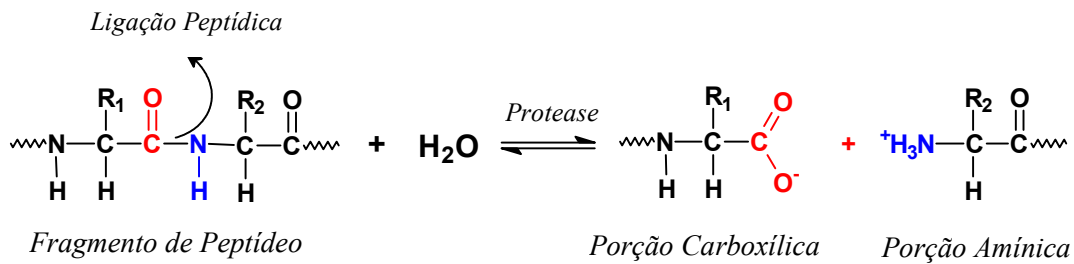
## 2.2. Enzimas Proteolíticas

Enzimas são proteínas globulares com atividade catalítica altamente específica que funcionam em condições moderadas de pH, temperatura e pressão.

O uso de enzimas proteolíticas na indústria alimentícia objetiva alterar o tamanho nas cadeias peptídicas, eventualmente separando aminoácidos indesejáveis.

As proteases são enzimas específicas cuja principal atividade é catalisar hidrólises de proteínas. Diferem entre si por sua especificidade, sítio ativo e mecanismo catalítico.

Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com um grupo carbonil peptídico e a ligação com o grupo amino do aminoácido seguinte é rompida - Figura 2.1.



**Figura 2.1:** Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease (Tardioli, 2003).

Historicamente, a proteólise enzimática tem sido associada às proteínas digestivas, como por exemplo, a tripsina e a quimotripsina. As proteases digestivas das secreções pancreática e gástrica estão entre as enzimas mais bem caracterizadas. De fato, muito do conhecimento da estrutura das proteínas e da função das enzimas deriva do estudo dessas proteases. Investigações da cinética, especificidade e inibição, junto com análises detalhadas da seqüência dos aminoácidos e raios-X da estrutura, têm levado à identificação de seus componentes e da geometria de seus sítios ativos, permitindo a dedução de seu mecanismo de ação. As enzimas proteolíticas são também a maior ferramenta na análise da seqüência de proteínas e na identificação e isolamento das proteínas multifuncionais mais complexas (Beynon e Bond, 1989).

Atualmente, as proteases são classificadas por meio de um sistema racional baseado na comparação dos sítios ativos, mecanismo de ação e estrutura tridimensional. A Tabela 2.6 apresenta as quatro classes mecanísticas reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica.

**Tabela 2.6:** Classes de enzimas proteolíticas

Classe	Protease(s) representativa(s)
Serina Protease I	Quimotripsina Tripsina Elastase Kallkrein Pancreática
Serina Protease II	Subtilisina (Alcalase <sup>®</sup> )
Cisteína Protease	Papaína
Protease Aspártica	Actinidina Penicilopepsina Proteases Ácidas Renina
Metalo-Protease I	Carboxipeptidase A Bovina
Metalo-Protease II	Termolisina

(Beynon e Bond, 1989 *apud* Galvão, 2000)

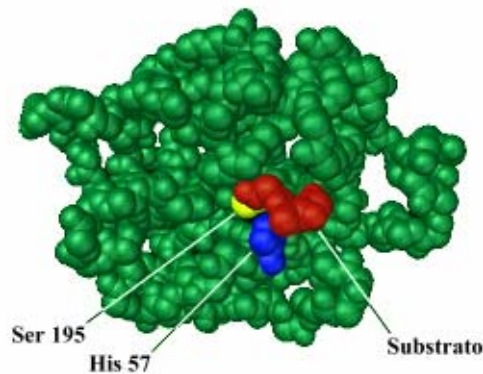
As serinas proteases incluem duas famílias distintas: as serinas proteases dos mamíferos (como quimotripsina, tripsina e elastase) e as serinas bacterianas (como a subtilisina). Elas diferem na seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional, apesar de apresentarem em comum a geometria do sítio ativo e o mecanismo enzimático (Beynon e Bond, 1989).

Duas enzimas são estudadas neste trabalho: a quimotripsina que pertence à classe das *serina-proteases I* e é produzida no pâncreas de animais e a carboxipeptidase A, que é uma exopeptidase e, portanto, remove aminoácidos do final das cadeias peptídicas.

### 2.2.1. Quimotripsina

A protease quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) tem massa molar 24,5 kDa e é sintetizada pelas células pancreáticas na forma inativa de quimotripsinogênio. Possui pH ótimo igual a 8,0, no qual sua atividade é máxima, e uma temperatura ótima de operação de 40°C, sem sofrer, contudo, inativação por mudanças conformacionais na estrutura terciária do seu sítio ativo (Galvao, 2004).

Seu sítio ativo possui a característica tríade catalítica, representada pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp). Esta enzima catalisa, preferencialmente e com maior velocidade, a ruptura de proteínas em enlaces peptídicos específicos das cadeias laterais hidrofóbicas e volumosas de fenilalanina, tirosina e triptofano (Blow *et al.*, 1971 *apud* Sanchez, 1995), embora também catalise a síntese de peptídeos (Bizzozero *et al.*, 1988 *apud* Sanchez, 1995), esterificação de aminoácidos e síntese de hidrazidas (Ono *et al.*, 1978 *apud* Sanchez, 1995). A estrutura tridimensional da quimotripsina está mostrada na Figura 2.2.



**Figura 2.2:** Estrutura tridimensional da quimotripsina com destaque para o substrato posicionado no sítio ativo da enzima e dois dos resíduos (Ser-195 e His-57) que compõem sua tríade catalítica (Lehninger e Cox, 2000).

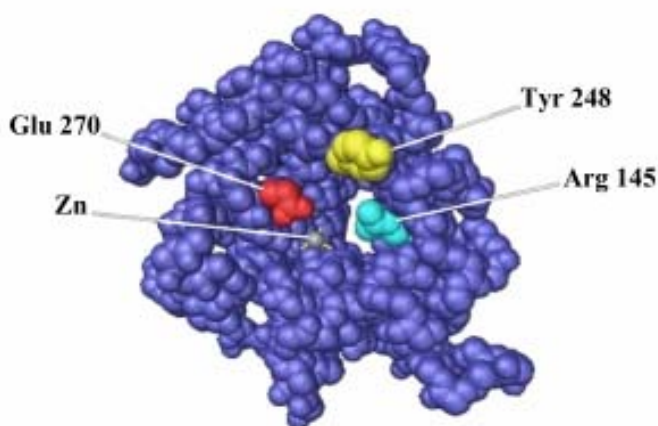
A reação enzimática da quimotripsina tem duas fases principais: acilação, na qual a ligação peptídica é clivada e uma ligação éster é formada entre o carbono carbonila do peptídeo e o resíduo serina do sítio catalítico da enzima; e deacilação, na qual a ligação éster é hidrolisada e a enzima regenerada (Lehninger *et al.*, 1995).

### 2.2.2. Carboxipeptidase A

Este item teve como referência primordial Tardioli, 2003, cuja descrição do mecanismo catalítico da CPA, feita com grande detalhe, será importante para a análise dos resultados obtidos nesta tese.

A carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase com massa molar de 34,5 kDa, pertencente à classe das metaloproteases, pois possui um íon zinco fortemente ligado cujo papel é de fundamental relevância na sua atividade catalítica. Formada por uma única cadeia polipeptídica contendo 307 aminoácidos, esta protease catalisa a hidrólise de

ligações peptídicas nas quais não estejam presentes como resíduos carboxi-terminais a arginina, lisina ou prolina (Whitaker, 1994). A Figura 2.3 mostra a estrutura tridimensional da carboxipeptidase A.



**Figura 2.3:** Estrutura tridimensional da carboxipeptidase A com destaque para o íon zinco e resíduos que participam do processo catalítico desta enzima (Lehninger e Cox, 2000).

Segundo Abeles *et al.* (1996), a carboxipeptidase A remove rapidamente os aminoácidos aromáticos carboxi-terminais tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp), mas também e com menor velocidade os aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos volumosos, tais como leucina (Leu), isoleucina (Ile), metionina (Met), treonina (Thr), glutamina (Gln), histidina (His), alanina (Ala) e valina (Val). Além desses, Amber (1972) declara que a carboxipeptidase A também remove, lentamente, asparagina (Asn), serina (Ser) e lisina (Lys), e muito lentamente glicina (Gly), aspartato (Asp) e glutamato (Glu).

Na Figura 2.3, observa-se que o íon  $Zn^{2+}$  está coordenado com três resíduos de aminoácidos, His<sup>196</sup>, His<sup>69</sup> e Glu<sup>72</sup> e uma molécula de água; entretanto dependendo do tamanho e da natureza do substrato, este íon pode também interagir com Arg<sup>71</sup>, Tyr<sup>198</sup> e Phe<sup>279</sup> (Whitaker, 1994; Stryer, 1996). De acordo com Whitaker (1994) o íon  $Zn^{2+}$  pode ser removido por fortes agentes quelantes, como EDTA e 1,10-fenantrolina, e substituído por  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ou  $Pb^{2+}$ . No entanto, a enzima não terá atividade igual à original.

### 2.2.3. Mecanismo catalítico da carboxipeptidase A

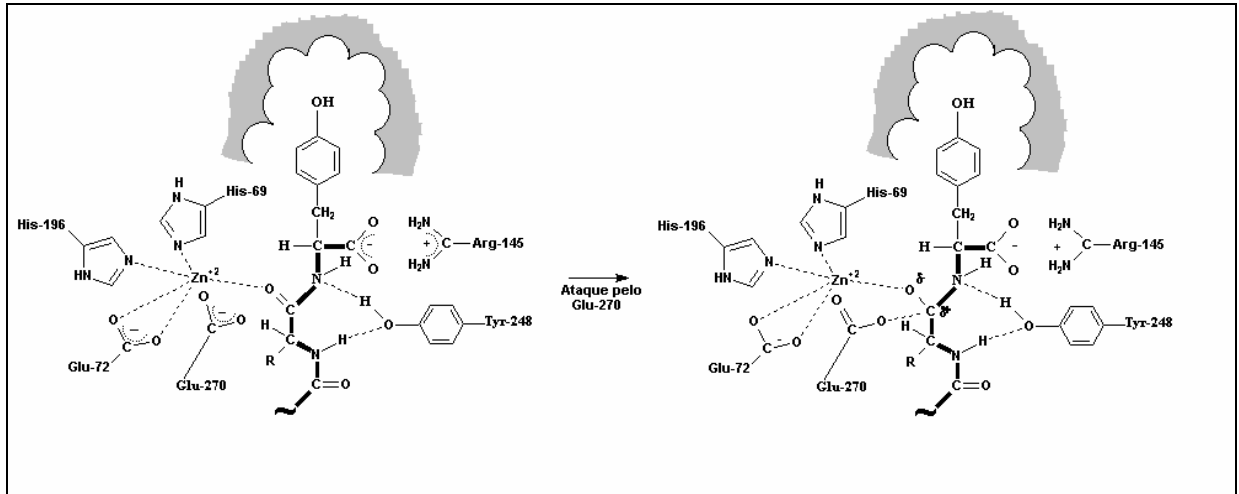
O mecanismo descrito a seguir é um compêndio baseado em informações apresentadas por Stryer, 1996; Whitaker, 1994; e Suckling, 1985 *apud* Tardioli, 2003.

a) A cadeia lateral do resíduo carboxi-terminal a ser liberado liga-se a uma “bolsa hidrofóbica” expulsando moléculas de água (pelo menos quatro moléculas). Essa interação hidrofóbica é a base da preferência desta enzima por cadeias laterais aromáticas ou alifáticas volumosas.

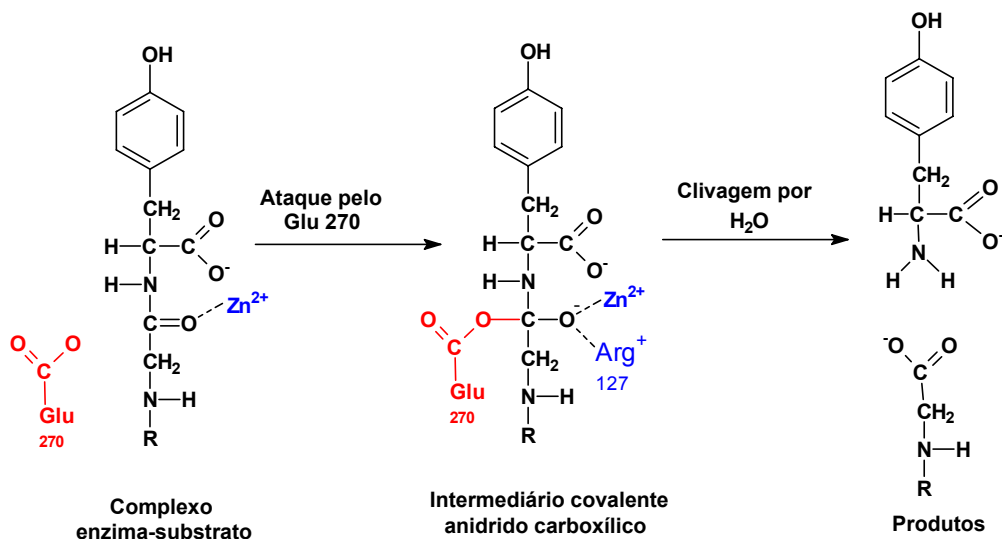
O oxigênio carbonílico da ligação peptídica susceptível coordena-se com o íon zinco, que atua como um ácido de Lewis e polariza o grupo carbonila da ligação peptídica susceptível, facilitando o ataque no átomo de carbono polarizado pelo grupo carboxílico do glutamato-270, ou por uma molécula ativada de água.

Grandes mudanças conformacionais ocorrem na etapa de ligação do substrato como observado na Figura 2.4. O grupamento guanidina da arginina-145 move-se 2 Å para se ligar ionicamente ao grupo carboxilato terminal do substrato. O grupo hidroxila da tirosina-248 move-se 12 Å (aproximadamente  $\frac{1}{4}$  do diâmetro da molécula de enzima, a maior mudança conformacional observada), a partir da superfície da molécula, para formar uma ligação de hidrogênio com o NH da ligação peptídica susceptível, e uma ligação com o NH da penúltima ligação peptídica. Este movimento tem uma importante consequência, o fechamento da cavidade do sítio ativo, expulsando a água. E finalmente, o movimento de 2 Å do grupo carboxilado do glutamato-270.

b) O mecanismo catalítico proposto para CPA esta representado na Figura 2.5. O glutamato-270 forma um anidrido com o átomo de carbono polarizado ( $C^{\delta+} \dots O^{\delta-} \dots Zn^{2+}$ ) da ligação peptídica susceptível ou promove o ataque de uma molécula de água sobre esse átomo de carbono polarizado. A carga negativa do átomo de oxigênio no intermediário tetraédrico é estabilizada por uma interação eletrostática com a cadeia lateral, carregada positivamente, da arginina-127, que se moveu para uma posição estratégica próxima. O substrato ligado é envolvido por todos os lados pelos grupamentos catalíticos da enzima ( $Zn^{2+}$ , Glu-270, Arg-127, Arg-145, Tyr-248). O intermediário anidrido carboxílico formado torna a ligação cindível pronta para o ataque por uma molécula de água que está ligada ao  $Zn^{2+}$ . A molécula de água altamente polarizada transfere um próton para o grupamento NH, quebrando a ligação cindível.



**Figura 2.4:** Complexo enzima-substrato (carboxipeptidase A-peptídeo com tirosina carboxi-terminal), mostrando as interações entre os resíduos do sítio ativo da enzima e o substrato a ser clivado (Suckling, 1985 *apud* Tardioli, 2003)



**Figura 2.5:** Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a carboxipeptidase A. O glutamato-270 ataca o carbono da carbonila da ligação cindível, formando um intermediário covalente anidrido misto (Stryer, 1992 *apud* Tardioli, 2003).

### 2.3. Imobilização de Enzimas

Este item teve como principal referência Galvão, 2004, cuja descrição do processo de imobilização multipontual, feita com grande detalhe, serviu de base para esta parte deste trabalho.

A técnica de imobilização de enzimas é amplamente conhecida e pode ser definida como sendo o confinamento físico dessas estruturas ou sua localização em certa região definida do espaço com manutenção de sua atividade catalítica.

Utilizar enzimas a temperaturas maiores que as biológicas é importante para acelerar a velocidade de reação enzimática e reduzir riscos de contaminação do meio reacional por bactérias. Contudo, pode implicar desnaturação da enzima, o que também ocorre por variação do pH. Neste contexto, inúmeras técnicas de imobilização vêm sendo desenvolvidas com o intuito de aumentar a estabilidade térmica das enzimas (Kennedy, 1987).

A imobilização em suportes sólidos insolúveis é uma técnica amplamente conhecida e estudada na literatura. Esta estratégia permite a insolubilização da enzima através de sua fixação a um suporte sólido insolúvel sendo possível, assim, reutilizá-la e manter o meio reacional com altas concentrações do catalisador. Essas vantagens tornam a tecnologia de imobilização de enzimas muito atrativa para fins industriais.

A imobilização de enzimas sobre suportes insolúveis amplia a opção de reatores para o processo, facilita sua operação e controle, permite utilização do catalisador por períodos prolongados de tempo, soluciona a questão da recuperação e aumenta a estabilidade operacional das enzimas. Contudo, a imobilização também pode implicar perda ou redução da atividade por unidade de volume, limitação difusional e custo adicional de preparação do catalisador (Kennedy *et al.*, 1988).

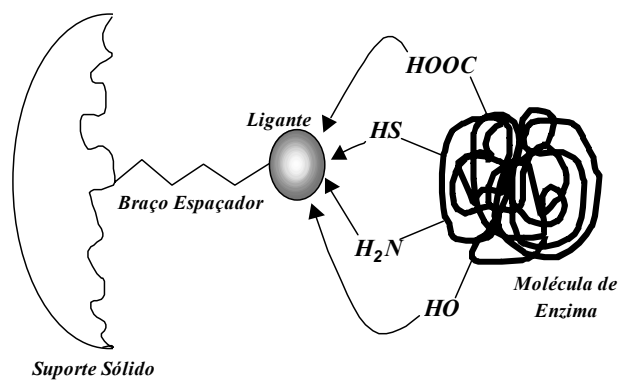
A imobilização de enzimas pode ocorrer através de três principais métodos: i) confinamento ou simplesmente aprisionamento físico; ii) ligação cruzada, onde se observa o estabelecimento de ligações químicas entre duas moléculas de enzima e iii) ligação da enzima a um suporte sólido, que pode se dar via adsorção física ou ligação química (iônica, metálica ou covalente).

Na literatura até o momento têm sido descritos vários protocolos para imobilização reversível de proteínas. Dentre eles, o mais antigo é a adsorção em resinas de troca iônica (principalmente de troca aniônica). As enzimas imobilizadas em tais resinas geralmente podem ser completamente desorvidas das matrizes quando submetidas a força iônica de baixa a moderada, e também em resposta a alterações no pH durante a reação. No entanto, atualmente, a imobilização via adsorção reversível em suportes porosos rígidos contendo alta densidade de trocadores iônicos tem sido proposta como método adequado para imobilização reversível, em consequência do surgimento de interações muito fortes. Desta forma, se a imobilização covalente não é possível ou necessária, a imobilização reversível



torna-se uma possibilidade muito atraente quando a estabilidade da enzima já é adequada para o processo em questão (Pessela *et al.*, 2003).

Na ligação covalente, por sua vez, o suporte ativado se combina quimicamente a grupos funcionais da enzima (grupos amino terminais ou resíduos de lisinas; grupos carboxílicos de resíduos aspartato e glutamato; fenólicos de tirosina; tióis de cisteína; hidroxilas de serina, tirosina e treonina; imidazóis de histidina; e indóis de triptofano) não essenciais para a atividade catalítica (Figura 2.6). A escolha depende dos grupos reativos disponíveis no suporte.



**Figura 2.6:** Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado (Galvão, 2004).

### 2.3.1. Suportes para imobilização de enzimas

As características principais a serem observadas na escolha de um suporte adequado para determinada aplicação são: área superficial, porosidade, insolubilidade, regenerabilidade, morfologia, composição, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, dentre outras.

Fundamentalmente, os suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. Conforme sua composição se classificam em: *orgânicos* (naturais e sintéticos) e *inorgânicos* (minerais e fabricados).

Os suportes também podem ser classificados conforme sua morfologia: em *porosos* que têm grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima, que neste caso fica protegida de turbulência externa; *não-porosos* que eliminam a resistência à transferência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível para a ligação da enzima; e os com *estrutura de gel*, que são de uso simples, mas com utilização

direta (sem etapa prévia de ativação, ou seja, imobilizando a enzima por encapsulamento) apenas nos casos em que a grade formada é de malha suficiente para reter a proteína sem implicar restrições difusionais sérias para o substrato (Cardias, 1996).

No processo de imobilização sobre suportes porosos a morfologia do poro é de fundamental importância, pois ele deve ser suficientemente grande para permitir tanto a acomodação da enzima quanto o livre acesso do substrato. Todavia, quanto maior o poro menor a área superficial do suporte. A imobilização feita na área interna dos poros de um suporte insolúvel (gel, sílica, etc.) resulta em grande área superficial disponível, mas também implica possíveis restrições difusionais para entrada de reagentes e saída de produtos. No caso da hidrólise de proteínas, este é um problema particularmente importante, pois os substratos são macromoléculas, ou seja, proteínas com massa molar elevada (Galvão, 2004).

São poucos os suportes que contêm grupos reativos que permitam acoplamento direto da enzima, necessitando, na maioria das vezes, de uma etapa inicial de ativação. Os reagentes mais comumente utilizados como agente ativante de suportes são o brometo de cianogênio e reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos.

Para ativação de suportes com grupos aldeído o reagente utilizado é o glicidol (2,3-epoxi-propanol). Esse reagente produz grupos aldeídos alifáticos bastante estáveis, reativos e disponíveis para o estabelecimento de enlaces com grupos aminos desprotonados dos resíduos de lisinas da molécula de enzima, possibilitando a formação de várias ligações covalentes enzima-suporte em pH alcalino. As ligações da enzima imobilizada com os grupos aldeídos gerados na superfície do suporte ativado tornam a molécula de enzima imobilizada mais rígida e, conseqüentemente, mais resistente à inativação induzida por altas temperaturas, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (Guisán, 1988).

#### **2.3.1.1. Gel de agarose**

O ágar, também conhecido como *agarose* é um polímero natural obtido a partir diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas constituídas por duas frações: a agarose e a agarpectina. Suas características não dependem unicamente das algas utilizadas, mas também da época da coleta, do local e do método de extração (Painter, 1985 *apud* Fernandez-Sanchez, 2000). A agarose é formada pela repetição de aproximadamente 400 unidades de agarobiose, com massa molar em torno de 120kDa.

As principais vantagens de se utilizar os géis de agarose são: a) estabilidade mecânica; b) grande área superficial (agarose 6B-CL: 25 m<sup>2</sup>/mL de gel); c) dimensão dos poros superior a de outros géis (entre 100 e 300nm de diâmetro); d) resistência à degradação microbiana; e) transparência ótica tanto no UV quanto no visível (o que viabiliza sua quantificação por espectrofotometria); f) fácil ativação e manuseio e g) atoxicidade. Porém, algumas desvantagens também podem ser associadas a este gel: não podem ser esterilizados; desintegram-se em soluções fortemente alcalinas e solventes orgânicos; necessitam ser estocados na forma úmida por encolherem irreversivelmente quando secos e, principalmente, são de elevado custo (Galvão, 2004).

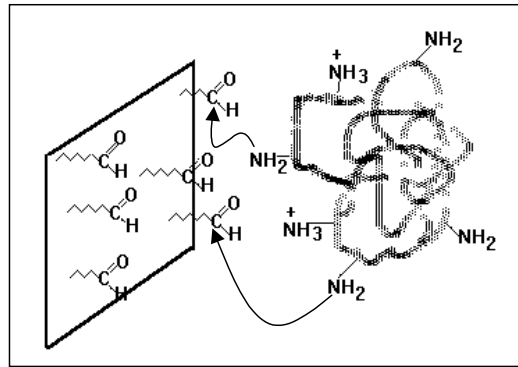
### 2.3.2. Imobilização multipontual de enzimas

Guisán (1988) propôs a estabilização de enzimas através do estabelecimento de várias ligações covalentes entre uma mesma molécula de enzima e o suporte sólido, a partir do controle rigoroso da intensidade do processo de multiinteração entre essas duas estruturas rígidas. Desta forma, é possível encontrar uma solução de compromisso que resulte em ligações multipontuais intensas o suficiente para promover uma estabilização muito alta e, ao mesmo tempo, suaves para não promover distorções significativas na estrutura tridimensional da enzima e, portanto, preservar seu centro ativo. É igualmente importante conhecer todas as variáveis que controlam a intensidade dessas ligações, a saber: a) *densidade superficial dos grupos reativos* quanto maior a densidade de grupos aldeídos maior a possibilidade de formação de novas ligações amino-aldeído; b) *pH* determina a quantidade de grupos aminos livres na superfície da enzima, quanto maior o pH maior a densidade desses grupos; c) *tempo de contato enzima-suporte* deve ser longo para favorecer a formação de ligações adicionais entre as duas estruturas envolvidas; f) *temperatura* promove aumento nos movimentos vibracionais da enzima, tornando-a mais flexível e, assim, possibilitando novos alinhamentos corretos amino-aldeído, após formação das primeiras ligações. Nesse sentido, o método de imobilização deve adotar soluções de compromisso para o binômio atividade/estabilidade, visando a obter enzimas altamente estabilizadas e com baixa perda de atividade catalítica. O enrijecimento de uma pequena parte da molécula de enzima (de 10 a 20%) seria transladado para toda a sua estrutura tridimensional devido às fortes interações entre todas as partes da molécula (Guisán, 1988).

A utilização de suportes porosos como sílica, alumina e agarose tem permitido superar um inconveniente com relação à imobilização covalente multipontual: a ausência de congruência geométrica entre a enzima e o suporte.

A imobilização multipontual de enzimas sobre suportes ativadas com grupos glioxil resulta na geração de várias ligações entre os grupos aminos das lisinas da enzima e os grupos aldeído gerados na superfície do suporte por ativação deste (Guisán *et al.*, 1992).

A escolha dos grupos aminos das enzimas para o processo de ligação multipontual se deve, basicamente, a três fatores: i) a maioria das proteínas apresenta muitos resíduos de lisina que, geralmente, não estão envolvidos no sítio catalítico; ii) os grupos aminos são polares e estão geralmente expostos ao meio aquoso na superfície da proteína e, iii) finalmente, quando estão desprotonados são muito reativos (Guisán, 1988). Os grupos aldeídos do suporte são uma boa opção para o processo de multiinteração com os grupos aminos da enzima, pois não possuem grandes substituintes no átomo de carbono que promovam impedimentos estéricos na reação com amina; são muito estáveis e conferem ao suporte alto grau de ativação, permitindo, quando necessário, que o processo de multiinteração enzima-suporte ocorra por longos períodos. As bases de Schiff (-CH=N-), ligações instáveis e reversíveis, inicialmente formadas entre os grupos amino da enzima e os aldeídos do suporte podem ser reduzidas a amins secundárias estáveis e os grupos aldeídos remanescentes podem ser convertidos em hidroxilas inertes, por meio de redução com borohidreto de sódio. O borohidreto tem se mostrado bastante apropriado como agente redutor, pois sendo uma molécula pequena, difunde facilmente para dentro da estrutura fechada formada pelas bases de Schiff entre cada molécula de enzima e o suporte. Além disso, Blanco e Guisán (1989) demonstraram que a redução feita em condições ótimas não exercia efeitos deletérios à estrutura da enzima. A Figura 2.7 mostra o sistema de imobilização/estabilização proposto por Guisán *et al.* (1992) *apud* Galvão (2004).



**Figura 2.7:** Sistema de imobilização/estabilização proposto por Guisán *et al.* (1992). Ligação da enzima via seus grupos aminos a grupos aldeídos alifáticos moderadamente separados da superfície do suporte.

#### 2.4. Modelos Cinéticos da Hidrólise Enzimática de Proteínas

Em geral, as velocidades de reações enzimáticas de proteólise são expressas em termos do “número de ligações peptídicas hidrolisáveis” ou do “grau de hidrólise”. Estas quantidades são normalmente calculadas utilizando-se o consumo de titulante (por exemplo, uma base forte) necessário para sustentar o pH do meio ao longo de ensaios de hidrólise em regime de batelada (Adler-Nissen, 1986). Além disso, adota-se cinética de Michaelis-Menten, eventualmente com termos de inibição, (Sousa Jr., 2003) ou de primeira ordem, quando a etapa controladora é o primeiro ataque à estrutura terciária da proteína, (Vorob`ev *et al.*, 1996). Algumas referências que apresentam levantamentos cinéticos da hidrólise de proteínas do soro são comentadas a seguir.

Gonzalez-Tello *et al.* (1994a) propuseram mecanismo no qual a reação era de ordem zero para a hidrólise enzimática das proteínas do soro a pH 8 e 50 °C para uma protease de origem animal, PEM 2500 S (uma mistura de enzimas pancreáticas, incluindo quimotripsina bovina e tripsina bovina e suína) e duas outras proteases de origem bacteriana: protease 660L (*Bacillus subtilis*) e alcalase 0,6L (uma enzima proteolítica obtida pela fermentação controlada de *Bacillus licheniformis*). Já Margot *et al.* (1997) propuseram modelos cinéticos empíricos para a hidrólise com tripsina.

Márquez e Vázquez (1999) citam que o grande número de ligações peptídicas rompidas, tanto em série quanto em paralelo, durante a hidrólise enzimática da maioria das moléculas poliméricas representa uma limitação natural à possibilidade de estimativa de parâmetros cinéticos básicos. Este é um problema geral no estabelecimento de modelos cinéticos para a hidrólise de substratos macromoleculares.

A hidrólise enzimática de peptídeos de cadeia curta pode ser representada por expressões de velocidades de reação mais simples, mas para proteínas ou misturas protéicas naturais recai-se em modelos muito complexos (Margot *et al.*, 1997). Um modelo muito complexo, entretanto, não pode ter seus parâmetros estimados estatisticamente com precisão suficiente a partir de simples ensaios cinéticos (Márquez e Vázquez, 1999). Por outro lado, se o modelo cinético for muito simples, sua representação inadequada do mecanismo real limitará sua aplicabilidade geral. Apesar disso, na falta de melhor alternativa, opta-se na literatura por equações de velocidade empíricas simples para representar curvas de hidrólise experimentais (Galvão, 2004).

Uma característica da cinética da hidrólise catalisada por proteases é a inibição pelos peptídeos formados, bem como a inativação da enzima por autólise. Alguns modelos propostos por Margot *et al.* (1997) foram capazes de fornecer uma boa descrição dos dados sob condições experimentais diversas. Com a utilização de proteases solúveis evita-se resistências à transferência de massa nos poros de matrizes de imobilização, esperados quando o substrato é constituído por macromoléculas. No entanto, o binômio custo/inativação da enzima ao longo do tempo deve ser levado em consideração. Esses autores utilizaram dados de hidrólise das proteínas do soro a 55°C, concentração inicial de substrato constante, pH 7,3 e diferentes relações enzima-substrato para pesquisar modelos matemáticos capazes de descrever a cinética dessa reação com enzimas livres.

Tardioli (2003) estudou a cinética da hidrólise de polipeptídeos (que foram produzidos por hidrólise seqüencial de proteínas de soro de queijo com tripsina, quimotripsina e CPA imobilizadas). A hidrólise de resíduos carboxi-terminais a 45°C, pH 7, catalisada pelo derivado CPA-glioxil, pôde ser adequadamente representada por cinética de Michaelis-Menten, com inibição pelo substrato e produto (Equação 2.1). O modelo cinético foi definido em termos de ligações peptídicas carboxi-terminais hidrolisáveis pela CPA, sem considerar a natureza do resíduo a ser liberado.

$$V_N = \frac{k * E * N}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + N \left(1 + \frac{N}{K_S}\right)} \quad (2.1)$$

Onde:  $V_N$  e Velocidade de hidrólise de ligações peptídicas C-terminais, (mM/min),  $N$  é a concentração molar de ligações peptídicas C-terminais que podem ser hidrolisadas pela CPA

(mM),  $E$  é a concentração de enzima no reator, em  $U_{\text{H-Phe}}/L$  de reator,  $I$  é a concentração molar do inibidor (mmol/L), e os parâmetros cinéticos são  $k$  (em mmol/min/ $U_{\text{H-Phe}}$ ),  $K_M$  (em mmol/L),  $K_S$  (mmol/L) e  $K_I$  (em mmol/L).

Sousa *et al.* (2003) propuseram para a hidrólise de soro de queijo com alcalase imobilizada em gel de agarose um modelo híbrido para um reator enzimático em batelada, consistindo de balanços de massa diferenciais acoplados a um “modelo cinético neural”, em que redes neurais artificiais prevêm a distribuição de massas molares dos peptídeos resultantes.

Sousa *et al.* (2004a) estudaram a hidrólise de proteínas de soro de queijo com alcalase imobilizada em gel de agarose 10%. O modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto foi ajustado satisfatoriamente aos dados experimentais (em termos de número de ligações hidrolisáveis), usando a técnica do pHstato e com o algoritmo de Marquardt foram estimados os parâmetros cinéticos. Sousa *et al.* (2004b) também estudaram o controle de pH da hidrólise enzimática de soro de queijo com alcalase imobilizada em gel de agarose, em um reator de tanque agitado de fluxo contínuo. O controle de pH é um ponto relevante no processo, posto que as reações proteolíticas mudam o pH do meio, afetando a atividade da enzima. Os autores propuseram um algoritmo híbrido GMC-fuzzy.

Resende *et al.* (2005) realizaram reações de proteólise utilizando Alcalase® imobilizada em gel de agarose em um reator contínuo com escoamento em vórtices (REV) Taylor-Coutte-Poiseuille para obtenção, de forma controlada, de peptídeos e/ou aminoácidos a partir da hidrólise enzimática de proteínas ou polipeptídeos provenientes de soro de queijo. Estimaram os parâmetros de transferência de massa a partir de curvas de distribuição de tempos de residência (DTR), ajustando-se o modelo aos dados experimentais. Redes neurais artificiais foram usadas para predição das velocidades de reação de cinco faixas de massa molar de peptídeos. Com este modelo híbrido, obtiveram uma descrição detalhada do sistema. Um REV em escala de bancada foi usado para validar o modelo.

Outros modelos empíricos como os propostos por Galvão (2004) podem ser utilizados, fornecendo um bom ajuste para sistemas complexos de reações proteolíticas com enzimas imobilizadas. O modelo empírico de Galvão (2004) para a reação de hidrólise de soro de queijo com quimotripsina imobilizada em gel de agarose é:

$$V = k_I N \quad \text{para tempo} < 5 \text{min} \quad (2.2)$$

$$V = \frac{k_2 N_0}{\left(\frac{P}{N_0}\right)^4} \quad \text{para tempo} > 5 \text{min} \quad (2.3)$$

Onde:  $P$  = concentração do produto,  $N$  = concentração molar das ligações peptídicas que podem ser hidrolisadas,  $N_0$  = concentração molar das ligações peptídicas hidrolisáveis no início da reação;  $k_1 = 0,05 \text{ min}^{-1}$  e  $k_2 = 1,51 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ .

Com base no exposto no decorrer deste item (2.3), pode-se inferir que a complexidade do sistema em questão indicará o tipo de modelo que melhor representará a cinética da reação estudada, se empírico ou fenomenológico.

## 2.5. Técnicas de Separação

Neste item, procurou-se resumir alguns conceitos básicos sobre o assunto, a título ilustrativo e como forma de auxiliar a compreensão de resultados apresentados nesta tese, mas sem a pretensão de esgotar o tema.

### 2.5.1. Processos de separação com membrana (PSM)

Os processos de separação com membranas vêm, cada vez mais, tornando-se importantes como alternativa aos processos convencionais de separação nas indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos (Petrus, 1997).

As principais vantagens dos processos de separação com membrana (PSM) são: economia de energia, pois em sua grande maioria os PSM promovem a separação sem que ocorra mudança de fase; neste sentido são processos energeticamente favoráveis. Seletividade, que é uma característica importante dos PSM; em algumas aplicações estes processos se apresentam como a única alternativa técnica de separação. Separação de termolábeis, pois via de regra, os PSM são operados a temperatura ambiente, fazendo com que estes possam ser aplicados no fracionamento de misturas envolvendo substâncias termosensíveis. Além disso, os PSM apresentam, ainda, a vantagem de serem extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de escalonamento.

Os PSM podem ser caracterizados em função de dois parâmetros: o fluxo permeado, que representa a vazão de permeado por unidade de área da membrana e a capacidade seletiva da membrana, a qual, dependendo do tipo de processo em questão, pode



ser definida de diferentes formas. Para processos cuja força motriz é o gradiente de pressão a capacidade seletiva da membrana, em relação a uma dada espécie, é medida através do coeficiente de rejeição ( $Re$ ), definido por uma relação entre a concentração da espécie na alimentação e sua concentração no permeado (Habert *et al.*, 2006).

Qualquer processo de transporte de uma dada espécie, através de membrana, ocorre devido à existência de uma força motriz. Na maioria dos processos com membranas esta força motriz corresponde a uma diferença de pressão, de concentração, de temperatura ou de potencial elétrico do componente entre os dois lados da membrana. Uma característica dos processos de separação com membranas é que eles podem ser operados em escoamento tangencial, onde a alimentação escoar em paralelo à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente a esta (Nóbrega *et al.*, 2005).

### 2.5.1.1. Membranas

Uma definição geral de membrana poderia ser: uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases. Deve-se notar que esta é uma definição macroscópica, enquanto que a separação deve ser considerada em nível microscópico (Mulder, 1991).

Entre os polímeros mais utilizados para a preparação de membranas de micro e ultrafiltração estão: poliamida, polissulfona, polietersulfona, polieterimida, acetato de celulose e, mais recentemente polifluoreto de vinilideno. Para a seleção do polímero mais adequado, faz-se necessário o conhecimento de suas propriedades, de sua estrutura e massa molar, da solubilidade para um determinado solvente ou uma mistura de solventes. Além disso, são necessárias informações sobre sua estabilidade química e suas propriedades térmicas (Petrus, 1997).

Em razão das aplicações a que se destinam, as membranas apresentam diferentes estruturas. De modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: *densas e porosas*.

Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. (Habert *et al.*, 2006).

Quanto à configuração, as membranas mais usadas, especialmente em ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF), são aquelas em que o material alimentado escoar

paralelamente à membrana, de forma a reduzir o fenômeno de polarização por concentração. (Cheryan, 1998; Rautenbach e Albrecht, 1989).

As membranas podem ser preparadas tanto na geometria plana quanto na cilíndrica. A partir dessas duas geometrias, diferentes tipos de módulos podem ser construídos. Membranas na geometria plana são usadas tanto em módulos de tipo placa e quadro quanto em módulos do tipo espiral. Os módulos preparados a partir de membranas com geometria cilíndrica podem ser divididos em três categorias segundo o diâmetro externo (DE) do cilindro: módulo Tubular,  $DE > 3$  mm; módulo Capilar,  $0,5\text{mm} < DE < 3$  mm e módulo do tipo fibra oca,  $DE < 0,5$  mm (Nóbrega *et al.*, 2005).

### 2.5.1.2. Ultrafiltração

Ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas, com tamanho de poro na faixa de  $0,05 \mu\text{m}$  até  $1\text{nm}$ . É um processo tipicamente utilizado para reter macromoléculas a partir de uma solução. O processo, onde o transporte de solvente é diretamente proporcional à pressão aplicada, é determinado principalmente pela forma e tamanho do soluto, relativo ao tamanho do poro na membrana (Mulder, 1991).

Segundo Ladisch (2001) o tamanho do poro para ultrafiltração está na faixa de  $5$  a  $5000$  nm, que correspondem a massa molar (curva de corte) de  $5$  a  $500$  kDa.

A ultrafiltração tem uma ampla faixa de aplicações envolvendo situações nas quais compostos de alta massa molar devem ser separados daqueles de baixa massa. Aplicações deste processo podem ser encontradas nas indústrias de laticínios e alimentos, farmacêutica, têxtil, química, metalúrgica, papel e curtume. Também vem sendo amplamente usada em bioprocessos, tanto na purificação quanto na concentração de proteínas e enzimas. Dentro da indústria de laticínios, algumas das maiores aplicações do processo de ultrafiltração estão na pré-concentração de leite, na recuperação de proteínas do soro e na fabricação de queijo (Nóbrega *et al.*, 2005).

Tendo em vista que as membranas de UF apresentam uma distribuição de tamanho de poros, elas são caracterizadas através da chamada curva de retenção nominal (*cut off*). A retenção nominal de uma membrana é definida como o valor de massa molar para o qual a membrana apresenta um coeficiente de rejeição de 95%. Assim uma membrana de retenção nominal  $15\text{kDa}$  é aquela capaz de rejeitar 95% das moléculas presentes em uma solução de um soluto com massa molar  $15\text{kDa}$ . A partir de rejeições de solutos de diferentes massas molares, pode-se construir a curva de corte de uma membrana. (Habert *et al.*, 2006).

Para o caso de micro, ultra e nanofiltração, para as quais a força motriz é o gradiente de pressão através da membrana, o fluxo permeado é fundamentalmente convectivo.

### 2.5.1.3. Parâmetros importantes para a análise do desempenho e eficiência do processo de ultrafiltração

Para análise do desempenho e eficiência do processo de ultrafiltração do soro, as seguintes grandezas são importantes:

- **Fluxo do permeado ( $J_p$ ):** é o volume obtido de permeado (L), por área de membrana ( $m^2$ ), por tempo (h).

- **Pressão média transmembrana ( $P$ ):** é definida como a pressão média entre a pressão de entrada e a saída do concentrado no equipamento:

$$P = \frac{P_{entrada} + P_{saída}}{2} \quad (2.2)$$

- **Fator de concentração volumétrica ( $F_{cv}$ ):** é definido como a razão entre o volume inicial de solução e o volume final do concentrado.

$$F_{cv} = \frac{V}{V_c} \quad (2.3)$$

onde  $V$  é o volume inicial do soro;  $V_c$  é o volume de concentrado de soro em cada amostragem.

- **Coefficiente de rejeição ( $R_e$ ):** o coeficiente de rejeição de uma membrana para um dado soluto é definido pela relação (Habert *et al.*, 2006) a seguir:

$$Re = 1 - \frac{C_p}{C_0} \quad (2.4)$$

onde  $C_p$  e  $C_0$  representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente. As membranas de ultrafiltração são caracterizadas através da chamada curva de corte, que relaciona o coeficiente de rejeição em função da massa molar do soluto.

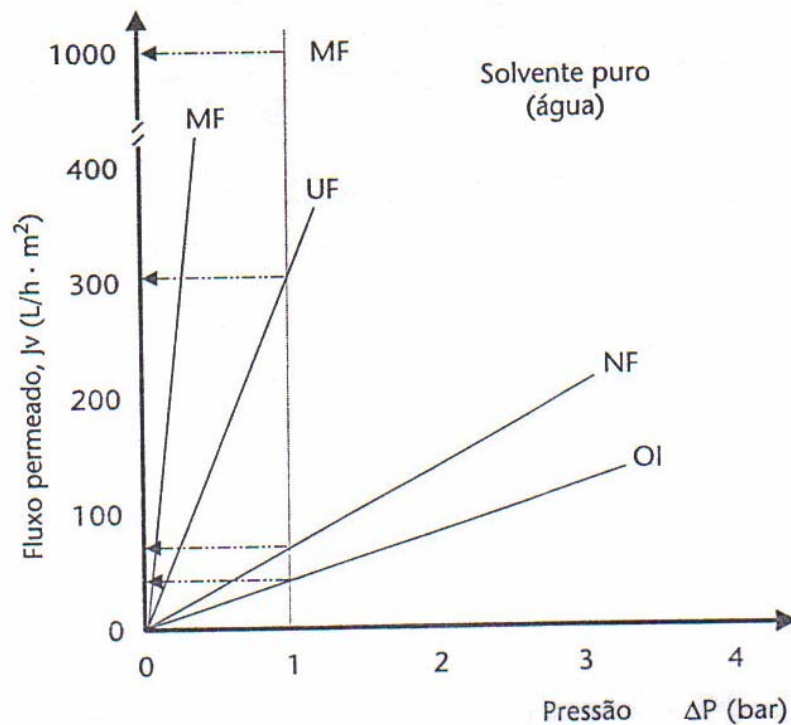
- **Permeabilidade da Membrana ( $L_p$ ):** pode ser entendida como uma medida da facilidade que esta oferece à passagem de um dado solvente. O inverso da permeabilidade é uma medida da resistência ( $R_m$ ) que o meio (membrana) oferece ao transporte. Assim, no caso de solvente puro tem-se a Equação (2.5), sendo  $\eta$  a viscosidade do solvente.

$$L_p = \frac{1}{\eta R_m} \quad (2.5)$$

Para solventes puros, admitindo-se que a membrana seja inerte em relação ao solvente, o fluxo de permeado deve apresentar dependência linear com a pressão e o coeficiente angular dessa reta será a permeabilidade da membrana para o solvente em questão.

O valor da permeabilidade das membranas para processos que utilizam o gradiente de pressão como força motriz varia algumas ordens de grandeza dependendo do tipo de processo. A Figura 2.8 apresenta valores típicos do fluxo permeado de solvente puro (água) segundo a pressão, para membranas com diferentes características.

Quando membranas são empregadas para fracionar ou concentrar soluções ou suspensões, os fluxos permeados, na prática, são bem menores do que os apresentados na Figura 2.8 devido à ocorrência de fenômenos como polarização de concentração e *fouling* (ou incrustação).



**Figura 2.8:** Valores típicos de fluxo permeado de solvente puro em função da pressão. MF = microfiltração, UF = ultrafiltração, NF = nanofiltração e OI = osmose inversa (Nóbrega *et al.*, 2005)

#### 2.5.1.4. Diafiltração

A diafiltração é um modo alternativo de operar sistemas de micro, ultra e nanofiltração e mesmo de osmose inversa. Pode ser entendida como um processo de “purificação” a volume constante. A operação consiste em se adicionar, continuamente, na solução a ser processada, solvente puro ou solução tampão, em vazão equivalente à vazão de permeado que sai do sistema. A diafiltração é utilizada quando se deseja purificar um determinado soluto de uma solução, onde os contaminantes são compostos de dimensões menores do que as do soluto de interesse (Habert *et al.*, 2006).

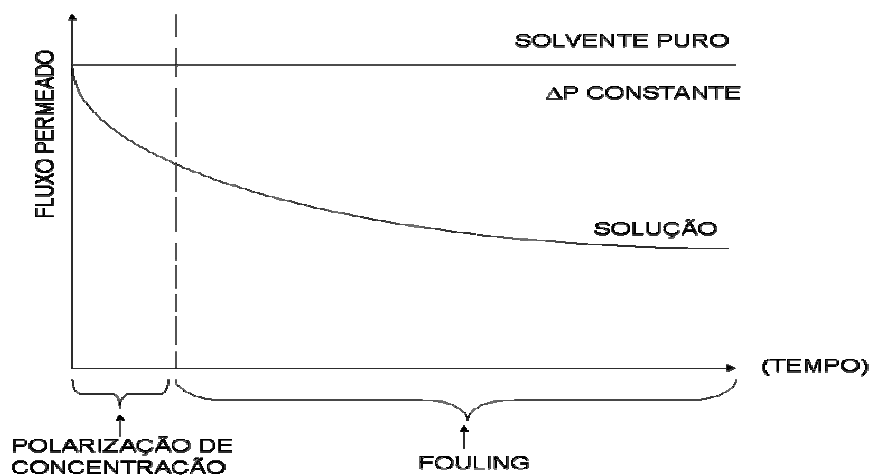
Cheang e Zydney (2004) utilizaram o processo de ultrafiltração para separar as proteínas  $\alpha$ -Lactoalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina. Seletividades de 55% foram alcançadas a pH 5,5 e 50mM de força iônica utilizando membrana de celulose de 30 kDa. Os autores acrescentaram então ao sistema etapas de diafiltração para aumentar a eficiência do processo. Diafiltrações utilizando um volume 16 vezes superior ao volume de solução a ser ultrafiltrada geraram um fator de purificação de 100 e recuperação de 90% de  $\beta$ -Lactoglobulina como

produto retido. A  $\alpha$ -Lactoalbumina foi recuperada no filtrado com um fator de purificação acima de 10 e recuperação de aproximadamente 99%.

### 2.5.1.5. Fenômenos envolvidos nos PSM

Em sistemas de separação com membranas, como ultra e microfiltração, é comum observar uma queda do fluxo permeado com o tempo. Este fenômeno, transiente, normalmente é acompanhado por um acréscimo na rejeição do soluto. A estabilização do fluxo permeado, se ocorrer, pode variar de alguns minutos até vários dias de operação. Esse comportamento do fluxo permeado com o tempo é atribuído à polarização de concentração e a uma série de outros fenômenos, conhecidos em seu conjunto como *fouling* (Nóbrega *et al.*, 2005).

A Figura 2.9 ilustra, com mais detalhes, o efeito da polarização de concentração e da incrustação no comportamento do fluxo permeado em processos com membranas. A polarização da concentração ocasiona a concentração do soluto na superfície da membrana, bloqueia os poros e reduz o fluxo através da membrana. Este efeito é reversível, ou seja, uma vez terminada a operação e efetuada a limpeza da membrana a permeabilidade ao solvente puro é recuperada (Ladish, 2001). Já os fenômenos que constituem a incrustação (*fouling*) são considerados total ou parcialmente irreversíveis.



**Figura 2.9:** Variação esquemática no fluxo permeado com o tempo de operação ocasionada por polarização de concentração e incrustação. Operação em escoamento tangencial, baseada em Habert *et al.* (2006).

Dentre os fenômenos que podem contribuir para a queda do fluxo permeado estão: a adsorção das moléculas de soluto na superfície da membrana ou/e no interior de seus poros devido a interações físico-químicas, o entupimento de poros por moléculas ou partículas em suspensão e o depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana (Hebert *et al.*, 2006).

De acordo com Cheryan (1998) dois fenômenos relacionados à superfície contribuem para a natureza e importância do *fouling*: propriedades de superfície da membrana e estado físico-químico da solução. A extensão da ocorrência depende fortemente do tipo de problema de separação envolvido. Em particular, na micro e ultrafiltração o declínio do fluxo é muito grande, chegando a 5% do fluxo de água pura.

A cada fenômeno corresponderá uma resistência adicional ao transporte. Assim, a relação entre fluxo permeado e a diferença de pressão aplicada entre os dois lados da membrana passa a ser expressa pela seguinte equação.

$$J = \frac{\Delta P}{\eta \cdot R_{total}} \quad (2.6)$$

onde  $R_{total} = R_m + R_a + R_b + R_g + R_p$

$J$ : fluxo volumétrico (L/h/m<sup>2</sup>)

$R_m$ : resistência ao transporte através da membrana (bar.h/L)

$R_a$ : resistência adicional devido ao fenômeno de adsorção (bar.h/L)

$R_b$ : resistência adicional devido ao bloqueio físico de poros (bar.h/L)

$R_g$ : resistência adicional devido à formação da camada gel sobre a membrana (bar.h/L)

$R_p$ : resistência adicional devido ao fenômeno de polarização da concentração (bar.h/L)

$R_{total}$ : resistência total à transferência de massa através da membrana (bar.h/L)

$\eta$ : viscosidade da solução que permeia através da membrana.

As várias resistências descritas na equação anterior contribuem em diferentes níveis para a resistência total ( $R_{total}$ ). No caso ideal, somente a resistência da membrana ( $R_m$ ), está envolvida (Hebert *et al.*, 2006)

### 2.5.1.6. Limpeza da membrana e vida útil

A vida útil das membranas pode ser afetada pelo tipo de agente de limpeza e procedimentos empregados. Esses, por sua vez, dependem da natureza do resíduo presente na membrana após o processamento. No caso de soro de queijo, os resíduos são constituídos principalmente por proteínas e sais de cálcio. Os fatores físico-químicos como pH, força iônica e temperatura, e condições operacionais como pressão, temperatura e fator de concentração, utilizadas na UF, influenciam na intensidade do *fouling* e conseqüentemente na intensidade da limpeza. Quanto maior esta intensidade, maiores serão os custos e mais curta a vida útil da membrana.

A regra básica na limpeza e manutenção das membranas é nunca deixar a membrana secar após o processo de ultrafiltração. O fim do processamento deve ser imediatamente seguido pelo enxágüe com água, até que se obtenha água limpa na saída. Em termos práticos, uma membrana é considerada limpa quando o fluxo original com água pura é restaurado.

Nos processos com membranas a queda de fluxo do permeado com o tempo que se observa é um problema inevitável. Na prática, no entanto, há algumas técnicas de operação desses sistemas que resultam em recuperação, ao menos parcial, do fluxo permeado. A mais comum é a *retrolavagem*, que é a inversão, por um intervalo curto de tempo, do sentido de fluxo permeado. Isso é obtido com uma válvula solenóide e um circuito de bombeamento do permeado. Recentemente novas técnicas estão sendo introduzidas, com a variação da pressão na corrente de alimentação, em alta freqüência, e a operação de sistemas em condições de baixa polarização.

Mesmo usando esses expedientes, o fluxo permeado médio diminui com o tempo. Por esta razão, periodicamente deve-se efetuar uma limpeza de natureza química na membrana. Lavagens ácidas e alcalinas são possíveis, dependendo do material da membrana. Mesmo com a limpeza química, a recuperação do fluxo permeado nunca é total.

Ácidos, como o nítrico e fosfórico, têm sido utilizados com o propósito de dissolver compostos minerais que precipitam dentro dos poros da membrana, como os sais de cálcio do soro de queijo. Resíduos orgânicos, como proteínas e gorduras, são removidos por detergentes alcalinos à base de hidróxido de sódio. Quando o *fouling* da membrana é mais severo, o uso de detergentes enzimáticos, com proteases e lipases, é necessário para suplementar ou substituir a limpeza com detergente alcalino (Viotto, 1993).



Quando o valor do fluxo permeado, após sucessivos ciclos de limpeza, cair abaixo de um valor crítico pré-determinado (que varia de caso a caso), deve-se proceder à substituição das membranas.

### **2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica desenvolvida para produzir separações precisas de misturas complexas e oferecer separação de alta resolução. Essa técnica nasceu essencialmente como uma técnica de separação, mas com os recursos que ela apresenta atualmente, passou a ocupar um lugar de grande destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa (Galvão, 2004).

Esta técnica é capaz de realizar detecções tão pequenas quanto 200 pg de material (Bidlingmeyer, 1992). Baseia-se na distribuição diferenciada dos componentes da amostra entre as fases móvel e estacionária, já que cada componente apresenta uma habilidade distinta em se difundir através delas. A separação de proteínas, peptídeos e aminoácidos emprega, comumente, técnicas cromatográficas onde predominam processos de interação hidrofóbica, formação de par iônico, exclusão por tamanho e troca iônica. A cromatografia de fase reversa é uma modalidade que se baseia em mecanismos de interação hidrofóbica e utiliza como fase móvel uma mistura água/solvente orgânico com polaridade maior que a da fase estacionária.

#### **2.5.2.1. Cromatografia de exclusão por tamanho (análise de peptídeos).**

A cromatografia em gel é baseada na penetração de moléculas do soluto dentro de pequenos poros de partículas empacotadas com base no tamanho molar e tipo de moléculas de soluto.

O empacotamento para cromatografia de exclusão por tamanho consiste de pequenas partículas poliméricas ou de sílica ( $\approx 10\mu\text{m}$ ), contendo uma rede de poros uniformes para os quais as moléculas de soluto e solvente podem difundir, em velocidades diferenciadas conforme o raio equivalente de cada molécula. O tempo médio de residência de cada espécie na coluna, assim, depende do seu tamanho efetivo. Moléculas que são significativamente maiores que o tamanho médio dos poros de empacotamento são excluídas e então, não sofrem retenção, ou seja, passam através da coluna a uma velocidade igual à da fase móvel.

Moléculas menores podem penetrar através do labirinto de poros e, então, serem aprisionadas por mais tempo, sendo eluídas em tempos distintos, dependendo do seu tamanho.

Colunas poliméricas e de sílica são normalmente utilizadas em cromatografia de exclusão por tamanho. Colunas baseadas em sílica com fases hidrofílicas ligadas são usadas para separar soluções aquosas de macromoléculas. Estas colunas também estão disponíveis para separação de polissacarídeos e proteínas.

### **2.5.2.2. Cromatografia de troca iônica (análise de aminoácidos)**

Na cromatografia de troca iônica a fase estacionária é altamente carregada. São seletivamente adsorvidos os solutos presentes na fase móvel (da própria fase móvel ou de amostras injetadas) e com cargas contrárias a ela. Os solutos adsorvidos podem ser subsequenteiramente eluídos por deslocamento com outros íons, com mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

A força motriz deste tipo de cromatografia consiste em diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel. De acordo com este método, a separação de materiais se baseia na adsorção reversível e diferenciada dos íons da fase móvel, deslocando aqueles da matriz adsorvente.

Para que a coluna possa ser novamente utilizada ela precisa ser regenerada, ou seja, ser equilibrada com o eluente inicial. Neste caso, os íons do eluente têm uma menor afinidade pelo trocador da matriz, mas a condição de equilíbrio é alcançada fazendo-se passar pela coluna um volume de eluente de 5-10 vezes maior que sua capacidade. Assim, é possível ocorrer troca de íons, eliminando aqueles contidos nos eluentes anteriormente utilizados. Desta forma, o grau de afinidade é superado pela maior concentração de íons.

A análise de aminoácidos requer, além da separação destes através de uma coluna cromatográfica apropriada, derivatização das substâncias, pois apenas fenilalanina, triptofano e a tirosina absorvem luz significativamente, na faixa ultravioleta. Dessa forma, são realizadas reações dos aminoácidos com reagentes com alta capacidade de absorção (geralmente ninidrina e o-ftaldeído (OPA) de modo a se fazer a detecção dessas substâncias antes ou após sua separação na coluna (derivatização pré ou pós-coluna, Spadaro, 1995 *apud* Galvão, 2004).

### 2.5.3. Separação de Phe – hidrolisados protéicos.

Vieira (2004) estudou três técnicas visando a definição de um protocolo adequado para separação entre aminoácidos aromáticos e peptídeos, sendo seu objetivo específico separar Phe dos demais aminoácidos e peptídeos formados a pós a hidrólise enzimática do sosro de queijo. Contudo, as técnicas foram exploradas de modo sistemático, visando à obtenção de resultados que pudessem ser úteis para outros sistemas.

#### a) Adsorção em resinas hidrofóbicas

A técnica de adsorção foi explorada testando-se três resinas comerciais hidrofóbicas: Amberlite XAD-4 (poliestireno divinilbenzeno), Amberlite XAD-7 (éster alifático) e Duolite XAD-761 (fenol-formaldeído)

As três resinas testadas apresentaram capacidade de adsorção dos aminoácidos Try, Phe e Tyr a 4°C cerca de 10% maiores que a 25°C. No estudo da influência do pH na eficiência de adsorção, a resina XAD-4 apresentou a 25°C, os maiores valores de selectividade: 2,71 no pH 7,5 para o par Phe/Tyr e de 0,63, obtida nos pHs 3,5; 4,5 e 6,5; para Phe/Tyr. Essa resina também apresentou as maiores capacidades de adsorção de Phe no pH 5,5 – 53%; de Trp no pH 6,5 – 84% e de Tyr no pH 6,5 – 30%, determinadas a 4 °C.

Ajuste de modelos de equilíbrio a pontos experimentais, obtidos para a resina XAD-4, mostrou que a isoterma linear representa bem a adsorção de Phe e Tyr, enquanto que o modelo de Langmuir foi escolhido para Trp.

#### b) Eletroforese contínua

A técnica de eletroforese contínua foi testada na separação entre uma proteína e um aminoácido com pontos isoelétricos bem diferentes, sistema esse para o qual a unidade deveria apresentar sua melhor performance. As melhores condições determinadas para esse sistema foram testadas para o hidrolisado real. Inicialmente esta técnica foi utilizada pela pós-doutoranda Astrea Silva, cujos dados experimentais foram utilizados por Ferreira (2002) que teve como objetivo o desenvolvimento e implementação em computador de modelo matemático da eletroforese contínua de proteínas e aminoácidos, em aparato SPLITT. O modelo a que se chegou ao final do trabalho, após uma série de simplificações, permitiu simular de forma consistente a operação do equipamento.

Estudos de separação entre Lys e  $\beta$ -lactoglobulina nessa unidade mostraram melhores resultados tanto na recuperação da proteína como no maior percentual de pureza da mesma, para a condição na qual se utilizou o tampão carregador no pH 7,0 e a vazão de saída da câmara de separação do lado direito ( $Q_{sLD}$ ) maior que a vazão de saída da câmara de separação do lado esquerdo ( $Q_{sLE}$ ), com a vazão de entrada do lado esquerdo fechado. Nessas condições obtiveram-se fator de recuperação de proteína 0,86 e pureza de 95%.

Operação da unidade nas condições selecionadas para separação de hidrolisado, pH 7,0; 50 Vols;  $Q_{sLD} > Q_{sLE}$  e entrada da câmara de separação do lado esquerdo fechada, não se mostrou eficiente resultando em aumento na proporção de Phe/peptídeos em relação ao inicial.

### c) Ultrafiltração/Diafiltração

A técnica de separação por membranas foi estudada no modo concentração por ultrafiltração e purificação por diafiltração para a remoção da Phe e demais aminoácidos aromáticos presentes em um mistura de oligopeptídeos gerados por hidrólise enzimática de proteínas de soro de queijo. Estudou-se as influências da pressão, vazão e pH de operação na eficiência de retenção de peptídeos e na eficiência de redução de Phe no concentrado ( $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{peptídeos}}$ ), utilizando-se uma membrana de celulose regenerada (Millipore Pellicon<sup>TM</sup>-2 Mini Holder) com corte de 1 kDa e área útil de 0,1 m<sup>2</sup>. Os resultados mostraram que as maiores eficiências de retenção de peptídeos foram obtidas com a pressão de 0,25 bar, chegando a 87% com vazão de 65 ml/min e pH 7,0 e que reduções de 50% foram obtidas para vazões de 35 ml/min, em duas condições: pressão de 0,5 bar e pH 9,0 e pressão 0,25 bar e pH 5,0.

Estudos de diafiltração mostraram que eficiência de redução de Phe de 85% pode ser obtida, com uma pressão de 0,5 bar; pH 7,0; vazão de recirculação 65 ml/min e um volume de solução dialisante duas vezes o volume de solução inicial. Nas mesmas condições de pH, vazão e pressão, um volume de solução dialisante quatro vezes maior que o inicial foi suficiente para retirar todos os aminoácidos presentes no hidrolisado.

Nesse estudo, concluiu-se que o processo de UF seguido por diafiltração é eficiente para a completa retirada de Phe do hidrolisado, gerando um concentrado constituído apenas por peptídeos e livre de aminoácidos. Vale destacar que Vieira (2004) considerou apenas a Phe livre no meio para o cálculo da eficiência na separação.

## 2.6. Reator Enzimático de Membrana

O reator enzimático de membrana (REM) é uma modalidade específica de reator na qual, em geral, um fluxo tangencial do meio reacional é aplicado a uma membrana. Normalmente, emprega-se esse sistema para reter a enzima (em forma solúvel) no reator, separando-a do produto final com a ajuda da membrana seletiva.

Para esse REM, o principal objetivo é assegurar a completa rejeição da enzima, a fim de manter a atividade total dentro do volume de reação. Dependendo do caso, as moléculas da enzima podem circular livremente no lado do retido, podem ser imobilizadas na superfície da membrana ou dentro de sua estrutura porosa (Rios *et al.*, 2004). Como muitas das enzimas têm massa molar entre 10 e 80 kDa, membranas de ultrafiltração com curva de corte entre 1 e 100 kDa são as mais freqüentemente usadas.

Também é reportado por vários autores que interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as moléculas biológicas e a membrana (como se descreveu no capítulo anterior) podem influenciar no desempenho do processo (Nua *et al.*, 1995 e Bouhallab e Henry, 1995).

Segundo Bouhallab (1998) *apud* Rios et al. (2004) as mais importantes vantagens e desvantagens de um REM com respeito à configuração clássica de um reator em batelada, reatores de leito fixo ou de leito fluidizado com enzima imobilizada em suportes sólidos, são as seguintes:

### Vantagens:

- Operação em modo contínuo (alimentando substrato);
- Retenção e reuso de catalisador;
- Redução da inibição pelo produto na cinética da reação;
- Produto final livre de enzima;
- Dois graus de liberdade para controle das propriedades do produto: a ação da enzima (especificidade) e a seletividade da membrana;
- Processo integrado (uma etapa com reação e separação).

### Desvantagens:

- Diminuição da atividade da enzima com o tempo de operação (perda de catalisador, efeito de tensão de cisalhamento, autólise, etc.);

- Heterogeneidade das condições de reação entre o centro da solução e a superfície da membrana;
- Camada de polarização induzida;
- *Fouling* da membrana.

Neste cenário, vêm sendo apresentadas diversas técnicas para incrementar a produtividade do REM e para reduzir o efeito de possíveis inibidores presentes no meio reacional. A literatura reporta que reatores de mistura contínuos com membrana (CSTMR) foram bem sucedidos em várias situações – particularmente, reatores de membrana com reciclo.

Mannheim e Cheryam (1990) promoveram a hidrólise de caseína com alcalase em um CSTMR de fibra oca, com enzima solúvel. Ensaios de longa duração para determinar a estabilidade do reator a 37 e 50 °C foram realizados. Após 15 horas de operação, a conversão caiu de 96% para 62% a 50 °C e de 75% para 51% a 37 °C. O declínio no desempenho do reator foi creditado ao escape da enzima através da membrana, interação enzima-membrana e desativação térmica da enzima. Embora os autores não enfoquem esse ponto, a autólise pode ter tido papel importante nessa queda.

Perea e Ugalde (1996) hidrolisaram proteínas do soro em um reator de membrana com reciclo em presença de alcalase solúvel para vários tempos de residência e razões enzima-substrato. O processo foi operacionalmente viável apenas nas primeiras sete horas de reação, devido à incrustação (*fouling*) da membrana e inativação da enzima.

Martin-Orue *et al.* (1999) investigaram a cinética de liberação de peptídeos bioativos nos modos de operação batelada e contínuo em um REM com a enzima tripsina livre. O substrato era caseinomacropéptido (CMP) e a hidrólise das três ligações susceptíveis a quebra durante a reação, Lys<sub>111</sub>-Lys<sub>112</sub>, Lys<sub>112</sub>-Asn<sub>113</sub>, e Lys<sub>116</sub>-Thr<sub>117</sub>, foi monitorada para determinação quantitativa dos produtos liberados. Os resultados mostraram que o REM oferece a possibilidade de um melhor controle do tipo de produto recuperado na saída do reator. Não foi reportado o grau de inativação da enzima.

Prata-Vidal *et al.* (2001) focalizaram seu estudo na reação hidrolítica de CMP com tripsina livre e na retenção por membrana dos peptídeos gerados na reação, comparando sistema em batelada com um REM. Os fatores que influenciaram na operação do reator de membrana, tais como concentração de substrato, força iônica, pressão transmembrana, foram estudados e discutidos. Uma conclusão importante foi quanto à influência da força iônica na

retenção de peptídeos, a qual pode constituir o parâmetro operacional chave na otimização do REM.

Guadix *et al.* (2006) hidrolisaram proteínas do soro a 50°C e pH 8,5 usando uma protease bacteriana (Protex 6L) em um reator CSTMR, incluindo um módulo de ultrafiltração de placas com membrana de poli-sulfona com 3 kDa de corte. O reator foi mantido em operação por 16 horas. A conversão atingiu um valor constante ao redor de 80% depois de 10 horas de operação. Uma leve desativação térmica da enzima livre foi detectada. Os antígenos na proteína de soro foram reduzidos em 99,97%, permitindo o uso do hidrolisado como fonte de nitrogênio em fórmulas infantis e em nutrição parenteral.

Cheison *et al.* (2006a) utilizaram a metodologia da superfície de resposta para investigar os efeitos da concentração de substrato (S), concentração da enzima (E) e taxa do fluxo do permeado inicial ( $J_i$ ) no comportamento de REM de fluxo tangencial. Foi empregada membrana de corte de 10 kDa durante 3 horas de hidrólise de proteína isolada de soro de queijo, usando protease N Amano® livre a pH 7 e 45°C. Os três fatores supracitados tiveram efeitos significativos no comportamento do fluxo do permeado. A atividade da enzima sofreu um declínio, podendo ser devido à evolução do produto, que contém alguns peptídeos inibidores, como também à inibição da enzima pelo substrato.

Cheison *et al.* (2006b) e (2006c) também caracterizaram o fluxo do permeado, recuperação do produto e destino da enzima mediante análise multivariada de dados da hidrólise de isolado protéico de soro (IPS) em um reator de membrana de fluxo tangencial com protease N livre.

Prieto *et al.* (2007) utilizaram um reator de membrana em batelada cíclica (RMBC) para a produção de hidrolisados de proteína do soro com reduzido efeito antigênico, usando subtilisina livre a 60°C e pH 8,5. As etapas sequenciais envolvidas no processo foram: hidrólise, ultrafiltração e reciclagem da enzima, resultando em hidrolisados com efeito antigênico reduzido em 1000 vezes. A otimização do RMBC foi realizada levando-se em conta a minimização da quantidade total de enzima como função objetivo. Os resultados mostraram que a enzima livre pôde ser reutilizada por mais de cinco vezes. Comparado com o modo de operação tradicional de batelada simples, uma economia de enzima acima de 59% pôde ser atingida.

A Tabela 2.7 apresenta-se um sumário de importantes artigos sobre o assunto (REM).

Tabela 2.7: Relação de importantes artigos sobre REM

Nome autor	Enzima	Reação	Forma de retenção da enzima	Condições operacionais
Balcao e Malcata (1998)	Lipase ( <i>Mucor javanicus</i> )	Interesterificação por acidólisis	Enzima adsorvida na membrana	40°C na ausencia de solvente sob controle da atividade da água
Ujang e Hazri (2000)	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Síntese enzimática de éster	Imobilizada no lado de externo da membrana	20 °C pH 8,2
Long et al. (2003)	Lipase ( <i>Candida rugose</i> )	Hidrólise de racemização de éster de ibuprofeno	Imobilizada no suporte da matriz porosa da membrana	Temp. ambiente pH 8,0 8-10 h
Magnan et al. (2004)	Lipase B ( <i>Candida Antarctica</i> )	Hidrólise de butil acetato	Imobilizada sobre a superfície de membrana cerâmica	37 °C pH 7,8
Long et al. (2005)	Lipase ( <i>candida rugose</i> )	Hidrólise de racemização de éster de ibuprofeno	Imobilizada na camada esponjosa da membrana	40 °C pH 8,0
Mori et al. (2005)	Lipase B ( <i>Candida Antarctica</i> )	Sínteses de butil laurate por acidólisis	Imobilizada na superfície de membranas cerâmicas	37 °C 5h de reação
Cursio et al (2006)	$\beta$ -galactosidase	Hidrólise de lactose	Imobilizada por adsorção física dentro dos poros e superfície da membrana	30 °C pH 4,5 6 h
Kappel et al. (2006)	Delvolase®	Hidrólise de proteína de alfafa branca	Enzima livre	40 °C pH 9,5 20 h reação
Hernandez et al. (2006)	Lipase B ( <i>Candida Antarctica</i> )	Síntese de butil propionato	Livre e Imobilizada em membrana de $\alpha$ -alumina	50 °C 80 bar
Pomier et al. (2007)	Lípase ( <i>Candida rugosa</i> )	Interestificação entre trigliceridos e metil oleato	Imobilização química sobre suporte cerâmico de membrana	55 °C Razão molar 20/1 oil/éster



Continuação da Tabela 2.7

Nome autor	Enzima	Reação	Forma de retenção da enzima	Condições operacionais
Cheison et al. (2007a)	Protease N ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Hidrolise de proteína de soro	Enzima livre	55 °C pH7
Cheison et al. (2007b)	Alcalase <sup>®</sup> , Protease N, Flavourenzima, Protrase A,	Hidrolise de proteína de soro	Enzima livre	pH 8,0; 60 °C pH 7,0; 55 °C pH 7,0; 50 °C pH 7,0; 50 °C
Liu e Cui (2007)	Glicose oxidase <i>Aspergillus niger</i>	Oxidação de glicose	Enzima livre	pH 4,0-7,0 a 30 °C 25-45 °C a pH 4,5 pH 4,5 - 25 °C
Wang et al. (2007)	Lipase ( <i>Candida rugosa</i> )	Hidrólise de Racemização de éster de ibuprofeno	Moléculas da enzima foram prendidas na interfase das camadas da membrana	40 °C pH 8,0 12 h reação
Trusek-Hahownia e Noworyta (2007a)	Lipase B ( <i>Candida Antarctica</i> )	Síntese de éster	Imobilizado por adsorção e ligação química	37 °C 0,1 MPa 120 h reação
Trusek-Hahownia (2007b)	Termolisina e Subtilisina	Hidrolisado de caseína	Enzima livre	50°C pH 7,5

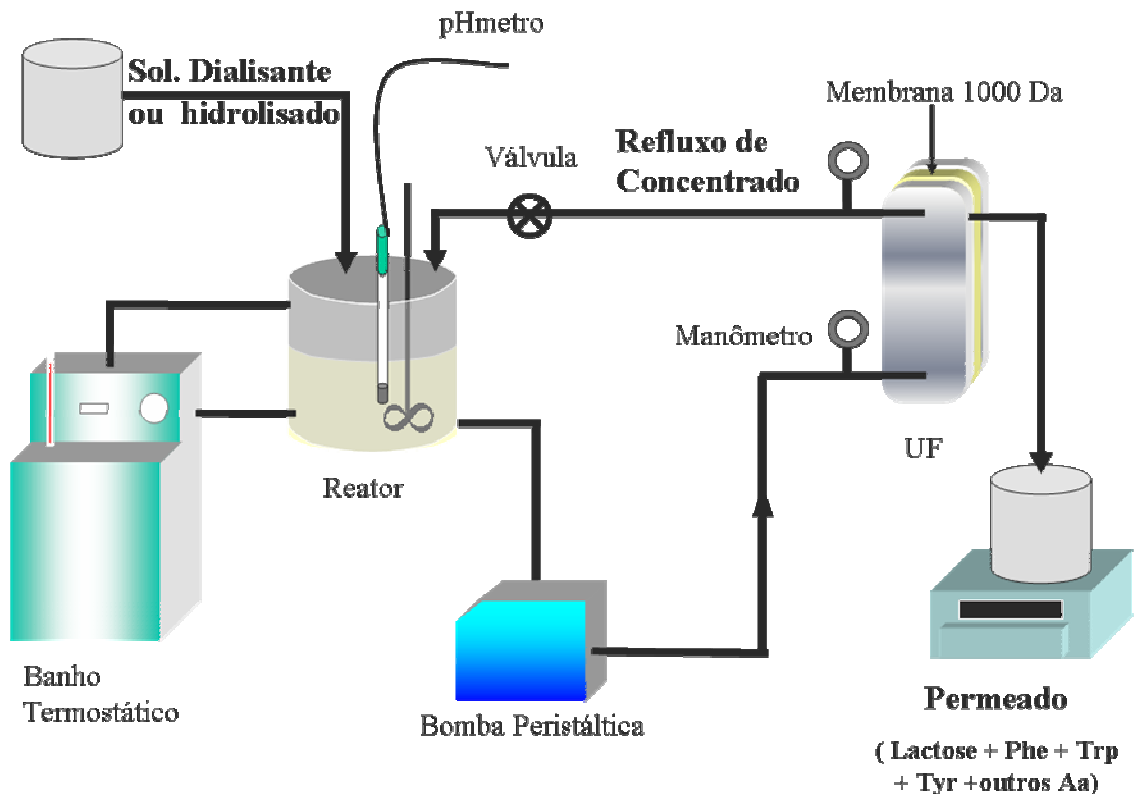
### CAPITULO 3. REATOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA (REM) PARA PROTEÓLISE DE HIDROLISADO DE SORO DE QUEIJO CATALISADA COM CPA: CINÉTICA DA REAÇÃO E MODELO MATEMÁTICO DO REATOR

O tema central desta tese é o desenvolvimento de um REM com uma concepção original: a protease é imobilizada em matriz gel agarose e as partículas de biocatalisador são retidas no reator de mistura, através de um filtro (1,5 cm de diâmetro) de tela inox (400 Tyler), enquanto que o meio reacional passa por sistema de filtração tangencial, com um duplo objetivo: retirar do meio produtos da hidrólise que atuam como inibidores da ação enzimática (fundamentalmente aminoácidos hidrofóbicos, mas especificamente fenilalanina); e integrar etapa de separação à de reação, em uma tentativa de otimizar o processo de proteólise controlada do soro de queijo. No presente trabalho o REM foi usado na etapa de hidrólise com CPA, vide Figura 1.1.

A Figura 3.1 traz um esquema do REM. O sistema é constituído por um reator de mistura alimentado com soro de queijo previamente hidrolisado por quimotripsina (grau de hidrólise em torno de 12% e 15%), onde é realizada hidrólise com CPA imobilizada em gel de agarose 6% (diâmetro médio 0,25 mm) a pH 7 e 45°C. O hidrolisado é transportado continuamente mediante uma bomba peristáltica a um sistema de ultrafiltração/diafiltração.

As condições de operação das unidades de UF foram definidas com base nos resultados de Vieira (2004) como se descreve no item (2.5.3). utilizando-se, assim, pH 7 e vazão de recirculação  $5 \times 10^{-3}$  L/mim.

Dois tipos de membrana foram testados: Millipore Pellicon<sup>TM</sup>-2 Mini Holder com módulo de placa plana e membrana de celulose regenerada com razão  $V_r/A_m =$  volume de reator/área de membrana igual a  $7,5 \times 10^{-2}$  cm. E módulo *hollow fiber* Amersham Biosciences, de polisulfona modelo: UFP-1-C-MM01),  $V_r/A_m = 7,7 \times 10^{-3}$  cm, ambos com curva de corte de 1 kDa. No permeado estão majoritariamente lactose, Phe, Tyr, Trp, Leu e outros aminoácidos, além de peptídeos menores do que o corte da membrana. Os peptídeos maiores permanecem no refluxo do concentrado, que volta a alimentar o reator. O reator pode ser alimentado tanto com hidrolisado novo como com solução dialisante (tampão fosfato 5mM, pH 7). Diferentes perfis de alimentação foram testados.



**Figura 3.1:** Esquema do processo de hidrólise de peptídeos com CPA no REM.

### 3.1. Cinética da hidrólise de soro de queijo com Carboxipeptidase A imobilizada em glioxil-agarose

Como descrito no item (4.2.10) o levantamento da cinética da reação foi realizado de forma conjunta com o doutorando Gilson Alexandre Pinto, que trabalhou paralelamente no mesmo projeto, porém com diferente enfoque. Os resultados foram reportados por Pinto *et al.*, 2007, onde se mostram os parâmetros da velocidade de hidrólise ( $R$ ), expressão utilizada no modelo matemático do reator com membrana. O mecanismo reacional proposto para a clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais,  $N$ , pela CPA imobilizada em suporte inerte glioxil-agarose (Amersham Biosciences) com 6% de entrecruzamento e com carga enzimática de 84 e 101  $U_{H-Phe}/g_{gel}$  é apresentado na Equação (3.1). O substrato dessa reação era soro de queijo concentrado ( $50g_{Proteína}/L$ ) pré-hidrolisado com quimotripsina a  $50^{\circ}C$  e pH 8 (graus de hidrólise,  $GH_Q = 12,3\%$  e  $15,3\%$ ).



onde:  $N$  é a concentração molar das ligações hidrolisáveis;  $P = N_0 - N$  é a concentração molar das ligações efetivamente hidrolisadas;  $E$  é a concentração de enzima no reator;  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$  são complexos enzima-substrato/produto;  $k_1$ ,  $k_p$ ,  $k_N$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-p}$ ,  $k_{-N}$  são parâmetros cinéticos.

Obtém-se então, para um reator batelada, o seguinte sistema de equações diferenciais ordinárias não-lineares (EDOs) como resultado do balanço de massa para as espécies presentes na reação (3.1).

$$\frac{dN}{dt} = V_N = k_{-1} * EN + k_{-N} * ENN - k_1 E * N - k_N * EN * N \tag{3.2}$$

$$\frac{dE}{dt} = V_E = k_{-1} * EN + k_2 * EN + k_{-p} * EP - k_1 * E * N - k_p * E * P \tag{3.3}$$

$$\frac{dEN}{dt} = V_{EN} = k_1 * E * N + k_{-N} * ENN - k_{-1} * EN - k_N * EN * N - k_2 * EN \tag{3.4}$$

$$\frac{dEP}{dt} = V_{EP} = k_p * E * P - k_{-p} * EP \tag{3.5}$$

$$\frac{dP}{dt} = V_P = k_2 * EN + k_{-p} * EP - k_p * E * P \tag{3.6}$$

$$\frac{dENN}{dt} = V_{ENN} = k_N * EN * N - k_{-N} * ENN \tag{3.7}$$

Depois de realizar diversos testes, a hipótese de Briggs-Haldane, de estado pseudo-estacionário dos intermediários, teve que ser relaxada, para um melhor ajuste do modelo. Os parâmetros cinéticos foram estimados de acordo com metodologia descrita em Pinto *et al.*, 2007 e são apresentadas na Tabela 3.1:

**Tabela 3.1:** Parâmetros cinéticos ajustados para sistema de EDOs na hidrólise com CPA de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,3% (equações 3.2 a 3.7) e 15,3% (equações 3.2 a 3.6).

Parâmetro	Valor *GH <sub>Q</sub> =12,3%	Intervalo de confiança (95%)	Valor *GH <sub>Q</sub> =15,3%	Intervalo de confiança (95%)
k <sub>1</sub> (L.mmol <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	304,08	± 97	989,4x10 <sup>-2</sup>	±101
k <sub>-1</sub> (min <sup>-1</sup> )	3905,2	± 6	340,2	±5685
k <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	505	± 308	167,4	±239
k <sub>p</sub> (L.mmol <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	43x10 <sup>-2</sup>	± 324x10 <sup>-2</sup>	49,9x10 <sup>-4</sup>	±1x10 <sup>-2</sup>
k <sub>-p</sub> (min <sup>-1</sup> )	116x10 <sup>-2</sup>	±725x10 <sup>-2</sup>	83,5x10 <sup>-4</sup>	±17x10 <sup>-4</sup>
k <sub>N</sub> (L.mmol <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	23x10 <sup>-4</sup>	± 13x10 <sup>-4</sup>	0	-
k <sub>-N</sub> (min <sup>-1</sup> )	0	-	0	-

\*GH<sub>Q</sub> = Grau de hidrólise da quimotripsina a 45°C e pH8.

Note-se que o ajuste paramétrico, para GH<sub>Q</sub> = 12,3%, indicou que k<sub>N</sub> é diferente de zero, enquanto que k<sub>-N</sub> é nulo. Se de fato isto ocorrer, estaremos modelando uma inativação gradual da enzima, pois o intermediário ENN iria se acumular. O pequeno valor de k<sub>N</sub>, entretanto, torna desprezível esse efeito, na prática. Por outro lado, para GH<sub>Q</sub> = 15,3%, obteve-se k<sub>N</sub> = k<sub>-N</sub> = 0. Assim, em todas as simulações do reator de membrana, foi desprezada a inibição pelo substrato.

Os parâmetros têm alta correlação (dados não mostrados) e, como se pode ver na Tabela 3.1, vários deles apresentam o zero no interior da região de confiança. Esse comportamento, comum em ajuste de equações de saturação, tipo Michaelis-Menten, se estendeu para o presente modelo – para o que contribuiu o fato de este ser um modelo empírico cujo substrato, número de ligações hidrolisadas, é uma abstração que agrupa inúmeras moléculas de peptídeos em um único pseudo-componente.

A partir desse enfoque empírico foi possível também relacionar o rendimento individual de hidrólise de cada aminoácido Y<sub>i</sub>, definido na Equação 3.8, com a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais, utilizando equações polinomiais ou exponenciais (Tardioli, 2003). Essas equações e seus respectivos parâmetros são apresentados na Tabela 3.2.

$$Y_i = \frac{V_i}{V_P} \quad (3.8)$$

onde:  $V_i$  é a velocidade de liberação de cada aminoácido;  $V_P$  é a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais em mmol/L/min (calculada via a resolução do sistema de EDOs, Equações 3.2 a 3.7 e parâmetros listados na Tabela 3.1).

**Tabela 3.2:** Relação entre o rendimento individual de cada aminoácido  $Y_i$  e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais para ( $\text{GH}_Q=12,3\%$ ).  $V=V_P/E_0$ , onde  $E_0$  = carga enzimática no reator ( $\text{U}_{\text{H-Phe}}/\text{L}$ )

Aminoácido	Equação	Parâmetros	Intervalo de Confiança 95%
<b>Phe</b>	$Y_{\text{Phe}} = a + bV$	a = $25 \times 10^{-3}$ b = $64^*$	$\pm 3 \times 10^{-3}$ $\pm 21 \times 10^{-1}$
<b>Tyr</b>	$Y_{\text{Tyr}} = \frac{aV}{b+V}$	a = $142 \times 10^{-3}$ b = $3,8 \times 10^{-5}^{**}$	$\pm 5 \times 10^{-3}$ $\pm 1,6 \times 10^{-5}$
<b>Trp</b>	$Y_{\text{Trp}} = a$	a = $70 \times 10^{-3}$	$\pm 2 \times 10^{-3}$
<b>Leu</b>	$Y_{\text{Leu}} = a$	a = $34 \times 10^{-2}$	$\pm 5 \times 10^{-3}$
<b>ILeu</b>	$Y_{\text{ILeu}} = a + bV$	a = $73 \times 10^{-3}$ b = $-24,7^*$	$\pm 5 \times 10^{-3}$ $\pm 3,1$
<b>Met</b>	$Y_{\text{Met}} = a + bV$	a = $40 \times 10^{-3}$ b = $-3,6^*$	$\pm 3 \times 10^{-3}$ $\pm 1,5$
<b>Val</b>	$Y_{\text{Val}} = a + bV$	a = $161 \times 10^{-3}$ b = $-44,6^*$	$\pm 7 \times 10^{-3}$ $\pm 4,3$
<b>Thr/Asn</b>	$Y_{\text{Thr/Asn}} = a + bV$	a = $51 \times 10^{-3}$ b = $-12,2^*$	$\pm 11 \times 10^{-3}$ $\pm 6,5$
<b>His</b>	$Y_{\text{His}} = a + b \exp\left(-\frac{V}{c}\right)$	a = 0 b = $88 \times 10^{-3}$ c = $31 \times 10^{-5}^{**}$	$\pm 5 \times 10^{-3}$ $\pm 26 \times 10^{-5}$
<b>Ala</b>	$Y_{\text{Ala}} = \frac{a}{E_0 V}$	a = $2322 \times 10^{-6}^{***}$	$\pm 3 \times 10^{-6}$

\* em  $\text{min.U}_{\text{H-Phe}} \cdot \text{mmol}^{-1}$ .

\*\* em  $\text{mmol.U}_{\text{H-Phe}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

\*\*\* em  $\text{mmol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Para a hidrólise com CPA utilizando como substrato pré-hidrolisado de quimotripsina ( $\text{GH}_Q=15,3\%$ ), determinou-se também a relação entre o rendimento individual de aminoácido  $Y_i$  e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais,

(calculada via a resolução do sistema de EDOs, Equações 3.2 a 3.6 e parâmetros listados na Tabela 3.1 para este caso).

**Tabela 3.3:** Relação entre o rendimento individual de cada aminoácido  $Y_i$  e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais.  $V = V_p / E_0$ , onde  $E_0$  = carga enzimática no reator ( $U_{H-Phe} L^{-1}$ )

Amino ácido	Equação	Parâmetro	Intervalo de Confiança (95%)
<b>Phe</b>	$Y_{Phe} = a + bV$	a = $196.5 \times 10^{-3}$ b = - $7854.4 \times 10^{-2}$ *	$\pm 36.7 \times 10^{-3}$ $\pm 5865 \times 10^{-2}$
<b>Tyr</b>	$Y_{Tyr} = a$	a = $1473.4 \times 10^{-4}$	$\pm 62 \times 10^{-4}$
<b>Leu</b>	$Y_{Leu} = a$	a = $5478.5 \times 10^{-4}$	$\pm 503 \times 10^{-4}$
<b>ILeu</b>	$Y_{ILeu} = a + bV$	a = $1548.2 \times 10^{-4}$ b = -13020. $4 \times 10^{-2}$ *	$\pm 382 \times 10^{-4}$ $\pm 7676.2 \times 10^{-2}$

\* em  $min.U_{H-Phe} \cdot mmol^{-1}$ .

Nas Tabelas 3.2 e 3.3,  $V = \frac{1}{E_0} V_p$ ; sendo  $E_0$  a concentração de CPA no reator em  $U_{H-Phe} \cdot L^{-1}$ ; e  $V_p$  a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais.

Portanto, a velocidade de liberação de cada aminoácido  $i$  ( $R_i$ ) é dada pela seguinte equação:

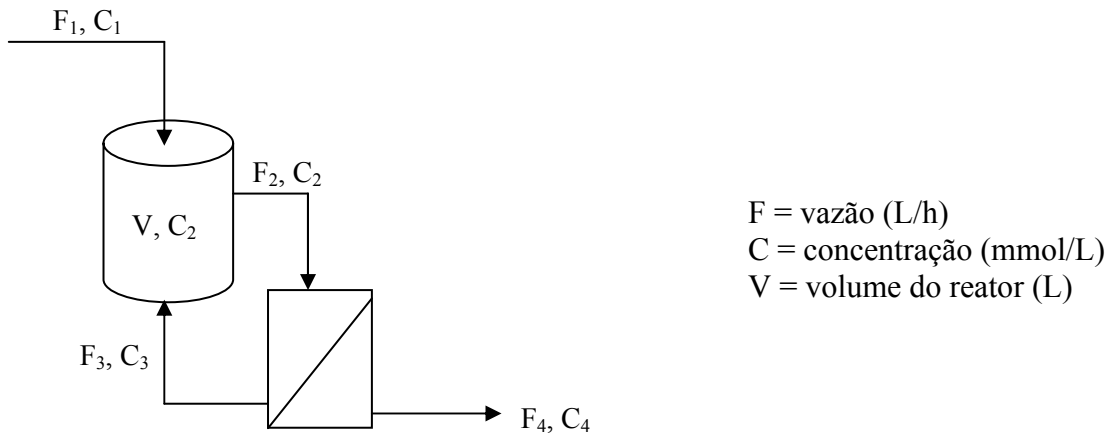
$$R_i = Y_i(E_0, V_p) * V_p \tag{3.9}$$

### 3.2. Modelagem do REM

Para a modelagem matemática do reator enzimático com membrana foi realizado um balanço de massa para o reator e outro para a unidade de ultrafiltração (Figura

3.2), sempre supondo processos isotérmicos. Ambos os balanços materiais foram combinados de modo a fornecer uma descrição da evolução temporal das espécies presentes no sistema: aminoácidos, pseudo-componentes e complexos intermediários ( $N$ ,  $P$ ,  $E$ ,  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$ ).

Nesta etapa, assumiu-se a hipótese de mistura perfeita, no reator e na unidade de ultrafiltração. Principalmente no último caso, essa hipótese pode ser um tanto restritiva, mas foge ao escopo deste trabalho o desenvolvimento de modelo mais detalhado da ultrafiltração, o que demandaria o levantamento de vários outros parâmetros.



**Figura 3.2:** Esquema do processo (REM)

**Balanco global de massa no reator**

Assumindo que as densidades são próximas e constantes em todos os pontos do processo (reator + membrana) tem-se a seguinte equação para o volume do reator  $V$ :

$$\frac{dV}{dt} = F_1(t) + F_3(t) - F_2 \tag{3.10}$$

**Balanco por componentes no reator**

Para cada componente  $i$  presente na reação o balanço no reator fica:

$$\frac{d(C_{2,i}V)}{dt} = F_1(t)C_{1,i} + F_3(t)C_{3,i}(t) - F_2C_{2,i}(t) + R_iV(t) \tag{3.11}$$



Rearranjando a Equação 3.11 tem-se:

$$C_{2,i}(t) \frac{dV}{dt} + V(t) \frac{dC_{2,i}}{dt} = F_1(t)C_{1,i} + F_3(t)C_{3,i}(t) - F_2C_{2,i}(t) + R_iV(t) \quad (3.12)$$

onde  $R_i$  é a velocidade de reação para cada componente no reator (Equação 3.9).

### Balço global na unidade de ultrafiltração

$$F_2 = F_3(t) + F_4(t) \quad (3.13)$$

### Balço por componentes na unidade de ultrafiltração

$$F_2C_{2,i}(t) = F_3(t)C_{3,i}(t) + F_4(t)C_{4,i}(t) \quad (3.14)$$

### Balço global e para cada componente no sistema reator + membrana

Substituindo a Equação (3.13) na Equação (3.10) tem-se a equação geral do sistema reator + membrana:

$$\frac{dV}{dt} = F_1(t) - F_4(t) \quad (3.15)$$

Substituindo a Equação (3.14) na Equação (3.12) tem-se a equação geral para os componentes presentes no sistema:

$$C_{2,i}(t) \frac{dV}{dt} + V(t) \frac{dC_{2,i}}{dt} = F_1(t)C_{1,i} - F_4(t)C_{4,i}(t) + R_iV(t) \quad (3.16)$$

### Balço de massa para os aminoácidos

Para os aminoácidos foram realizados balanços de massa com diferentes hipóteses tais como: vazões na alimentação e no permeado são iguais, ou seja, volume do

reator constante, assim como considerando constante a concentração no reator e no permeado; vazões de alimentação e no permeado diferentes,  $F_1 \neq F_4$  (volume variável no reator), hipótese observada experimentalmente e concentrações no reator e permeado diferentes  $C_2 \neq C_4$ . A segunda hipótese foi então adotada para o balanço dos aminoácidos. Assim, temos:

Substituindo-se a Equação (3.15) na Equação (3.16):

$$\frac{dC_{2,i}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,i} - C_{2,i}(t)) + (C_{2,i}(t) - C_{4,i}(t))F_4(t)] + R_i \quad (3.17)$$

O coeficiente de rejeição de cada componente  $Re_i$  para a membrana é definido da seguinte maneira.

$$Re_i = 1 - \frac{C_{4,i}}{C_{2,i}} \quad \Rightarrow \quad C_{4,i} = C_{2,i}(1 - Re_i) \quad (3.18)$$

Substituindo a Equação (3.18) na Equação (3.17) obtém-se:

$$\frac{dC_{2,i}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,i} - C_{2,i}(t)) + Re_i(t)C_{2,i}(t)F_4(t)] + R_i \quad (3.19)$$

### Balanço de massa para as ligações C-terminais hidrolisáveis dos peptídeos (N)

Para o balanço de  $N$  foram admitidas as mesmas hipóteses que para o balanço de aminoácidos, e depois das respectivas substituições na combinação de Equações (3.15) e (3.16) obtém-se a Equação (3.20):

$$\frac{dC_{2,N}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,N} - C_{2,N}(t)) + (C_{2,N}(t) - C_{4,N}(t))F_4(t)] - R_N \quad (3.20)$$

onde  $R_N$  é a velocidade de consumo para  $N$ .

O coeficiente de rejeição ( $Re_N$ ), baseado na concentração total de proteínas ao longo do tempo para este caso foi determinado mediante a seguinte equação:

$$Re_N = 1 - \frac{C_{P_{permeado}}}{C_{Prator}} \quad (3.21)$$

Onde  $C_{P_{permeado}}$  é a concentração de proteína no permeado e  $C_{Prator}$  é a concentração de proteína no reator, em cada instante de tempo.

Substituindo a Equação (3.21) na Equação (3.20) obtém-se:

$$\frac{dC_{2,N}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,N} - C_{2,N}(t)) + F_4(t)Re_N C_{2,N}(t)] - R_N \quad (3.22)$$

### Balanco de massa para produto e espécies intermediárias

Para o balanço de massa do produto ( $P$ ) foram admitidas as mesmas considerações que para o balanço de  $N$ . Combinando as equações gerais (3.15) e (3.16) obtém-se:

$$\frac{dC_{2,P}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,P} - C_{2,P}(t)) + Re_N F_4 C_{2,P}] + R_P \quad (3.23)$$

onde.  $R_P$  é a velocidade de formação do produto.

Para os balanços de massa da enzima ( $E$ ), complexo enzima-substrato ( $EN$ ), complexo enzima-produto ( $EP$ ) e enzima-substrato-substrato ( $ENN$ ) foram admitidas a concentração do permeado como nula ( $C_4 = 0$ ) e  $F_1 \neq F_4$ . Substituindo estas considerações na combinação de equações gerais (3.15) e (3.16) obtém-se as seguintes equações:

$$\frac{dC_{2,E}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,E} - C_{2,E}(t)) + F_4 C_{2,E}] + R_E \quad (3.24)$$

onde  $R_E$  é a velocidade de aparecimento/desaparecimento da enzima não-complexada com o tempo.

$$\frac{dC_{2,EN}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,EN} - C_{2,EN}(t)) + F_4 C_{2,EN}] + R_{EN} \quad (3.25)$$

onde  $R_{EN}$  é a velocidade de formação do complexo enzima-substrato com o tempo.

$$\frac{dC_{2,EP}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,EP} - C_{2,EP}(t)) + F_4 C_{2,EP}] + R_{EP} \quad (3.26)$$

onde  $R_{EP}$  é a velocidade de formação do complexo enzima-produto com o tempo.

$$\frac{dC_{2,ENN}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,ENN} - C_{2,ENN}(t)) + F_4 C_{2,ENN}] + R_{ENN} \quad (3.27)$$

onde  $R_{ENN}$  é a velocidade de formação do complexo enzima-substrato-substrato com o tempo.

Como o volume do reator foi considerado variável durante a corrida, as equações resultantes dos balanços das espécies presentes no sistema (aminoácidos e pseudo-componentes) foram resolvidas numericamente, conjuntamente com a Equação (3.15). O programa foi desenvolvido em Matlab® 6.5, MathWorks, Inc, a função intrínseca para solução de EDOs usada foi a *ode15s*, integrando no tempo as equações diferenciais resultantes dos balanços de massa.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item serão apresentados os materiais utilizados no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para tal.

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Enzimas

Foram utilizados dois tipos de enzimas:

- Quimotripsina (*EC 3.4.21.1*) de pâncreas bovino, tipo II, três vezes cristalizada a partir do quimotripsinogênio quatro vezes cristalizado, liofilizada e livre de sais, adquirida da Sigma - Aldrich Co., St Louis, EUA.
- Carboxipeptidase A (*EC 3.4.17.1*) de pâncreas bovino, tipo II suspensa em solução aquosa de tolueno, adquirida da Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA.

As atividades enzimáticas, determinadas de acordo com a metodologia descrita a seguir, eram de  $148 U_{\text{BTEE}}/\text{mg}_{\text{Proteína}}$  para quimotripsina e  $53 U_{\text{H-Phe}}/\text{mg}_{\text{Proteína}}$  para CPA.

#### 4.1.2. Substratos

Soro de queijo (pH entre 4,5 e 5,0), tipo Prato e Minas Frescal doados pela Cooperativa de Laticínios São Carlos, foi o principal material utilizado neste trabalho para hidrólises seqüenciais e controladas de proteínas, catalisadas por quimotripsina e carboxipeptidase A, imobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose.

N-benzoil-glicina-fenilalanina (hipuril-fenilalanina, H-Phe) foi utilizado para medir a atividade da carboxipeptidase A imobilizada em glioxil-agarose.

#### 4.1.3. Suporte para imobilização

O suporte empregado na imobilização das proteases foi Sepharose 6B-CL (agarose 6%) adquirido da Amersham Pharmacia Biotech AG, Suécia. O diâmetro ( $95,16 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ) das partículas esféricas desse gel de agarose foi medido utilizando um equipamento específico Malvern Mastersizer, modelo, MICRO-P. O gel de agarose foi previamente ativado

com borohidreto de sódio, glicidol (2,3-epoxi-1-propanol) e, a seguir, oxidado com periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>).

#### 4.1.4. Padrões de aminoácidos, peptídeos e proteínas

Padrões de aminoácidos (Asp, Thr, Asn, Ser, Glu, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe, His, Trp, Lys e Arg) e solução padrão de aminoácidos (com norleucina, taurina, ácido cistéico e cloreto de amônio incluídos) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St Louis, (EUA) e utilizados na calibração da coluna cromatográfica de troca iônica (Shim-pack Amino-Na, Shimadzu, SINC do Brasil) empregada na análise de aminoácidos dos hidrolisados de proteínas do soro de queijo por HPLC (modelo: LC-10A/C-R7A, Shimadzu, Japão).

Padrões de proteínas e peptídeos (soro albumina bovina - MM 67.000Da;  $\alpha$ -lactoalbumina - MM 14.146Da; [Sar]-Neurotensin - MM 1.672,9Da e Leucine Enkephalin - MM 556,6Da) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA. Insulina regular humana (BioHulin®) - MM 5.807,6Da - foi adquirida da Biobrás (Brasil). Todos esses padrões foram utilizados na calibração da coluna de exclusão por tamanho (Superdex Peptide 10/300 GL), empregada na análise de peptídeos por cromatografia líquida.

#### 4.1.5. Reagentes

Os reagentes para análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica mercaptoetanol e o-ftaldeído (OPA) foram adquiridos de Calbichem, Alemanha, e Bry-35 (polietilenoglicol dodecil eter) foi adquirido de Fluka Chemie AG, Suíça. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico de diferentes marcas comerciais.

## 4.2 Metodologia experimental

### 4.2.1 Preparação do Substrato

Soro de queijo *in natura* (prato e minas frescal) foi esterilizado por microfiltração utilizando uma membrana de fibra oca de 0,2  $\mu$ m de corte, modelo CFP-2-E-

8A (A/G Technology Co.), e em seguida concentrado até 50 g<sub>proteína</sub>/L por ultrafiltração utilizando uma membrana de placa plana de 10 kDa de corte (Millipore-Pellicon2<sup>®</sup>).

#### 4.2.2 Determinação das propriedades físicas do soro concentrado

Para o soro de queijo tipo *Prato* concentrado foram realizadas as seguintes determinações:

- a) **Densidade:** foi determinada em triplicata para diferentes temperaturas (25, 45 e 55°C), utilizando o método de picnometria.
- b) **Viscosidade:** também foi determinada em triplicata para diferentes temperaturas (25, 45 e 55°C), utilizando reômetro de Brookfield, modelo DV-III, tipo cilindro concêntrico, composto por uma cuba encamisada e impelidor (spindle 00 – U1 – adapter ultra low).
- c) **pH:** determinado por triplicata em diferentes temperaturas (25, 45 e 55°C) utilizando pHstato Titrimo modelo 718 STAT, Metrohm.
- d) **Absorbância:** foi determinada a 415 nm e a 25 °C em espectrofotômetro UV/Visível modelo Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech) em triplicata.
- e) **Índice de refração:** a porcentagem de sólidos totais no soro concentrado foi determinada a 25°C no refratômetro automático modelo Auto ABBE (Cambridge Instrument Company)

#### 4.2.3 Dosagem de proteínas – método de Kjeldahl

A concentração de proteínas presentes no soro de queijo (*in natura*, microfiltrado ou concentrado), aqui utilizado como substrato nas reações de hidrólise, foi determinada pelo método de Kjeldahl, seguindo-se o procedimento descrito no boletim técnico da MICRONAL, 1995. Nestes ensaios, utilizou-se uma unidade digestora (B-435) e uma unidade de destilação de amônia (Büchi, modelo B-231), onde todo o nitrogênio presente na amostra previamente digerida era quantificado.

##### 4.2.3.1 Digestão das amostras

Aos tubos de digestão adicionou-se 1 mL (soro concentrado) de amostra, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1 g de catalisador misto (preparado com uma parte de

CuSO<sub>4</sub> para três partes de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e esferas de ebulição. Esta mistura, de coloração marrom escuro, era posta para ser digerida até que atingisse uma tonalidade verde claro. Em seguida, as amostras eram destiladas.

#### 4.2.3.2 Destilação das amostras

Para a destilação das amostras foram preparadas soluções de ácido bórico 2% e NaOH 32%. *Erlenmeyers* contendo 100 mL da solução de ácido bórico 2% e três gotas de indicador misto cada eram, juntamente com os tubos contendo as amostras já digeridas, devidamente posicionados na unidade de destilação. 30 mL de água destilada e solução de NaOH 32% eram adicionadas aos tubos até que estes atingissem novamente coloração marrom escuro. A partir daí, as amostras eram destiladas por um período de sete minutos. Posteriormente, o destilado coletado no *erlenmeyer* era submetido à etapa de titulação.

#### 4.2.3.3 Titulação das amostras

O conteúdo dos *erlenmeyers* foi titulado com HCl padronizado na concentração de 0,1 M. A concentração de proteínas presente nas amostras foi determinada utilizando-se as equações abaixo:

$$C_N(g/L) = \frac{V_{HCl} * C_{HCl} * 14}{V_{amostra}} \quad (4.1)$$

$$C_P(g/L) = C_N(g/L) * 6,38 \quad (4.2)$$

onde:

- $C_N$  = Concentração de nitrogênio total (g/L);
- $V_{HCl}$  = Volume de ácido gasto na titulação (mL);
- $C_{HCl}$  = Concentração do ácido usado na titulação (N);
- $14$  = Massa molar do nitrogênio (g/mol);
- $V_{amostra}$  = Volume da amostra (mL);
- $C_P$  = Concentração de nitrogênio protéico (g/L);
- $6,38$  = Fator de conversão de nitrogênio total para nitrogênio protéico para proteínas do leite.



#### 4.2.4. Dosagem de Lactose: método DNS

A dosagem de lactose no soro de queijo foi feita usando o método de DNS (3-5 ácido di-nitro salicílico), de acordo com Miller (1959).

O reagente deve ser preparado mantendo-se um banho a 45°C, ou usando bico de Bunsen com muito cuidado, para que não se atinja a temperatura de ebulição. Em um becker de 400 ml dissolve-se por completo 30 g de sal de Rochelle P.A. (tartrato duplo de sódio e potássio) em 50 ml de água destilada. Adiciona-se em seguida 1 g de 3-5 ácido di-nitro salicílico (DNS) à solução anterior, e com um bastão de vidro tenta-se dissolver ao máximo as partículas sólidas. E, finalmente, adiciona-se 20 ml de NaOH 2 M (8,3 g em 100 ml de água destilada), misturando sempre até completa dissolução dos sólidos presentes.

Transfere-se quantitativamente a solução obtida para balão volumétrico em banho de água à temperatura ambiente por 2 horas para resfriamento. Por fim, ajusta-se o volume do balão para 100 ml com água destilada.

Prepara-se uma solução de lactose com concentração de 1,5 g/L (0,15 g em 100 ml de água destilada), e em 10 balões volumétricos preparam-se diluições com concentrações de 0,4, 0,8, 1,0, 1,2 e 1,5 g/L (em duplicata). Faz-se a leitura, em espectrofotômetro, de absorbância versus concentração (g/L)  $\lambda = 540$  nm. Esses dados foram ajustados a uma reta para determinar os coeficientes linear e angular, e a curva de calibração para determinar a concentração da lactose em g/L é dada por:

$$C = \frac{Abs + Cof.linear}{Cof.angular} \quad (4.3)$$

A 1 ml de solução da lactose (ou amostra), adequadamente diluída adiciona-se 2 ml de solução de DNS (previamente preparada). Colocam-se os tubos de Follin contendo estas misturas em banho com água em ebulição por 5 minutos e a seguir resfria-se em banho de gelo. Completa-se o volume até 25 ml com água destilada, homogeneizando bem, e determina-se a absorbância no espectrofotômetro em 540 nm. As medidas eram previamente calibradas com uma amostra teste (água destilada).

## 4.2.5. Preparação de suporte para imobilização

### 4.2.5.1. Preparação de gel de agarose com alta densidade de grupos aldeído

A preparação de gel de agarose foi desenvolvida segundo Guisán (1988).

#### Ativação do Gel de Agarose: Gel Gliceril-Agarose

A etapa de ativação do suporte consiste na esterificação do gel de agarose com glicidol (2,3-epóxi-1-propanol), na presença de NaOH e NaBH<sub>4</sub>. Inicialmente, uma determinada massa de gel é abundantemente lavada com água destilada e, em seguida, filtrada sob vácuo, de modo a se pesar a quantidade desejada do suporte inerte seco. A essa massa (1g) adiciona-se água (286µL), solução de NaOH 1,7M (476µL), previamente preparada a frio e contendo NaBH<sub>4</sub> (28,5 mg/mL de solução) e, finalmente, glicidol (343µL). Esta etapa é realizada sob rigoroso controle de temperatura ( $T < 4^{\circ}\text{C}$ ). O glicidol, agente ativante do suporte, é adicionado ao gel, gota a gota, controlando-se a temperatura para que esta não ultrapassasse os  $10^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a mistura reacional é submetida a agitação mecânica por um período de 15-18 horas à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Concluído este período, o gel ativado é exaustivamente lavado com água destilada até que o pH do filtrado atinja a neutralidade.

#### Oxidação do suporte: gel glioxil-agarose

Após a etapa de ativação, suspende-se o gel em água destilada na relação de 1:10 ( $V_{\text{gel}}/V_{\text{total da suspensão}}$ ). A esta suspensão adiciona-se uma massa de NaIO<sub>4</sub> suficiente para resultar em uma densidade superficial de grupos aldeídos de aproximadamente 70 a 80 µmoles de periodato por mililitro de gel empacotado, ativação máxima da agarose 6 %. A reação de oxidação ocorre por um período de 2 horas, utilizando-se agitação mecânica. Em seguida, o gel deve ser repetidamente lavado com água destilada até pH próximo da neutralidade, seco a vácuo e estocado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### Quantificação de grupos aldeído em suportes glioxil-agarose

A quantificação dos grupos aldeídos presentes na superfície do gel de agarose ativado é feita medindo-se o periodato de sódio não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril. Nesta reação, o periodato não consumido ( $\text{IO}_4^-$ ) reage com o iodeto ( $\text{I}^-$ ) em excesso, gerando o íon tri-iodeto ( $\text{I}_3^-$ ), que é quantificado por colorimetria:



A formação do íon tri-iodeto é de fundamental importância, pois o iodo na forma  $\text{I}_2$  é muito volátil:



Em meio ácido, ocorre perda de iodo por volatilização em consequência da oxidação de iodeto pela ação de oxigênio atmosférico (Eq. 4.6). Já em ambientes neutros, a oxidação do iodeto é desprezível (Vogel, 1981). Daí esta etapa ser desenvolvida na presença de bicarbonato de sódio.



Experimentalmente, prepara-se uma solução aquosa de periodato, nas mesmas condições da suspensão do gel gliceril-agarose (substituindo o gel por água) e uma mistura 1:1 de iodeto de potássio 10 % e bicarbonato de sódio saturado. A uma cubeta de vidro, adiciona-se 3 mL da mistura 1:1 e 75  $\mu\text{L}$  da solução de periodato. A seguir, procura-se um comprimento de onda (em torno de 423 nm) que ofereça como resposta uma absorvância de 0,7; este valor representa o branco.

Durante a oxidação do gel, retiram-se alíquotas do sobrenadante em tempos determinados (zero, imediatamente após a adição do periodato à suspensão; 30 minutos; 1 hora; 1,5 horas e 2 horas de reação). Para se mensurar o consumo de periodato ao longo deste período utiliza-se a seguinte equação:

$$\frac{\mu\text{moles}(\text{IO}_4^-)_{\text{Consumidos}}}{\text{mL de Gel}} = \frac{\mu\text{moles}(\text{IO}_4^-)_{\text{Totais}} - (12,8 * \text{Abs}_{\approx 423\text{nm}} * \text{Vol}_{\text{Suspensão}})}{\text{Volume}_{\text{Gel}}} \quad (4.7)$$

onde o valor 12,8 representa a razão concentração/absorbância. Concluída a oxidação, a suspensão é filtrada e o gel abundantemente lavado com água destilada (Galvão, 2004).

#### 4.2.6. Imobilização multipontual de enzimas

##### Quimotripsina

Inicialmente, prepara-se uma solução tampão bicarbonato de sódio 100 mM, com pH rigorosamente ajustado em 10,05. A massa de enzima (quimotripsina) necessária para se atingir a carga desejada ( $\text{mg}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{agarose}}$  ou  $\text{mg}_{\text{Enzima}}/\text{mL}_{\text{agarose}}$ ) é igualmente pesada e adicionada à solução anteriormente citada. O pH deve ser novamente checado para se garantir que o valor requerido de 10,05 não sofre alteração. Retira-se 1 mL desta mistura para acompanhamento da atividade enzimática (branco) livre de possíveis mudanças conformacionais induzidas pelas multiinterações com o suporte. Neste ponto adiciona-se a quantidade desejada de gel ativado/oxidado ao frasco contendo a solução tampão bicarbonato de sódio + enzima, e esta mistura reacional final é submetida a suave agitação em *shaker* por 24 horas a 25 °C. Ao longo do tempo, o desaparecimento da enzima do sobrenadante e a atividade do branco devem ser acompanhados. Após 24 horas de contato enzima-suporte, dobra-se o volume da mistura reacional e adiciona-se boridreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), obedecendo a relação de 1 mg  $\text{NaBH}_4$ /mL de solução. O tempo reacional é de 30 minutos, sob agitação mecânica. Lava-se o derivado obtido primeiramente com tampão fosfato 200 mM pH 7,5 e, posteriormente, com excesso de água destilada (Galvão, 2004).

Atividade BTEE: 140  $\mu\text{L}$  de solução enzimática ou suspensão de enzima imobilizada, convenientemente diluídas, são adicionadas à mistura reacional composta por 2,8 ml de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 e 140  $\mu\text{L}$  de éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) 8 mM, preparado em etanol. O aumento na absorbância, medida a 258 nm, era acompanhado por 5 a 10 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade era calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 870 L/(mol x cm). Uma unidade ( $U_{\text{BTEE}}$ ) hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de BTEE por min, nas condições descritas (Tardioli, 2003).

### Carboxipeptidase A

Mistura-se uma solução de tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,05 em uma relação de 1:5  $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$  da suspensão com 4,8 ml de suspensão de CPA (40  $U_{\text{H-Phe}}/\text{mg}$ ). Toma-se uma amostra de 0,5 ml para medir a atividade enzimática da solução. Suspendem-se 5 g de glioxil-agarose 6 % (previamente ativado e oxidado) na solução enzimática mantendo-se a suspensão sob suave agitação em *shaker* por 48 horas a 25 °C. Amostras do sobrenadante e da suspensão total são coletadas para medida de atividade enzimática. Após imobilização total (desaparecimento de toda atividade do sobrenadante), adiciona-se, em uma relação de 1:10  $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$  da suspensão, uma solução de inibidor, tirosina, 10 mM em tampão bicarbonato 100 mM (pH 10,05), suficiente para se obter a concentração final necessária, e reduz-se com borohidreto de sódio (1 mg/mL<sub>suspensão</sub>). Após 30 minutos de agitação mecânica suave, lava-se o derivado com excesso de água destilada para armazenamento após secagem a vácuo (Tardioli *et al.*, 2003).

Atividade H-PHE: 100 µL de solução enzimática ou suspensão de enzima imobilizada, convenientemente diluída são adicionados a 2,90 mL de hipuril-L-Phe 1 mM, preparado em tampão tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 500 mM (protocolo de acordo com Sigma Chemical Company). Acompanha-se o aumento na absorbância a 254 nm, por 5-10 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade é calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 360 L / (mol x cm). Uma unidade ( $U_{\text{H-Phe}}$ ) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de hipuril-Phe por min a 25°C e pH 7,5 (Tardioli *et al.*, 2003).

#### **4.2.7. Hidrólise das proteínas do soro catalisadas por quimotripsina imobilizada**

De modo geral, as hidrólises das proteínas de soro de queijo realizadas neste trabalho foram desenvolvidas após etapas de microfiltração e posterior concentração do soro por ultrafiltração. Todos os experimentos de hidrólise foram desenvolvidos utilizando-se a técnica do pHstato, na qual o consumo de base durante a reação permite calcular o grau de hidrólise através da seguinte equação (Adler-Nissen, 1986):

$$GH = V_{\text{Base}} * C_{\text{Base}} * \frac{1}{\alpha} * \frac{1}{MP} * \frac{1}{h_{\text{tot}}} * 100\% \quad (4.8)$$

onde:  $V_{base}$  = volume de base consumido na reação (mL);  $C_{base}$  = concentração da base (N);  $\alpha$  = grau de dissociação médio dos grupos  $\alpha$ -NH;  $MP$  = massa de proteína (g);  $h_{tot}$  = número total de ligações peptídicas no substrato protéico em mmol/g<sub>Proteína</sub> (8,8 para proteínas do soro).

#### 4.2.7.1. Preparação de substrato

O soro de queijo previamente micro- e ultrafiltrado (50 g<sub>proteína</sub>/L) era hidrolisado inicialmente com quimotripsina imobilizada - derivado contendo 40 mg<sub>Enzima</sub>/g<sub>GeI</sub> a pH 8 e 55°C, de acordo com Galvão (2004). O soro concentrado era mantido no reator enzimático, com 0,07 g<sub>Catalisador</sub>/g<sub>Proteína</sub>, até atingir um grau de hidrólise (GH<sub>Q</sub>) de 12,3% ou 15,3% , utilizando como metodologia de medição do GH a técnica do pH-stato.

#### 4.2.8. Ensaio para a determinação da distribuição de massas molares dos peptídeos ao longo da hidrólise com quimotripsina e após hidrólise com CPA: calibração da coluna de peptídeos

O produto gerado após hidrólise seqüencial do soro concentrado de queijo pela ação da quimotripsina e da carboxipeptidase A (esta última no reator enzimático de membrana, REM) foi analisado quanto à distribuição de massa molecular dos peptídeos resultantes.

Inicialmente para a variedade de soro de queijo *prato* realizou-se hidrólise de longa duração (10 horas) com quimotripsina em pHstato (Metrohm® 718 Stat Titrimo) com controle de temperatura (banho térmico Neslab®, Modelo RTE 111), a 55 °C, pH 8,0, utilizando 25 ml de soro concentrado (50 g<sub>Proteína</sub>/L) e 0,08 g<sub>Catalisador</sub>/g<sub>Proteína</sub> (40 mg<sub>Enzima</sub>/g<sub>GeI</sub>). Amostras de 500 µl foram colhidas ao longo do tempo.

As amostras foram diluídas 15 vezes e analisadas via cromatografia por exclusão de tamanho em equipamento HPLC Shimadzu, modelo bomba: LC-10AD, utilizando-se uma coluna Superdex Peptide 10/300 GL (100-7000 Da) e como fase móvel, tampão fosfato sódico 0,02M pH 7,2, contendo 0,25M de NaCl, a uma vazão de 0,25mL/min. O volume de hidrolisado injetado na coluna de peptídeos era de 25µL, sendo a detecção feita no UV a 214nm.

Para isto, foi necessário definir procedimentos de calibração utilizando padrões adequados para que se pudesse obter a distribuição mássica de peptídeos para cada amostra considerada. De acordo com a metodologia descrita por Sousa et al. (2003) foram injetados seis padrões (dois peptídeos e 4 proteínas) para que se pudesse relacionar a massa molar de peptídeos com o tempo de retenção na coluna. Os tempos de retenção obtidos para os padrões estão apresentados na Tabela 4.1

**Tabela 4.1:** Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide 10/300 GL para análise de peptídeos no HPLC (LC-10AD)

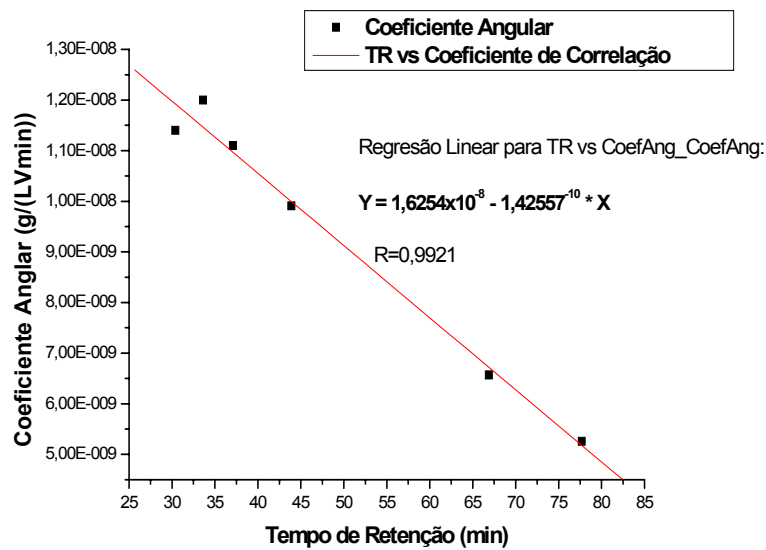
Padrão	Identificação	Massa Molar (Da)	Tempo de Retenção (min)
1	Leucine (peptídeo)	556,62	77,7
2	Angiotensin (peptídeo)	1003,17	66,9
3	Insulina	5807,58	43,9
4	$\alpha$ -Lactalbumina	14146	37,1
5	$\beta$ -Lactoglobulina	18300	33,6
6	Soro Albumina Bovina	67000	30,4

Levantou-se, em seguida, uma curva de calibração área versus concentração mássica para cada um dos padrões. Estes pontos experimentais foram ajustados a uma reta para determinar os coeficientes angulares para cada caso (Anexo I).

Uma curva tempo de retenção (TR) media vs. coeficientes angulares, também foi levantada como mostrado na Figura 4.1, onde foi observando que os pontos se ajustam a uma reta.

Obteve-se então uma equação geral que correlaciona concentração mássica (g/L) à área no cromatograma (Vxmin) em função do tempo de retenção (min) na coluna.

$$C = (1,62541 \times 10^{-8} - 1,42557 \times 10^{-10} \times \text{tempo}) \times \text{área} \quad (4.9)$$



**Figura 4.1:** Coeficiente angular em função do tempo de retenção média para a calibração da coluna Superdex Peptide 10/300 GL no HPLC (LC-10AD).

Por problemas de entupimento nas tubulações do HPLC por causa do tampão fosfato utilizado, foi necessário a troca de equipamento a outro com tubulações de maior diâmetro e, por conseguinte foi realizada novamente a calibração da coluna.

Para o soro de queijo *minas frescal* as amostras eram diluídas 6 vezes tanto para análise de hidrolisado de quimotripsina ( $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ) como para hidólisado de CPA no REM e analisadas via cromatografia por exclusão de tamanho como anteriormente descrito no HPLC Shimadzu, (modelo bomba: LC-6AD).

Para esse caso, foram injetados cinco padrões (dois peptídeos e 3 proteínas) para que se pudesse relacionar massa molar de peptídeos e tempo de retenção na coluna. A Tabela 4.2 apresenta os padrões utilizados para calibração.

Seguindo o mesmo procedimento da calibração anterior foi levantada para este caso a curva tempos de retenção (TR) versus coeficientes angulares. A Figura 4.2 mostra a boa correlação linear obtida.

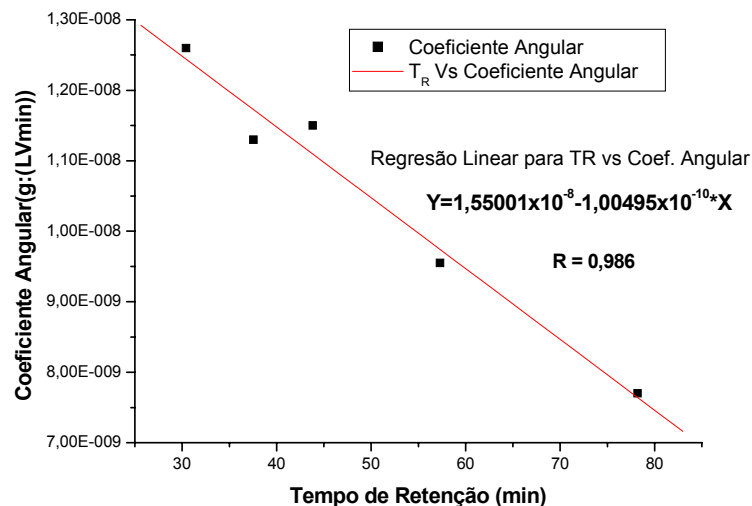


**Tabela 4.2:** Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide 10/300 GL para análise de peptídeos no HPLC (LC-6AD)

Padrão	Identificação	Massa Molar (Da)	Tempo de Retenção (min)
1	Leucina (peptídeo)	555,6	78,2
2	Neurotensina (peptídeo)	1672,9	57,3
3	Insulina	5807,6	43,8
4	$\alpha$ -Lactalbumina	14146	37,6
5	Soro Albumina Bovina	67000	30,4

A correlação obtida foi:

$$C = (1,55001 \times 10^{-8} - 1,00495 \times 10^{-10} \times tempo) \times \text{área} \quad (4.10)$$



**Figura 4.2:** Coeficiente angular em função do tempo de retenção média para a calibração da coluna Superdex Peptide 10/300 GL no HPLC (LC-6AD)

É importante dizer que a presença de alguns pequenos peptídeos e aminoácidos não detectáveis pela espectrofotometria na análise de HPLC foi quantificada observando-se a conservação de massa: a quantidade de matéria não detectável pela análise (que parecia desaparecer com o andamento da hidrólise) correspondia aos pequenos peptídeos e aminoácidos não detectáveis; tal quantidade de matéria era incluída na faixa de massa molar mais baixos, fechando o balanço de massa global.

#### 4.2.9. Hidrolisados obtidos pela ação de Carboxipeptidase A (CPA): levantamento da cinética da reação enzimática

De acordo com Galvão (2004), hidrolisados de quimotripsina com grau de hidrólise ( $GH_Q$ ) em torno de 12,3 % disponibilizam praticamente 100 % dos resíduos de Phe à ação da CPA. Portanto, para esta etapa, foram preparados hidrolisados com 12,3 % GH utilizando quimotripsina (derivado com alta carga – 40  $mg_{Enzima}/g_{Gel}$ ), concentração enzimática de 4  $mg_{Enzima}/mL_{suspensão}$ . Para o estudo da cinética da CPA foram realizados ensaios de velocidades iniciais (30 minutos) e ensaios com 10 horas de duração a pH 6, 7 e 8. Os hidrolisados obtidos pela ação da CPA foram analisados por cromatografia de troca iônica com derivatização.

##### 4.2.9.1. Ensaios de velocidades iniciais

Estes ensaios foram realizados com 30 ml de amostra, provenientes da hidrólise de soro de queijo com quimotripsina ( $GH_Q = 12,4\%$ ) a diferentes concentrações 5, 10, 20, 30, 35 e 42,52  $g_{proteína}/L$ , a 45 °C, com adição de 10  $U_{H-Phe}/g_{proteína}$  de CPA (84  $U_{H-Phe}/g_{Gel}$ ) por um período de 30 minutos e em diferentes pHs (6, 7 e 8). Foram tomadas amostras de 0,5 ml a cada 5 minutos para monitoramento da liberação de aminoácidos no período inicial da reação, quando os efeitos inibitorio ainda não estão atuando.

##### 4.2.9.2. Ensaios de longa duração

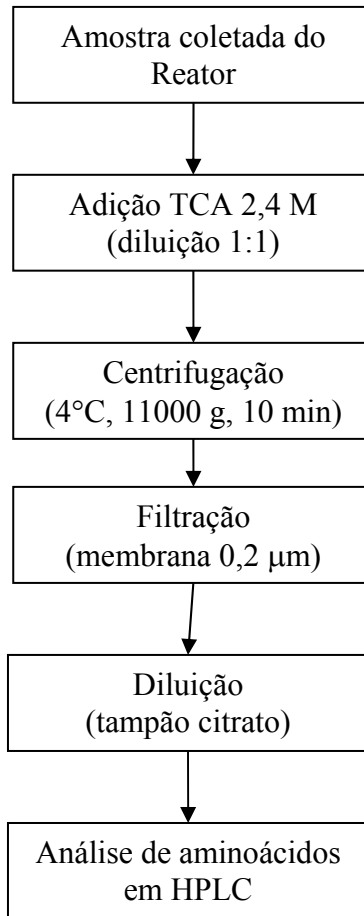
Ensaios em batelada por tempos prolongados (10 horas) foram realizados para a estimativa da constante de inibição ( $K_I$ ). Para isso, foram utilizados 60 ml de amostra proveniente da hidrólise de soro de queijo com quimotripsina ( $GH_Q=12,4\%$ ) com uma concentração de 38,8  $g_{proteína}/L$ , adicionando-se 21,9  $U_{H-Phe}/g_{proteína}$  de CPA (84  $U_{H-Phe}/g_{Gel}$ ) a uma temperatura de 45 °C e a diferentes pHs (6, 7, 8). Foram tomadas amostras de 0,7 ml ao longo do tempo para a análise de aminoácidos.

#### 4.2.10. Análise de aminoácidos por HPLC

Os hidrolisados gerados após hidrólise seqüencial do substrato real pela ação da quimotripsina e carboxipeptidase A foram analisados quanto à presença de aminoácidos livres e distribuição de massa molar dos peptídeos resultantes. Já os hidrolisados gerados após hidrólise ácida foram analisados somente com relação ao seu conteúdo de aminoácidos.

Para análise de aminoácidos foi usada uma coluna Shim-pack ISC-30 amino-Na (Shimadzu) e as fases móveis A (tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 3,2), B (citrato de sódio 0,6 M e ácido bórico, pH 10) e C (hidróxido de sódio 0,2 M) em um gradiente apropriado, a uma vazão constante de 0,50 mL/min. Foram usados para derivatização pós-coluna dos aminoácidos os reagentes RA (solução de ácido bórico-ácido carbônico, pH 10, contendo 0,04 % (p/v) de hipoclorito de sódio comercial) e RB (solução 0,8 mg/mL de o-ftalaldeído, Sigma Chem. Co., contendo 0,4 mg/mL de Bry-35, Amersham Pharmacia Biotech, e 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, Sigma Chem. Co.) a uma vazão total de 0,40 mL/min. A temperatura de análise foi de 60°C e os aminoácidos eram detectados, após serem derivatizados, por fluorescência com comprimento de onda de excitação 350 nm e de emissão igual a 450 nm.

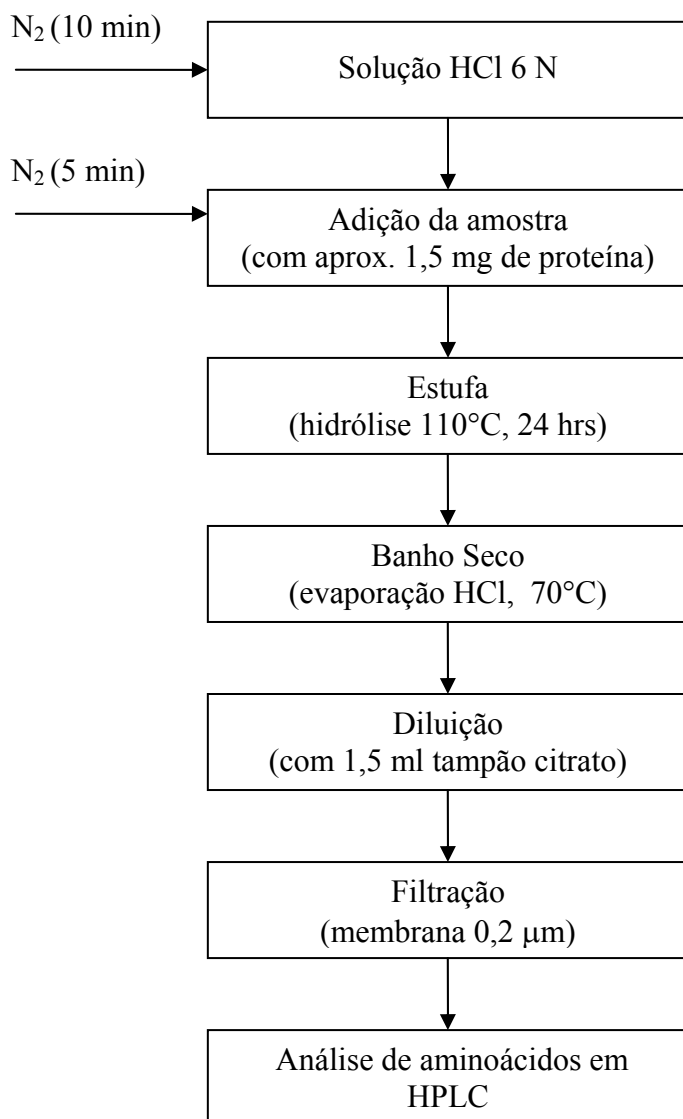
Inicialmente, proteínas e peptídeos presentes nas amostras de hidrolisados eram precipitados pela adição de ácido tricloroacético 2,4 M, para uma razão final amostra/ácido igual a 1/1 (v/v). Após centrifugação (centrífuga Micromax, modelo: OM3590, Thermo Electron Corporation) por 10 minutos (4 °C e 11000 g.), o sobrenadante era diluído com tampão citrato de sódio 0,2 M (pH 2,2) e filtrado em membranas de 0,45 µm. 10 µL das amostras eram automaticamente injetados na coluna e um gradiente apropriado era aplicado por 72 minutos. A concentração de aminoácidos ( $C_{AA}$ ) era determinada por meio de curvas-padrão ( $C_{AA}$  versus  $A_c$ ). A metodologia de análise de aminoácidos é resumida no seguinte diagrama de blocos.



**Figura 4.3:** Diagrama de blocos da metodologia de análise de aminoácidos.

#### 4.2.11. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida do soro concentrado, do hidrolisado de quimotripsina e do hidrolisado de CPA foi utilizada para determinar quantitativamente o teor de aminoácidos nesses substratos e produtos das proteólises. Foi realizada em tubos de ensaio vedados: 5 mL de uma solução de HCl 6 N eram colocadas no tubo de ensaio e nitrogênio era injetado por 10 minutos para eliminar o oxigênio livre da solução. Adiciona-se então a amostra contendo aproximadamente 1,5 mg de proteína, com mais 5 min de injeção de nitrogênio. Os frascos eram completamente vedados e levados a estufa por 24 horas a 110°C. Após este período a mistura final era evaporada em capela, utilizando-se banho seco a 70°C. O extrato seco de aminoácidos era dissolvido em tampão citrato de sódio 0,2 N, pH 2,2 e filtrado em membranas de 0,45 µm para posterior análise de aminoácidos por HPLC. A metodologia resumida para hidrólise ácida é apresentada no diagrama de blocos que segue.



**Figura 4.4.** Diagrama de blocos da metodologia de hidrólise ácida.

### 4.3. Sistemas utilizados para os ensaios de hidrólise com CPA

Para os ensaios de hidrólise com CPA foram utilizados dos sistemas descritos a seguir:

#### 4.3.1. Reator com membrana de placa plana (*flat Sheet*)

O primeiro sistema testado para hidrólise com CPA era constituído por um módulo de placa plana de ultrafiltração (Pellicon<sup>TM</sup>-2 Mini Holder), que possui membrana de celulose regenerada com área efetiva de 0,1 m<sup>2</sup>, de 1 kDa de corte, como mostrado na Figura

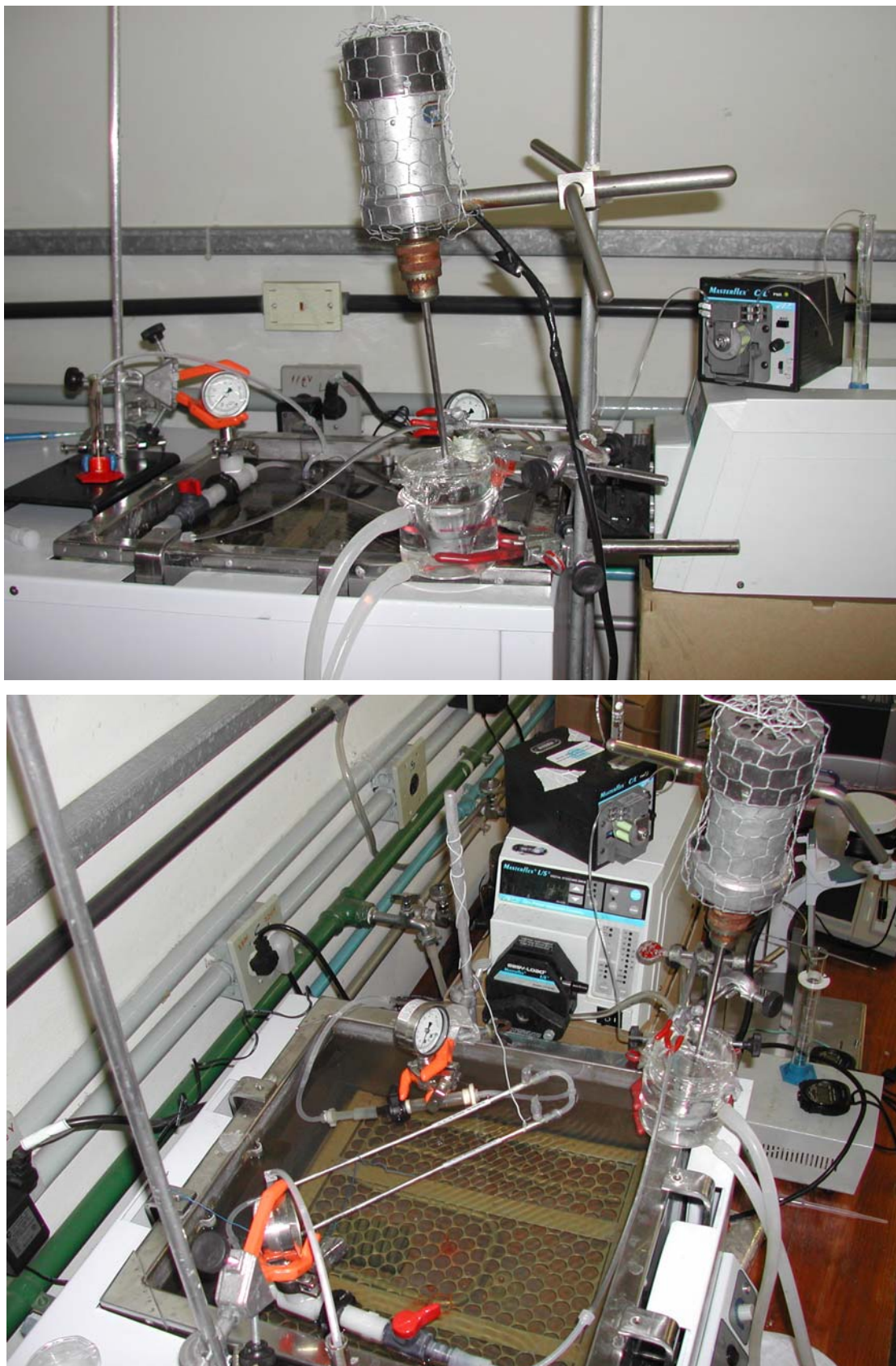
4.5. O sistema consistia de um reator encamisado para manter a temperatura da reação em 45°C, com duas bombas de recirculação e alimentação Masterflex L/S (Cole Palmer). O sistema continha ainda dois manômetros, para medida das pressões de entrada e saída da unidade de ultrafiltração e, finalmente, duas provetas, reservatórios para a alimentação e para o permeado. O número de Reynolds para esta unidade foi definido como  $Re_{placa\ plana} = \frac{F_2}{L\nu}$ . Aqui  $F_2$  é vazão de recirculação,  $\nu$  é a viscosidade cinemática do fluido e  $L$  é a largura da unidade. Esta definição admite que a espessura do canal do fluxo,  $e$ , como dimensão característica do aparato (a área do fluxo transversal é  $e.L$ ). A unidade foi operada a 25°C.



**Figura 4.5:** Foto do sistema REM (Reator + Membrana placa plana) para hidrólise com CPA.

#### 4.3.2. Reator com membrana de fibra oca (*hollow fiber*)

Além do sistema que utiliza o módulo de ultrafiltração de placas com membrana de celulose regenerada, na etapa final do trabalho foi testado outro sistema para a hidrólise com CPA, como mostrado na Figura 4.6 (vistas frontal e superior).



**Figura 4.6:** Fotos do REM (Reator + Membrana *fibra oca*) para processo de hidrólise com CPA.

Para o sistema da Figura 4.6 foram usados dois módulos tipo fibra oca de polisulfona de 1 kDa em paralelo, cada uma com 26 cm<sup>2</sup> de área útil (Amersham Biosciences). O sistema consiste de um reator encamisado para manter a temperatura da reação a 45°C, e duas bombas Masterflex L/S (Cole Palmer) e Masterflex C/L, uma para recirculação e outra para alimentação. As membranas em paralelo ficam submersas em um banho de água quente (50°C), com o intuito de baixar a viscosidade do hidrolisado e, portanto, facilitar a passagem do permeado. O sistema contém ainda dois manômetros, para medida das pressões de entrada e saída, e duas provetas, reservatórios para a alimentação e para o permeado. Para esta unidade, a qual tem  $n = 6$  fibras com diâmetro interno  $d$ , o número de Reynolds foi definido como  $Re_{fibra\ oca} = \frac{4F_2}{n\pi d v}$ . Esta unidade foi operada a 45°C para reduzir a queda de pressão.

#### 4.3.3 Caracterização dos módulos de membrana

Os dois tipos de membranas, placa plana e fibra oca, inicialmente foram acondicionadas mediante lavagem exaustiva com água deionizada, NaOH 0,4 mol/L e mais água para enxugar, sempre à temperatura de 50°C, até se obter uma vazão do permeado especificada pelo fabricante. Em seguida foram caracterizadas mediante as seguintes determinações:

##### 4.3.3.1. Determinação da permeabilidade da membrana limpa

Para os dois tipos de membrana foram realizados ensaios com água destilada, para determinar sua permeabilidade, antes dos ensaios com hidrolisado de soro de queijo. Monta-se o sistema de ultrafiltração com recirculação, colocando água com uma vazão de recirculação de  $5 \times 10^{-2}$  L/min. Para o sistema com membrana de placa plana coletam-se amostras (em duplicata) do fluxo do permeado durante um minuto para diferentes pressões (0; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 bar) e, para o sistema com membrana de fibra oca, durante dez minutos (0; 0,4; 0,55; 0,78; e 0,95 bar). Determina-se o fluxo de permeado por pesagem. Os dados de fluxo vs pressão são ajustados mediante regressão linear.



#### 4.3.3.2. Determinação dos valores de $R_m$ e $R_p$

As características de desempenho do módulo de membrana de placa plana foram estudadas também usando água destilada e hidrolisado de quimotripsina com uma concentração de  $45,6 \text{ g}_{\text{Proteína}}/\text{L}$  ajustado a pH 7, sem adição de enzima. Em ambos os casos, o retido é reciclado para o reator. A vazão de recirculação foi a mesma utilizada para os ensaios com enzima ( $5 \times 10^{-2} \text{ L/min}$ ). O sistema e a metodologia anteriormente descritos foram usados para determinar os valores de  $R_m$  (resistência ao transporte através da membrana) e  $R_p$  (resistência devido ao fenômeno de polarização da concentração) (Guadix *et al.*, 2006).

Esta determinação não foi realizada para o sistema com membrana de fibra oca porque não foi possível coletar as amostras no permeado em pressões menores de 1 bar para o hidrolisado do soro de queijo.

### 4.4 Ensaios de Hidrólise com CPA

Foram realizados em torno de vinte ensaios de hidrólise com CPA, dos quais somente doze chegaram a seu fim por problemas operacionais e de outras naturezas, como queda da energia elétrica, rompimento de mangueiras e outros.

#### 4.4.1 Primeira etapa de ensaios de hidrólise com CPA

Nesta etapa foram realizados vários ensaios preliminares para ajuste do equipamento, após o que realizaram-se corridas para validação do modelo matemático desenvolvido e para avaliação do desempenho do REM. A seguir descrevem-se as condições operacionais desses ensaios.

##### 4.4.1.1. Ensaio (1) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)

Para este ensaio foram utilizadas  $75 \times 10^{-3} \text{ L}$  de soro de queijo hidrolisado previamente com quimotripsina,  $\text{GH}_Q = 12,4\%$ . A hidrólise com CPA foi iniciada com  $1,0 \text{ g}$  de gel ( $84 \text{ U}_{\text{H-Phc}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ) nas seguintes condições operacionais: pH 7;  $45^\circ\text{C}$ ; agitação no reator (mecânica) de 750 rpm; pressão transmembrana 0,6 bar; vazão de recirculação  $50 \times 10^{-3} \text{ L/min}$ ; tempo de operação de 5 horas e alimentação no reator controlada manualmente, sistema liga-desliga, objetivando manter o volume reacional constante durante o experimento. Foram

alimentados  $100 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro e  $225 \times 10^{-3}$  L de solução dialisante. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos somente no reator.

#### **4.4.1.2. Ensaio (2) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)**

Neste ensaio também foram utilizadas  $75 \times 10^{-3}$  L de soro de queijo hidrolisado previamente com quimotripsina ( $\text{GH}_Q=12,4\%$ ). A hidrólise com CPA foi iniciada com 1,0 g de gel ( $84 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ) nas seguintes condições operacionais: pH 7,  $45^\circ\text{C}$ , 750 rpm, pressão transmembrana 0,6 bar, vazão de recirculação  $55 \times 10^{-3}$  L/min, tempo de operação de 6 horas, a partir desse ensaio a alimentação no reator foi contínua ( $115 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro e  $98 \times 10^{-3}$  L de solução dialisante). Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

#### **4.4.2 Segunda etapa de ensaios de hidrólise com CPA**

Para esta etapa também foram realizadas várias tentativas de ensaios, sendo dois os considerados nesta etapa.

##### **4.4.2.1. Ensaio (3) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)**

A reação com CPA foi realizada em um reator de membrana utilizando  $75 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina,  $\text{GH}_Q = 12,3\%$ ) a pH 7;  $45^\circ\text{C}$ ; com adição de 1,0 g de gel ( $66,3 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ); vazão de recirculação de  $50 \times 10^{-3}$  L/min; pressão transmembrana de 0,6 e um tempo de operação de 6 horas. Foram alimentados  $75 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro e  $390 \times 10^{-3}$  L de solução dialisante em forma contínua. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

##### **4.4.2.2. Ensaio (4) em batelada seguido de diafiltração com membrana de placa plana (Bat-PP)**

Este ensaio foi realizado em um reator operado em batelada convencional (750 rpm) utilizando  $55 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 12,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7,  $45^\circ\text{C}$ , com adição de 1,1 g de gel ( $54,5 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ) e um tempo de operação de 6 horas, ao longo das quais foram tomadas amostras para

análise de aminoácidos. Após a hidrólise foi realizada a diafiltração, utilizando aproximadamente três vezes o volume inicial, com uma vazão de recirculação na membrana de  $50 \times 10^{-3}$  L/min, pressão transmembrana de 0,6 bar. O tempo de diafiltração foi de 2 horas.

#### **4.4.3 Preparação de substrato com soro de queijo Minas Frescal**

Foi preparado um novo substrato com outra variedade de soro de queijo (Minas Frescal), previamente tratado como no caso anterior (MF e UF). O soro concentrado foi hidrolisado com quimotripsina imobilizada utilizando  $0,07 \text{ g}_{\text{Catalisador}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  ( $40 \text{ mg}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ) até um grau de hidrólise de 12,3 % e posteriormente com um grau de hidrólise de 15,3 %.

#### **4.4.4 Terceira etapa de ensaios**

Apartir desta etapa todos os ensaios foram feitos com soro de queijo Minas Frescal.

##### **4.4.4.1. Ensaio (5) em batelada seguido de diafiltração com membrana de placa plana (Bat-PP)**

Este ensaio foi realizado em um reator de batelada convencional (750 rpm) utilizando  $20 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 12,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7,  $45^\circ\text{C}$ , com adição de CPA imobilizada ( $84 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ),  $237,9 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ , e um tempo de operação de 10 horas ao longo dos quais foram tomadas amostras para análise de aminoácidos. Após a hidrólise foi realizada a diafiltração, utilizando aproximadamente 10 volumes iniciais, com uma vazão de recirculação na membrana de  $50 \times 10^{-3}$  L/min, pressão transmembrana de 0,6 bar. O tempo de diafiltração foi de 2 horas.

##### **4.4.4.2. Ensaio (6) em batelada seguido de diafiltração com membrana de placa plana (Bat-PP)**

Este ensaio foi realizado em um reator de batelada convencional (750 rpm) utilizando  $30 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7,  $45^\circ\text{C}$ , com adição de CPA imobilizada ( $84$

$U_{\text{H-Phe/gGel}}$ ),  $200,0 U_{\text{H-Phe/gProteína}}$  e um tempo de operação de 10 horas ao longo dos quais foram tomadas amostras para análise de aminoácidos. Após a hidrólise foi realizada a diafiltração, utilizando aproximadamente 10 volumes iniciais, com uma vazão de recirculação na membrana de  $50 \times 10^{-3}$  L/min e pressão transmembrana de 0,6 bar. O tempo de diafiltração foi de 2 horas.

#### **4.4.5 Quarta etapa de ensaios**

##### **4.4.5.1. Ensaio (7) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)**

Para esse ensaio foi utilizado  $75 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7;  $45^\circ\text{C}$ ; com adição de 2,2 g de gel ( $101,2 U_{\text{H-Phe/gGel}}$ ); vazão de recirculação na membrana de  $25 \times 10^{-3}$  L/min; pressão transmembrana de 0,25 bar e tempo de operação de 6 horas. Foram alimentados  $198 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro e  $100 \times 10^{-3}$  L de solução dialisante. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

##### **4.4.5.2. Ensaio (8) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)**

Para esse ensaio também foi utilizando  $75 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7;  $45^\circ\text{C}$ ; com adição de 2,5 g de gel ( $98,8 U_{\text{H-Phe/gGel}}$ ); vazão de recirculação na membrana de  $25 \times 10^{-3}$  L/min; pressão transmembrana de 0,25 bar e um tempo de operação de 6 horas. Foram alimentados  $55 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro e  $188 \times 10^{-3}$  L de solução dialisante. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

#### **4.4.6. Quinta etapa de ensaios**

Nesta etapa foram realizados os dois últimos ensaios consecutivos no sistema com membrana de placa plana.

#### 4.4.6.1. Ensaio (9) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)

Para esse ensaio foi utilizado  $75 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7;  $45^\circ\text{C}$ ; com adição de 2,25 g de gel ( $100 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ); vazão de recirculação na membrana de  $25 \times 10^{-3}$  L/min; pressão transmembrana média de 0,4 e um tempo de operação de 6 horas. Foram alimentados somente com  $235 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro com quimotripsina. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

#### 4.4.6.2. Ensaio (10) em reator com membrana de placa plana (REM-PP)

Esse ensaio foi realizado em seguida ao ensaio (9), sem se ter efetuado a lavagem do sistema de ultrafiltração, utilizando  $75 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ). A reação com CPA foi realizada a pH 7;  $45^\circ\text{C}$ ; com adição de 2,25 g de gel ( $100 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ); vazão de recirculação na membrana de  $25 \times 10^{-3}$  L/min; pressão transmembrana média de 0,6 bar e um tempo de operação de 6 horas. Foram alimentados  $190 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro com quimotripsina. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

#### 4.4.7 Sexta etapa de ensaios

Foram realizados dois ensaios com o novo módulo de fibra oca, um em REM e outra em batelada seguido de diafiltração.

#### 4.4.7.1. Ensaio (11) em reator com membrana de fibra oca (REM-FO)

Para este ensaio foram utilizados  $40 \times 10^{-3}$  L de substrato previamente hidrolisado com quimotripsina:  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ . A reação com CPA foi realizada a pH 7;  $45^\circ\text{C}$  com adição de 1,2 g de gel ( $101 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ) vazão de recirculação na membrana de  $50 \times 10^{-3}$  L/min; pressão transmembrana média de 1,4 bar e um tempo de operação de 10 horas. Foram alimentados  $25 \times 10^{-3}$  L de hidrolisado de soro com quimotripsina e  $15 \times 10^{-3}$  L de solução

dialisante. Foram tomadas amostras ao longo do tempo para análise de aminoácidos tanto no reator como no permeado.

#### 4.4.7.2. Ensaio (12) em batelada seguido de diafiltração com membrana de fibra oca (Bat-FO)

Este ensaio foi realizado em um reator operado em batelada convencional (750 rpm) utilizando  $40 \times 10^{-3}$  L de substrato (previamente hidrolisado com quimotripsina: GH = 15,3%). A reação com CPA foi realizada a pH 7; 45°C; com adição de 1,2 g de gel ( $101 U_{H-Phe}/g_{Gel}$ ) e um tempo de operação de 10 horas, ao longo dos quais foram tomadas amostras para análise de aminoácidos. Após a hidrólise foi realizada a diafiltração, utilizando 1 volume de hidrolisado de CPA e 1 volume de solução dialisante, vazão de recirculação na membrana de  $50 \times 10^{-3}$  L/min, pressão transmembrana 1,4 bar.

Na Tabela 4.3 apresenta-se uma listagem resumida de ensaios realizados no presente trabalho.

**Tabela 4.3:** Ensaio de hidrólise com CPA realizados nos dois sistemas

Ensaio	GH <sub>Q</sub> (%)	V* × 10 <sup>3</sup> (L)	CP † (g/L)	CE × (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> )	E/S † (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Pro</sub> )	HSQ <sup>o</sup> × 10 <sup>3</sup> (L)	‡SD × 10 <sup>3</sup> (L)	V/A <sup>o</sup> (cm)	Duração (min)
1 REM-PP	12,4	75	46,3	84,0	24,2	100	225	$7,5 \times 10^{-2}$	300
2 REM-PP	12,4	75	45,6	84,0	24,5	115	98	$7,5 \times 10^{-2}$	360
3 REM-PP	12,3	75	49,7	66,3	18	75	390	$7,5 \times 10^{-2}$	360
4 Bat-PP	12,3	55	49,7	54,5	22,2	0	150	-	480
5 Bat-PP	12,3	20	48,5	84,0	238	0	105	-	720
6 Bat-PP	15,3	30	45,6	84,0	200	0	210	-	720
7 REM-PP	15,3	75	50	101,2	60	198	100	$7,5 \times 10^{-2}$	360
8 REM-PP	15,3	75	50	98,8	60	55	188	$7,5 \times 10^{-2}$	360
9 REM-PP	15,3	75	50	100,0	60	235	0	$7,5 \times 10^{-2}$	360
10 REM-PP	15,3	75	50	100,0	60	190	0	$7,5 \times 10^{-2}$	360
11 REM-FO	15,3	<b>40</b>	50	101,0	60	<b>25</b>	<b>15</b>	<b><math>71,4 \times 10^{-2}</math></b>	<b>600</b>
12 BAT-FO	15,3	<b>40</b>	50	101,0	60	<b>0</b>	<b>40</b>	-	<b>945</b>

\*Volume do reator

†Concentração de material protéico

\*Carga enzimática no gel

†Razão enzima;substrato

oVolume de hidrolisado processado

‡Volume de solução dialisante

oRazão (volume de reator)/(área de membrana)

## CAPITULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho enfocou duas etapas do processo proposto para obtenção de um hidrolisado protéico com reduzido teor de fenilalanina (Phe), embora com diferentes ênfases: na primeira etapa, promoveu-se a hidrólise das proteínas do soro de queijo concentrado pela endoprotease quimotripsina imobilizada em gel de agarose e na segunda, cujo substrato é o produto da primeira proteólise, a hidrólise com auxílio da exoprotease Carboxipeptidase A (CPA), imobilizada na mesma matriz. O foco desta tese é o REM para essa segunda etapa, mas a hidrólise com quimotripsina era um pré-tratamento essencial e, assim, aspectos dessa reação tiveram, também, que ser abordados aqui.

Como o escopo do trabalho era o processo para obtenção de um hidrolisado protéico com baixo teor de Phe para pacientes fenilcetonúricos, foi necessário incorporar outra etapa aos estudos: a ultrafiltração, para separar os aminoácidos liberados por ação da CPA, principalmente Phe (além de outros inibidores da reação). Para isso, utilizou-se reator enzimático de membrana (REM), comparando-se seu desempenho com o de um reator batelada, seguido por processo de ultrafiltração.

A concepção de reator REM aqui apresentada é, até onde vai nosso conhecimento, inédita. Muitas vezes biorreatores de membrana são empregados com a finalidade de reter a enzima solúvel no meio reacional, enquanto se permite a retirada de produto. Essa configuração, entretanto, apresenta problemas no que se refere à estabilidade da enzima livre, como se descreveu na revisão da literatura: inativação térmica, por variações de pH e, no caso de proteases, causada por autólise. Outra possibilidade, reportada na literatura, é a imobilização da enzima sobre a própria membrana. Essa alternativa acopla o biocatalisador à superfície filtrante, diminuindo a flexibilidade do sistema com respeito à máxima carga enzimática a ser empregada.

O grupo de Engenharia de Processos Enzimáticos do DEQ/UFSCar, coordenado pela Profa. Raquel Giordano, tem grande experiência em desenvolvimento de biocatalisadores, particularmente com a enzima ligada a partículas insolúveis. Essa experiência foi importante para definir a concepção do REM aqui apresentado, e as discussões com o grupo foi essencial para viabilizar essa alternativa. Assim, estudou-se aqui um reator de membrana com a enzima imobilizada em partículas esféricas de gel de agarose, retidas no volume reacional propriamente dito por um filtro. Com isso, a membrana de ultrafiltração ficou a cargo apenas da separação dos aminoácidos (e, eventualmente, pequenos peptídeos)

presentes no hidrolisado, o qual era reciclado continuamente para o frasco contendo a enzima imobilizada.

Foram realizados ensaios para caracterização da membrana de placa plana, para em seguida serem feitos ensaios em diferentes condições experimentais no processo integrado (reação com enzima imobilizada acoplada à ultrafiltração), utilizando, como substrato, o soro de queijo tipo *Prato*. Essa escolha foi circunstancial, em função de a Cooperativa de Laticínios de São Carlos, que fornecia a matéria-prima para os estudos, estar produzindo esse tipo de queijo quando foi coletado o soro para esses primeiros ensaios. A expectativa era que o tipo de queijo não iria ser crucial para definir as condições de reação para remover a Phe do hidrolisado. Entretanto, observou-se que os primeiros resultados não foram satisfatórios (leia-se baixo teor de Phe no hidrolisado). Por uma questão de tempo disponível para conclusão da tese, decidiu-se então usar como matéria prima o soro de queijo tipo *Minas Frescal*, que fora utilizado em trabalhos anteriores (Galvão, 2004; Tardioli, 2003), e novamente disponibilizado pela Cooperativa de Laticínios S. Carlos. Certamente, com estudos mais detalhados seria possível otimizar o processo para o soro de queijo *Prato*, mas o referido laticínio havia novamente alterado sua linha de produção, e apenas soro de queijo *Minas Frescal* estava disponível.

Esses inconvenientes poderiam ser superados caso se tivesse optado por utilizar um soro de queijo já processado, em pó, como existem vários no mercado. Mas o enfoque desta tese era fundamentalmente tecnológico, e o intuito era testar o processo com a matéria-prima real. Essa opção condicionou o andamento dos trabalhos.

A membrana usada de início, plana com  $1000\text{cm}^2$ , era um complicador em termos de escalonamento do processo em laboratório (*scale down*), pois os volumes de reator que podiam ser testados com o equipamento disponível eram limitados. Com isso, a razão volume de reator/área de membrana era muito baixa. Optou-se como alternativa testar uma nova membrana (*hollow fiber*) de menor área ( $0,52\text{cm}^2$ ), que fornecia uma razão volume de reator/área de membrana ordens de grandeza menor.

Foi desenvolvido, também, um modelo matemático do REM, e suas previsões foram comparadas a dados experimentais de hidrólise com CPA.

Finalmente, foi comparado o desempenho de três sistemas: reator com membrana de placa plana, reator com membrana de fibra oca e reator em batelada, seguida por diafiltração com membrana de fibra oca. Apresentam-se a seguir esses resultados.



### 5.1. Propriedades físicas e composição do concentrado de soro de queijo

A Tabela 5.1 apresenta alguns dados sobre o soro do queijo tipo *prato* concentrado, obtidas experimentalmente:

**Tabela 5.1:** Propriedades físicas e composição do soro de queijo (Prato) concentrado ( $\pm$  desvio padrão de triplicatas).

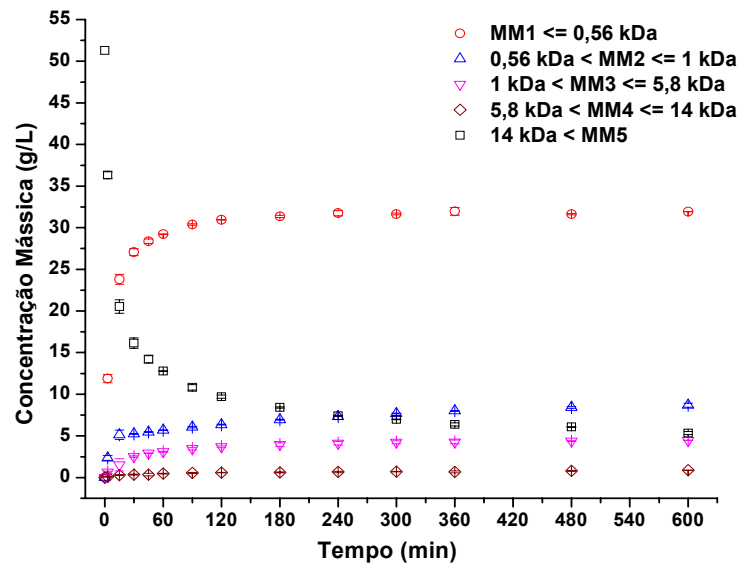
Parâmetros	Composição	Temperaturas		
		25°C	45°C	55°C
Densidade (g/mL)		$1,04 \pm 4 \times 10^{-4}$	$1,03 \pm 1 \times 10^{-3}$	$1,03 \pm 1 \times 10^{-3}$
Viscosidade (cp)		$1,70 \pm 7 \times 10^{-3}$	$1,22 \pm 3 \times 10^{-2}$	$0,95 \pm 3 \times 10^{-2}$
Índice de Refração (°Brix)		$1,35 \pm 2 \times 10^{-3}$		
Absorbância		$0,46 \pm 3 \times 10^{-3}$		
pH		$5,27 \pm 1 \times 10^{-2}$		
Proteínas (g/L)	$60,6 \pm 4,0 \times 10^{-1}$			
Lactose (g/L)	$44,2 \pm 1,0 \times 10^{-1}$			

### 5.2. Distribuição de peptídeos nos hidrolisados de quimotripsina

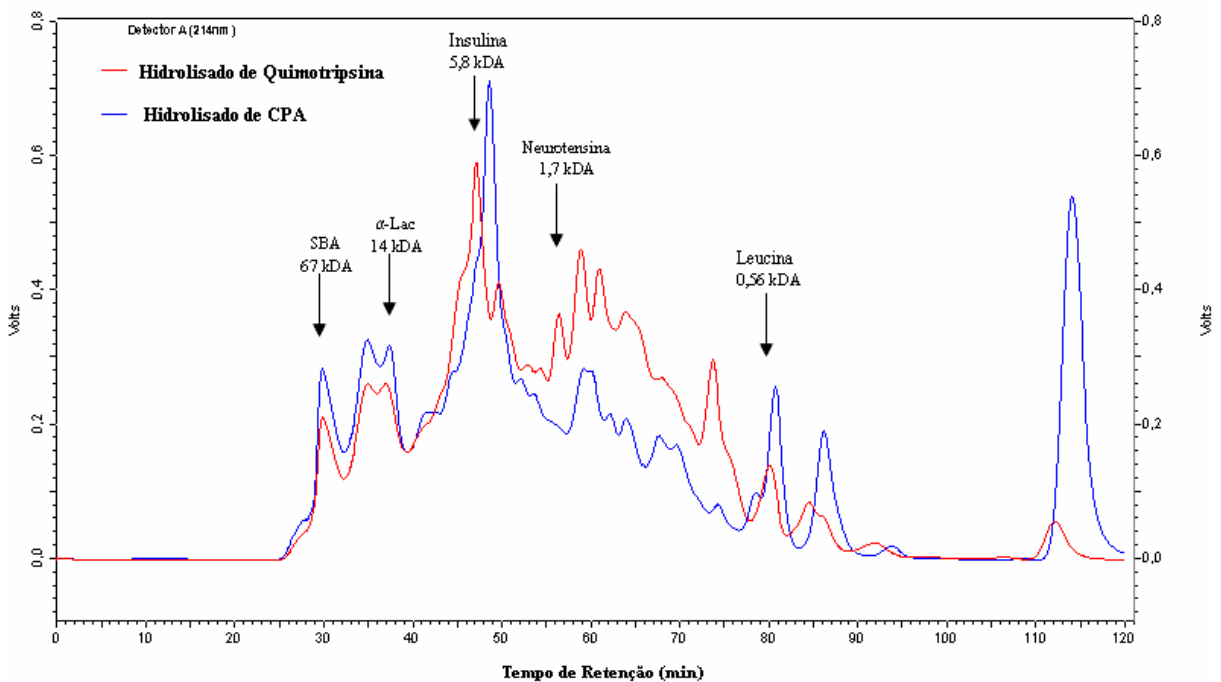
A Figura 5.1 apresenta a distribuição de peptídeos ao longo do tempo de hidrólise de soro de queijo *prato* com quimotripsina para pH 8 e 55 °C, utilizando 25ml de soro ( $50 \text{ g}_{\text{Proteína}}/\text{L}$ ) com  $0,08 \text{ g}_{\text{catalisador}}/\text{g}_{\text{proteína}}$  ( $40 \text{ mg}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ).

Como se pode ver na Figura 5.1, a ação da quimotripsina promove alteações no perfil de massas molares, uma vez que peptídeos menores são gerados a partir de sua ação como endoprotease.

Na Figura 5.2 estão ilustrados os cromatogramas após hidrólise de soro de queijo *minas frescal* com quimotripsina ( $\text{GH}_Q = 15,3\%$ , pH 8, 55°C,  $50 \text{ g}_{\text{Proteína}}/\text{L}$ ,  $0,07 \text{ g}_{\text{catalisador}}/\text{g}_{\text{proteína}}$ ,  $40 \text{ mg}_{\text{Derivado}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ) e, posteriormente, com CPA no REM de fibra oca (pH 7, 45°C, razão inicial Enzima/Substrato  $60 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ , e carga de  $101 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Gel}}$ ).



**Figura 5.1:** Distribuição de peptídeos durante hidrólise com quimotripsina, pH 8,0, 55°C, utilizando 25ml de soro prato (50 g<sub>Proteína</sub>/L) com 0,08 g<sub>catalisador</sub>/g<sub>proteína</sub> (40mg<sub>enzima</sub>/g<sub>Gel</sub>). Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.



**Figura 5.2:** Cromatogramas de exclusão por tamanho para hidrolisado com quimotripsina e hidrolisado com CPA (razão inicial Enzima/Substrato 60 U<sub>H-Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub>, e carga de 101 U<sub>H-Phe</sub>/g<sub>Gel</sub>) no REM de *fibra oca*, a partir de soro de queijo *minas frescal*. As setas indicam os tempos de retenção para os marcadores utilizados.

A Figura 5.2 mostra claramente a ação da CPA, liberando aminoácidos (e eventualmente di- e tri-peptídeos). O anexo II traz a seqüência das principais proteínas do soro e uma tabela com o conteúdo teórico de cada aminoácido.

A partir destes resultados, fica evidente que alguma perda de peptídeos pela membrana de 1 kDa será inevitável.

### **5.3. Sistemas Utilizados para Hidrólise com CPA**

Como descrito no item (4.3) foram usados dois sistemas, REM *placa plana* e REM *fibra oca*, para a hidrólise com CPA. Inicialmente, foi realizado estudo de caracterização das membranas, apresentado a seguir.

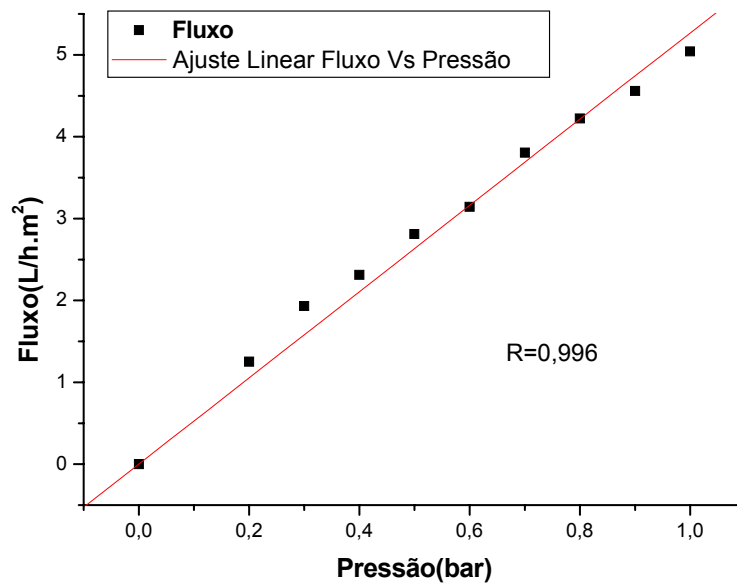
#### **5.3.1 Caracterização das membranas**

Como resultado do acondicionamento das membranas obteve-se uma vazão do permeado de 3,00 ml/min para o módulo de placa plana e 0,05 ml/min para a membrana de fibra oca, como especificado pelos fabricantes.

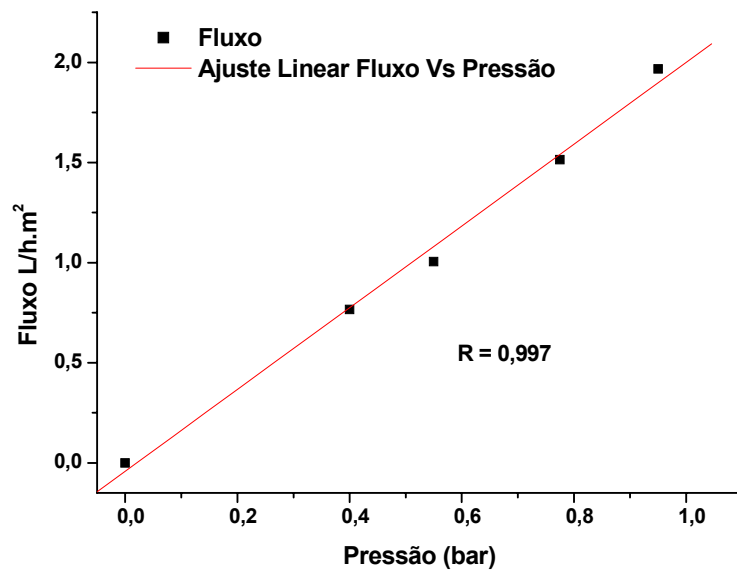
##### **5.3.1.1 Determinação da permeabilidade das membranas limpas**

A determinação da permeabilidade da membrana limpa foi feita com solvente puro, neste caso água destilada.

Nas Figuras 5.3 e 5.4 apresentam-se os fluxos do permeado em função da pressão da água destilada para as membranas de placa plana e de fibra oca. Os pontos experimentais foram ajustados por regressão linear, cujos coeficientes angulares (5,27 e 5,04 L/bar.h.m<sup>2</sup>) representam as permeabilidades das respectivas membranas. Uma forma simples de verificar a eficiência de limpeza da membrana é analisar a vazão, que deve ser tomada sempre a uma mesma pressão, depois de cada lavagem. Essa vazão deve ser próxima da obtida para membranas novas.



**Figura 5.3:** Fluxo do permeado em função da pressão da água destilada para a determinação da permeabilidade da membrana de placa plana (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm<sup>2</sup>, Millipore Pellicon<sup>TM</sup>-2 Mini Holder, modelo: XX42PMINI).



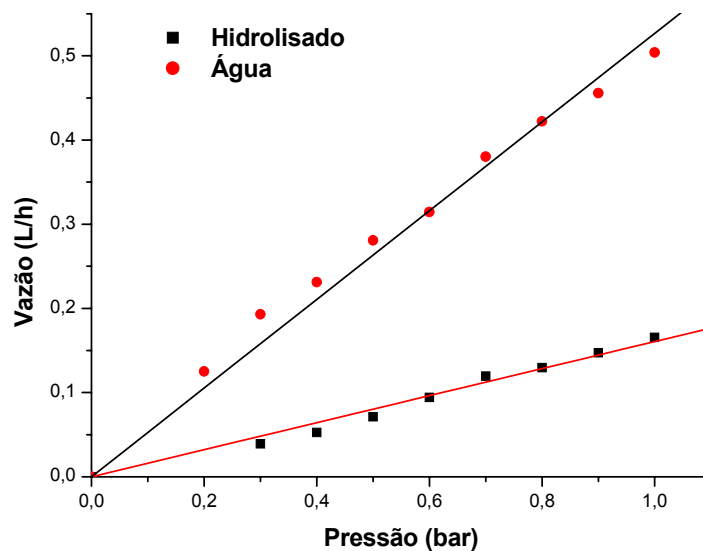
**Figura 5.4:** Fluxo do permeado em função da pressão da água destilada para a determinação da permeabilidade das membranas de fibra oca (polissulfona, 1 kDa, 56 cm<sup>2</sup>, Amersham Biosciences Co., modelo: UFP-1-C-MM01).

### 5.3.1.2 Determinação dos valores de $R_m$ e $R_p$

Este ensaio foi realizado somente para o sistema com membrana de placa plana, pois para a fibra oca não foi possível coletar amostras no permeado em pressões menores de 1 bar para o hidrolisado do soro de queijo.

Na Figura 5.5 é apresentado o gráfico de vazão do permeado ( $Q_p$ ) em função da pressão transmembrana ( $P_T$ ) para água e hidrolisado de soro para o sistema com membrana de placa plana. Não foi observado nenhum comportamento assintótico para o hidrolisado, o que sugere que a operação ocorre em uma região controlada pela pressão (Guadix *et al.*, 2006).

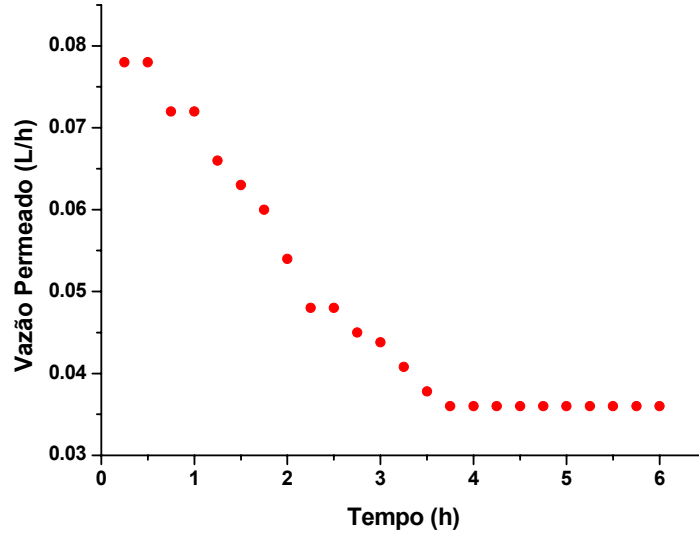
$R_m$  e  $R_p$  são, respectivamente, as resistências devido ao transporte através da membrana e ao fenômeno de polarização da concentração.  $R_m$  pode ser calculada como o inverso da inclinação da reta ajustada para a vazão de água ( $R_m=1,8984$  h.bar/L).  $R_p$  resulta da diferença entre o inverso da inclinação da reta ajustada para a vazão do hidrolisado e  $R_m$  ( $R_p=4,3286$  h.bar/L).



**Figura 5.5:** Relação entre o fluxo da vazão do permeado ( $Q_p$ ) e a pressão trans-membrana ( $P_T$ ) no módulo da membrana de placa plana (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm<sup>2</sup>).

Na Figura 5.6 observa-se que, como resultado do fenômeno de *fouling* ou incrustação da membrana, a vazão do permeado ( $Q_p$ ) decresce ao longo do tempo, mantendo-se constante a partir de 3,75 h até o final do ensaio, sugerindo que o regime estacionário foi

atingido com respeito à deposição de componentes do meio reacional sobre a superfície ou dentro dos poros da membrana.

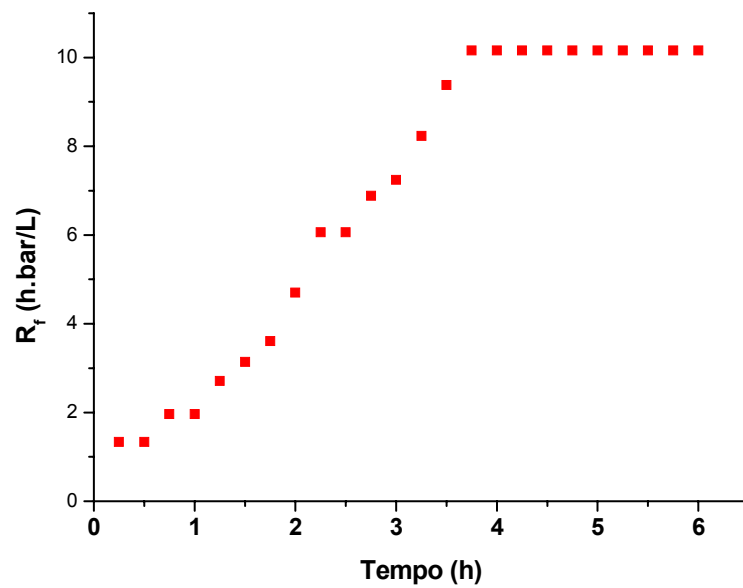


**Figura 5.6:** Evolução da vazão do permeado ( $Q_P$ ) no sistema com membrana de placa plana (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm<sup>2</sup>)

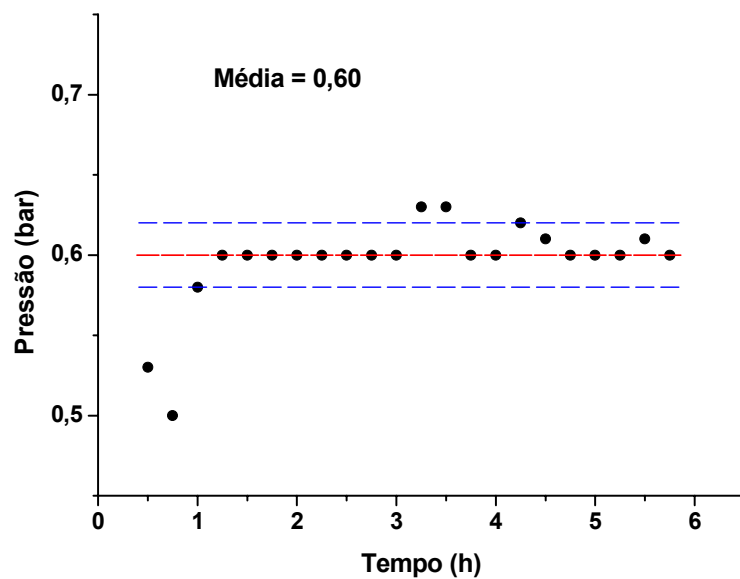
De acordo com o modelo de resistência de Cheryan (1998), o decréscimo na vazão do permeado está correlacionado ao aumento na resistência devido ao *fouling* ( $R_f$ ), o qual pode ser calculado via Equação 5.1, uma vez que  $R_m$  e  $R_p$  foram obtidos inicialmente para a membrana limpa (antes de realizar os ensaios). A evolução de  $R_f$  é apresentada na Figura 5.7:

$$Q_P = \frac{P_T}{R_m + R_p + R_f} \quad (5.1)$$

A pressão transmembrana se manteve praticamente constante ao longo da reação, com um desvio padrão pequeno, como se pode observar na Figura 5.8 (para um ensaio típico). Assim, foi considerada a média ( $0,60 \pm 2 \times 10^{-2}$  bar) para os cálculos pertinentes.



**Figura 5.7:** Evolução da resistência devido ao *fouling* ( $R_f$ ) da membrana de placa plana. (celulose regenerada, 1kDa, 1000 cm<sup>2</sup>)



**Figura 5.8:** Pressão média transmembrana ao longo de uma reação (6h) de hidrólise com CPA no sistema com membrana de placa plana com vazão de recirculação de 3 L/h.

### 5.3.2 Ensaio de hidrólise com CPA

#### 5.3.2.1. Primeira etapa de ensaios

Inicialmente foram realizados vários ensaios REM (sistema acoplado: reator mais unidade de diafiltração), com a finalidade de verificar o comportamento do sistema.

Dessa primeira etapa, foram considerados somente dois ensaios, os quais apresentaram ainda diversas deficiências que foram contornadas no decorrer do trabalho.

Os dois ensaios realizados como descrito no item (4.4.1) diferem no modo de alimentação: para o ensaio (1), a vazão de alimentação foi controlada manualmente, sistema liga-desliga, objetivando manter o volume reacional constante durante o experimento, enquanto no ensaio (2) a alimentação foi contínua e controlada mediante uma bomba peristáltica.

Em ambos os casos foram alimentados, inicialmente, hidrolisado de soro com quimotripsina (HSQ) e, em seguida, solução dialisante (SD), sob as condições operacionais mostradas na Tabela 5.2.

No ensaio (1) não foram tomadas as vazões do permeado ao longo do tempo. Portanto, não foi possível utilizar o modelo matemático do REM para simulações por falta de dados.

A análise dos ensaios (1) e (2) nos proporciona uma visão geral do processo e de suas limitações. Além disso, são pontos de referência para a realização de futuros ensaios.

Para esta etapa foi tomado como base de cálculo o total teórico de Phe (livre e ligada) contida no concentrado de proteínas de soro de queijo, de acordo com a Tabela 2.2.

A conversão em Phe (X) para a hidrólise sequencial do soro de queijo com quimotripsina e CPA, é definida como:

$$X_{Phe} = \frac{N_{liberada}^{Phe} - N_{Phe}^0}{N_{total}^{Phe} - N_{Phe}^0} \quad (5.2)$$

onde  $N_{liberada}^{Phe}$  moles de Phe liberada durante a reação (reator + permeado para o REM),  $N_{total}^{Phe}$  é o total de moles de Phe disponível no substrato (livre e ligada);  $N_{Phe}^0$  é o número de moles de Phe livres previamente disponível no substrato.



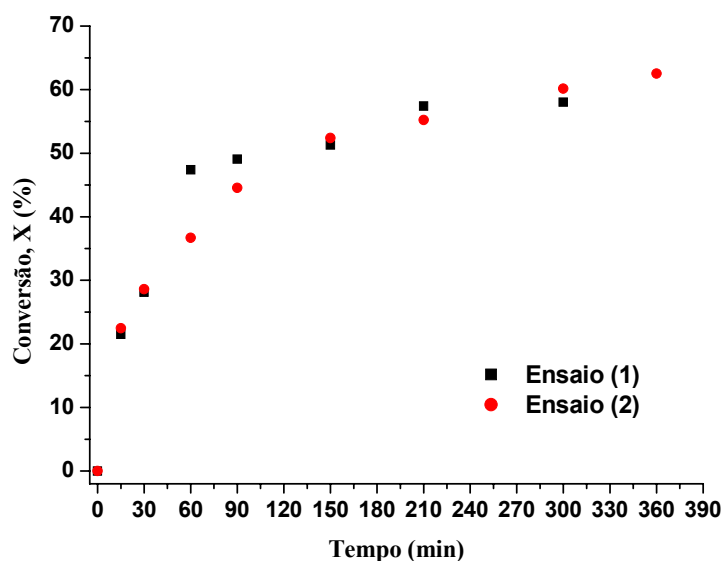
**Tabela 5.2:** Condições operacionais dos ensaios 1 e 2 (substrato: HSQ, queijo prato)

Condições operacionais	Ensaio	
	1	2
Temperatura (°C)	45	
pH	7	
Agitação (rpm)	750	
GH <sub>Q</sub> (%)	12,4	
Volume de reação (L)	75×10 <sup>-3</sup>	
Concentração inicial de proteína no substrato (g/L)	46,3 ± 0,44 (*)	45,6 ± 0,44 (*)
Carga de CPA (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>gel</sub> )	84	
Concentração no reator (U <sub>H-Phe</sub> /L)	1120	
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	24,2	24,6
Vazão de recirculação (L/min)	50×10 <sup>-3</sup>	55×10 <sup>-3</sup>
Pressão média transmembrana (bar)	0,6 ± 3×10 <sup>-3</sup> (*)	
Tempo de operação (h)	5	6
Volume alimentado hidrolisado de soro (L)	100×10 <sup>-3</sup>	115×10 <sup>-3</sup>
Volume alimentado solução dialisante (L)	225×10 <sup>-3</sup>	98×10 <sup>-3</sup>
Conteúdo inicial de Phe, livre mais ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	38,2 (**)	
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	7,5×10 <sup>-2</sup>	
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.1)	9,3	

\* Desvio-padrão de triplicatas.

\*\* Valor teórico segundo Adler-Nielsen

Na Figura 5.9, observa-se que ambos os ensaios apresentam comportamentos diferentes; depois de 5 horas de reação a conversão atingida pelo ensaio (2) é ligeiramente superior à do ensaio (1). A conversão atingida no final da corrida (5 e 6 horas respectivamente) foi de 58,0 % e 62,5 % respectivamente.

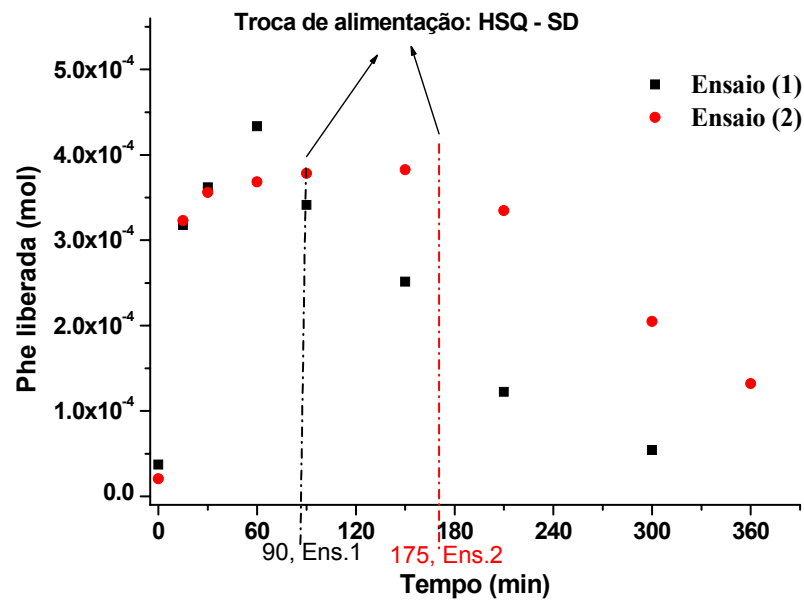


**Figura 5.9:** Conversão de Phe (%) na proteólise com CPA (previamente hidrolisada com quimotripsina 12,4%) em função do tempo.  $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7 para os dois ensaios.

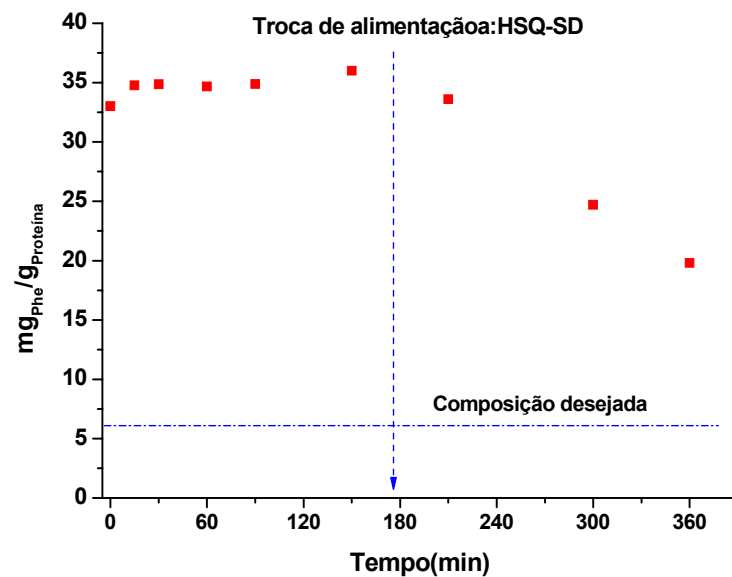
Os resultados da quantidade de Phe liberada (mol) no reator ao longo de tempo para os dois ensaios são mostrados na Figura 5.10, em que se observam comportamentos diferentes para ambos. O ensaio (1) atinge a liberação máxima de Phe em uma hora, já a queda é muito mais rápida do que a do ensaio (2). Acredita-se que isto seja devido ao fato de que o primeiro foi alimentado com mais do que o dobro do volume de solução dialisante.

Esta alimentação foi realizada aproximadamente após 90 min de reação, facilitando o transporte da Phe para o permeado e permitindo, assim, que uma quantidade menor de Phe ficasse no reator em comparação com o outro ensaio, onde a máxima liberação de Phe é atingida praticamente nos primeiros 90 min de reação, mantendo-se quase constante até 175 min, quando ocorre o início da alimentação com solução dialisante.

Na Figura 5.11, apresenta-se a relação entre a massa total teórica de Phe por massa de proteína no reator ao longo do tempo da operação (hidrólise com CPA e separação simultânea mediante a unidade de ultrafiltração com membrana de 1 kDa) para o ensaio (2).



**Figura 5.10:** Evolução da concentração de fenilalanina livre no reator a longo da proteólise com CPA. T = 45 °C, pH 7 para os dois ensaios. HSQ = hidrolisado de soro de queijo prato. SD = solução dialisante



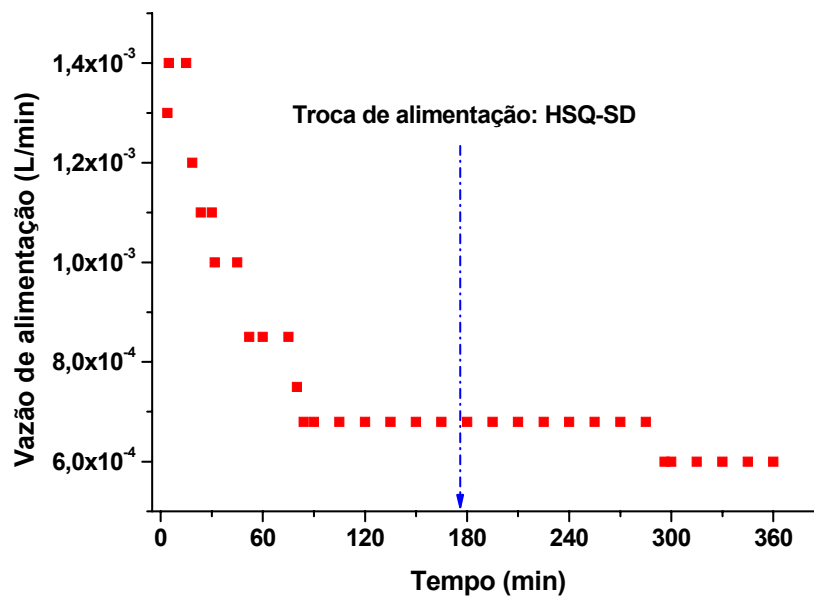
**Figura 5.11:** Relação  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  no reator ao longo do tempo da operação (6 horas) para o ensaio (2).

Como pode ser observado, a relação  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  no reator começa a diminuir somente quando realizada a troca de alimentação de HSQ por SD, sugerindo que com uma alimentação de menor quantidade de HSQ e maior de SD poder-se-á caminhar no sentido de atingir o valor especificado por Lara (1997) para pacientes fenilcetonúricos, de 6

$\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ . Em contrapartida, a alimentação com SD fez com que a concentração protéica no reator também diminuísse.

A importância do conteúdo de Phe total no hidrolisado com CPA fez-nos implantar metodologia de hidrólise ácida do meio reacional, para posterior quantificação dos aminoácidos totais presentes em HPLC, o que passou a ser feito rotineiramente a partir do próximo ensaio.

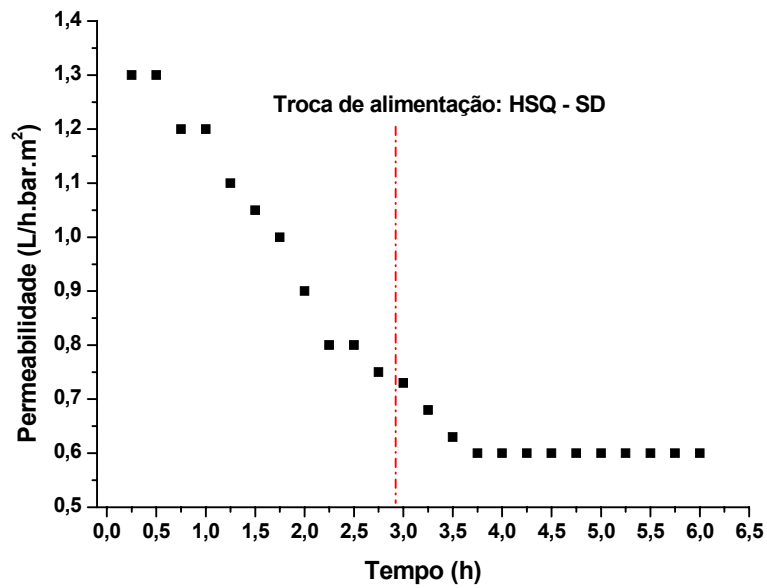
Na Figura 5.12, pode ser observado o perfil de alimentação do reator do ensaio (2) com hidrolisado de soro com quimotripsina (HSQ) e com solução dialisante (SD) (troca após 175 min de reação).



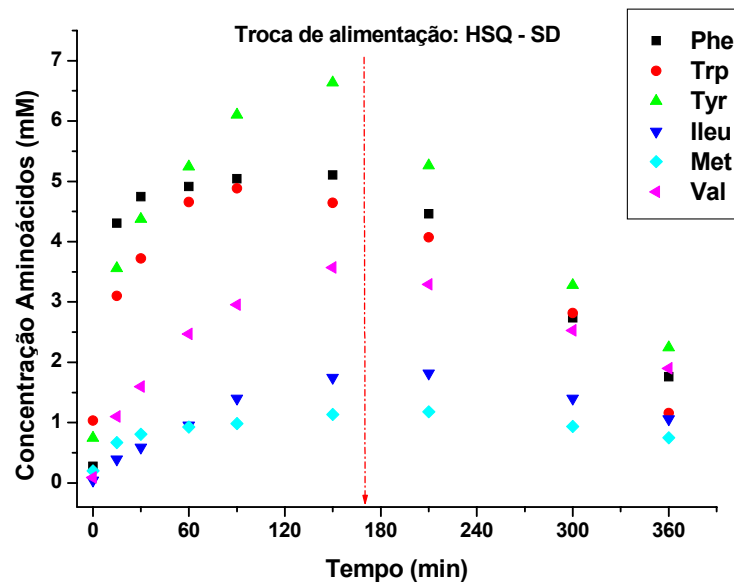
**Figura 5.12:** Perfil de alimentação do REM *placa plana* para o ensaio (2).

Na Figura 5.13, mostra-se a permeabilidade ao longo da reação (6 horas) de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (2). Observa-se que a permeabilidade decresce com o tempo como conseqüência da incrustação da membrana e a partir de 225 min se mantém constante, o que indica que o sistema atingiu o regime estacionário.

Na Figura 5.14 apresenta-se a concentração livre (aminoácidos não ligados aos peptídeos) de seis aminoácidos durante o curso da reação de soro de queijo pré-hidrolisado com quimotripsina, catalisada por CPA com  $24,6 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  no REM. Observa-se que as concentrações para todos os aminoácidos aumentam ao longo de tempo até o momento da troca de alimentação HSQ por SD. A partir desse ponto as concentrações diminuem com o tempo.



**Figura 5.13:** Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (2).



**Figura 5.14:** Concentração de aminoácidos livres no meio reacional, durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo prato pré-hidrolisada com quimotripsina ( $\text{GH}_Q = 12,4\%$ ) catalisada por CPA com  $1120 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{L}$  no REM. Ensaio (2).

Esses primeiros ensaios no REM forneceram uma visão geral do processo em análise. Portanto fica evidente a necessidade de um aprofundamento no estudo da influência

das variáveis de operação no processo como por exemplo, pressão, perfil de alimentação hidrolisado/solução dialisante no reator, concentração da enzima, entre outras.

### 5.3.2.2 Segunda etapa de ensaios

O ponto de partida principal nesta etapa foi realizar a hidrólise ácida do soro de queijo *prato* concentrado e dos demais hidrolisados com a finalidade de quantificar o conteúdo máximo de Phe que se conseguiria liberar para este substrato e, assim, compará-lo com o máximo teórico previsto por Adler-Nissen (1986), que era utilizado até então como referência neste trabalho. Desta forma, seria possível confirmar se o valor aproximado de 60% de conversão que foi obtido na média dos ensaios realizados correspondia, de fato, a pouco mais da metade do conteúdo capaz de ser liberado. Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados obtidos para alguns aminoácidos.

**Tabela 5.3:** Conteúdo ( $\text{g}_{\text{Aminoácido}}/100\text{g}_{\text{Proteína}}$ ), determinado após hidrólise ácida de soro de queijo *prato* utilizado como substrato. Condições de hidrólise ácida (conforme item 4.2.11) HCl 6 N, 110 °C e 24 horas de incubação. Comparação com os valores teóricos previstos por Adler-Nissen (1986).

<b>Aminoácidos</b>	<b>% de aminoácidos no soro (valor médio e desvio padrão de três ensaios)</b>	<b>Referência: Adler-Nissen, 1986.</b>
Valina (Val)	6,86 ± 0,21	6,42
Isoleucina (Ileu)	7,52 ± 0,55	6,92
Leucina (Leu)	13,97 ± 0,77	14,01
Tirosina (Tyr)	3,39 ± 0,59	3,50
Fenilalanina (Phe)	3,84 ± 0,05	3,82
Histidina (His)	2,33 ± 0,80	2,05

Observa-se uma boa concordância com a literatura. Diante disso, a partir desse ponto do trabalho os dados experimentais obtidos por hidrólise ácida apresentados na Tabela 5.3 serão utilizados como referência.

Uma das metas principais para o ensaio seguinte foi alimentar um volume menor de hidrolisado de soro em contrapartida a um maior volume de solução dialisante. O principal problema experimental observado foi a ineficiência do sistema de contenção do gel

com enzima imobilizada dentro do reator. Até aqui se utilizava filtro de ponteira de pipeta automática para o transporte do substrato, sem enzima, do reator até a membrana. Esse filtro tinha área pequena, e depois de algum tempo de operação ficava bloqueado pelo próprio gel, devido à sucção da bomba, impedindo o transporte uniforme do substrato e ocasionando instabilidade ao sistema, principalmente quando foi aumentada a quantidade de enzima imobilizada. A solução foi adaptar, a partir do ensaio 3, um filtro com área maior, evitando dessa maneira a saturação do mesmo (veja descrição no item 3).

Nesta etapa foram realizados dois ensaios: no REM, ensaio (3), e em batelada seguida de diafiltração, ensaio (4). Como apresentaram condições experimentais próximas, os dois ensaios são comparados a seguir.

As condições experimentais dos dois sistemas são apresentadas na Tabela 5.4.

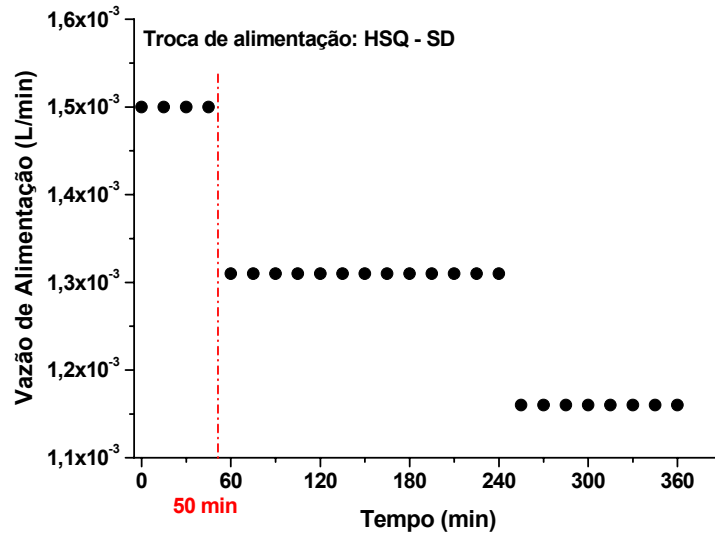
**Tabela 5.4:** Condições operacionais dos sistemas comparados. Ensaio (3): REM. Ensaio (4): batelada seguido de ultrafiltração. Substrato: HSQ *prato*.

Condições operacionais	Ensaio (3)*	Ensaio (4)
pH	7,0	
Temperatura (° C)	45,0	
Agitação (rpm)	750	
GH <sub>Q</sub> (%)	12,4	
Volume de reação (L)	75×10 <sup>-3</sup>	55×10 <sup>-3</sup>
Carga CPA (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> )	66,3	54,5
Concentração da enzima (U <sub>H-Phe</sub> /L)	895	1100
Concentração inicial de proteína no substrato (g <sub>Proteína</sub> /L)	49,66 ± 0,39(**)	
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-PHE</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	18	22,2
Volume de HSQ alimentado ao longo da reação (L)	75×10 <sup>-3</sup>	0
Volume de solução dialisante (L)	390×10 <sup>-3</sup>	150×10 <sup>-3</sup>
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	38,4 ± 0,05(**)	
Pressão média transmembrana (bar)	0,6	
Vazão de recirculação (L/min)	50×10 <sup>-3</sup>	
Tempo total de operação (min), reação + diafiltração	360	480 360 +120
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	7,5×10 <sup>-2</sup>	
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.1)	9,3	

\* depois de 50 min de operação, a alimentação de HSQ foi trocada para solução dialisante, SD.

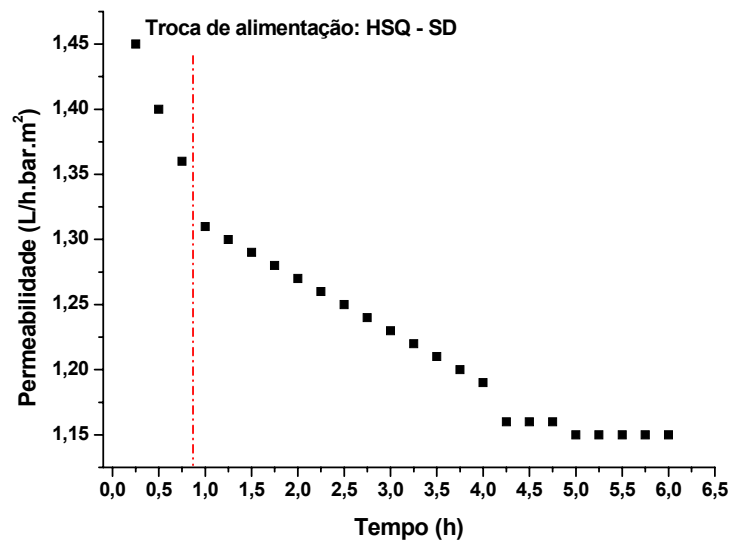
\*\* Desvio-padrão de triplicatas.

A Figura 5.15 mostra o perfil de alimentação do reator no ensaio (3) com hidrolisado de soro (HSQ) e com solução dialisante (SD) (troca após 50 min de reação). Com o objetivo de simplificar a operação do sistema, optou-se por um menor número de degraus na alimentação – compare-se o perfil com o do ensaio (2), Figura 5.12.



**Figura 5.15:** Perfil de alimentação do REM *placa plana* para o ensaio (3).

Na Figura 5.16 mostra-se a permeabilidade ao longo do tempo para o ensaio (3) no REM. Observa-se que inicialmente a permeabilidade vai diminuindo com o tempo, devido à incrustação na membrana e aproximadamente a partir de 4,25 h se atinge o regime estacionário.

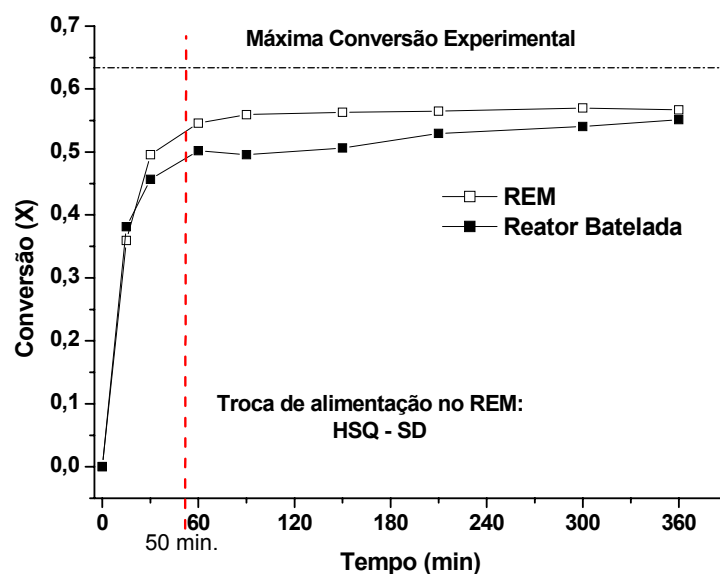


**Figura 5.16:** Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (3).



Para este caso, a conversão ( $X$ ) ao longo da reação, tanto para o reator com membrana como em batelada, é definida pela Equação 5.2 e mostrada na Figura 5.17, onde se pode observar um desempenho ligeiramente superior para o REM (ensaio 3) quando comparado ao reator de batelada (ensaio 4), utilizando a conversão como base para a avaliação.

O perfil de alimentação (HSQ ou SD) certamente afeta a conversão no REM. A otimização desse perfil é certamente de importância crucial para a viabilidade do processo global.

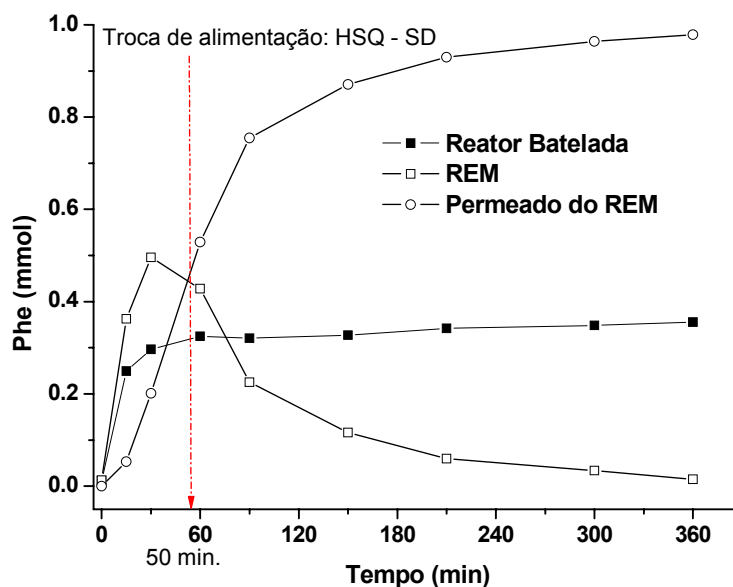


**Figura 5.17:** Conversão da Phe ao longo da hidrólise catalisada por CPA a pH 7 e 45°C. Ensaios 3 (REM) e 4 (batelada). Substrato: HSQ *prato*.

Como foi observada uma conversão relativamente baixa para ambos os sistemas, realizou-se um ensaio em batelada com maior carga e por maior tempo. A conversão máxima atingida para este tipo de soro concentrado, *prato*, foi de 0,63 após 10 horas de hidrólise com CPA a pH 7, 45 °C e 200  $U_{H-Phe}/g_{Proteína}$ , confirmando que as conversões atingidas para os dois sistemas apresentados na Figura 5.17 foram próximas do limite máximo.

A Figura 5.18 apresenta a evolução de Phe livre durante a reação com CPA, para ambos os sistemas. Após 50 minutos de hidrólise, a alimentação no REM foi trocada de hidrolisado de soro com quimotripsina para solução dialisante.

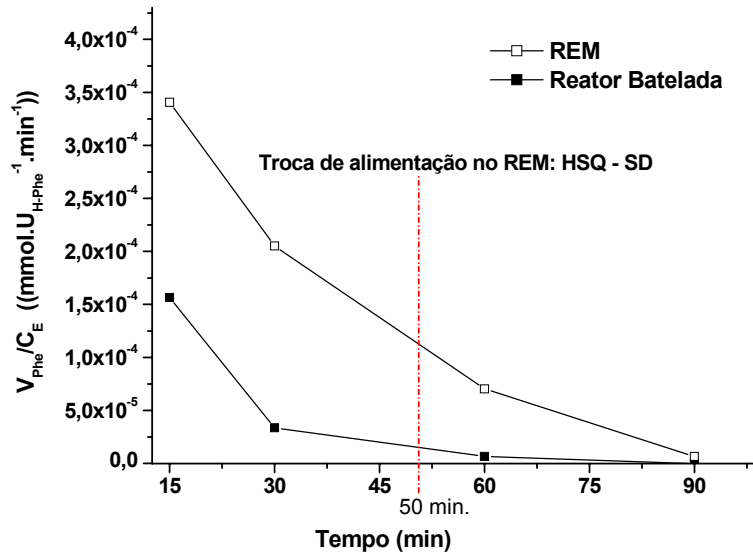
Os perfis da Figura 5.18 mostram que um dos objetivos primeiros do reator com membrana foi atingido, isto é, a remoção de Phe livre do meio reacional. Após a troca da solução de alimentação (hidrolisado de soro por solução dialisante) a remoção de Phe aumentou, como esperado.



**Figura 5.18:** Perfis de Phe liberada durante as reações catalisadas com CPA no reator em batelada e no REM (reator e permeado). Substrato: HSQ *prato*.

Na Figura 5.19 pode ser observado de forma evidente o melhoramento da cinética de reação dentro do REM em razão da diminuição da concentração de inibidores da ação da CPA (aminoácidos livres). Este é o ponto crucial, que justifica o uso do REM, que acopla reação e separação dos aminoácidos produzidos.

Nesta figura, as velocidades de liberação de Phe são apresentadas até 90 min. Depois desse tempo, a velocidade é praticamente constante e igual a zero para ambos os ensaios e, por isso, foi omitida do gráfico. Quando Phe e outros aminoácidos foram removidos do meio de reação, reduziram-se os efeitos inibitórios e, por conseguinte, velocidades de reação mais elevadas foram atingidas. Conseqüentemente, a produtividade em Phe foi mais elevada para o REM (ensaio 3).



**Figura 5.19:** Velocidades de liberação de Phe por unidade da enzima. Hidrolisados por CPA, pH 7,0 e 45°C. Substrato: HSQ *prato*.

As produtividades (P), definidas pela Equação 5.3, são comparadas na Tabela 5.5. A produtividade do REM foi 20% mais elevada do que a do reator intermitente, e acredita-se que com um perfil “ótimo” de alimentação certamente se aumentará ainda mais esse diferencial.

$$P = \frac{M_{PHS}}{R_{Phe/hid}^{PHS} \cdot t \cdot E \cdot M_{Substrato}} \quad (5.3)$$

onde:

$M_{PHS}$  : massa das proteínas no hidrolisado de soro obtido após a diafiltração (g);

$R_{Phe/hid}^{PHS}$  : massa de Phe livre e ligada, por massa do hidrolisado de soro, (mg<sub>Phe</sub>/g<sub>hid</sub>);

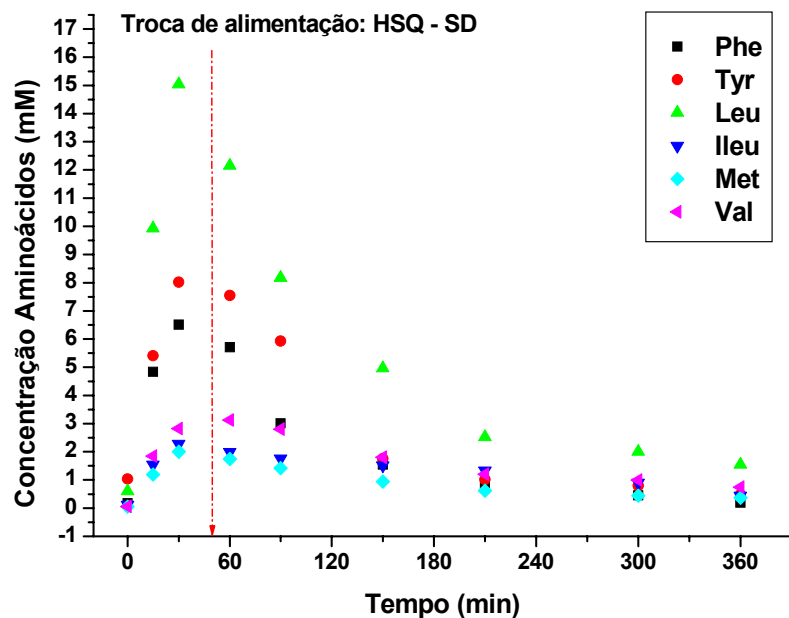
$t$ : tempo total de operação reação mais diafiltração (h);  $E$ : carga de CPA (U<sub>H-Phe</sub>);

$M_{Substrato}$  : massa do substrato processada durante a corrida (g).

**Tabela 5.5:** Comparação das produtividades para REM e batelada.

	<b>Ensaio (3): REM</b>	<b>Ensaio (4): batelada+diafiltração</b>
Massa de hidrolisado de soro obtido no final do processo ( $g_{hid}$ )	2,55	0,98
$R_{Phe/hid}^{PHS}$ ( $mg_{Phe}/g_{hid}$ )	19,3	20,8
Produtividade, $P$ ( $g_{hyd}/mg_{Phe}/U_{H-Phe}/h$ )	$43,4 \times 10^{-6}$	$36,2 \times 10^{-6}$

Na Figura 5.20 mostram-se os resultados das concentrações livres de seis aminoácidos durante o curso da reação de soro de queijo pré-hidrolisado com quimotripsina e em seguida hidrolisado por CPA com  $18 U_{H-Phe}/g_{Proteína}$  no REM. Como pode ser observado, para todos os aminoácidos a concentração aumenta até a troca de alimentação de HSQ por SD e depois desse ponto as concentrações diminuem até o final da reação.



**Figura 5.20:** Concentração dos aminoácidos livres durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo pre-hidrolisada com quimotripsina ( $GH_Q = 12,3\%$ ) catalisada por CPA com  $895 U_{H-Phe}/L$  no REM. Ensaio (3): REM, substrato HSQ *prato*.

Na Tabela 5.6 são apresentados os resultados do balanço de Phe do ensaio no REM e outros resultados importantes:

**Tabela 5.6:** Resultados obtidos no ensaio (3) em reator com membrana (REM), com pré-hidrolisado de soro de queijo *prato* com quimotripsina. Todos os valores em mol<sub>Phe</sub>.

		Total Phe
Phe fornecida ao REM (carga inicial + alimentação)		$1,72 \times 10^{-3}$
Livre	$2,67 \times 10^{-5}$	
Ligada (por diferença)	$1,69 \times 10^{-3}$	
Phe no final da reação (no REM)		$3,16 \times 10^{-4}$
Livre	$1,46 \times 10^{-5}$	
Ligada (por diferença)	$3,01 \times 10^{-4}$	
Phe no permeado		$8,24 \times 10^{-4}$
Livre	$8,24 \times 10^{-4}$	
Ligado (não determinado)		
Phe <sub>alimentada</sub> - Phe <sub>final no Reator</sub> - Phe <sub>permeado</sub> *		$5,78 \times 10^{-4}$
(Phe <sub>alimentada</sub> - Phe <sub>final no Reator</sub> - Phe <sub>permeado</sub> ) / Phe <sub>alimentada</sub> × 100%		33,6%
Conversão atingida**		48%
mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> ao final do processo		20,5
Conteúdo de proteína ao final do processo (g/L)		$33,9 \pm 5 \times 10^{-1}$
Conteúdo de proteína inicial (g/L)		49,66

\* Diferença no balanço global de massa: possível adsorção na membrana e perdas de peptídeos através da Membrana.

\*\* Eq. (5.2)

Como pode ser observado na Tabela 5.6, não foi determinado no permeado o total de moles ligados de Phe, somente a Phe livre. Um balanço de massa total para a Phe (reator + permeado) indica um valor residual de  $5,78 \times 10^{-4}$  mol (33,6% do total alimentado). Essa Phe remanescente pode estar presente ligada a pequenos peptídeos do permeado, e o restante (livre e ligada), supõe-se ter ficado adsorvida na membrana, sendo essa uma possível explicação para a baixa conversão aparente observada no presente ensaio. Note-se que a baixa razão (volume de reator)/(área de membrana) para o equipamento em escala de laboratório distorce esse resultado, pois a área disponível para retenção do aminoácido é

proporcionalmente muito maior que em um equipamento industrial. Esse efeito de *scale down* deve ser considerado ao se analisar a viabilidade econômica do processo.

Objetivando aumentar os níveis da conversão para a Phe liberada, novos ensaios de hidrólises seqüenciais foram planejados usando proteínas de uma nova fonte: soro de queijo *Minas Frescal*, utilizado nas pesquisas anteriores que fizeram parte do projeto (Galvão, 2004; Tardioli, 2003), e novamente disponibilizado pelo fabricante.

O soro *in natura* proveniente da produção de queijo *Minas Frescal* foi esterilizado (conteúdo de proteína de 7,8 g/L); concentrado e caracterizado. Os resultados são mostrados na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7:** Principais características do soro de queijo *Minas Frescal* concentrado ( $\pm$  desvio padrão de triplicatas)

pH (55°C)	$5,13 \pm 1 \times 10^{-2}$
Concentração de Proteína (g/L)	$53,4 \pm 0,4$
Lactose (g/L)	$43,2 \pm 0,1$

Para esta variedade de soro também foi realizada hidrólise ácida tanto para o soro concentrado como para o hidrolisado de quimotripsina, obtendo-se valores muito próximos: 38,3 e 38,1 mg<sub>Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub> respectivamente.

O soro concentrado foi hidrolisado com quimotripsina imobilizada até um grau de hidrólise de 12,3% e utilizado como substrato para hidrólise com CPA. Inicialmente, foi realizado um ensaio em batelada por 10 horas, com 193,4 U<sub>H-Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub>, composta por 61,7 U<sub>H-Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub> de CPA imobilizada mais 131,7 U<sub>H-Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub> de CPA livre, a 45°C, pH 7,0, a fim de verificar qual a máxima conversão obtida em uma condição com alta relação E/S. A conversão atingida foi de  $79,5 \pm 0,03$  %. Como o valor obtido não foi o esperado (próximo de 100 %, como sugere Galvão, 2004), supõe-se que a enzima livre foi desativada, por apresentar tempo de meia-vida de 1,19 min, a 60°C, pH 7,5 (Tardioli, 2003). Portanto, outro ensaio com uma relação E/S ligeiramente maior, 237,9 U<sub>H-Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub>, com enzima imobilizada (meia vida de 35,6 h a 50°C, pH 7, segundo Tardioli, 2003), foi realizado, nas mesmas condições de pH e temperatura (7,0 e 45°C). Obteve-se nesse ensaio uma conversão de 76,2 % (próxima à do ensaio anterior). Assim, comparando os resultados, nota-se que a limitação para a conversão estava em outra variável. Vale lembrar que as conversões são calculadas segundo a Equação (5.2).

O produto obtido na hidrólise anterior (conversão de 76,2 %) foi submetido a uma diafiltração com volume de solução dialisante igual a 10 vezes o volume inicial, com a finalidade de se separar os inibidores do meio, e hidrolisado novamente com 202,3  $U_{H-Ph}/g_{Proteína}$  por 4 horas, nas mesmas condições de pH e temperatura. Uma conversão adicional de 20,8 % foi atingida, tomando como base as concentrações iniciais no soro concentrado, equação 5.2

Portanto, chegou-se à conversão total de 97% (após duas etapas de hidrólise com CPA). Conclui-se daí que a limitação da conversão nos ensaios em batelada era causada por uma combinação de efeitos cinéticos: inibição pelo produto associada à inativação da enzima. Verificou-se novamente, assim, que em ensaios longos em batelada existe uma forte inibição pelos produtos da reação, ratificando a realização da reação no REM.

### 5.3.2.3 Terceira etapa de ensaios

Como não foram atingidos os resultados desejados nos ensaios anteriores, uma nova estratégia de trabalho foi adotada: aumentar o grau de hidrólise com quimotripsina e manter a razão inicial E/S em aproximadamente 200,0  $U_{H-Ph}/g_{Proteína}$  para a hidrólise com CPA.

Assim foram realizados dois novos ensaios: O primeiro utilizando substrato (hidrolisado de soro com quimotripsina) com  $GH_Q=12,3\%$  (ensaio 5) e seus resultados foram comparados com os de outro ensaio (6), utilizando um substrato com  $GH_Q=15,3\%$ . As condições operacionais utilizadas nos ensaios catalisados por CPA são mostradas na tabela a seguir. Note-se que para todas as corridas a partir do ensaio (5) o substrato originava-se de soro de queijo tipo *Minas frescal*.

Como pode ser observado, as condições operacionais para ambos os ensaios são similares (Tabela 5.8), sendo o grau de hidrólise do substrato a variável que influenciaria diretamente na conversão da reação com CPA.

De acordo com a Figura 5.21, nota-se que ambos os sistemas de reação apresentaram comportamento similar. Quando o grau de hidrólise com quimotripsina foi de 12,3%, uma conversão de  $75,5 \pm 4,2\%$  (desvio padrão de dados experimentais medidos em triplicata) foi atingida. Entretanto, aumentando o grau de hidrólise com a mesma enzima para 15,3%, foi obtida uma conversão de  $91,2 \pm 4\%$  (desvio padrão de dados experimentais medidos em triplicata). Esta conversão elevada é associada possivelmente a uma maior

disponibilização de aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe e Trp) no lado carboxi-terminal dos oligopeptídeos obtidos após a ação do quimotripsina por mais tempo, isto é, até um maior grau de hidrólise.

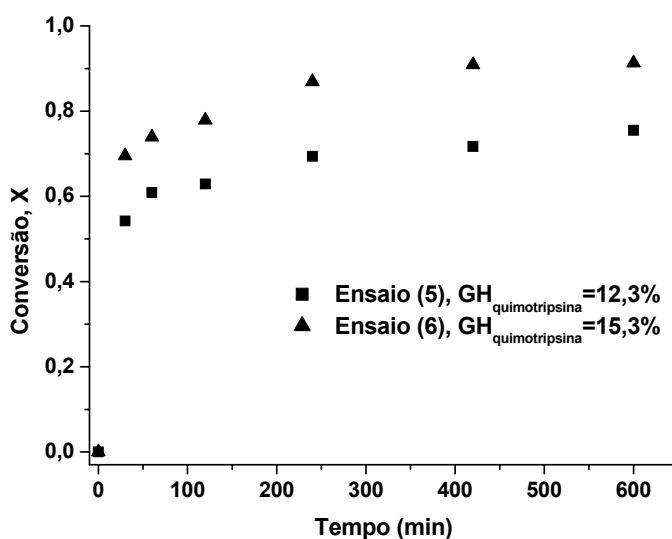
**Tabela 5.8:** Condições operacionais para os dois ensaios em batelada seguida de diafiltração. Substrato HSQ Minas Frescal.

Condições operacionais	Ensaio (5)	Ensaio (6)
Grau de hidrólise com quimotripsina GH <sub>Q</sub> (%)	12,3	15,3
pH	7,0	
Temperatura (° C)	45,0	
Agitação (rpm)	750	
Volume de reação (L)	20×10 <sup>-3</sup>	30×10 <sup>-3</sup>
Concentração inicial de proteína (g <sub>Proteína</sub> /L)	48,5	45,6
Carga CPA (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> )	84	
Carga enzimática no reator (U <sub>H-Phe</sub> /L)	11540	9121
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	238	200
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	38,1 ± 0,2 (*)	
Tempo de operação hidrólise com CPA (min)	600	
Volume inicial do hidrolisado de CPA (L)	10,5×10 <sup>-3</sup>	21×10 <sup>-3</sup>
Volume da solução dialisante (L)	105×10 <sup>-3</sup>	210×10 <sup>-3</sup>
Pressão média transmembrana (bar)	0,6	
Vazão da alimentação da membrana (L/min)	50×10 <sup>-3</sup>	
Tempo de operação da diafiltração (min)	120	
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	7,5×10 <sup>-2</sup>	
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.1)	9,3	

\* Desvio-padrão de triplicatas.

A separação de Phe depois das hidrólises seqüenciais foi feita via diafiltração, como comentado previamente. A concentração de Phe total (livre e ligada) nos hidrolisados obtidos depois da ação de quimotripsina e nos concentrados depois da diafiltração foi determinada usando hidrólise ácida, cujos resultados são mostrados na Tabela 5.9:





**Figura 5.21:** Phe liberada após a ação seqüencial da quimotripsina (55°C, pH 8.0 e graus de hidrólise de 12,3 e de 15,3%) e de CPA (45°C, pH 7,0 e 10 h de reação).

Como se pode observar na Tabela 5.9, ambos os hidrolisados apresentaram aproximadamente a mesma concentração inicial de Phe. No fim do processo com diafiltração (membrana de 1kDa), o ensaio (6) com o GH<sub>Q</sub> inicial de 15,3% resultou em um conteúdo mais baixo de Phe (11,7 mg<sub>Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub>), comparado com os 15,3 mg<sub>Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub> obtidos no ensaio (5), com um GH<sub>Q</sub> inicial de 12,3%, indicando que um maior grau de hidrólise com CPA implica uma maior liberação de Phe. Observou-se também que uma quantidade considerável de proteína foi perdida durante o processo de diafiltração (mostrada na Tabela 5.9). Este fato mostra que a operação de diafiltração deve ser otimizada, objetivando reduzir as perdas dos peptídeos.

**Tabela 5.9:** Phe nos hidrolisados com quimotripsina e após diafiltração nos ensaios (5) e (6).

	<b>Ensaio (5)</b>	<b>Ensaio (6)</b>
Grau de hidrólise com quimotripsina (GH <sub>Q</sub> , %)	12,3	15,3
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	38,0	38,1
Conteúdo final de Phe no concentrado – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	15,3	11,7
Concentração de proteínas no produto final (g <sub>Proteína</sub> /L)	16,4	16,2

### 5.3.3 Ensaios cinéticos de hidrólise com CPA em novas condições: grau de pré-hidrólise com quimotripsina de 15,3% e carga enzimática de 135 $U_{H-Phe}/g_{gel}$

Como demonstrado no ensaio (6) com um grau de hidrólise de 15,3% no pré-hidrolisado com quimotripsina e uma maior relação E/S na hidrólise com CPA foi possível obter uma conversão próxima de 100%. Assim, na seqüência do trabalho, novas condições operacionais foram utilizadas. Primeiro CPA foi imobilizada em gel de agarose, oferecendo-se maior quantidade de enzima por grama de gel, com a finalidade de se obter uma enzima imobilizada com maior carga. Obteve-se uma carga aparente de  $134,5 \pm 3,9 U_{H-Phe}/g_{gel}$ . Com esta alta carga não será preciso usar muito gel no reator, o que prejudicaria a recirculação do substrato no sistema contínuo.

Com estas novas condições, foi realizado um ensaio para determinar a cinética da CPA. Nele foram utilizados 60 ml de pré-hidrolisado de quimotripsina ( $GH_Q = 15,3\%$ ), proveniente de soro de queijo *Minas Frescal*, que foi submetido à ação da CPA ( $E/S = 60 U_{H-Phe}/g_{Proteína}$ ) e  $2968 U_{H-Phe}/L_{reator}$  por 10 horas a pH 7 e 45 °C. Obteve-se uma conversão em torno de 90%. Os novos valores dos parâmetros cinéticos encontram-se no item 3.2 (Tabela 3.1).

#### 5.3.3.1 Quarta etapa de ensaios

Nesta etapa foram realizados dos novos ensaios no REM com o novo substrato (soro de queijo *Minas Frescal* previamente hidrolisado com quimotripsina 15,3%) determinado na etapa anterior.

Inicialmente foi realizado o ensaio (7) mudando algumas condições operacionais no processo como vazão de recirculação, pressão de filtração e estratégia de alimentação. Esta última iniciava com uma vazão baixa, a qual foi aumentando ao longo do tempo até um valor constante, com o propósito de tentar manter o volume do reator invariante. As condições experimentais são mostradas na Tabela 5.10.

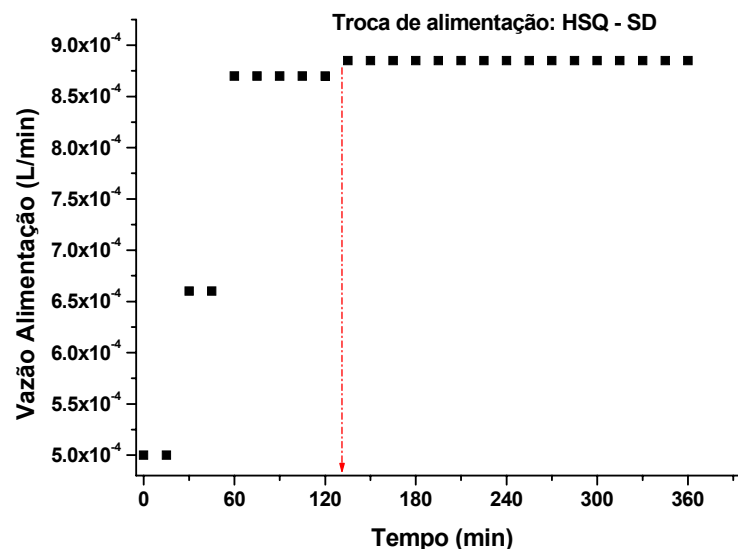
A Figura 5.22 mostra o perfil de alimentação do reator com hidrolisado de soro com quimotripsina (HSQ) e com solução dialisante (SD) (troca após 135 min de reação). Como se pode observar, a vazão de alimentação no reator foi crescente até a troca de HSQ por SD, mantendo-se a seguir uma vazão constante até o final do ensaio.

**Tabela 5.10:** Condições operacionais do ensaio (7) de hidrólise com CPA no REM. Substrato; HSQ Minas frescal

Condições operacionais	Ensaio (7)*
Temperatura (°C)	45
pH	7
Agitação (rpm)	750
Volume de reação (L)	$75 \times 10^{-3}$
GH <sub>Q</sub> hidrolisado quimotripsina (%)	15,3
Concentração do hidrolisado (g <sub>Proteína</sub> /L)	$50 \pm 7 \times 10^{-1}$ (**)
Carga aparente CPA imobilizada (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> )	$101,2 \pm 3,4$ (**)
Concentração da enzima no reator (U <sub>H-Phe</sub> /L)	3000
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	60
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	$38,1 \pm 0,2$ (**)
Vazão da entrada membrana (L/min)	$25 \times 10^{-3}$
Pressão media transmembrana (bar)	0,25
Tempo de operação (min)	360
Volume alimentado hidrolisado de soro (HSQ) (L)	$100 \times 10^{-3}$
Volume alimentado solução dialisante (L)	$198 \times 10^{-3}$
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	$7,5 \times 10^{-2}$
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.1)	4,63

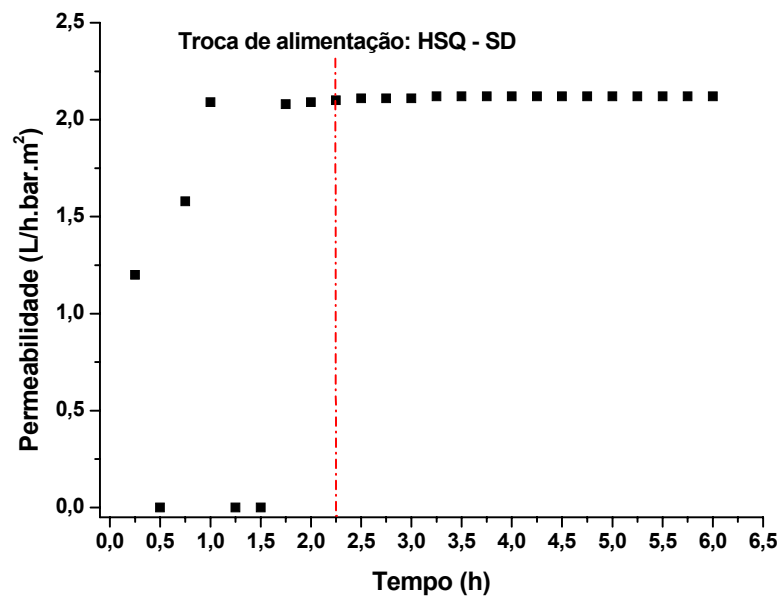
\* depois de 135 min de operação, a alimentação do HSQ foi trocada para solução dialisante.

\*\* média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas



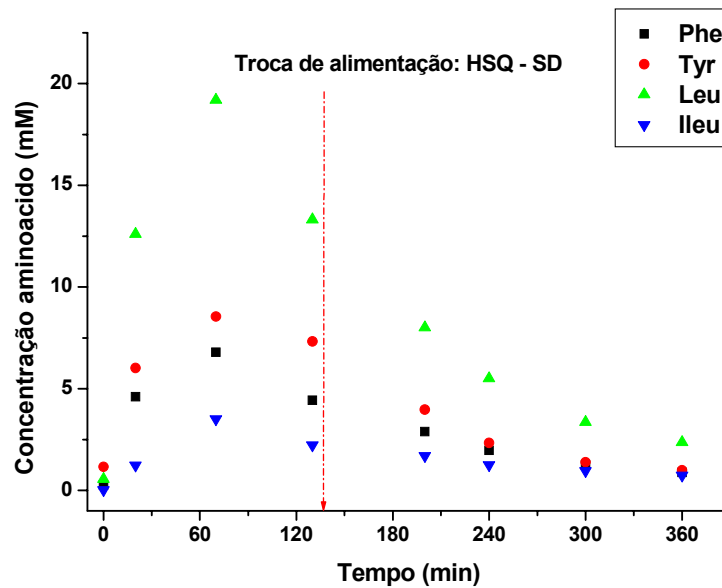
**Figura 5.22:** Perfil de alimentação do REM *placa plana* para o ensaio (7)

Na Figura 5.23 apresenta-se a permeabilidade ao longo do tempo da reação para o ensaio (7) no REM, onde pode ser observado que como consequência da mudança na estratégia na alimentação no reator a permeabilidade apresenta um comportamento totalmente diferente dos ensaios (2) e (3). Até 105 minutos foi muito variável, a partir desse tempo se manteve praticamente constante até o final da reação.



**Figura 5.23:** Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (7).

Na Figura 5.24 mostram-se as concentrações de aminoácidos livres durante o curso da reação de soro de queijo pré-hidrolisado com quimotripsina e, em seguida, catalisado por CPA com  $60 \text{ U}_{\text{H-Phen}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  no REM. Nota-se que a diminuição da concentração para todos os aminoácidos se inicia antes da troca de alimentação de HSQ por SD, ao contrário do que ocorria nos ensaios anteriores (2 e 3). Esta variação de comportamento pode ser devida à mudança na estratégia de alimentação do reator.



**Figura 5.24:** Concentração de aminoácidos livres durante o curso da reação da hidrólise de soro de queijo pré-hidrolisado com quimotripsina ( $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ) catalisada por CPA com  $3000 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{L}$ . Substrato: HSQ *Minas frescal*.

Na Tabela 5.11 são apresentados os resultados do balanço de Phe do ensaio (7) no REM, e outros resultados importantes:

Segundo a Tabela 5.11, também neste ensaio, depois de realizado o balanço, tem-se um residual de  $7,24 \times 10^{-4}$  moles Phe (35,8%, da mesma ordem do obtido no ensaio 3, vide tabela 5.6). Novamente, supõe-se que essa Phe remanescente pode estar presente em forma ligada, em pequenos peptídeos do permeado, e o restante (livre e ligada) ficou adsorvida na membrana.

Neste ensaio, realizado com substrato com um grau de hidrólise de 15,3 %, foi obtida uma conversão ainda baixa, que pode ter sido influenciada pela Phe não contabilizada que ficou adsorvida na membrana e ligada aos peptídeos permeados. O produto final do ensaio (7) apresentou  $20,9 \text{ mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  e um conteúdo de proteínas de 28 g/L, valores ainda insatisfatórios para o produto desejado.

**Tabela 5.11:** Resultados obtidos do ensaio (7) no REM. Todos os valores em mol<sub>Phe</sub>.  
Substrato: HSQ Minas frescal.

		Total Phe
Phe fornecida ao REM (carga inicial + alimentação)		$2,02 \times 10^{-3}$
Livre	$4,45 \times 10^{-5}$	
Ligado (por diferença)	$1,98 \times 10^{-3}$	
Moles de Phe no final da reação (Reator)		$2,66 \times 10^{-4}$
Livre	$6,62 \times 10^{-5}$	
Ligada (por diferença)	$1,99 \times 10^{-4}$	
Moles de Phe no permeado		$1,03 \times 10^{-3}$
Livre	$1,03 \times 10^{-3}$	
Ligado (não determinado)	-----	
Phe <sub>alimentada</sub> - Phe <sub>final no Reator</sub> - Phe <sub>permeado</sub> *		$7,24 \times 10^{-4}$
(Phe <sub>alimentada</sub> - Phe <sub>final no Reator</sub> - Phe <sub>permeado</sub> ) / Phe <sub>alimentada</sub> × 100%		35,8%
Conversão atingida		53,2%
mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> ao final do processo		20,9
Conteúdo de proteína ao final do processo (g/L)		$28,0 \pm 5 \times 10^{-1}$

\* Diferença no balanço global de massa: possível adsorção na membrana e perdas de peptídeos através da membrana.

\*\* Eq. (5.2)

Como a nova estratégia de alimentação, adotada no ensaio (7), não manteve o volume reacional constante, além de ter influenciado negativamente o comportamento da vazão do permeado, foi realizado outro ensaio, de número (8), com as condições experimentais apresentadas na tabela 5.12.

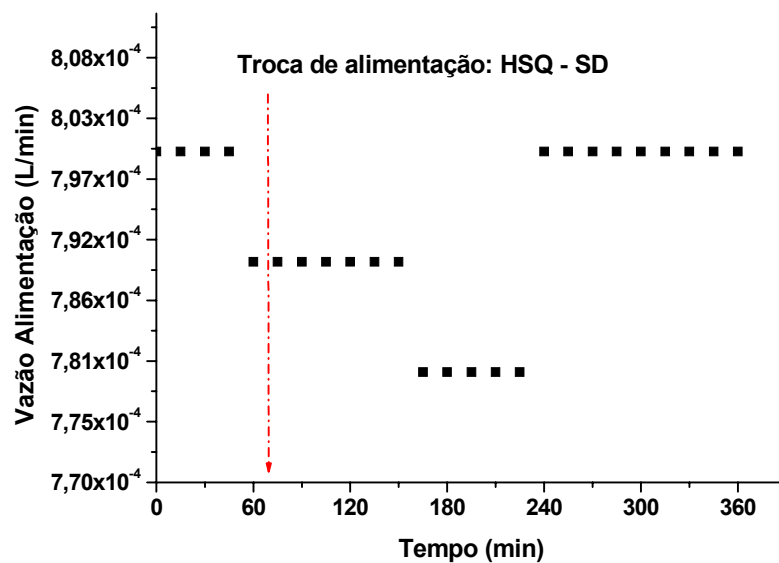
A Figura 5.25 mostra o perfil de alimentação do reator com hidrolisado de soro com quimotripsina (HSQ) e com solução dialisante (SD) (troca após 70 min de reação). Como pode ser observado, neste caso a vazão de alimentação no reator é descendente até 240 minutos. A partir desse ponto, o volume reacional sofreu uma diminuição considerável e a vazão de alimentação foi aumentada até atingir um valor igual à da vazão inicial, mantendo-se constante até o final do ensaio.

**Tabela 5.12:** Condições operacionais do ensaio (8) de hidrólise com CPA no REM. Substrato: HSQ Minas frescal.

Condições operacionais	Ensaio (8)**
Temperatura (°C)	45
pH	7
Agitação (rpm)	750
Volume de reação (L)	$75 \times 10^{-3}$
GH <sub>Q</sub> hidrolisado quimotripsina (%)	15,3
Concentração do hidrolisado (g <sub>Proteína</sub> /L)	$50 \pm 7 \times 10^{-1}$ (*)
Carga aparente CPA imobilizada (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> )	$98,8 \pm 3,4$ (*)
Concentração da enzima no reator (U <sub>H-Phe</sub> /L)	3000
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	60
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	$38,1 \pm 0,2$ (*)
Vazão da entrada membrana (L/min)	$25 \times 10^{-3}$
Pressão media trans-membrana (bar)	0,3
Tempo de operação (min)	360
Volume alimentado hidrolisado de soro (HSQ) (L)	$55 \times 10^{-3}$
Volume alimentado solução dialisante (L)	$188 \times 10^{-3}$
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	$7,5 \times 10^{-2}$
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.1)	4,63

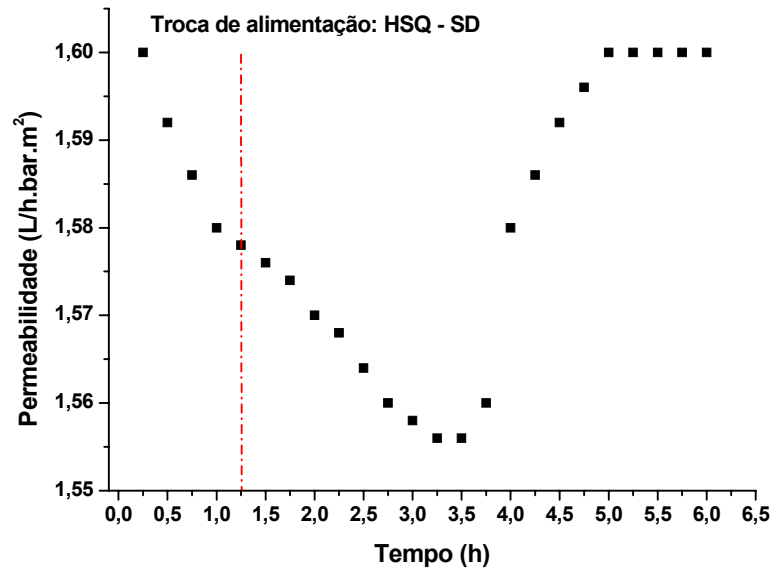
(\*) média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

\*\* depois de 70 min de operação, a alimentação do HSQ foi trocada para solução dialisante.



**Figura 5.25:** Perfil de alimentação do REM *placa plana* para o ensaio (8)

Na Figura 5,26 mostra-se a permeabilidade do ensaio (8) ao longo do tempo de reação de hidrólise com CPA no REM. Observa-se uma vez mais como a forma de alimentação no reator influi no comportamento da permeabilidade.



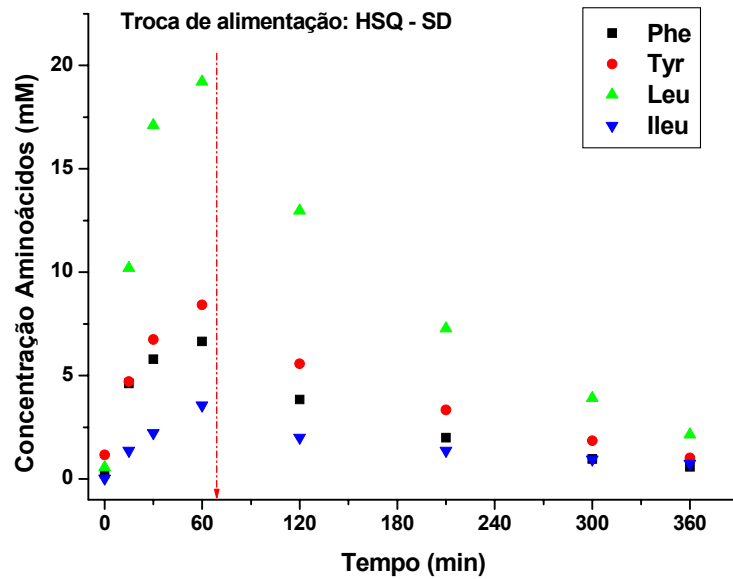
**Figura 5.26:** Permeabilidade a longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (8)

Na Figura 5.27 mostra-se as concentrações de aminoácidos livres durante o curso da reação de soro de queijo pré-hidrolisado com quimotripsina e em seguida catalisado por CPA com  $60 U_{H-Phe}/g_{Proteína}$  REM. Como pode ser observado, para as condições do ensaio (8) o decréscimo da concentração também se inicia logo depois da troca de alimentação de HSQ por SD, como os observados nos ensaios (2) e (3).

Na Tabela 5.13 é apresentado o balanço de Phe do ensaio (8) no REM, além de outros resultados importantes:

Nesse ensaio a conversão atingida (63,1%) foi maior que as obtidas nos ensaios anteriores no REM, porém ainda baixa em comparação com a conversão obtida na hidrólise em batelada (em torno 90%). Da mesma forma, o teor de Phe atingido para o produto ( $17 mg_{Phe}/g_{Proteína}$ ) é menor que o do ensaio (7), porém apresentou um baixo conteúdo de proteínas no produto final. Além disso, nesse ensaio o balanço de massa para a Phe tampouco fechou, tendo um remanescente de  $4,0 \times 10^{-4}$  moles de Phe que podem estar na sua forma ligada no permeado ou retidos na membrana.





**Figura 5.27:** Concentração de aminoácidos livres durante o curso da reação de hidrólise de soro de queijo pre-hidrolisado com quimotripsina ( $\text{GH}_Q = 15,3\%$ ) catalisada por CPA com  $3000 \text{ U}_{\text{H-Phe}}/\text{L}$  no REM. Ensaio (8). Substrato: HSQ *Minas frescal*.

**Tabela 5.13:** Resultados obtidos do ensaio (8) no REM. Todos os valores em  $\text{mol}_{\text{Phe}}$ .

		Total Phe
Phe fornecida ao REM (carga inicial + alimentação)		$1,5 \times 10^{-3}$
Livre	$2,67 \times 10^{-5}$	
Ligada (por diferença)	$1,47 \times 10^{-3}$	
Moles de Phe no final da reação (Reator)		$1,81 \times 10^{-4}$
Livre	$4,34 \times 10^{-5}$	
Ligada (por diferença)	$1,38 \times 10^{-4}$	
Moles de Phe no permeado		$9,19 \times 10^{-4}$
Livre	$9,19 \times 10^{-4}$	
Ligada (não determinado)	-----	
$\text{Phe}_{\text{alimentada}} - \text{Phe}_{\text{final no Reator}} - \text{Phe}_{\text{permeado}}^*$		$4,0 \times 10^{-4}$
$(\text{Phe}_{\text{alimentada}} - \text{Phe}_{\text{final no Reator}} - \text{Phe}_{\text{permeado}}) / \text{Phe}_{\text{alimentada}} \times 100\%$		26,7%
Conversão atingida		63,1%
$\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$		17,0
Conteúdo de proteína ao final do processo (g/L)		$23,4 \pm 5 \times 10^{-1}$

\* Diferença no balanço global de massa: possível adsorção na membrana e perdas de peptídeos através da membrana.

\*\* Eq. (5.2)

### 5.3.3.2 Quinta etapa de ensaios

Depois da realização dos ensaios no REM, com diferentes condições operacionais, observou-se que o produto obtido apresenta ainda um teor de Phe elevado, encontrando-se no limite superior da faixa especificada pelo Ministério da Saúde no Brasil (Portaria N° 847, de 31 de outubro de 2002). Além disso, houve uma perda considerável do conteúdo protéico no produto final, com baixa conversão da reação. Esses resultados provavelmente foram mascarados pela retenção de peptídeos e aminoácidos na membrana, já que sua área é muito grande quando comparada com os volumes do reator. Além disso, em virtude desse baixo volume do reator a vazão de recirculação tinha que ser baixa em relação à especificada para operação da unidade de ultrafiltração.

Para confirmar a hipótese da adsorção de aminoácidos e de peptídeos na membrana, foram realizados mais dois ensaios consecutivos no sistema com membrana de corte de 1 kDa, ou seja, o segundo ensaio foi realizado em continuação ao primeiro sem limpar a membrana. Mediu-se também a Phe ligada a peptídeos do permeado (por hidrólise ácida). Para esses dois ensaios decidiu-se alimentar o reator somente com hidrolisado de soro, com a finalidade de evitar a diminuição da concentração de proteínas por diluição.

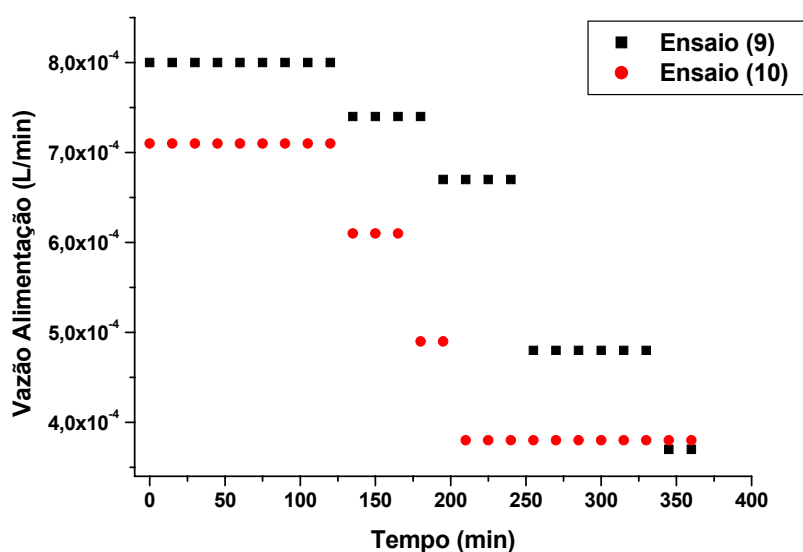
As condições operacionais dos ensaios (9) e (10) são apresentadas na Tabela 5.14.

Na Figura 5.28 apresenta-se a vazão de alimentação no REM, tanto para o ensaio (9) como para o ensaio (10). Como pode ser observado, ambas apresentam um comportamento semelhante, porém o ensaio (10) tem vazões sempre menores com exceção da última faixa de tempo, em que é ligeiramente maior.

**Tabela 5.14:** Condições operacionais dos ensaios de hidrólise com CPA no REM. Substrato: HSQ Minas frescal.

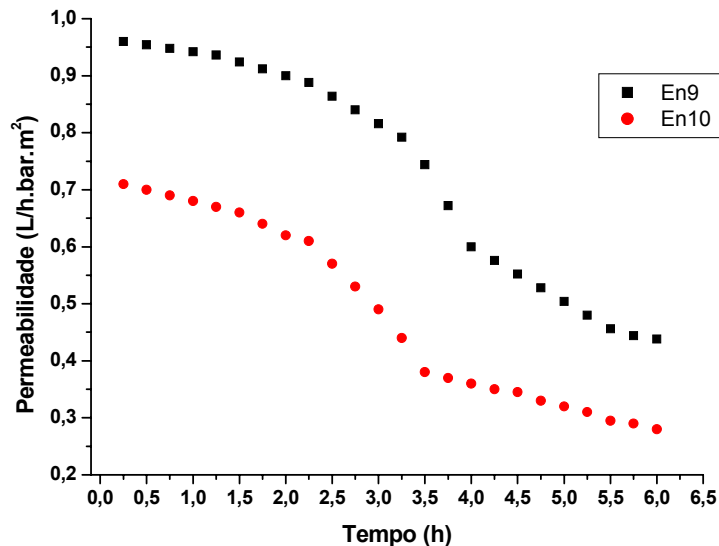
Condições operacionais	Ensaio	
	(9)	(10)
Temperatura (°C)	45	
pH	7	
Agitação (rpm)	750	
Volume de reação (L)	$75 \times 10^{-3}$	
GH <sub>Q</sub> (%)	15,3	
Concentração do hidrolisado (g/L)	50±0,7 (*)	
Carga de CPA imobilizada (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>gel</sub> )	100±3,4 (*)	
Concentração no reator (U <sub>H-Phe</sub> /L)	3000	
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	60	
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	38,1±0,2 (*)	
Vazão de recirculação (L/min)	$25 \times 10^{-3}$	
Pressão média trans-membrana (bar)	0,4	0,6
Tempo de operação (min)	360	
Volume alimentado hidrolisado de soro (L)	$235 \times 10^{-3}$	$190 \times 10^{-3}$
Volume alimentado solução dialisante (L)	0	0
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	$7,5 \times 10^{-2}$	
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.1)	4,63	

(\*) média ± desvio padrão de triplicatas



**Figura 5.28:** Vazão de alimentação do REM *placa plana* para os ensaios (9) e (10).

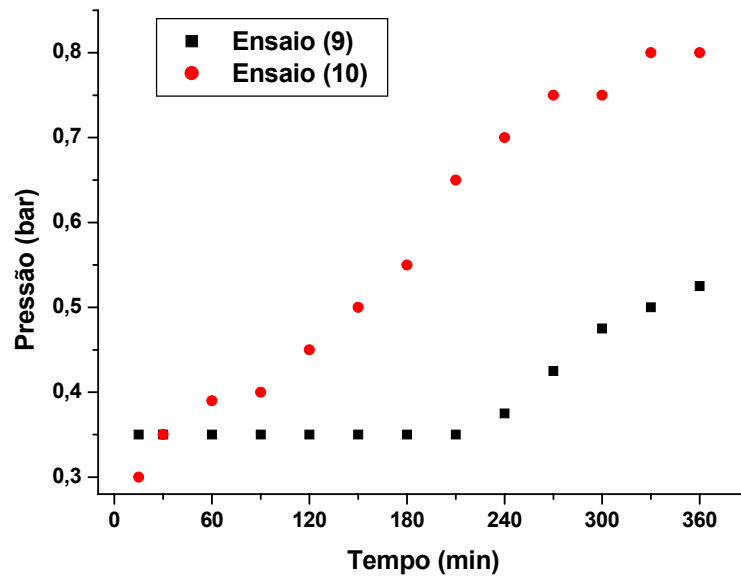
A Figura 5.29 mostra a permeabilidade ao longo do tempo de hidrólise com CPA no REM para os ensaios (9) e (10). Nota-se que para os dois ensaios um comportamento semelhante, sendo as permeabilidades do ensaio (10) menores que do ensaio (9) ao longo de toda a reação devido ao fenômeno da incrustação na membrana.



**Figura 5.29:** Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para os ensaios (9) e (10).

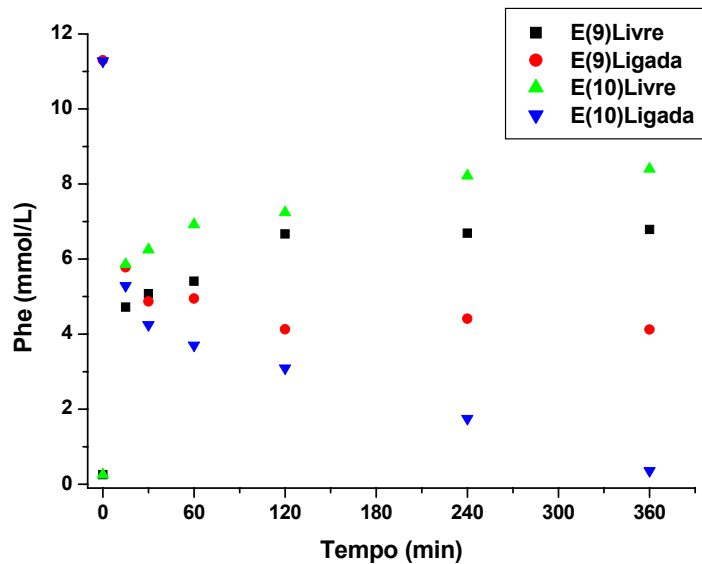
Na Figura 5.30 mostra-se a evolução da pressão trans-membrana ao longo do tempo da reação com CPA para os dois ensaios consecutivos. Como pode ser observado, no ensaio (9) a pressão se mantém constante até 240 minutos e somente a partir desse tempo começa a aumentar até aproximadamente 0,5 bar. No ensaio (10), que foi realizado em continuação ao primeiro sem lavar a membrana, observa-se o aumento da pressão desde o início, pois os poros da membrana já estavam saturados.

A partir dessa etapa, foi realizada hidrólise ácida de amostras do meio reacional ao longo de tempo e, assim, foi possível calcular a evolução da Phe (livre, ligada e total) ao longo da reação.



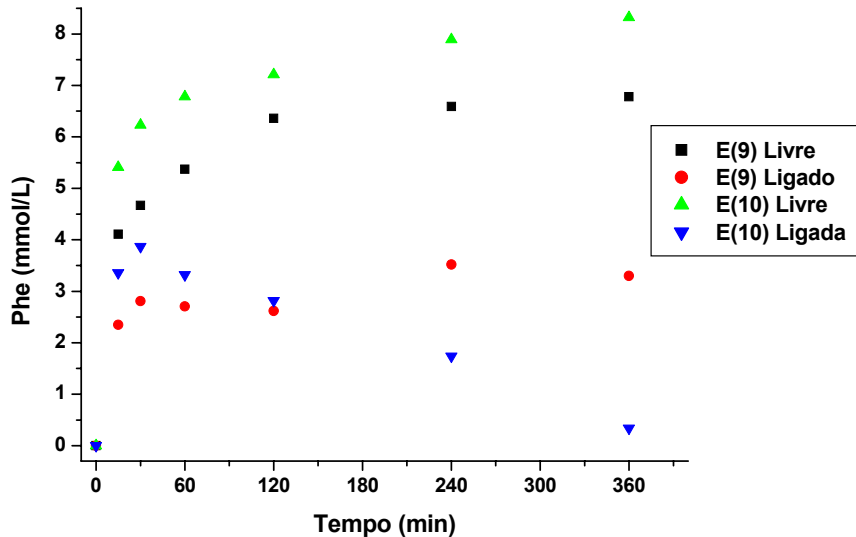
**Figura 5.30:** Evolução da pressão média trans-membrana (bar) ao longo do tempo de reação para os ensaios (9) e (10).

Na Figura 5.31 mostra-se a evolução da Phe livre e ligada no reator ao longo do tempo de reação com CPA para os ensaios (9) e (10). Como pode ser observado o ensaio (10) apresenta maior liberação de Phe ao longo da reação que o ensaio (9).



**Figura 5.31:** Evolução da Phe livre e ligada no reator ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).

Na Figura 5.32 apresenta-se a evolução da Phe livre e ligada no permeado ao longo do tempo da reação com CPA para ambos os ensaios. Como pode ser observado, também para o ensaio (10) a evolução da Phe livre ao longo do tempo é maior que no ensaio (9).

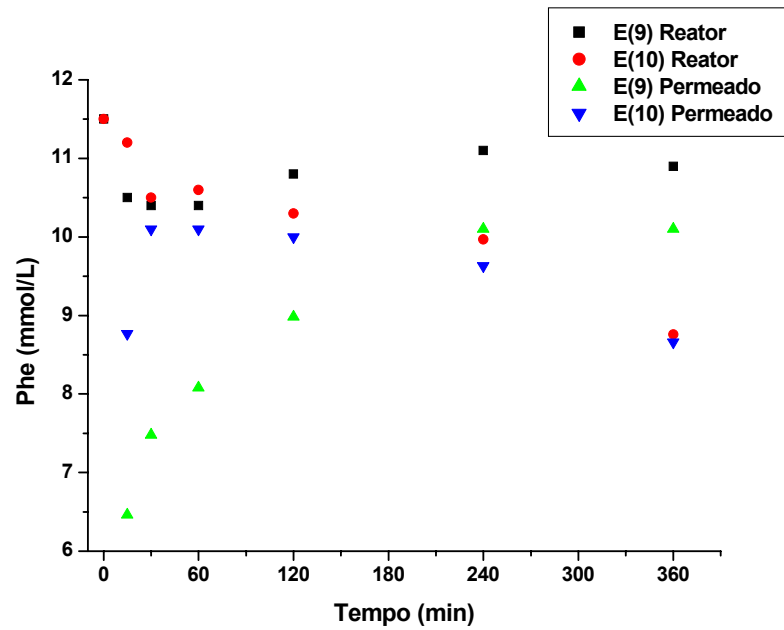


**Figura 5.32:** Evolução da Phe livre e ligada no permeado ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).

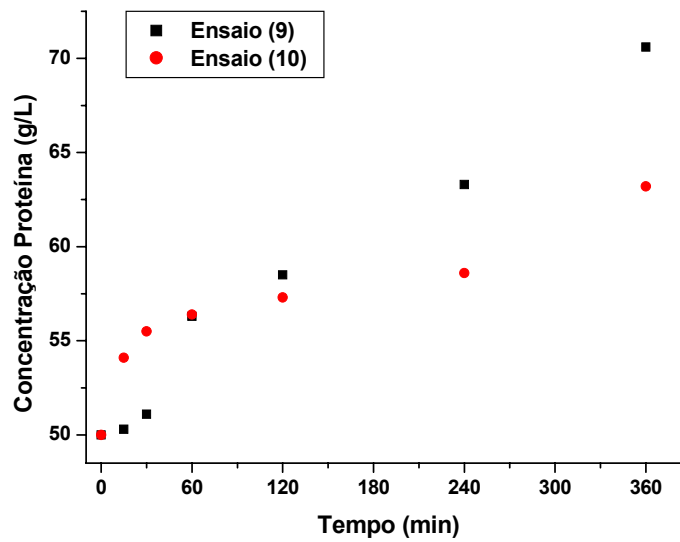
Na Figura 5.33 mostra-se a evolução da Phe total no reator e permeado ao longo do tempo de reação com CPA para os ensaios (9) e (10). Nota-se comportamentos diferentes da evolução da Phe total ao longo do tempo da reação tanto no reator como no permeados para os ensaios (9) e (10).

Na Figura 5.34 ilustra-se a evolução da concentração protéica total ao longo do tempo de reação com CPA para os ensaios (9) e (10). Como pode ser observado, para ambos os ensaios a concentração de proteínas foi aumentando com o tempo principalmente devido à alimentação do reator somente com hidrolisado de sorocom quimotripsina.

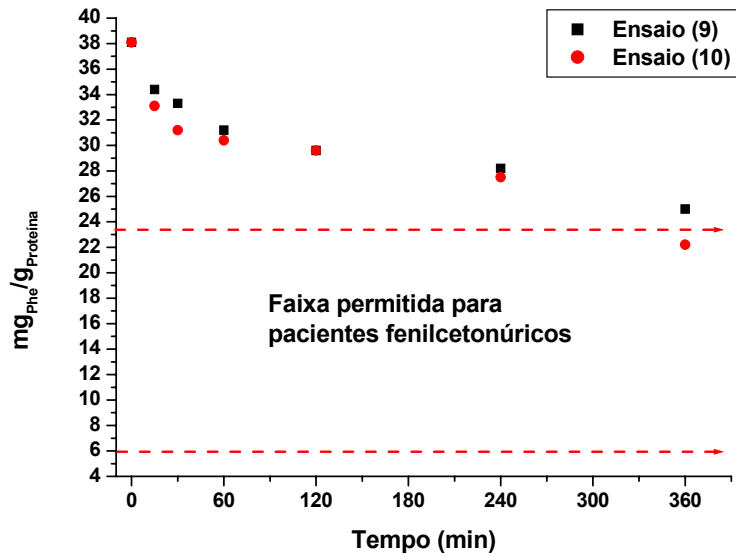
Na Figura 5.35 se apresenta a evolução do teor de Phe ( $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ ) ao longo de tempo de reação com CPA para ambos os ensaios, assim como a faixa permitida para pacientes fenilcetonúricos. Como pode ser observado, somente o ensaio (10) alcança o limite superior da faixa permitida para esta doença.



**Figura 5.33:** Evolução da Phe total no reator e permeado ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).



**Figura 5.34:** Evolução da concentração das proteínas ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).



**Figura 5.35:** Evolução da concentração de  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  ao longo do tempo da reação (360 min) para os ensaios (9) e (10).

Na Tabela 5.15 são apresentados os resultados do balanço total de Phe (moles) dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no reator com membrana e outros resultados importantes:

**Tabela 5.15:** Resultados do balanço de massa dos ensaios (9) e (10) no REM. Todos os valores em  $\text{mol}_{\text{Phe}}$ .

	Ensaio (9)	Ensaio (10)
Phe fornecida ao REM (carga inicial + alimentação)	$3,58 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-3}$
Livre	$7,87 \times 10^{-5}$	$6,73 \times 10^{-5}$
Ligado (por diferença)	$3,50 \times 10^{-3}$	$2,99 \times 10^{-3}$
Moles de Phe no final da reação (Reator)	$8,01 \times 10^{-4}$	$6,37 \times 10^{-4}$
Livre	$5,09 \times 10^{-4}$	$6,30 \times 10^{-4}$
Ligada (por diferença)	$2,92 \times 10^{-4}$	$6,47 \times 10^{-6}$
Moles de Phe no permeado	$2,13 \times 10^{-3}$	$1,94 \times 10^{-3}$
Livre	$1,63 \times 10^{-3}$	$1,56 \times 10^{-3}$
Ligado (por diferença)	$4,99 \times 10^{-4}$	$3,79 \times 10^{-4}$
$\text{Phe}_{\text{alimentada}} - \text{Phe}_{\text{final no Reator}} - \text{Phe}_{\text{permeado}}^*$	$6,47 \times 10^{-4}$	$4,81 \times 10^{-4}$
$(\text{Phe}_{\text{alimentada}} - \text{Phe}_{\text{final no Reator}} - \text{Phe}_{\text{permeado}}) / \text{Phe}_{\text{alimentada}} \times 100\%$	18,1%	15,7%

\* Diferença no balanço global de massa: possível adsorção na membrana



Nota-se na Tabela 5.15 que o balanço total da Phe ficou mais próximo de fechar.

A adsorção (e/ou retenção por algum outro mecanismo) de Phe na membrana foi determinada mediante a seguinte equação:

$$Ads = \left( \frac{n_{Phe}^{Total} - n_{Phe}^{Reator} - n_{Phe}^{Permeado}}{n_{Phe}^{Total}} \right) * 100 \quad (5.4)$$

onde:  $n_{Phe}^{total}$  – total moles de Phe disponível no substrato (livre e ligada);  $n_{Phe}^{Reator}$  – total moles de Phe no reator (livre e ligada);  $n_{Phe}^{Permeado}$  – total moles de Phe no permeado (livre e ligada). Valores determinados por hidrólise ácida.

Os resultados principais dos ensaios consecutivos (9) e (10) estão resumidos na Tabela 5.16. Como pode ser observado, o ensaio (9) apresenta uma conversão menor (58,8%) em comparação ao ensaio (10), que atingiu 71,7%. Também se pode observar que, alimentando-se o reator somente com hidrolisado de soro com quimotripsina, ao final da reação o produto apresenta uma maior concentração de proteínas (70,6g/L no ensaio 9 e 63,2 g/L no ensaio 10). Porém, em contrapartida, o teor de Phe,  $mg_{Phe}/g_{Proteína}$ , aumenta para ambos os ensaios em comparação com ensaios anteriores no REM, que foram alimentados tanto com HSQ como com SD. Somente ensaio (10) alcançou o limite superior da faixa especificada para pacientes fenilcetonúricos.

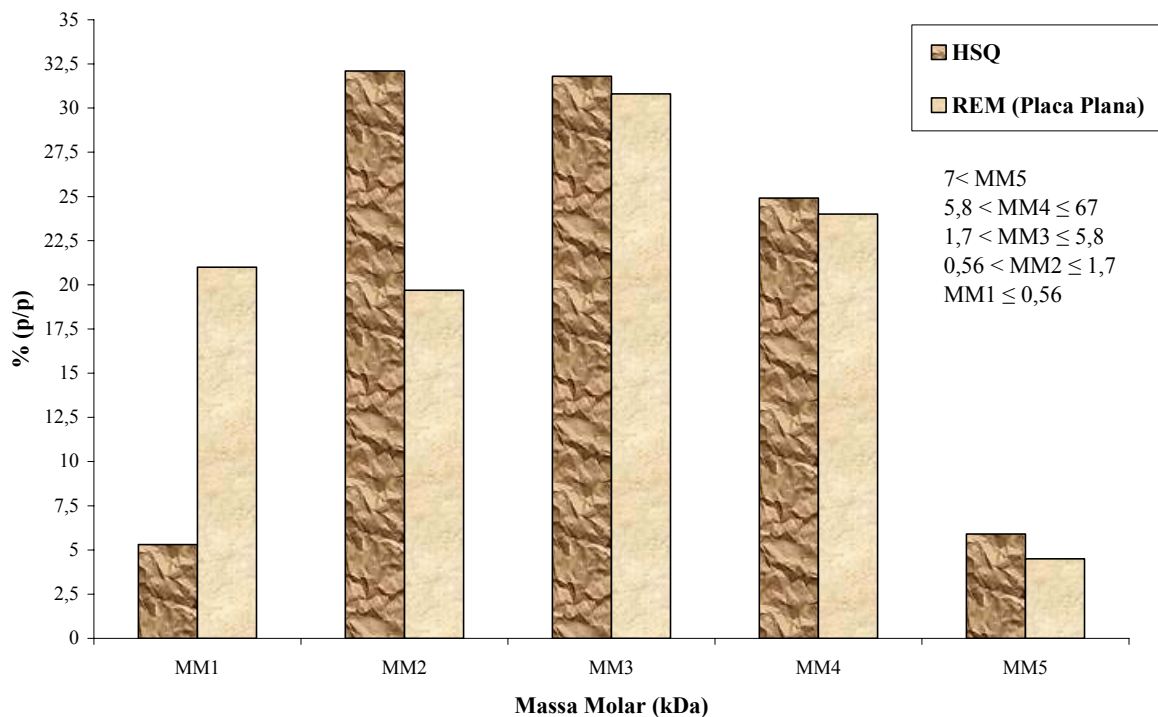
**Tabela 5.16:** Resultados principais dos ensaios (9) e (10) no REM.

	<b>Ensaio 9</b>	<b>Ensaio 10</b>
Adsorção na membrana (%)*	18,1	15,7
Conversão atingida ( $Phe_{(R+P)} - Phe_{início} / Phe_{total} - Phe_{início}$ )**	0,59	0,72
Conteúdo de proteína no produto final (g/L)	$70,6 \pm 4,3 \times 10^{-1}$	$63,2 \pm 4,3 \times 10^{-1}$
$mg_{Phe}/g_{Proteína}$ (Total Phe no reator/proteína no reator)	25,0	22,2
Produtividade ( $g_{hyd} \cdot mg_{Phe}^{-1} \cdot U_{H-Phe}^{-1} \cdot h^{-1}$ )***	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$

\* Eq. (5.4); \*\* Eq. (5.2); \*\*\* Eq. (5.3)

A retenção de material protéico na membrana (por adsorção ou outro fenômeno de superfície) foi alta em ambos os ensaios. Esse comportamento reflete o fato da relação área da membrana por volume de reator (e, portanto, de produto tratado) ser elevada. Além disso, deve-se resaltar que o material da membrana, celulose regenerada, tem afinidade por proteínas. Assim, decidiu-se testar uma nova membrana nos ensaios seguintes.

Na Figura 5.36 mostra-se a distribuição de peptídeos em percentagem mássica (% m/m) para diferentes faixas de massa molar antes (ou seja, no HSQ) e depois da reação com CPA (produto final) para o ensaio (10). Observa-se que o produto da hidrólise com CPA está constituído principalmente por peptídeos  $\leq 5,8$  kDa, com quantidades expressivas abaixo de 0,56 kDa.



**Figura 5.36:** Distribuição dos peptídeos antes e depois da reação com CPA no reator com membrana de Placa plana do ensaio (10).

No anexo III São mostrados os resultados da hidrólise com CPA no REM *placa plana* de outros aminoácidos correspondentes aos ensaios (9) e (10).

### 5.3.4. Ensaios no REM com nova membrana de *fibra oca*

Uma nova membrana de polisulfona foi adquirida, (Hollow Fiber Cartridge, modelo: UFP-1-C-MM01 Amersham Biosciences), com 1 kDa de curva de corte e com uma área significativamente menor, de 26 cm<sup>2</sup>, com o intuito de reduzir a relação volume de reator/área de membrana. Foram utilizadas duas membranas em paralelo no sistema porque o volume de permeado de uma única membrana era insuficiente para se obter as amostras necessárias para as análises requeridas.

#### 5.3.4.1. Sexta etapa de ensaios

Esta última etapa compreendeu dois ensaios, um no REM (ensaio 11) e outro em batelada seguido de diafiltração (ensaio 12).

As condições operacionais do ensaio no REM de *fibra oca* são mostradas na Tabela 5.17.

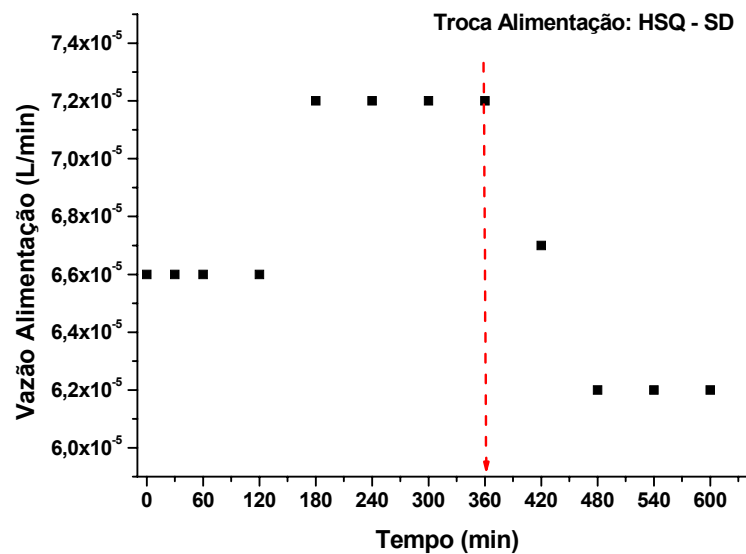
**Tabela 5.17:** Condições operacionais do ensaio (11) no REM de *fibra oca*. Substrato: HSQ *Minas frescal*.

Condições operacionais	Ensaio (11)*
pH	7,0
Temperatura (° C)	45,0
Agitação (rpm)	750
GH <sub>Q</sub> hidrolisado quimotripsina (%)	15,3
Volume de reação (L)	40×10 <sup>-3</sup>
Concentração da enzima (U <sub>H-Phe</sub> /L)	3000
Concentração da proteína inicial no substrato (g <sub>Proteína</sub> /L)	50±0,7 (**)
Carga aparente CPA imobilizada (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Gel</sub> )	101±3(**)
Razão inicial Enzima/Substrato (U <sub>H-Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	60
Volume de substrato alimentado ao longo da reação (L)	25×10 <sup>-3</sup>
Volume de solução dialisante (L)	15×10 <sup>-3</sup>
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada (mg <sub>Phe</sub> /g <sub>Proteína</sub> )	38,1±0,2 (**)
Pressão média trans-membrana (bar)	1,4
Vazão de recirculação (L/min)	50×10 <sup>-3</sup>
Tempo total de operação (min), reação + diafiltração	600 360 + 240
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	76,9×10 <sup>-2</sup>
Número de Reynolds (ultrafiltração, item 4.3.2)	298

\* depois de 360 min de operação, a alimentação do HS foi trocada para solução dialisante

\*\* média ± desvio padrão de triplicatas.

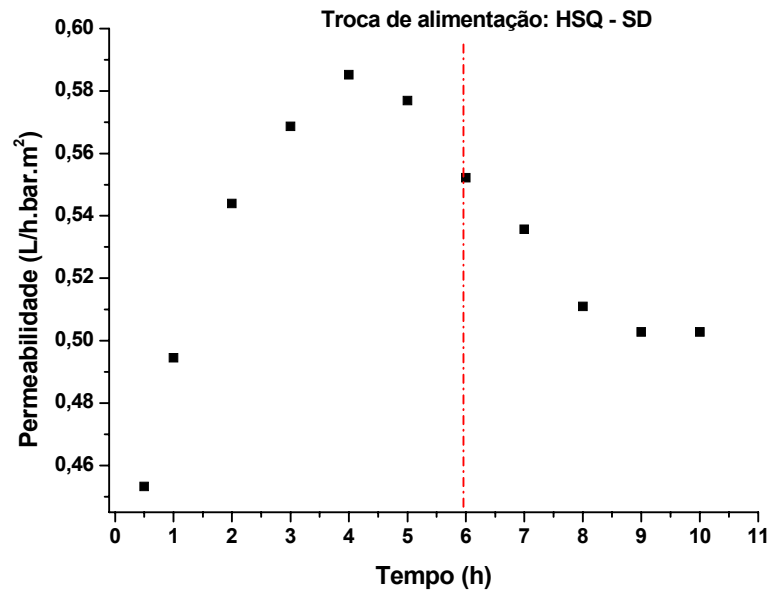
A Figura 5.37 mostra o perfil de alimentação do reator com hidrolisado de soro (HS) e com solução dialisante (SD) (troca após 360 min de reação). Como pode ser observado para este sistema, a vazão de alimentação do reator depois de manter-se constante por 160 minutos, foi aumentada, mantendo-se novamente constante até 360 minutos e a partir desse ponto a vazão de alimentação diminuiu até atingir um valor que se mantém constante até o final do ensaio.



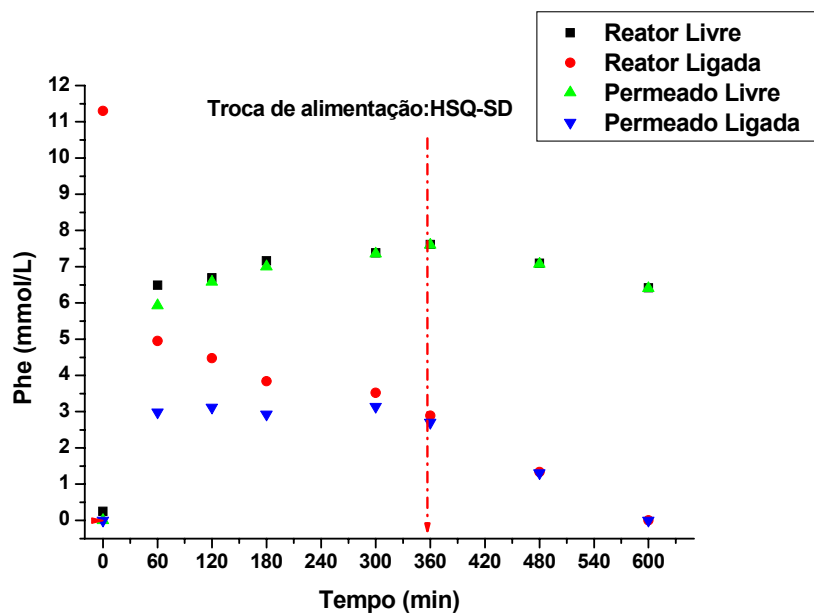
**Figura 5.37:** Perfil de alimentação do REM *fibra oca* para ensaio (11).

Na Figura 5.38 apresenta-se o perfil da permeabilidade ao longo da reação de hidrólise com CPA no REM *fibra oca* para o ensaio (11). Como pode ser observado, o comportamento difere das permeabilidades nos ensaios com membrana de *placa plana*. Acredita-se que diferença de geometria das membranas seja a causa desse comportamento.

Na Figura 5.39 mostram-se as concentrações de Phe livre e ligada no reator e no permeado para o ensaio (11). Observa-se que a Phe livre no reator é ligeiramente superior à do permeado, até a troca de alimentação de HSQ por SD. A partir desse ponto, as concentrações são praticamente iguais. A Phe ligada a peptídeos no reator é maior que a Phe no permeado também até a troca de alimentação, sendo as concentrações praticamente iguais a partir de 360 minutos.



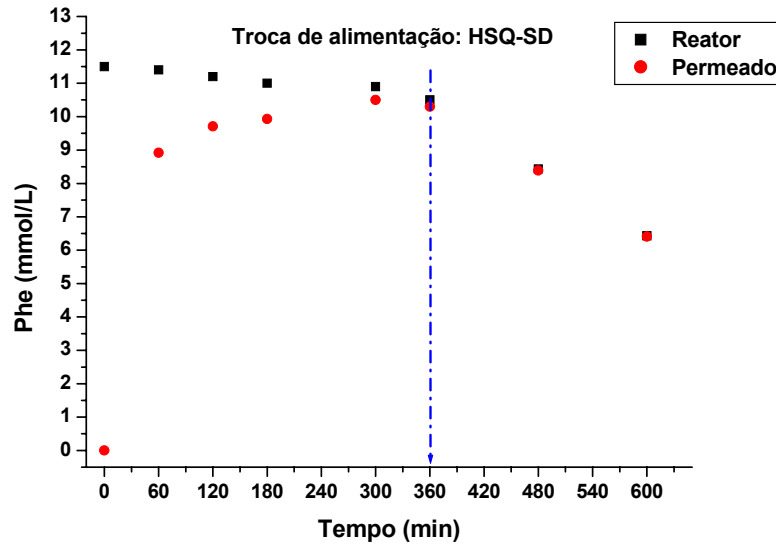
**Figura 5.38:** Permeabilidade ao longo do tempo da reação de hidrólise com CPA no REM para o ensaio (11).



**Figura 5.39:** Concentração de Phe livre e ligada (a peptídeos) no reator e permeado ao longo do tempo de reação com CPA para o ensaio (11).

Na Figura 5.40 mostra as concentrações de Phe total (mmol/L) no reator e permeado ao longo do tempo de reação com CPA. Nota-se que a concentração de Phe no

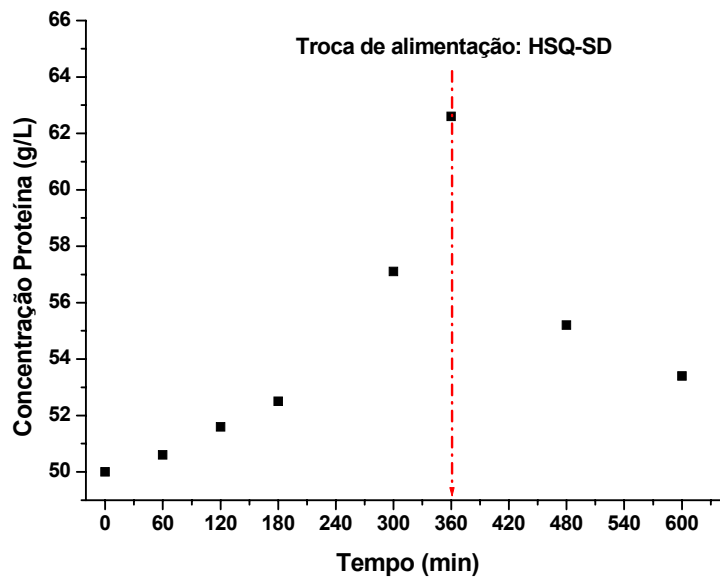
reator é maior que no permeado até a troca da alimentação por SD. A partir desse momento (360 min) as concentrações são praticamente iguais até o final da reação.



**Figura 5.40:** Concentração de Phe total no reator e permeado ao longo do tempo de reação com CPA para o ensaio (11).

Na Figura 5.41 apresenta-se a evolução da concentração de material protéico no reator ao longo do tempo de reação com CPA no REM. Como pode ser observado, essa concentração é ascendente até 360 min, tempo durante o qual o reator é alimentado com hidrolisado de soro com quimotripsina. A partir desse ponto, a concentração das proteínas diminui como consequência do início da alimentação do reator com solução dialisante. Esse comportamento deixa clara a importância da perda de peptídeos através da membrana: quando cessa a alimentação de substrato, há queda significativa dessa concentração – que não é explicada apenas pela lavagem dos aminoácidos.

O comportamento do sistema retratado nas Figuras 5.39 a 5.41 fornece uma indicação sobre as dinâmicas relativas entre os dois processos ocorrendo no REM: reação e transporte de massa através da membrana. Em primeiro lugar, observa-se, na figura 5.39, que as concentrações de Phe livre no reator e no permeado são muito parecidas (levemente superiores no reator, como seria de se esperar) ao longo de todo o processo – apenas nos 60 min iniciais há uma diferença perceptível entre essas concentrações. Essa é uma indicação de que a velocidade de transporte do aminoácido pela membrana não é a etapa controladora do processo – o gradiente trans-membrana é muito pequeno, e a Phe liberada pela CPA passa para o permeado sem atraso – ou seja, a reação é a etapa controladora neste caso.



**Figura 5.41:** Evolução da concentração de proteínas no reator ao longo do tempo de reação com CPA para o ensaio (11).

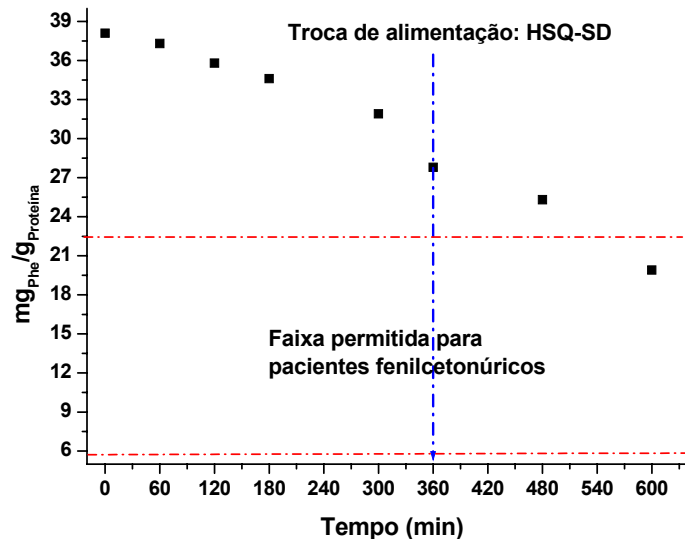
Já para a Phe ligada a peptídeos, a situação é diversa: há uma diferença expressiva entre as concentrações do lado do retentado e do filtrado no início do processo. Enquanto se alimenta substrato novo (e mesmo com vazão mais alta após 180 min), a Phe ligada decresce com o tempo – ou seja, a soma do desaparecimento de Phe ligada por hidrólise, mais a vazão de Phe ligada a peptídeos perdidos através da membrana, resulta em um valor maior que a vazão de Phe alimentada ao reator. A concentração de Phe ligada no permeado fica praticamente constante, apesar do aumento da concentração total de material protéico no reator (vide figura 5.41). Isso implica uma maior vazão molar de Phe através da membrana entre 60 min e 240 min, pois a vazão volumétrica de permeado aumenta continuamente nesse intervalo de tempo (vide fig. 5.38).

Assim, a dinâmica da reação (hidrólise) deve ser mais rápida que a da ultrafiltração (indesejada) dos peptídeos, e a Phe ligada no interior do reator cai com o tempo, enquanto que a do permeado fica constante. Esse é um aspecto positivo para nosso sistema. Com efeito, esse comportamento deve se refletir em uma queda na Phe global no reator durante essa primeira etapa da operação do REM, o que de fato se observa na figura 5.40: a concentração total de Phe no interior do reator realmente cai (embora não com um gradiente muito significativo) ao longo desta primeira etapa. Note-se que, como as proteínas se

concentram no reator até os 360 min, o teor de Phe ( $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{proteína}}$ ) cai constantemente ao longo do tempo, como se deseja neste processo (vide Figura 5.42).

Uma vez iniciada a alimentação com solução dialisante, dilui-se o meio reacional, tornando mais lenta a dinâmica da hidrólise (e, conseqüentemente, a geração de Phe livre), e as diferenças de concentração trans-membrana tornam-se desprezíveis.

Na Figura 5.42 mostra-se a evolução do teor de Phe ( $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ ) no produto ao longo de tempo de reação com CPA para o ensaio (11) no REM, assim como a faixa permitida para pacientes fenilcetonúricos. Como pode ser observado este ensaio alcança o limite superior da faixa permitida.



**Figura 5.42:** Evolução da concentração de  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  ao longo do tempo da reação com CPA para o ensaio (11).

Na Tabela 5.18 apresentam-se os resultados do balanço de massa da Phe em moles do processo de hidrólise com CPA no REM *fibra oca*. Como pode ser observada, quase a totalidade da Phe encontrada no reator está livre. No permeado tem-se também maior quantidade de Phe livre que ligada. O balanço praticamente fechou. Desapareceu uma quantidade pequena de Phe ( $7,3 \times 10^{-6}$ ), que representa somente 1% do total. Esse valor está dentro da margem de erro das medidas, ou seja, a pequena área da membrana *fibra oca* fez com que a retenção de Phe sobre sua superfície se tornasse insignificante.



**Tabela 5.18:** Resultados do balanço de massa da Phe do ensaio (11) no REM. Todos os valores em mol<sub>Phe</sub>.

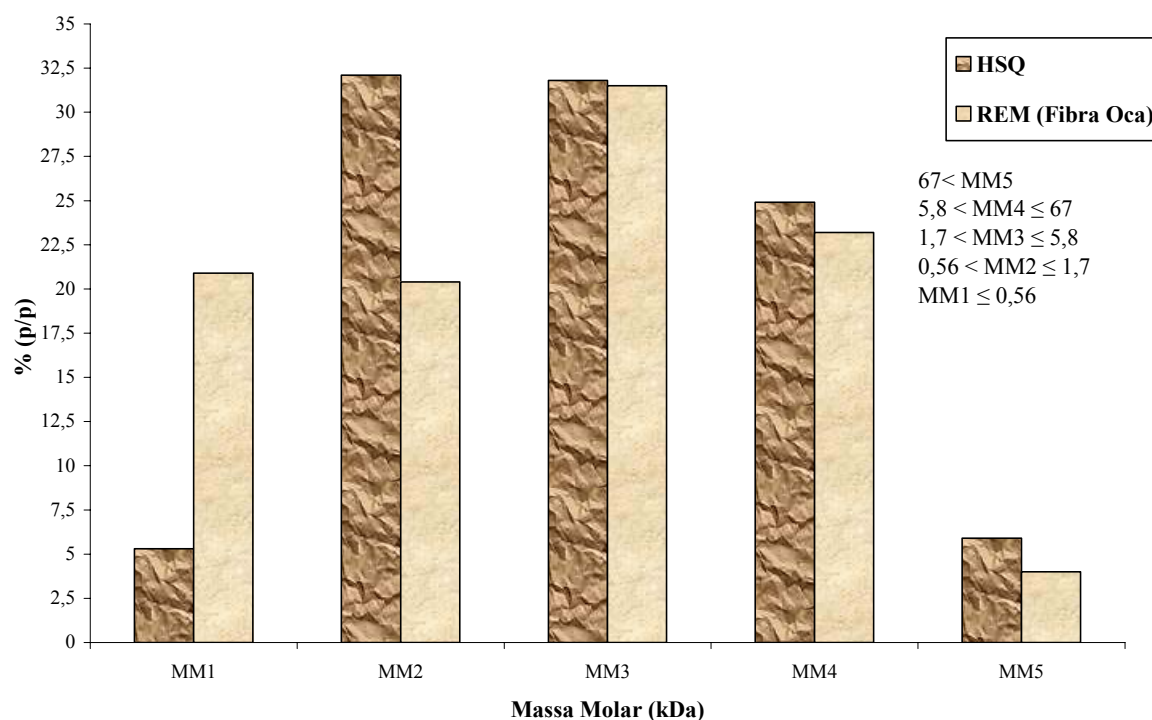
		<b>Total Phe</b>
Phe fornecida ao REM (carga inicial + alimentação)		<b>7,49x10<sup>-4</sup></b>
Livre	1,65x10 <sup>-5</sup>	
Ligado (por diferençia)	7,33x10 <sup>-4</sup>	
Moles de Phe no final da reação (Reator)		<b>2,57x10<sup>-4</sup></b>
Livre	2,57x10 <sup>-4</sup>	
Ligada (por diferençia)	4,55x10 <sup>-7</sup>	
Moles de Phe no permeado		<b>4,85x10<sup>-4</sup></b>
Livre	3,80x10 <sup>-4</sup>	
Ligado (por diferençia)	1,05x10 <sup>-4</sup>	
Phe <sub>alimentada</sub> - Phe <sub>final no Reator</sub> - Phe <sub>permeado</sub> *		<b>7,26x10<sup>-6</sup></b>
Adsorção na membrana (%)**		1

\* Diferença no balanço global de massa: possível adsorção na membrana e perdas de peptídeos através da membrana

\*\*Eq. (5.4)

Na Figura 5.43 apresenta-se a distribuição de peptídeos em diferentes faixas de massa molar para o hidrolisado de soro com quimotripsina (HSQ) e depois da reação com CPA (produto final). Nota-se que o produto final está constituído por pequenos peptídeos  $\leq 5,8$  kDa. A evolução desses perfis é muito semelhante à já observada no ensaio 10, vide figura 5.36.

A hidrólise prévia com quimotripsina tem por finalidade expor resíduos aromáticos carboxi-terminais (principalmente Phe) à ação da CPA. Para tanto, é inevitável reduzir o tamanho médio dos peptídeos, mas em termos de rendimento do processo global é importante que a maior fração possível de peptídeos fique acima do tamanho de corte da membrana do REM. A figura 5.43 dá idéia da máxima perda de pequenos peptídeos que ocorrerão no REM para este substrato (usando membranas de 1 kDa).



**Figura 5.43:** Distribuição de peptídeos antes e depois da reação com CPA no reator com membrana de fibra oca (ensaio 11).

No anexo IV mostra-se os resultados da hidrólise com CPA no REM *fibra oca* de outros aminoácidos correspondentes ao ensaio (11).

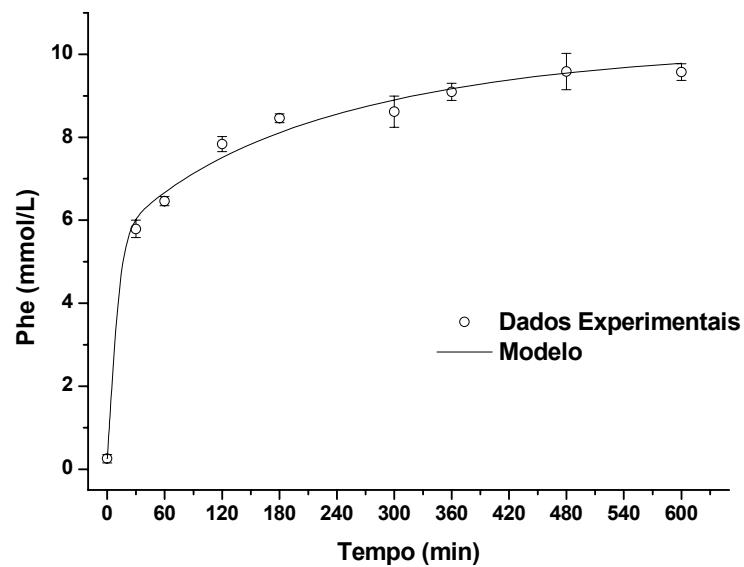
As condições experimentais do ensaio (12) realizado no modo batelada seguida de diafiltração com membrana de *fibra oca* para hidrólise com CPA são mostrados na tabela 5.19.

Na Figura 5.44 mostra-se os resultados previstos pelo modelo cinético (equações 3,2 a 3,7, item 3.1), confrontados com os dados experimentais do ensaio 11, operado em modo batelada. Observa-se que o ajuste aos dados experimentais é excelente, validando o modelo cinético desenvolvido para hidrólise com CPA.

**Tabela 5.19:** Condições operacionais do ensaio 12 em reator de batelada. Substrato: HSQ *Minas Frescal*.

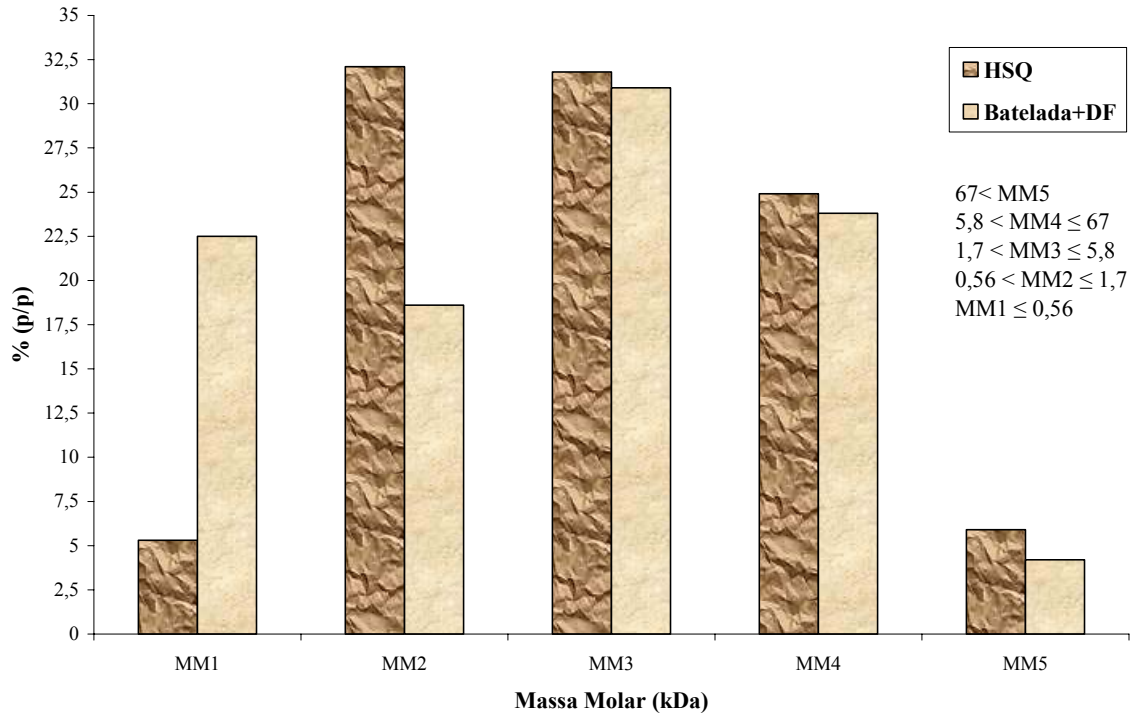
Condições operacionais	Ensaio (12)
pH	7,0
Temperatura (° C)	45,0
GH do hidrolisado de quimotripsina (%)	15,3
Volume de reação (L)	$53 \times 10^{-3}$
Concentração da enzima ( $U_{H-Phe}/L$ )	3000
Concentração da proteína inicial no substrato ( $g_{Proteína}/L$ )	$50 \pm 0,7$ (*)
Massa de gel (g)	1,57
Carga aparente CPA imobilizada ( $U_{H-Phe}/g_{Gel}$ )	$101 \pm 3$ (*)
Razão inicial Enzima/Substrato ( $U_{H-Phe}/g_{Proteína}$ )	60
Volume de solução dialisante (L)	$40 \times 10^{-3}$
Conteúdo inicial de Phe no substrato – livre e ligada ( $mg_{Phe}/g_{Proteína}$ )	$38,1 \pm 0,2$ (*)
Pressão media trans-membrana (bar)	1,4
Vazão de recirculação (L/min)	$5 \times 10^{-2}$
Tempo total de operação (min), reação + diafiltração	945 600 + 345

(\*) média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas



**Figura 5.44:** Concentração de Phe livre ao longo do tempo de reação em reator de batelada com CPA: valores experimentais e previstos pelo modelo. As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicata.

Na Figura 5.45 apresenta-se a distribuição de peptídeos em diferentes faixas de massa molar do HSQ e depois da reação catalisada por CPA, seguida por diafiltração do produto. Observa-se que o produto final no ensaio (12) também está constituído por pequenos peptídeos  $\leq 5.8$  kDa.

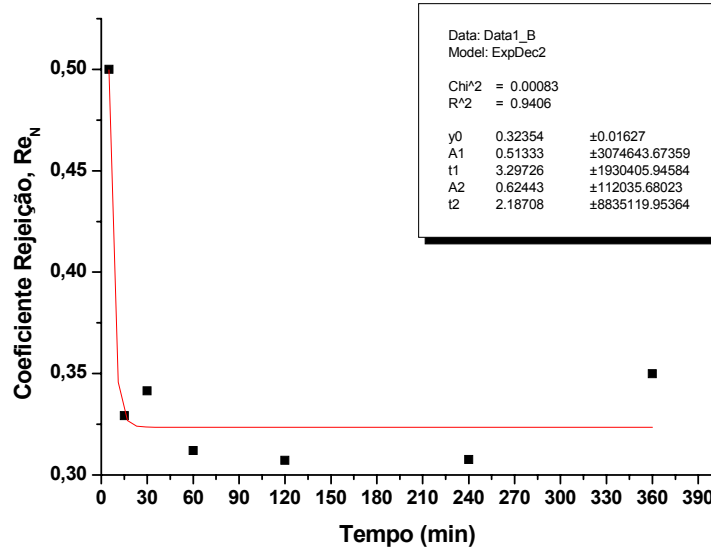


**Figura 5.45:** Distribuição de peptídeos antes e depois da reação com CPA no reator de batelada + diafiltração com membrana *fibra oca* (ensaio 12).

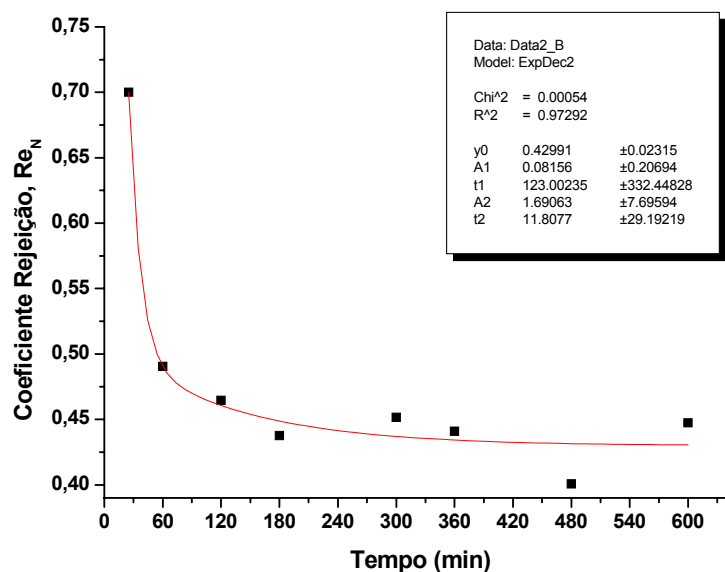
### 5.3.5 Simulações do REM e Análise da Sensibilidade Paramétrica

O modelo matemático do REM desenvolvido no cap. 3 pressupõe o conhecimento do perfil de vazão de permeado, do coeficiente de rejeição do aminoácido  $i$ ,  $Re_i$  e de peptídeos,  $Re_N$  (determinado com base no conteúdo protéico total). Com efeito, um modelo totalmente preditivo do REM implicaria modelar a dinâmica das membranas, incluindo a incrustação. Esse enfoque foge ao escopo deste trabalho. Assim, optou-se aqui por se utilizar nas simulações dados obtidos experimentalmente para essa variável (vazão de permeado) e parâmetros. No item 5.3.2 foram apresentadas as vazões de alimentação para todos os ensaios no REM. Os dados de  $Re_N$  somente foram obtidos para os dois últimos ensaios, no REM *placa plana*, ensaio(10), que foi utilizado para as simulação dos demais ensaios nesse sistema, e também para o ensaio (11), *fibra oca*.

Nas Figuras 5.46 e 5.47 mostra-se os coeficientes de rejeição  $Re_N$  para o ensaio (10) no REM *placa plana* e para o ensaio (11) no REM *fibra oca*, determinados com base na concentração protéica total no reator e permeado, e ajustados por expressão empírica: decaimento exponencial de segunda ordem, Equação (5.5). Os parâmetros são listados na Tabela 5.20.



**Figura 5.46:** Coeficiente de rejeição  $Re_N$  baseado na concentração protéica total e ajustado por decaimento exponencial de segunda ordem para a ensaio (10) no REM *placa plana*.



**Figura 5.47:** Coeficiente de rejeição  $Re_N$  baseado na concentração protéica total e ajustado por decaimento exponencial de segunda ordem para a ensaio (11) no REM *fibra oca*.

$$Re = y_0 + A_1 e^{-t/x_1} + A_2 e^{-t/x_2} \quad (5.5)$$

**Tabela 5.20:** Valores das constantes do ajuste do  $Re_N$  para os ensaios (10) *placa plana* e (11) *fibra oca* no REM.

	<b>Ensaio (10)</b>	<b>Ensaio (11)</b>
$y_0$	0,32354	0,42991
$A_1$	0,51333	0,08156
$x_1$	3,29726	123,00235
$A_2$	0,62443	1,69063
$x_2$	2,18708	29,19219

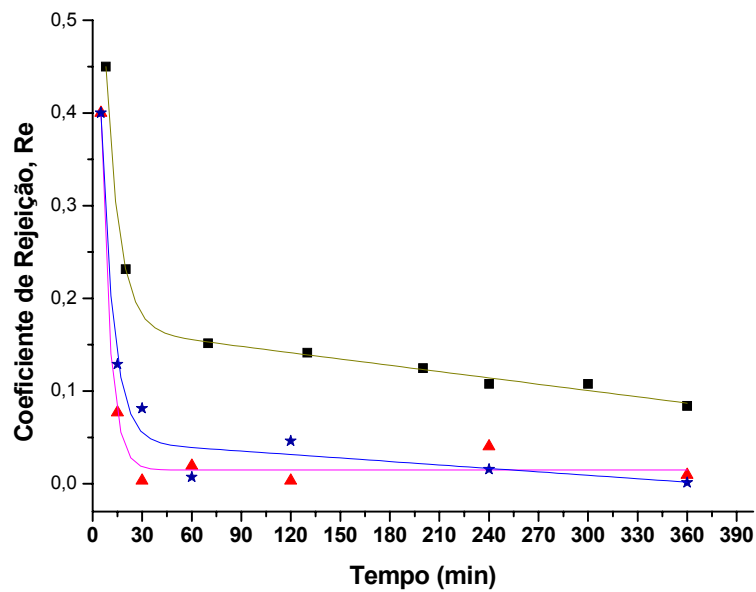
Realiza-se a seguir análise da sensibilidade do modelo matemático para predição de concentrações da Phe frente a variações no coeficiente de rejeição ( $Re$ ) e vazão de permeado.

Foram utilizados cinco coeficientes de rejeição dos quais quatro foram selecionados aleatoriamente de dados obtidos experimentalmente (ensaios 7, 9, 10 e 11) ajustados a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem. O último  $Re_5 = 0,0693 \pm 0,04$  foi obtido da média de todos os dados dos ensaios anteriores.

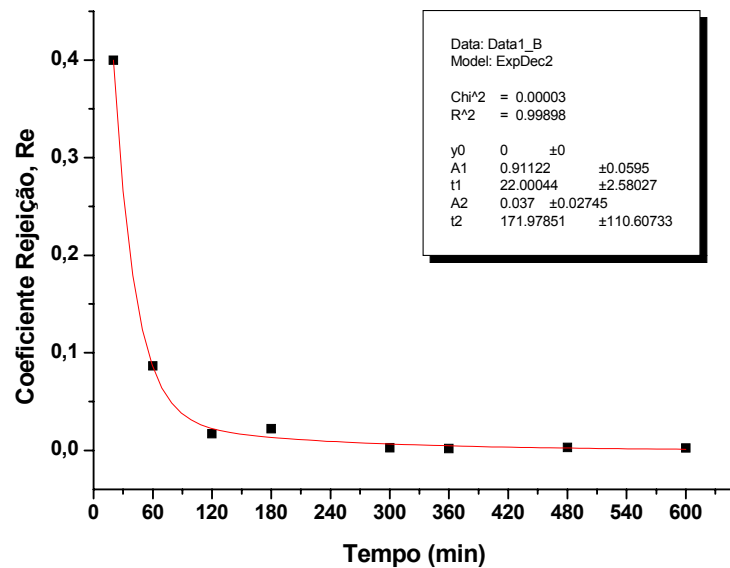
Nas Figuras 5.48 e 5.49 apresentam-se os coeficiente de rejeição ( $Re$ ) da Phe livre ao longo do tempo de reação para os ensaios (7), (9) e (10) no REM placa plana e para o ensaio (11) no REM *fibra oca* que foram ajustados a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem, representada pela Equação (5.5). Suas constantes são listadas na Tabela 5.21.

**Tabela 5.21:** Valores das constantes do ajuste de  $Re_{phe}$  utilizados nas simulações.

	<b>Re1</b>	<b>Re2</b>	<b>Re3</b>	<b>Re4</b>
	<b>Ensaio (7)</b>	<b>Ensaio (9)</b>	<b>Ensaio (10)</b>	<b>Ensaio (11)</b>
$y_0$	1517,04524	1516,9842	0,01486	0
$A_1$	-1516,87666	-1516,9378	0,4899	0,91122
$x_1$	-6699083,329	-12237658,28	5,35798	22,00044
$A_2$	0,7359	0,68802	0,4899	0,037
$x_2$	8,37859	7,4894	5,35798	171,97851



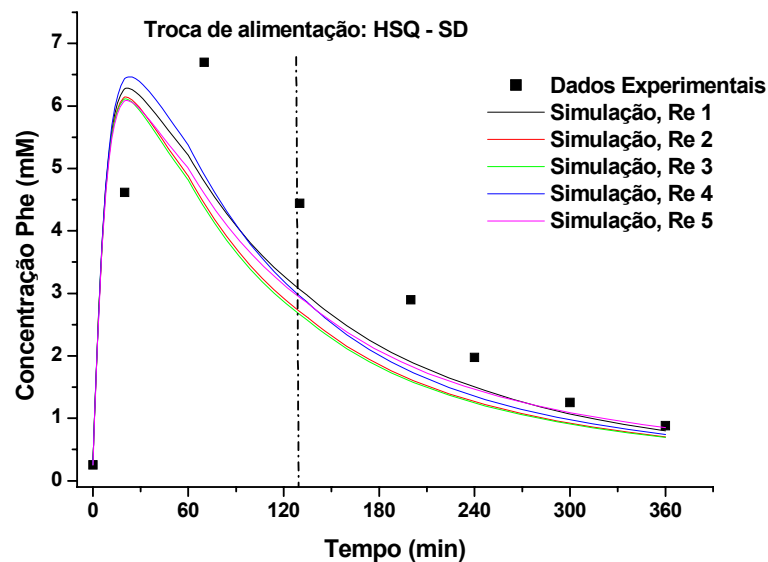
**Figura 5.48:** Coeficiente de rejeição da Phe livre ao longo do tempo de reação ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem para os ensaios (7), (9) e (10) no REM *placa plana*.



**Figura 5.49:** Coeficiente de rejeição da Phe livre ao longo do tempo de reação ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem para o ensaio (11) no REM *fibra oca*.

Foram realizadas simulações dos perfis de Phe no REM, utilizando os dados correspondentes a cada ensaio e somente variando o coeficiente de rejeição, com a finalidade de verificar a sensibilidade do modelo frente a este parâmetro. A seguir, a título de ilustração, apresenta-se os resultados das simulações para três ensaios típicos, dois no REM *placa plana* e um no REM *fibra oca*.

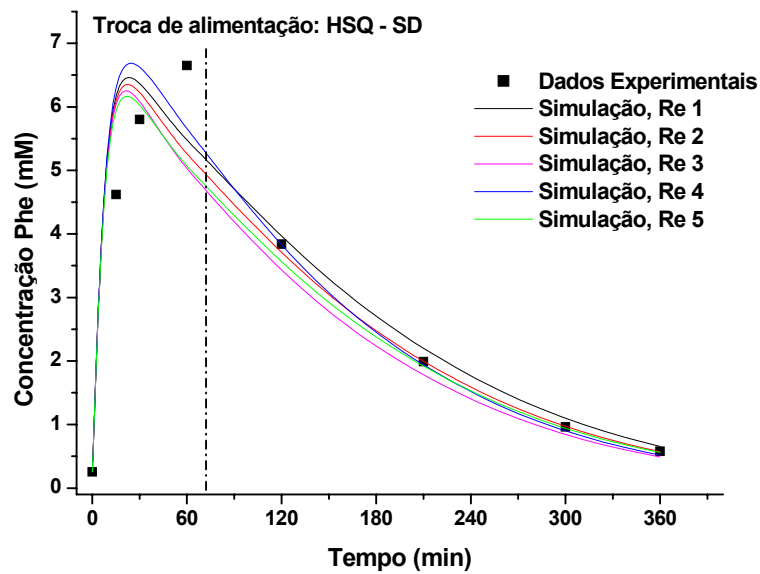
Na Figura 5.50 apresentam-se os resultados da simulação da Phe livre frente a variações do Re e os dados experimentais obtidos da hidrólise com CPA no REM *placa plana* para o ensaio (7). Como pode ser observado o modelo apresentou pouca sensibilidade frente a este parâmetro.



**Figura 5.50:** Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações do Re para o ensaio (7) no REM *placa plana*.

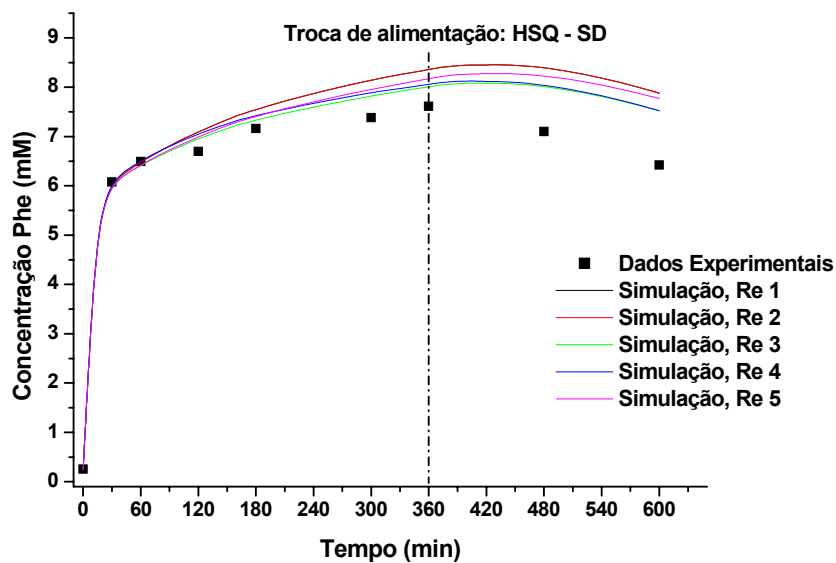
Na Figura 5.51 mostram-se os resultados da simulação da Phe livre frente a variações do Re e os dados experimentais obtidos da hidrólise com CPA no REM *placa plana* para o ensaio (8). Nota-se que em geral, o modelo é pouco sensível a variações deste parâmetro.





**Figura 5.51:** Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações do  $Re$  para o ensaio (8) no REM *placa plana*.

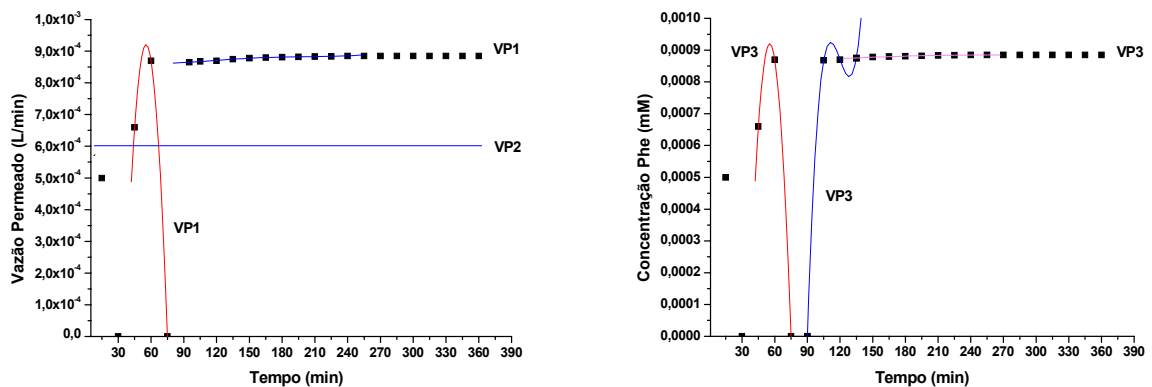
Na Figura 5.52 mostram-se os resultados da simulação da Phe livre frente a variações do  $Re$  e os dados experimentais obtidos da hidrólise com CPA no REM *fibra oca* para o ensaio (11). Nota-se que, de modo similar àquele apresentado para os casos anteriores, o modelo é pouco sensível a variações do coeficiente de rejeição, apresentando maior sensibilidade frente a  $Re$  2, correspondente ao ensaio (9) no REM *placa plana*, seguido de  $Re$  5 (valor médio de todos os dados).



**Figura 5.52:** Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações do  $Re$  para o ensaio (11) no REM *fibra oca*.

Como mencionado anteriormente, também foram realizadas simulações do modelo matemático com diferentes ajustes no perfil da vazão do permeado, com a finalidade de verificar a sensibilidade do modelo frente a esta variável. A seguir, a título de ilustração, apresenta-se os resultados das simulações para três ensaios típicos, dois no REM *placa plana* e um no REM *fibra oca*.

Para a simulação do ensaio (7) da hidrólise com CPA no REM *placa plana* foram utilizados diferentes ajustes do perfil da vazão do permeado, mostrados na Figura 5.53: VP1 (duas faixas de vazão, ajustadas por polinômios de segunda e quarta ordem, respectivamente), VP2 (vazão constante, igual ao valor médio durante todo o ensaio), VP3 (três faixas de vazão, ajustadas por polinômios de segunda, terceira e segunda ordem respectivamente),  $VP4=1,2 \times VP1$ , e  $VP5=0,6 \times VP1$ .



**Figura 5.53:** Ajustes polinomiais da vazão do permeado para o ensaio (7) no REM *placa plana*.

Na Figura 5.54 mostra-se os resultados das simulações da Phe livre e os dados experimentais para o ensaio (7), utilizando esses cinco diferentes ajustes do perfil da vazão do permeado (VP). Foi escolhida essa variável para ilustrar os resultados da simulação porque Phe é o aminoácido de interesse neste processo. Entretanto, os demais aminoácidos têm comportamento similar, não sendo mostrados aqui apenas por razão de concisão.

A Figura 5.54 indica com clareza que a resposta do modelo frente a alterações na vazão de permeado é diferenciada, em duas regiões: no início da corrida essa resposta (concentração de Phe livre no reator) responde diretamente ao aumento da vazão de permeado. Em outras palavras, há um maior acúmulo de Phe livre no reator para as maiores vazões de permeado. Após aproximadamente 90 min essa tendência se inverte, ou seja, o

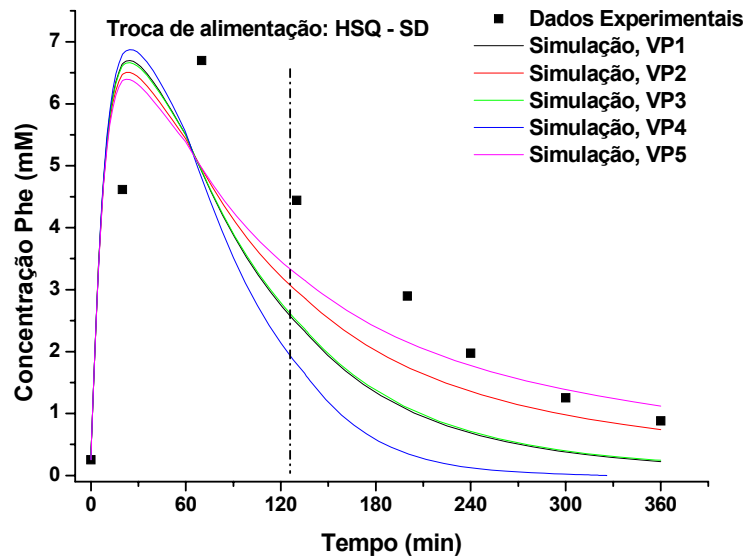
aumento da vazão de permeado causa uma redução da concentração de Phe livre no reator. Observa-se aqui uma diminuição considerável da concentração da Phe, principalmente após o início da alimentação de solução dialisante, aos 135 min.

Esse comportamento é causado pela evolução do coeficiente de rejeição da membrana ao longo do tempo. Para melhor compreender esse efeito, transcreve-se a seguir o balanço individual dos aminoácidos, deduzida no capítulo 3:

$$\frac{dC_{2,i}}{dt} = \frac{1}{V(t)} [F_1(t)(C_{1,i} - C_{2,i}(t)) + Re_i(t)C_{2,i}(t)F_4(t)] + R_i \quad (3.19)$$

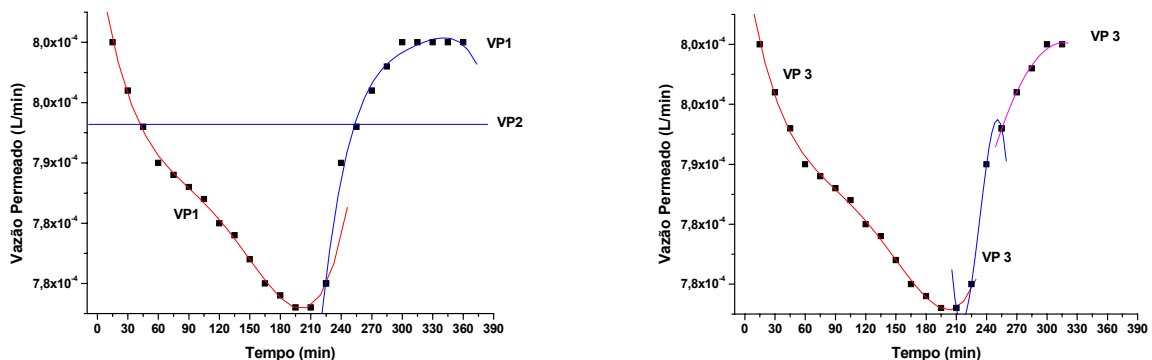
onde  $C_{2,i}$  é a concentração da espécie  $i$  no interior do REM (mM) – suposta uniforme em todo reator e também na unidade de ultrafiltração (hipótese de mistura ideal);  $F_1$  é a vazão volumétrica da alimentação (L/min),  $C_{1,i}$  é a concentração inicial da espécie  $i$  (mM),  $V$  é o volume no reator (L),  $Re_i$  é o coeficiente de rejeição da espécie,  $F_4$  é a vazão volumétrica do permeado (L/min) e  $R_i$  é a velocidade de reação da espécie  $i$ .

Essa equação deve ser analisada à luz das Figuras 5.48 a 5.50 e Tabela 5.2. Como se vê nessas figuras, o coeficiente de rejeição  $Re_i$  decai exponencialmente com o tempo no início do processo, até tender a um valor assintótico. Em outras palavras, no início do ensaio o segundo termo do lado direito da Equação (3.19) é maior que o primeiro, e tanto maior quanto mais elevada a vazão de permeado,  $F_4$ . Assim,  $\frac{dC_{2,i}}{dt}$  é positiva nos tempos iniciais, e tão mais positiva quanto maior for  $F_4$ . Com o passar do tempo, entretanto,  $Re_i$  diminui e o termo  $-F_1(t) \times C_{2,i}(t)$  passa a preponderar sobre todos os demais do lado direito de (3.19). Então,  $\frac{dC_{2,i}}{dt}$  fica negativa, e a concentração da espécie  $i$  no meio reacional decai com o tempo. E essa derivada é tanto mais negativa quanto maior for  $F_4$ , porque o volume do reator ( $V$ ) diminui mais rapidamente quando se aumenta  $F_4$  (lembrando que a vazão de entrada no sistema,  $F_1$ , foi mantida constante nestes testes de sensibilidade). Isso explica porque os perfis da Figura 5.55 se cruzam nos tempos maiores.



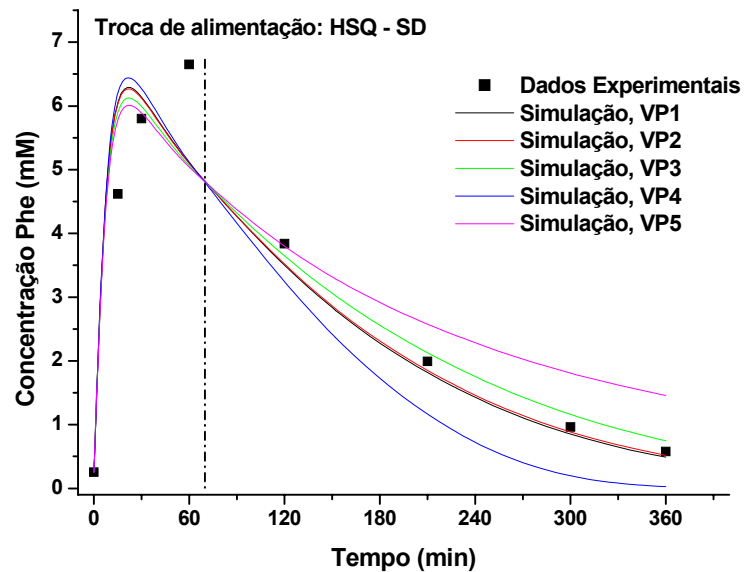
**Figura 5.54:** Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações da vazão do permeado para o ensaio (7) no REM *placa plana*.

Para a simulação do ensaio (8) da hidrólise com CPA no REM *placa plana* foram utilizados diferentes ajustes do perfil da vazão do permeado mostrados na Figura 5.55; VP1 (duas faixas de vazão, ajustadas por polinômios de quarta ordem), VP2 (vazão constante, igual ao valor médio durante todo o ensaio), VP3 (três faixas de vazão, ajustadas por polinômios de quarta, terceira e segunda ordem respectivamente), entanto que  $VP4 = 1,2 \times VP1$  e  $VP5 = 0,6 \times VP1$ .



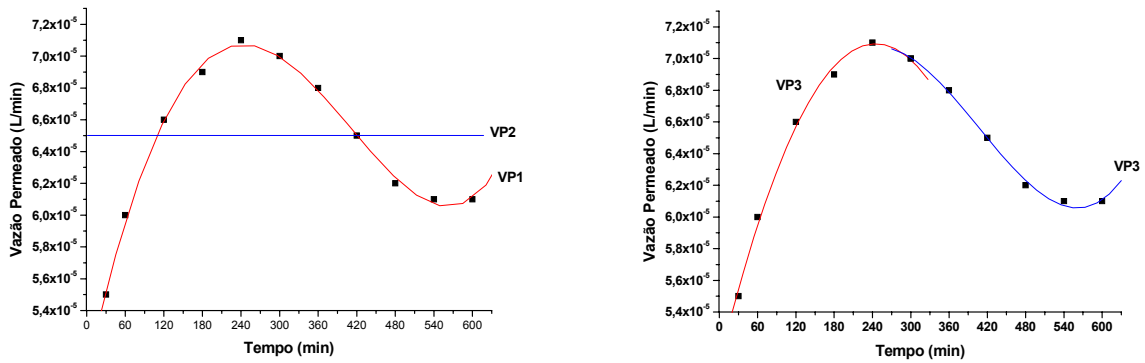
**Figura 5.55:** Ajustes polinomiais da vazão do permeado para o ensaio (8) no REM *placa plana*.

Na Figura 5.56 apresenta-se os resultados das simulações da Phe livre e os dados experimentais para o ensaio (8), utilizando cinco diferentes ajustes do perfil da vazão do permeado (VP). Observa-se que para este ensaio o modelo é, maiormente sensível frente a VP4 e VP5, que foram calculados da mesma forma que nas simulações do ensaio (7). Note-se que o comportamento observado com respeito às alterações nas vazões de permeado é semelhante ao do ensaio anterior.



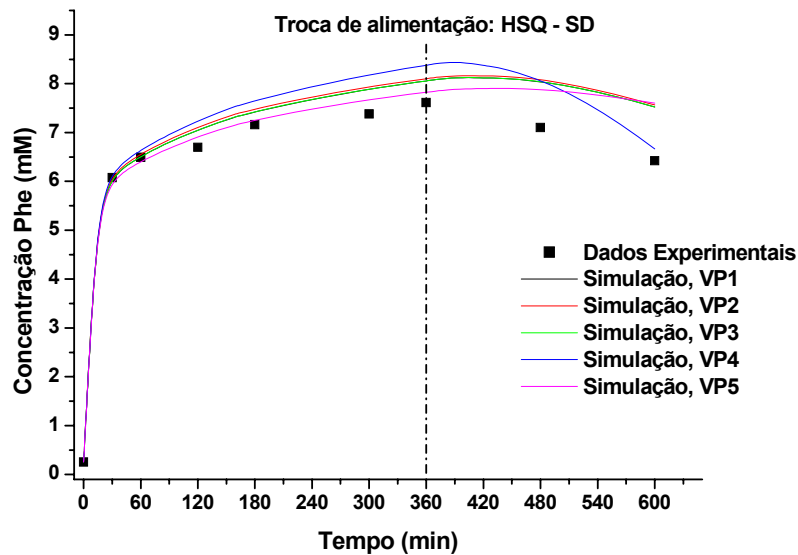
**Figura 5.56:** Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações da vazão do permeado para o ensaio (8) no REM *placa plana*.

Para a simulação do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM *fibra oca* foram utilizados os ajustes do perfil da vazão do permeado mostrados na Figura 5.57; VP1 (vazão ajustada por polinômio de quarta ordem), VP2 (vazão constante, igual ao valor médio durante todo o ensaio), VP3 (dois polinômios, de terceira e segunda ordem respectivamente),  $VP4=1,6 \times VP1$  e  $VP5=0,5 \times VP1$ .



**Figura 5.57:** Ajustes polinomiais da vazão do permeado para o ensaio (10) no REM *fibra oca*

Na Figura 5.58 são mostrados os resultados das simulações da Phe livre e os dados experimentais para o ensaio (11). Observa-se que também para este ensaio o modelo apresentou sensibilidade somente frente a VP4 e VP5. O comportamento qualitativo é o mesmo que o observado nos casos anteriores, apenas o ponto de máxima concentração de Phe fica deslocado para tempos maiores porque o valor de  $F_4$  é menor neste caso, o que amortece os efeitos discutidos anteriormente, com base na equação (3.19).



**Figura 5.58:** Resultados das simulações do modelo da Phe livre frente a variações da vazão do permeado para o ensaio (11) no REM *fibra oca*.

A partir desta discussão sobre a sensibilidade do modelo frente a um parâmetro (coeficiente de rejeição) e frente a uma variável (vazão de permeado), ambos relacionados

com a unidade de ultrafiltração, torna-se clara a importância de se modelar em maior detalhe essa unidade, o que fica como sugestão para continuidade da pesquisa.

### 5.3.6 Comparação do desempenho dos três sistemas

Finalmente foram comparados os três sistemas testados, o ensaio (10) em reator com membrana de *placa plana* (R1), em reator com membrana de *fibra oca*; ensaio (11) (R2) e em reator em batelada (R3) mais diafiltração com membrana de *fibra oca*; ensaio (12).

Na tabela a seguir são mostrados as principais condições operacionais e resultados obtidos nos três sistemas.

Observa-se na Tabela 5.22 que o REM *placa plana* apresentou a maior retenção de Phe na membrana (16%). Em comparação, o REM *fibra oca*, apresentou somente 1% de retenção. A razão volume reacional por área de membrana é, portanto, fator determinante no desempenho do processo e também na qualidade de predição do modelo matemático proposto.

Na Figura 5.59 apresenta-se a evolução da concentração de proteínas no produto para os três sistemas. Observa-se que R1 apresenta uma maior concentração de proteínas dado que esse sistema foi alimentado somente com substrato fresco (hidrolisado de soro com quimotripsina) durante todo o tempo da reação (360 min.). Observe também que R2, no momento da troca na alimentação de HSQ para solução dialisante, apresenta aproximadamente a mesma concentração protéica que R1, apesar de ter sido alimentado com um volume menor de substrato. Com a pequena relação volume de reator/área da membrana para R1, parte da Phe livre e dos demais componentes ficam retidos na membrana, o que não é contemplado pelo modelo em pauta. A adsorção de Phe definida na Equação (5.4) e mostrada para os três sistemas na Tabela 5.22 ratifica essa observação.

Para o sistema R3 seguido de diafiltração (DF), como era esperado, a concentração de material protéico se mantém constante durante todo o tempo de reação em batelada (600 min). Mas, como consequência da diafiltração por um tempo de 345 min, o produto final sofre uma considerável diminuição dessa concentração, devida à grande quantidade de solução dialisante utilizada na diafiltração em comparação com o sistema R2. Fica clara, aqui, uma das vantagens de se utilizar o REM, quando comparado à operação seqüencial batelada-diafiltração.

**Tabela 5.22:** Comparação do desempenho de três sistemas de reatores

	<b>R1</b>	<b>R2<sup>(*)</sup></b>	<b>R3</b>
Volume de reação (L)	$75 \times 10^{-3}$	$40 \times 10^{-3}$	$53 \times 10^{-3}$
Massa de gel (g)	2,25	1,19	1,19
Carga aparente CPA imobilizada ( $U_{H-Phe}/g_{Gel}$ )	$100 \pm 3$ (*)	$101 \pm 3$ (*)	
Volume de substrato alimentado ao longo da reação (L)	$190 \times 10^{-3}$	$25 \times 10^{-3}$	0
Volume de solução dialisante (L)	0	$15 \times 10^{-3}$	$40 \times 10^{-3}$
Tempo total de operação (h), reação e diafiltração	6	10	15,75
Relação (Volume reator/Área na membrana) (cm)	$7,5 \times 10^{-2}$	$76,9 \times 10^{-2}$	--
Conversão atingida <sup>a</sup>	0,71	0,85	0,83
Concentração proteínas produto final (g/L)	$63,2 \pm 4 \times 10^{-1}$	$53,4 \pm 4 \times 10^{-1}$	$33,1 \pm 4 \times 10^{-1}$
Teor final de Phe $mg_{Phe}/g_{Proteína}$	22,2	19,9	18,8
Produtividade ( $g_{hyd} \cdot mg_{Phe}^{-1} \cdot U_{H-PHE}^{-1} \cdot h^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-5}$
Adsorção na membrana (%) <sup>c</sup>	16	1	não disponível

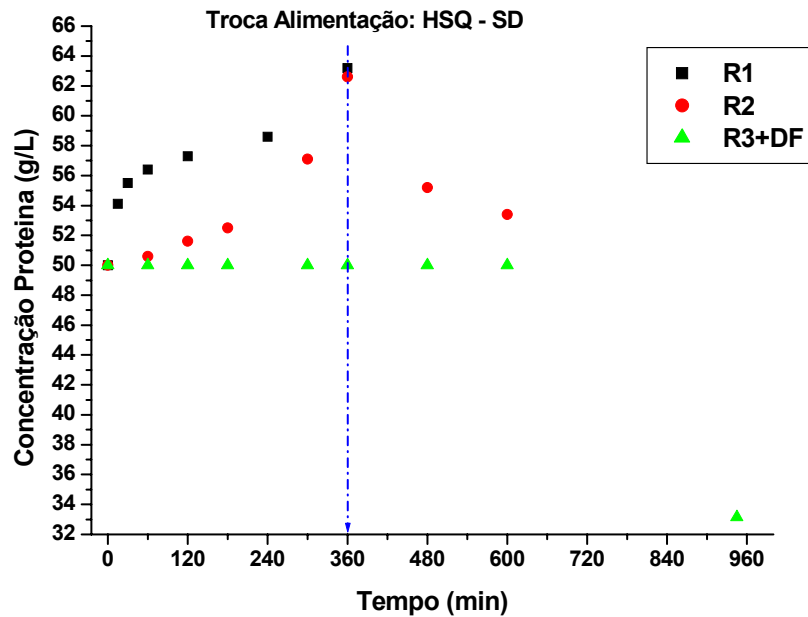
(\*) média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas

<sup>(\*)</sup> depois de 360 min de operação, a alimentação do HSQ foi trocada para solução dialisante

<sup>a</sup> Eq. (5.2)    <sup>b</sup> Eq. (5.3);    <sup>c</sup> Eq. (5.4).

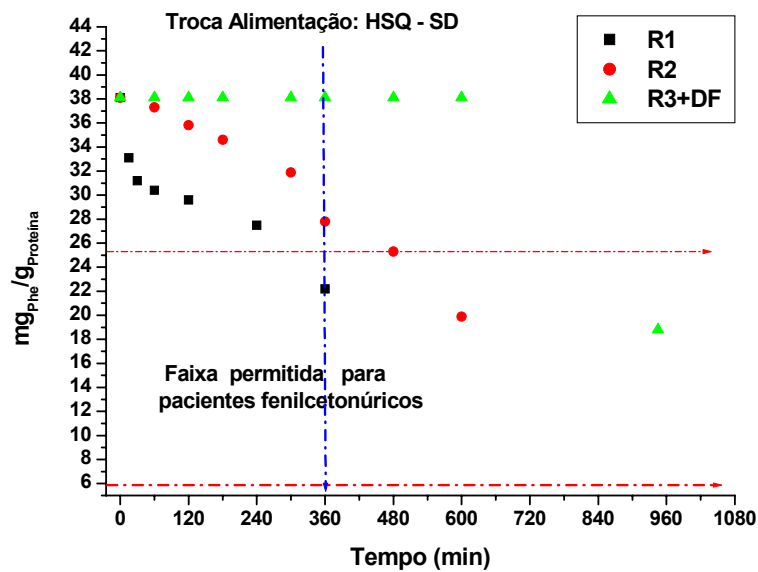
Observa-se na Tabela 5.22 que os três sistemas atingiram boas conversões, sendo que R1 apresentou o menor valor. Como anteriormente discutido, a adsorção de parte da Phe livre na membrana pode explicar tal comportamento. As produtividades são também comparadas na Tabela 5.22. O sistema R2 apresentou a maior produtividade, seguida do sistema R3; ambos os sistemas operaram com a membrana de fibra oca.





**Figura 5.59:** Comparação da evolução da concentração de proteínas do produto final ao longo do tempo da reação para os três sistemas.

Na Figura 5.60 mostra-se a evolução do teor de Phe no produto,  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ , durante a reação para os três sistemas. Nota-se que os produtos dos três sistemas estão dentro da faixa permitida para pacientes fenilcetonúricos (Portaria N 847 de 31/10/2002 da Secretaria de assistência à saúde de Brasil), sendo que a razão  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  de R1 se encontra no limite superior da faixa, enquanto que os valores de  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$  de R2 e R3 encontram-se em melhor posição dentro da faixa tolerada. Levando em consideração também a concentração final de proteínas obtida no produto de cada sistema, pode se considerar que o produto final do reator com membrana *fibra oca* (R2) possui uma melhor combinação das duas propriedades buscadas para o tipo de produto aqui estudado: baixo teor de Phe com uma concentração razoável de peptídeos.



**Figura 5.60:** Comparação da evolução do teor de Phe ( $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ ) ao longo do tempo da reação para os três sistemas.

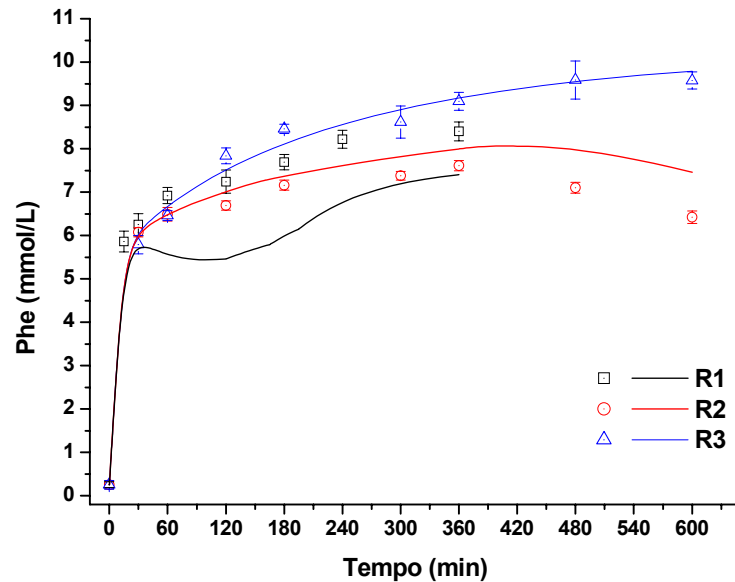
Na Tabela 5.23 apresenta-se a distribuição de peptídeos em percentagem mássica (% m/m) para diferentes faixas de massa molar antes (HSQ) e depois da reação com CPA (produto final) para os três sistemas. Observe que as três configurações apresentam distribuições semelhantes. O produto final para os três sistemas é constituído basicamente de peptídeos  $\leq 5,8$  kDa.

**Tabela 5.23:** Distribuição da massa molar dos peptídeos antes e depois da reação com CPA (produto final) dos três sistemas.

MM (kDa)	HQ (% p/p) (antes da reação)	R1 (% p/p)	R2 (% p/p)	R3 (% p/p)
$67 < \text{MM}_5$	5,9	4,5	4,0	4,2
$5,8 < \text{MM}_4 \leq 67$	24,9	24	23,2	23,8
$1,7 < \text{MM}_3 \leq 5,8$	31,81	30,8	31,5	30,9
$0,56 < \text{MM}_2 \leq 1,7$	32,1	19,7	20,4	18,6
$\text{MM}_1 \leq 0,56$	5,3	21,0	20,9	22,5

Na Figura 5.61 são comparados as previsões do modelo matemático proposto com os dados experimentais dos três sistemas. A qualidade do ajuste dos parâmetros cinéticos pode ser observada na boa predição do modelo para o reator batelada (R3). As simulações para R1 e R2 têm acopladas o modelo empírico do módulo de ultrafiltração (vazão de

permeado, coeficientes de rejeição). Para R2 a predição do modelo está em concordância com o perfil observado para a concentração de Phe livre. Já para R1 o modelo não apresentou um bom ajuste, porém tem comportamento qualitativo razoável, seguindo a tendência dos pontos experimentais.



**Figura 5.61:** Phe livre ao longo do tempo de ração com CPA: comparação entre modelo e dados experimentais dos três sistemas. As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicata.

Nosso modelo no sistema foi considerado de mistura ideal mais a configuração do reator com mangueiras e unidade de ultrafiltração poderá causar defeitos de mistura o que não é considerado pelo modelo. Esses efeitos podem ser responsáveis, em parte pelo deslocamento do modelo com relação aos dados experimentais do REM.

Note-se que para o reator batelada, cuja mistura é muito próxima da perfeita o modelo se ajusta muito bem aos dados experimentais indicando, assim, que as velocidades de reação estão bem representadas pela cinética adotada nesta tese.

## 6. CONCLUSÕES

Para a produção de hidrolisados protéicos a partir de soro de queijo *in natura*, propôs-se no presente trabalho a hidrólise enzimática seqüencial utilizando duas enzimas, quimotripsina e carboxipeptidase A, ambas imobilizadas em gel de agarose; realizando-se a etapa de hidrólise com CPA em um reator enzimático com membrana de *placa plana e fibra oca*. Paralelamente foi desenvolvido um modelo matemático para o sistema (reator acoplado a uma unidade de diafiltração), validado com os dados experimentais. Os principais resultados obtidos no presente trabalho serão apresentados a seguir:

O enfoque de Briggs-Haldane não foi adequado para modelar a cinética da hidrólise de soro de queijo com CPA (pré-hidrolisada com quimotripsina). Relaxando-se a hipótese de estado pseudo-estacionário, entretanto, conseguiu-se um bom ajuste aos dados experimentais, embora os parâmetros tenham largos intervalos de confiança (Tabela 3.1).

A inibição pelo substrato na hidrólise de soro de queijo com CPA (pré-hidrolisada com quimotripsina) pode ser desprezada.

O conteúdo máximo de Phe no soro de queijo concentrado *prato e minas frescal* determinados por hidrólise ácida foram: 3,84 e 3,83  $\text{g}_{\text{Phe}}/\text{100g}_{\text{Proteína}}$  respectivamente. Estes valores estão próximos do valor teórico previsto por Adler-Nissen.

Na hidrólise com CPA no REM *placa plana* utilizando-se soro de queijo tipo *prato*, pré-hidrolisado com quimotripsina até 12,3%, obteve-se baixas conversões da reação e perda de conteúdo de proteínas no produto final.

Determinou-se o novo substrato a ser utilizado nos ensaios subseqüentes a partir da comparação de dois ensaios em batelada seguidos de diafiltração e utilizando soro de queijo *minas frescal* pré-hidrolisado com quimotripsina em dois diferentes graus de hidrólise (12,3 e 15,3%). O melhor resultado foi obtido utilizando o substrato com grau de hidrólise de 15,3%, ou seja, conversão da reação de 91,2% e 11,7  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ .

Os resultados do melhor ensaio na hidrólise com CPA no REM *placa plana* utilizando-se soro de queijo tipo *minas frescal* pré-hidrolisado com quimotripsina  $\text{GH}_Q = 15,3\%$ , e alimentando somente hidrolisado de soro de queijo com quimotripsina foram: 72% de conversão e um produto final com conteúdo de proteínas de 63,2 g/L constituído basicamente por peptídeos com massa molar  $\leq 5,8$  kDa e 22,2  $\text{mg}_{\text{Phe}}/\text{g}_{\text{Proteína}}$ , valor que se encontra abaixo do limite superior da faixa permitida para pacientes fenilcetonúricos.

Verificou-se que na hidrólise com CPA no REM *placa plana* existe uma considerável adsorção de peptídeos e aminoácidos na membrana (em torno de 16%) após 360

min de operação, principalmente devido ao fato da razão volume de reator/área de membrana ( $7,5 \times 10^{-2}$  cm) ter sido muito baixa neste caso.

Apesar do modelo matemático desenvolvido para o sistema (reator/membrana) empregar um enfoque simplificado para os fenômenos envolvidos no processo, principalmente o transporte de massa trans-membrana, foi possível representar de forma aceitável o perfil de Phe ao longo da reação para os dois tipos de membrana estudados. Um melhor desempenho do modelo foi obtido para o REM *fibra oca*, onde justamente a relação volume reacional por área de membrana minimiza possíveis efeitos de retenção na membrana (por adsorção, por exemplo).

O modelo matemático apresentado usa uma abordagem simplificada para a unidade de filtração, e depende de valores experimentais para os coeficientes de rejeição e para a vazão de permeado. Os testes de sensibilidade do modelo frente à vazão de permeado deixaram evidente a importância de se modelar em maior detalhe a unidade de ultrafiltração.

O REM *fibra oca* em geral apresentou melhor desempenho (85% de conversão, produtividade de  $275,2 \times 10^{-7}$  g<sub>hidrolisado</sub>/mg<sub>Phe</sub>/U<sub>H-Phe</sub>/h e 1% de adsorção de Phe na membrana), seguido do sistema Batelada/diafiltração (83% de conversão e produtividade de  $186,5 \times 10^{-7}$  g<sub>hidrolisado</sub>/mg<sub>Phe</sub>/U<sub>H-Phe</sub>/h), e por último o sistema REM *placa plana* (71% de conversão, produtividade  $119,3 \times 10^{-7}$  g<sub>hidrolisado</sub>/mg<sub>Phe</sub>/U<sub>H-PHE</sub>/h e 16% de adsorção de Phe na membrana). A pequena relação (volume reator/área membrana) foi um dos fatores principais para o baixo desempenho desse último sistema.

Pode-se concluir que o produto resultante do sistema REM *fibra oca* apresentou as melhores características para ser utilizado como complemento protéico para pacientes fenilcetonúricos por apresentar um alto conteúdo de proteínas (53,4 g/L), constituído principalmente por peptídeos de massa molar  $\leq 5,8$  kDa e com 19,9 mg<sub>Phe</sub>/g<sub>Proteína</sub>, valor que se encontra dentro da faixa tolerada para esse tipo de pacientes.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

As principais sugestões para trabalhos futuros são listadas a seguir:

- Construir uma membrana com características adequadas para facilitar a separação dos aminoácidos hidrofóbicos, principalmente a Phe, de forma a se reduzir seu teor no hidrolisado sem perda importante de peptídeos através da membrana.
- Testar outras configurações de membranas para o processo
- Analisar a importância de desvios da idealidade da mistura no interior do REM, principalmente nas tubulações e na unidade de ultrafiltração.
- Desenvolver um modelo matemático específico para o sistema de ultrafiltração, de caráter preditivo (com atenção para a previsão da evolução da vazão de permeado e do coeficiente de rejeição ao longo do tempo). Assim o modelo para o sistema completo seria mais apropriado para estudos de otimização do processo.
- Otimizar a alimentação do hidrolisado de soro de queijo com quimotripsina/solução dialisante no REM.
- Desenvolver algoritmo para otimização do processo.
- Verificar a necessidade e viabilidade econômica de se incluir no processo unidade de cromatografia para redução de teor de Phe.
- Realizar um estudo para a secagem, caracterização e análise sensorial do produto final.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, R. H.; FREY, P. A.; JENCKS, W. P. **Biochemistry**. Boston: Jones; London: Bartlett Publishers, 1996.

ADACHI, S. et al., Separation of Peptide Groups with definite characteristics enzymatic protein hydrolysate, **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 925-932, 1991

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

AMBER, R. P. Carboxypeptidase A and B. **Methods Enzymology**, v. 25 B, p. 261-272, 1972.

BALCAO, V. M.; MALCATA, F. X. On the performance of a hollow fiber bioreactor for acidolysis catalyzed by immobilized lipase. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 60,n.1, p. 114-123, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de assistência à saúde do Brasil. **Portaria N 847 de 31 de outubro de 2002**. Brasília , 2002.

BEYNON, R. J. BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. USA: Oxford University Press, 1989.

BHAVE, R. R. **Inorganic membranes: synthesis, characteristics and applications**, New York: Ed. Chapman & Hall, 1991.

BIDLINGMEYER, B. A., **Practical HPLC Methodology and Applications**. New York: John Wiley & Sons, 1992.

BOUHALLAB, S.; HENRY, G. Enzymatic hydrolysis of sodium caseinate in a continuous ultrafiltration reactor using inorganic membrane. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 692-696, 1995.

CARDIAS, H. T. C. **Estudo da Imobilização Multipontual de Penicilina G Acilase em Sílica Macroporosa Ativada com Glutaraldeído**. 1996. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química UFSCar, São Carlos, 1996.

CHEANG, B.; ZYDNEY, A. L. A two stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. **J. Membr. Sci.**, v. 231, p. 159-167, 2004.

CHEISON, S. C.; WANG, Z.; XU, S. Y. Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties characterization by multivariate data analysis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 10, p. 3896–3904, 2007a.

CHEISON, S. C., WANG, Z., XU, S. Y. Multivariate strategy in screening of enzymes to be used for whey protein hydrolysis in an enzymatic membrane reactor. **International Dairy J.**, v.17, p. 393–402, 2007b.

CHEISON, S. C.; WANG, Z., XU, S. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. **J. Food Eng.**, 2006a (article in press).

CHEISON, S. C.; WANG, Z., XU, S. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis. **J. Membr. Sci.**, v. 283, p. 45-56, 2006b

CHEISON, S. C.; WANG, Z., XU, S. Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor II. Characterisation for the fate of the enzyme by multivariate data analysis. **J. Membr. Sci.**, v. 286, p. 322-332, 2006c.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, 1998.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Food Sc. Technol.**, v. 11, p. 254-262, 2000.

FERNANDEZ-SANCHEZ, V. M. **Difusão de aminoácidos e proteínas em partículas de gel de agarose**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química UFSCar, São Carlos, 2000.

FERREIRA, H. P. **Modelagem e simulação da separação de proteínas, peptídeos e aminoácidos por eletroforese contínua**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química UFSCar, São Carlos, 2000.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 234-237, 2006.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise de Proteínas do Soro de Queijo com Tripsina e Quimotripsina Livres e Imobilizadas**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química UFSCar, São Carlos, 2000.

GALVÃO, C. M. A. **Hidrólise Controlada de Proteínas do Soro Láctico Usando Tripsina e Quimotripsina Imobilizadas em Diferentes Suportes**. Tese de Doutorado – Departamento de Engenharia Química UFSCar, São Carlos, 2004.

GONZÁLEZ-TELLO, F. et al., Enzymatic hydrolysis of whey proteins: i. kinetic models. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 529-532, 1994.

GUIMARÃES, C. P.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Estimativa do teor de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não-protéica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, 2005.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-Agarose Gels as Activated Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J. M. et al. Enzyme stabilization by multipoint attachment to activated pre-existing supports: stability and stabilization of enzymes. **Proceedings of an International Symposium held in Maastricht**, The Netherlands, 22-25, November, 1992.



GUADIX, A.; CAMACHO, F. e GAUDIX, M. E. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. **J. Food Engin.**, v. 72, p. 398-405, 2006.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de separação com membranas**. Rio de Janeiro: E- paper Serviços Editoriais, 2006.

HERNANDEZ, F. et al. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems. **App. Cataly. B-Environ.**, v. 67, n. 1-2, p.121-126, 2006.

HOCH, G. J. Whey to go: news applications for concentrated whey proteins are both functional, healthy. **Food processing**, 1997.

INTERNET: <http://www.meadjohnson.com> (03/09/06).

INTERNET: [http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe\\_art.asp?id=5834](http://www.portaldovoluntario.org.br/sala/exibe_art.asp?id=5834), matéria publicada em 17/06/2004.

INTERNET: <http://www.fcf.usp.br/fenilcetonuricos/> (25/11/06).

JULIANO, A. M. M.; PETRUS, J. C. C.; TORRANO, A. D. M. Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para produção de queijos. **Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes**, v. 42, n. 251, p. 3-6, 1987.

KAPEL, R. et al. Characterization of an antihypertensive peptide from an alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. **Process Biochem.**, v. 41, n. 9, p. 1961-1966, 2006.

KENNEDY, J. F. Enzyme technology. In: REHM, H. J., REED, G. **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1987. v.7.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A.; MELO, E. H. M. The immobilization of enzymes and cells. **Chimicaoggi**, p. 21-29, 1988.

LADISCH, M.R. **Bioseparations engineering: principles, practice, and economics**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

LANFER-MARQUEZ, U. M. et al. Estudo da composição química de flocos de cereais com ênfase nos teores de fenilalanina. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 17, n.3, 1997.

LONG, W. S.; BHATIA, S.; KAMARUDDIN, A. Modeling and simulation of enzymatic membrane reactor for kinetic resolution of ibuprofen ester. **J. Membr. Sci.** v. 219, n. 1-2, p. 69-88, 2003.

LONG, W. S.; KAMARUDDIN, A. H.; BHATIA, S. Enzyme kinetics of kinetic resolution of racemic ibuprofen ester using enzymatic membrane reactor. **Chem. Eng. Sci.**, v. 60, n. 18, p. 4957-4970, 2005.

- LARA, M. G. **Estudo das condições de obtenção de um hidrolisado enzimático de proteínas de soro de leite com baixo teor de fenilalanina.** Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmácia. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** 2. ed. Sao Paulo: Sarvier, 1995.
- LEHNINGER, N. D.; COX, M. M. **Principles of biochemistry.** 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000.
- LIU, J.; CUI, Z., Optimization of operating conditions for glucose oxidation in an enzymatic membrane bioreactor. **J. Membr. Sci.** v. 302, p. 180-187, 2007.
- MAGNAN, E. et al. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. **J. Membr. Sci.** v. 241, n. 1, p. 161-166, 2004.
- MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Continuous Hydrolysis of Milk Protein in a Membrane Reactor. **J. Food Sci.**, 55, 381-385, 1990
- MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technol.**, v. 48, n.10, p. 89-95, 1994.
- MARGOT, A.; FLASCHEL, E.; RENKEN, A. Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. **Process. Biochem.**, v. 32, n. 3, p. 217-223, 1997.
- MÁRQUEZ, M. C.; VÁZQUEZ, M. A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. **Process. Biochem.**, v. 35, p. 111-117, 1999.
- MARTIN-ORUE, C.; HENRY, G.; BOUHALLAB, S. Tryptic hydrolysis of k-caseinomacropetide: control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, p. 173-180, 1999.
- MARTINS A. M. **Fenilcetonúria:** abordagem terapêutica. Nestlé, 1993. (Temas em Pediatria 54 )
- MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J.F. Review: whey - pollution problem and potencial utilization. **Internat. J. Food Sci. Technol.**, v. 23, p. 323-336, 1988.
- MICRONAL – Boletim. A determinação do nitrogênio de acordo com o método de Kjeldahl, p. 2-9, 1995.
- MILLER, G. L. Analytical chemistry. use of dinotrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. V. 31, n. 3, 1959.
- MISSICK, T. W. A new whey to prevent cancer?. **Agricult. research**, p.10-11, Oct., 2000.
- MORI, M. et al. A new way to conduct enzymatic synthesis in an active membrane using ionic liquids as catalyst. **Catal. Today**, v. 104, n. 2-4, p. 313-317, 2005

- MORR, C. V. e HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 341-476, 1993.
- MULDER, M., Basic principles of membrane technology. Netherlands: Kwer Academic Publishers, 1991.
- NEVES, B. S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. **Revista Leite e Derivados**, n. 10, p. 50-54, 1993.
- NÓBREGA, R.; BORGES, C. P.; HABERT, A. C. Processos de separação por membrana. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Sao Paulo: Editora Manole, 2005. cap. 4, p. 37-88.
- NAU, F. et al. Selective separation of tryptic  $\alpha$ -casein peptides through ultrafiltration membranes: influence of ionic interactions. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 46, p. 246- 253, 1995.
- PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of wey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme Microb. Technol.**, v.18, p. 29-34, 1996.
- PESSELA, B. C. C.et al. Reversible immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase via ionic adsorption on pei-coated sepabeads. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 32, p. 369-374, 2003.
- PETRUS, J. C. C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de sucos de frutas**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- PINTO, G. A. et al. Amino acids yields during proteolysis catalyzed by carboxypeptidase a are strongly dependent on substrate pre-hydrolysis. **Biochem. Eng. J.**, 2007. Article in press.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; CASTRO-GOMES, R. J. H. Soro de leite - obtenção, características e aproveitamento. in: **Seminário Cia. Agr.**, v. 13, n. 1, p. 92-96, 1992. Londrina.
- POMIER, E.et al. Effect of working conditions on vegetable oil transformation in an enzymatic reactor combining membrane and supercritical CO<sub>2</sub>. **J. Supercritical Fluids**, v. 41, n. 3, p. 380-385, 2007.
- PRATA-VIDAL, M. et al. An experimental study of caseinomacropeptide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor. **Biochem. Eng. J.**, v. 8, p. 195-202, 2001.
- PRIETO, C. A.et al. Cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. **J. Food Eng.**, v. 78, p. 257-265, 2007.
- RAUTENBACH, R.; ALBRECHT, R. **Membrane process**. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: 3-Bioprocessing**. New York : VCH Publishers, 1993.

RESENDE, M. M. **Proteólise Enzimática de Soro de Queijo em Reator de Taylor-Couette-Poiseuille**. Tese de Doutorado - Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2002.

RESENDE, M. M. et al. Enzymatic tailor-made proteolysis of whey in a vortex flow reactor. **J. American Institute Chemical Engineers**, v. 21, n. 1, p. 314-322, 2004.

RICHARDS, N.S. Emprego racional do soro. **Indústria de Laticínios**, v. 67, 1997.

RIOS, G. M. et al. Progress in enzymatic membrane reactors – review. **J. Membr. Sci.**, v. 242, p. 189-196, 2004.

SAHA, B.; HAYASHI, K. Research review paper - debittering of protein hydrolysates. **Biotechnol. Advances**, v. 19, p. 355-370, 2001.

SANCHEZ, G. S. **Diseño de derivados de quimotripsina como catalizadores en reacciones de química fina**. Tesis Doctoral – Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC), Madrid, 1995.

SANTOS J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Rev. do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 44-50, 2001.

SCOTT, R. **Cheesemaking Practice**. London: Elsevier Applied Science, 1986, p. 312-319.

SCRIVER, C. R. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, 8. ed. New York: Mc- Graw-Hill, 2001.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 1996.

SILVA, C. R. N. **Processos de recuperação de proteínas de soro de queijo na forma de hidrolisados e concentrados**. Dissertação Mestrado - Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2000.

SILVESTRE, M. P. C., HAMON, M.; YVON, M. Analysis of protein hydrolysates. characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method, **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 2783-2789, 1994.

SOARES, L. M. C. G., **Hidrólise enzimática e caracterização de peptídeos obtidos a partir de proteínas de soro de queijo**, Tese de Doutorado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 1995.

SOUSA Jr., R. **Inteligência computacional aplicada à automação da hidrólise enzimática de soro de queijo em reator contínuo**. Tese de Doutorado - Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2003.

SOUSA Jr., R. et al. Hybrid model for an enzymatic reactor: hydrolysis of cheese whey proteins by alcalase immobilized in agarose gel particles. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105-108, p. 413- 422, 2003.

SOUSA Jr., R. et al. Hibrid model for an enzymatic reactor: hydrolysis of cheese whey proteins by alcalase immobilized in agarose gel particles. **Brazilian J. Chem. Eng.**, v. 21, n. 2, p. 147-153, 2004a.

SOUSA Jr., R. et al. GMC-fuzzy control of ph during enzymatic hydrolysis of cheese whey proteins. **Computers Chem. Eng.**, v. 28, p. 1661-1672, 2004b.

SPELLMAN, D.; O'CUINN, G.; FITZGERALD, R. J. Physicochemical and sensory characteristics of whey protein hydrolysates generated at diferent total solids levels. **J. Dairy Res.**, v.72, p. 138-143, 2005.

STRYER, L. **Bioquímica**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada das proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase a e alcalase® imobilizadas multipontualmente em agarose**. Tese de Doutorado - Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2003.

TARDIOLI, P. W. et al. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase a derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 565-574, 2003.

TIERNEY JR. L. M. **Diagnóstico & tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2001, p. 1537,

TREFZ, F. K. et al. Genotype-Phenotype Correlations in Phenylketonuria. **Clin. Chim. Acta**, v. 217, p. 15-21, 1993.

TRUSEK-HALOWNIA, A.; NOWORYTA, A. An integrated process: ester synthesis in an enzymatic membrane reactor and water sorption. **J. Biotechnol.**, v.130, n. 1, p. 47-56, 2007a.

TRUSEK-HALOWNIA, A. Production of protein hydrolysates in enzymatic membrane reactor. **Biochem. Eng. J.**, 2007b. Article in press.

UJANG, Z.; HAZRI, A. Overall mass transfer coefficient for the removal of water from an enzyme-immobilized hollow fiber reactor. **J. Membr. Sci.**, v. 175, n. 1, p. 139-144, 2000.

VIEIRA, A. M. S. **Separação de aminoácidos aromáticos de oligopeptídeos**. Tese de Doutorado - Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2004.

VIOTTO, W. H., **Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal. efeito de pré-tratamento de soro no desempenho na membrana de ultrafiltração e na composição e solubilidade do concentrado protéico de soro**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Quantitativa**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, 1981.

VOROB'EV, M. M.; LEVICHEVA, I. Y.; BELIKOV, V. M. Kinetic of the initial stage of milk protein hydrolysis by chymotrypsin. **App. Biochem. Biotechnol.** v. 32, p. 219-222, 1996.

WANG, Y. et al. Immobilization of lipase with special microstructure in a composite hydrophilic ca/hydrophobic ptfé membrane for the chiral separations of racemic ibuprofen. **J. Membr. Sci.**, v. 293, n. 1-2, p. 133-141, 2007.

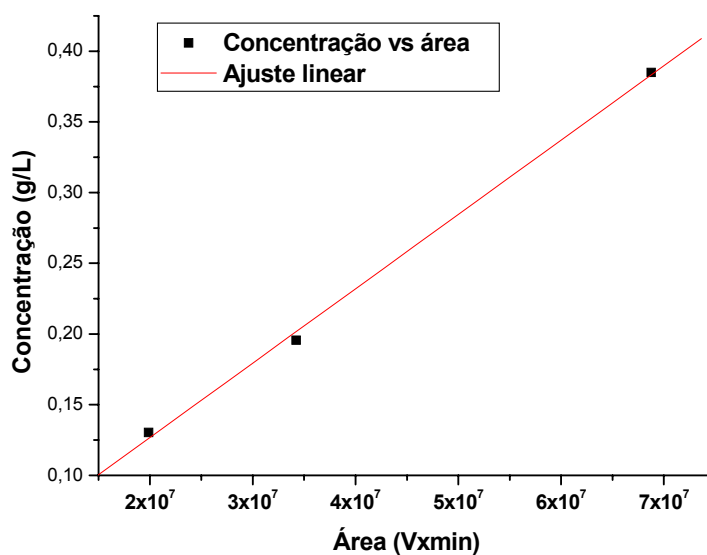
WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2. Ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

## ANEXO I

## Curvas de Calibração dos Peptídeos

No presente anexo mostram-se os ajustes lineares da concentração versus área dos padrões utilizados nas duas calibrações realizadas.

Para a primeira calibração da coluna Superdex Peptide10/300 GL: 100-7000 Da (GE Biosciences), realizada no HPLC Shimadzu, modelo bomba: LC-10AD, foram ajustados seis padrões (dois padrões de peptídeos e quatro de aminoácidos), cujos ajustes lineares são apresentados a seguir:



**Figura A1.1:** Ajuste linear de Leucine (0,56 kDa) (padrão de peptídeo)

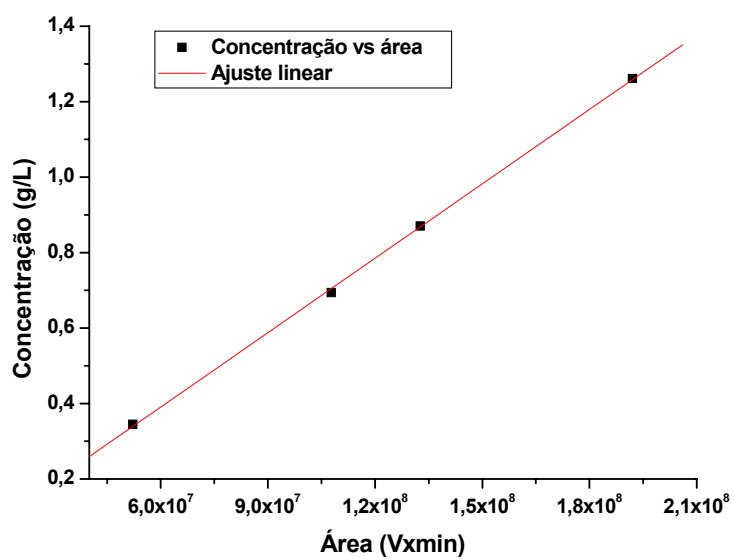


Figura A1.2: Ajuste linear de Angiotensin (1 kDa) (padrão de peptídeo)

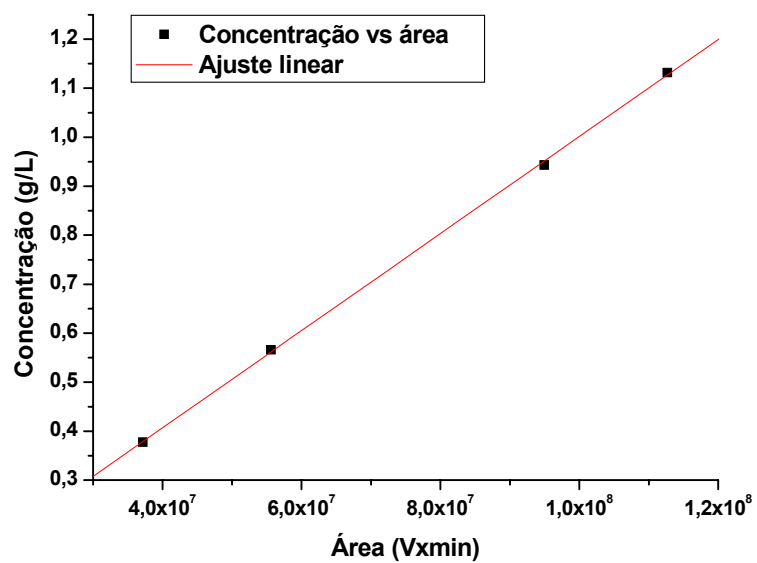
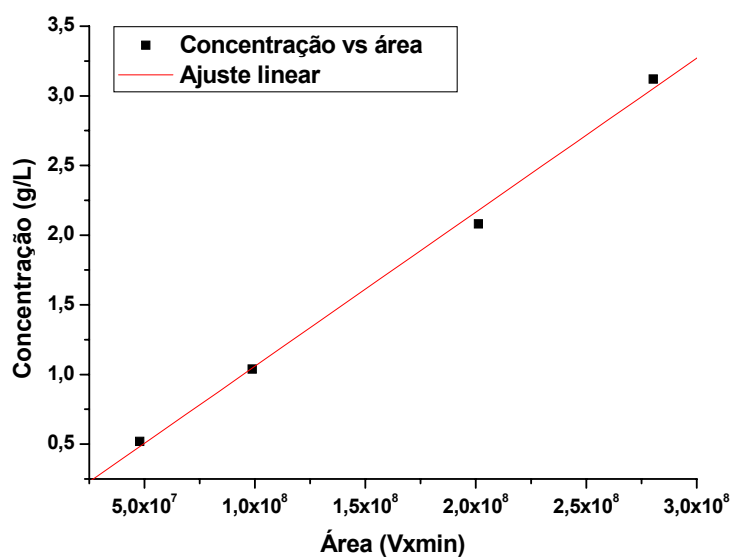
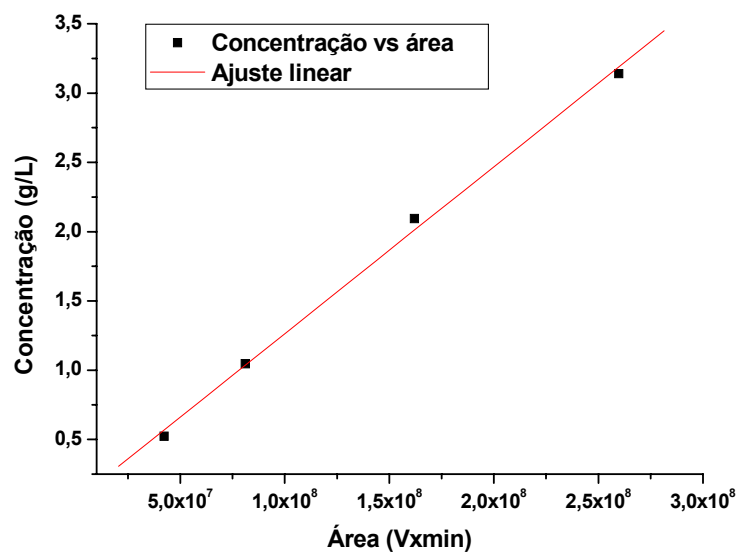
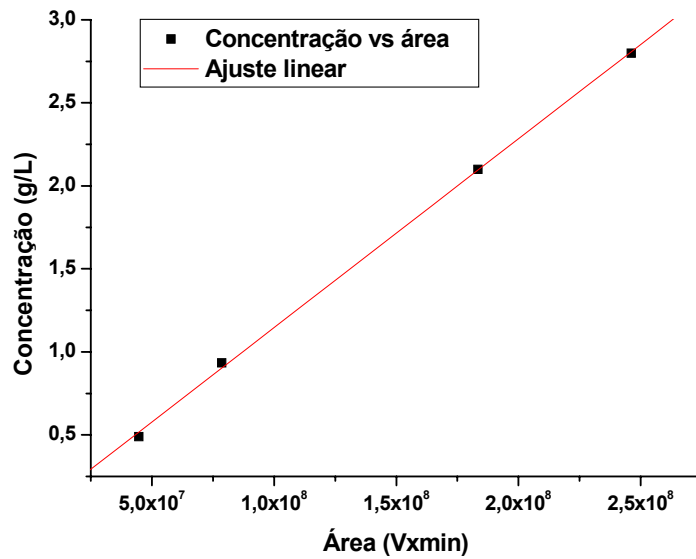


Figura A1.3: Ajuste linear de Insulina (5,8 kDa)

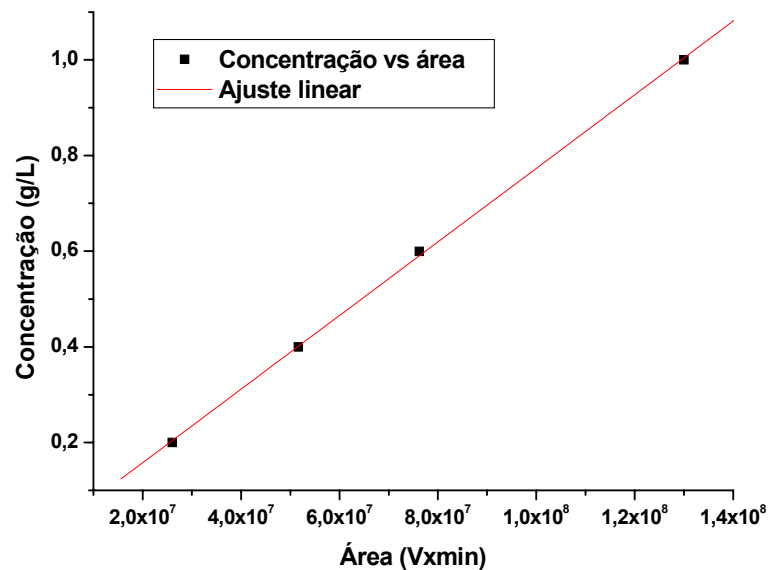


Figura A1.4: Ajuste linear da  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa)Figura A1.5: Ajuste linear da  $\beta$ -Lactoglobulina (18,3 kDa)



**Figura A1.6:** Ajuste linear de Soro Albumina Bovina (67 kDa)

Para a segunda calibração da coluna Superdex Peptide10/300 GL: 100-7000 Da (GE Biosciences) realizada no HPLC Shimadzu, modelo bomba: LC-6AD, foram ajustados cinco padrões (dois padrões de peptídeos e três proteínas), cujos ajustes lineares são apresentados a seguir:



**Figura A1.7:** Ajuste linear de Leucine (0,56 kDa) (padrão de peptídeo)

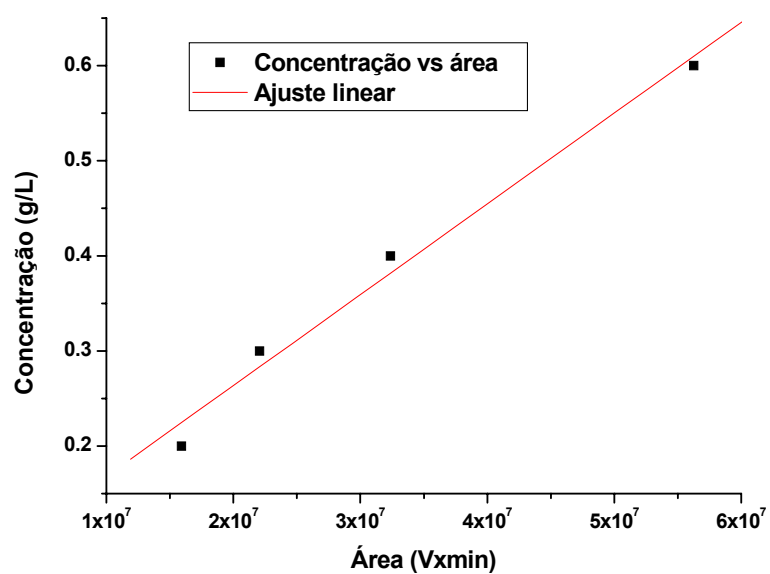


Figura A1.8: Ajuste linear de Neurotensin ( 1,7 kDa) (padrão de peptídeo)

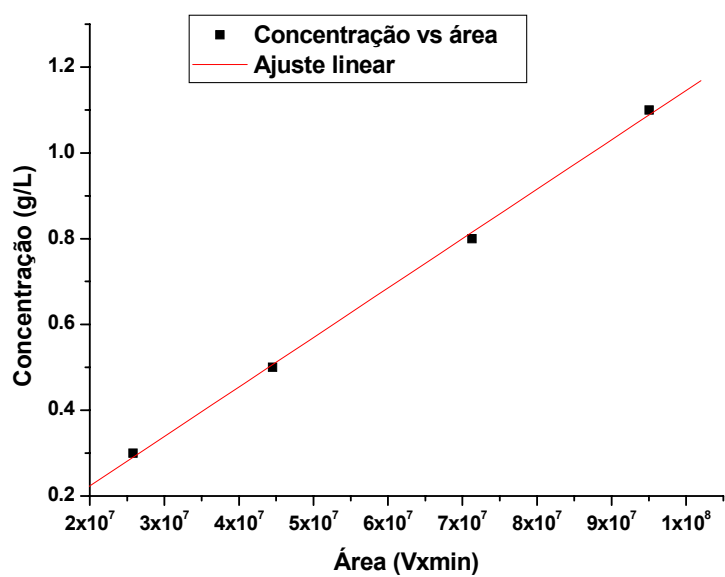


Figura A1.9: Ajuste linear de Insulina (5,8 kDa)

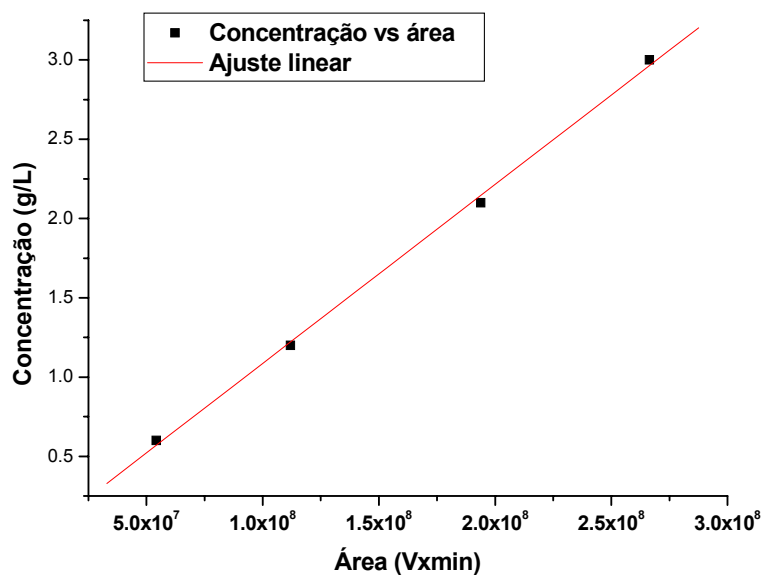


Figura A1.10: Ajuste linear da  $\alpha$ -Lactalbumina (14 kDa)

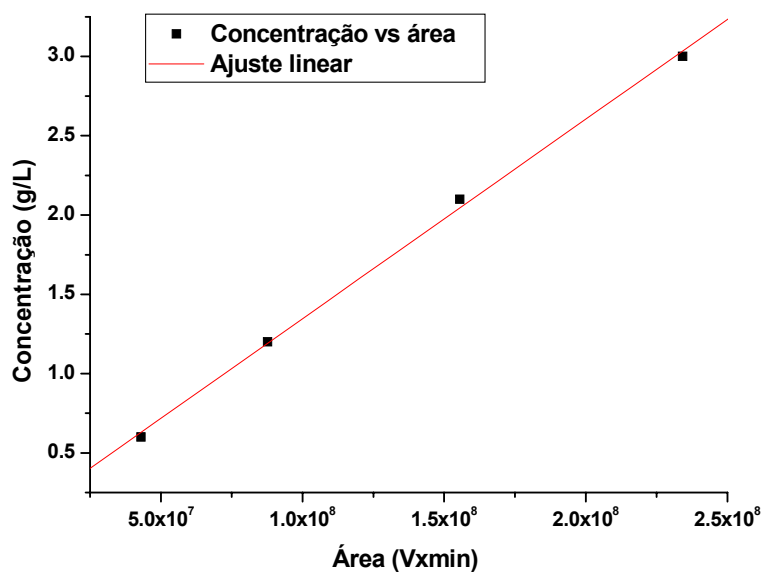


Figura A1.11: Ajuste linear de Soro Albumina Bovina (67 kDa)

## ANEXO II

## Seqüência de Aminoácidos das Principais Proteínas

A seguir apresentam-se as estruturas primárias das principais proteínas do soro apresentadas na literatura obtidas da Protein Data Bank.

SEQÜÊNCIA DE  $\alpha$ -LACTALBUMINA

GLU-GLN-LEU-THR-LYS-CYS-GLU-VAL-PHE-GLN-LYS-LEU-LYS-ASP-LEU-LYS-ASP-TYR-GLY-GLY-VAL-SER-LEU-PRO-GLU-TRP-VAL-CYS-THR-ALA-PHE-HIS-THR-SER-GLY-TYR-ASP-THR-GLN-ALA-ILE-VAL-GLN-ASN-ASN-ASP-SER-THR-GLU-TYR-GLY-LEU-PHE-GLN-ILE-ASN-ASN-LYS-ILE-TRP-CYS-LYS-ASP-ASP-GLN-ASN-PRO-HIS-SER-ARG-ASN-ILE-CYS-ASN-ILE-SER-CYS-ASP-LYS-PHE-LEU-ASP-ASP-ASP-LEU-THR-ASP-ASP-ILE-VAL-CYS-ALA-LYS-LYS-ILE-LEU-ASP-LYS-VAL-GLY-ILE-ASN-TYR-TRP-LEU-ALA-HIS-LYS-ALA-LEU-CYS-SER-GLU-LYS-LEU-ASP-LN-TRP-LEU-CYS-GLU-LYS-LEU

SEQÜÊNCIA DE  $\beta$ -LACTOGLOBULINA

LEU-ILE-VAL-THR-GLN-THR-MET-LYS-GLY-LEU-ASP-ILE-GLN-LYS-VAL-ALA-GLY-THR-TRP-TYR-SER-LEU-ALA-MET-ALA-ALA-SER-ASP-ILE-SER-LEU-LEU-ASP-ALA-GLN-SER-ALA-PRO-LEU-ARG-VAL-TYR-VAL-GLU-GLU-LEU-LYS-PRO-THR-PRO-GLU-GLY-ASP-LEU-GLU-ILE-LEU-LEU-GLN-LYS-TRP-GLU-ASN-GLY-GLU-CYS-ALA-GLN-LYS-LYS-ILE-ILE-ALA-GLU-LYS-THR-LYS-ILE-PRO-ALA-VAL-PHE-LYS-ILE-ASP-ALA-LEU-ASN-GLU-ASN-LYS-VAL-LEU-VAL-LEU-ASP-THR-ASP-TYR-LYS-LYS-TYR-LEU-LEU-PHE-CYS-MET-GLU-ASN-SER-ALA-GLU-PRO-GLU-GLN-SER-LEU-VAL-CYS-GLN-CYS-LEU-VAL-ARG-THR-PRO-GLU-VAL-ASP-ASP-GLU-ALA-LEU-GLU-LYS-PHE-ASP-LYS-ALA-LEU-LYS-ALA-LEU-PRO-MET-HIS-ILE-ARG-LEU-SER-PHE-ASN-PRO-THR-GLN-LEU-GLU-GLU-GLN-CYS-HIS-ILE

## SEQUÊNCIA DA SORO ALBUMINA BOVINA

ASP- THR- HIS- LYS- SER- GLU- ILE- ALA- HIS- ARG- PHE- LYS- ASP- LEU- GLY-  
GLU- GLU- HIS- PHE- LYS- GLY- LEU- VAL- LEU- ILE- ALA- PHE- SER- GLN- TYR-  
LEU-  
GLN- GLN- CYS- PRO- PHE- ASP- GLU- HIS- VAL- LYS- LEU- VAL- ASN- GLU-  
LEU- THR- GLU- PHE- ALA- LYS- THR- CYS- VAL- ALA- ASP- GLU- SER- HIS- ALA-  
GLY- CYS- GLU- LYS- SER- LEU- HIS- THR- LEU- PHE- GLY- ASP- GLU- LEU- CYS-  
LYS- VAL- ALA- SER- LEU- ARG- GLU- THR- TYR- GLY- ASP- MET- ALA- ASP-  
CYS- CYS- GLU- LYS- GLN- GLU- PRO- GLU- ARG- ASN- GLU- CYS- PHE- LEU-  
SER- HIS- LYS- ASP- ASP- SER- PRO- ASP- LEU- PRO- LYS- LEU- LYS- PRO- ASP-  
PRO- ASN- THR- LEU- CYS- ASP- GLU- PHE- LYS- ALA- ASP- GLU- LYS- LYS- PHE-  
TRP- GLY- LYS- TYR- LEU- TYR- GLU- ILE- ALA- ARG- ARG- HIS- PRO- TYR- PHE-  
TYR- ALA- PRO- GLU- LEU- LEU- TYR- TYR- ALA- ASN- LYS- TYR- ASN- GLY-  
VAL- PHE- GLN- GLU- CYS- CYS- GLN- ALA- GLU- ASP- LYS- GLY- ALA- CYS-  
LEU- LEU- PRO- LYS- ILE- GLU- THR- MET- ARG- GLU- LYS- VAL- LEU- THR-  
SER- SER- ALA- ARG- GLN- ARG- LEU- ARG- CYS- ALA- SER- ILE- GLN- LYS- PHE-  
GLY- GLU- ARG- ALA- LEU- LYS- ALA- TRP- SER- VAL- ALA- ARG- LEU- SER-  
GLN- LYS- PHE- PRO- LYS- ALA- GLU- PHE- VAL- GLU- VAL- THR- LYS- LEU-  
VAL- THR- ASP- LEU- THR- LYS- VAL- HIS- LYS- GLU- CYS- CYS- HIS- GLY- ASP-  
LEU- LEU- GLU- CYS- ALA- ASP- ASP- ARG- ALA- THR- LEU- ALA- LYS- TYR- ILE-  
CYS- ASP- ASN- GLN- ASP- THR- ILE- SER- SER- LYS- LEU- LYS- GLU- CYS- CYS-  
ASP-  
LYS- PRO- LEU- LEU- GLU- LYS- SER- HIS- CYS- ILE- ALA- GLU- VAL- GLU- LYS-  
ASP- ALA- ILE- PRO- GLU- ASP- LEU- PRO- PRO- LEU- THR- ALA- ASP- PHE- ALA-  
GLU- ASP- LYS- ASP- VAL- CYS- LYS- ASN- TYR- GLN- GLU- ALA- LYS- ASP-  
ALA- PHE- LEU- GLY- SER- PHE- LEU- TYR- GLU- TYR- SER- ARG- ARG- HIS- PRO-  
GLU- TYR- ALA- VAL- SER- VAL- LEU- LEU- ARG- LEU- ALA- LYS- GLU- TYR-  
GLU- ALA- THR- LEU- GLU- GLU- CYS- CYS- ALA- LYS- ASP- ASP- PRO- HIS- ALA-  
CYS- TYR- THR- SER- VAL- PHE- ASP- LYS- LEU- LYS- HIS- LEU- VAL- ASP- GLU-  
PRO- GLN- ASN- LEU- ILE- LYS- GLN- ASN- CYS- ASP- GLN- PHE- GLU- LYS- LEU-  
GLY- GLU- TYR- GLY- PHE- GLN- ASN- ALA- LEU- ILE- VAL- ARG- TYR- THR-  
ARG- LYS- VAL- PRO- GLN- VAL- SER- THR- PRO- THR- LEU- VAL- GLU- VAL-  
SER- ARG- SER- LEU- GLY- LYS- VAL- GLY- THR- ARG- CYS- CYS- THR- LYS-  
PRO- GLU- SER- GLU- ARG- MET- PRO- CYS- THR- GLU- ASP- TYR- LEU- SER-  
LEU- ILE- LEU- ASN- ARG- LEU- CYS- VAL- LEU- HIS- GLU- LYS- THR- PRO- VAL-  
SER- GLU- LYS- VAL- THR- LYS- CYS- CYS- PRO- GLU- SER- LEU- VAL- ASN-  
ARG- ARG- PRO- CYS- PHE- SER- ALA- LEU- THR- PRO- ASP- GLU- THR- TYR-  
VAL- PRO- LYS- ALA- PHE- ASP- GLU- LYS- LEU- PHE- THR- PHE- HIS- ALA- ASP-  
ILE- CYS- THR- LEU- PRO- ASP- THR- GLU- LYS- GLN- ILE- LYS- LYS- GLN- THR-  
ALA- LEU- VAL- GLU- LEU- LEU- LYS- HIS- LYS- PRO- LYS- ALA- THR- GLU-  
GLU- GLN- LEU- LYS- THR- VAL- MET- GLU- ASN- PHE- VAL- ALA- PHE- VAL-  
ASP- LYS- CYS- CYS- ALA- ALA- ASP- ASP- LYS- GLU- ALA- CYS- PHE- ALA-  
VAL- GLU- GLY- PRO- LYS- LEU- VAL- VAL- SER- PRO- GLN- THR- ALA- LEU-  
ALA-

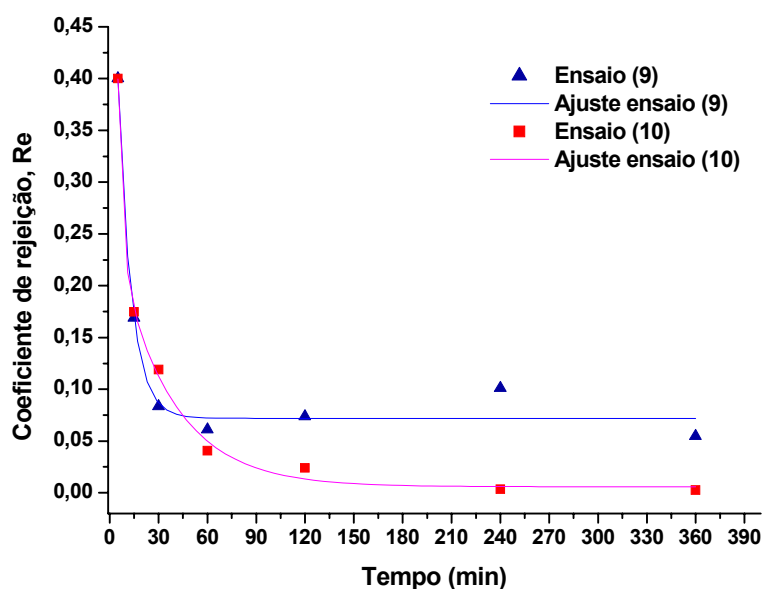
**Tabela A2.1:** Conteúdo teórico de cada aminoácido para as principais proteínas do soro de queijo

<b>Aminoácidos</b>	<b><math>\alpha</math>-Lactalbumina</b>	<b><math>\beta</math>-Lactoglobulina</b>	<b>Soro Albumina Bovina (SAB)</b>
Triptofano, Trp, W	4	2	2
Isoleucina, Ileu, I,	8	10	14
Fenilalanina, Phe, F	4	4	27
Prolina, Pro, P	2	8	30
Tyrosina, Tyr, Y	4	4	20
Leucina, Leu. L	13	22	61
Valina, Val, V	6	10	36
Metionina, Met, M	0	4	4
Lisina, Lys, K	13	15	59
Cisteína, Cys, C	8	5	35
Alanina, Ala, A	5	14	46
Histidina, His, H	3	2	17
Arginina, Arg, R	1	3	23
Glutamato, Glu, E	6	16	59
Aspartato, Asp, D	14	10	40
Glicina, Gly, G	5	4	16
Asparagina, Asn, N	8	5	13
Serina, Ser, S	6	7	28
Treonina, Thr, T	6	8	33
Glutamina, Gln, Q	6	9	20

## ANEXO III

**Hidrólise com Carboxipeptidase A no Reator Enzimático com Membrana de Placa Plana**

No presente anexo são apresentados os gráficos dos aminoácidos tirosina (Tyr), leucina (Leu) e isoleucina (Ileu) resultantes da comparação dos ensaios 9 e 10 da hidrólise seqüencial com quimotripsina e carboxipeptidase A (CPA) realizado no reator de membrana com *placa plana* (1 kDa, celulose regenerada, 1000 cm<sup>2</sup>).

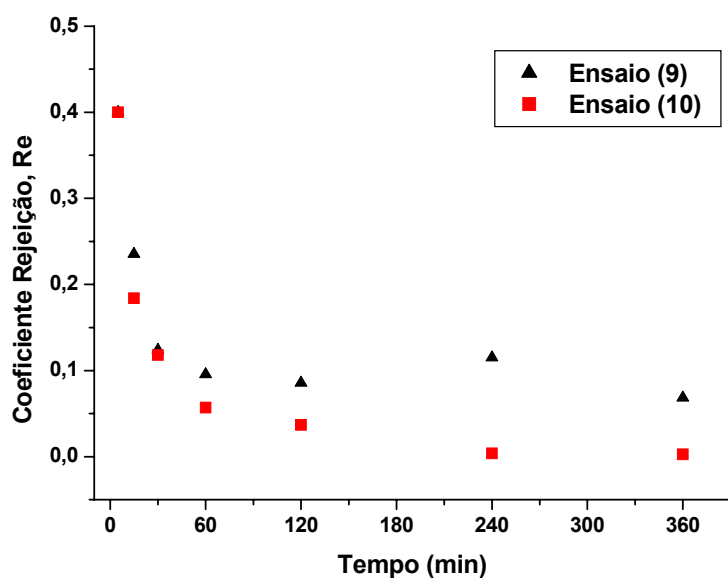


**Figura A3.1:** Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr livre dos ensaios (9) e (10), ajustados a uma equação de decaimento exponencial de Segundo ordem.

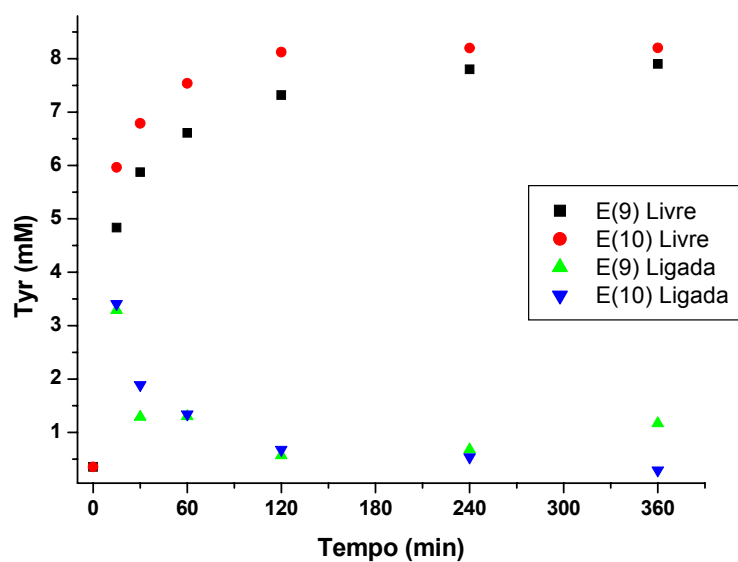
**Tabela A3.1:** Constantes do ajuste do Re da Tyr dos ensaios (9) e (10)

Constantes	Ensaio (9)	Ensaio (10)
$Y_0$	0,07195	0,00587
$A_1$	0,30446	0,25917
$A_2$	0,30446	1,02471
$X_1$	8,09541	33,87073
$X_2$	8,0954	2,78473

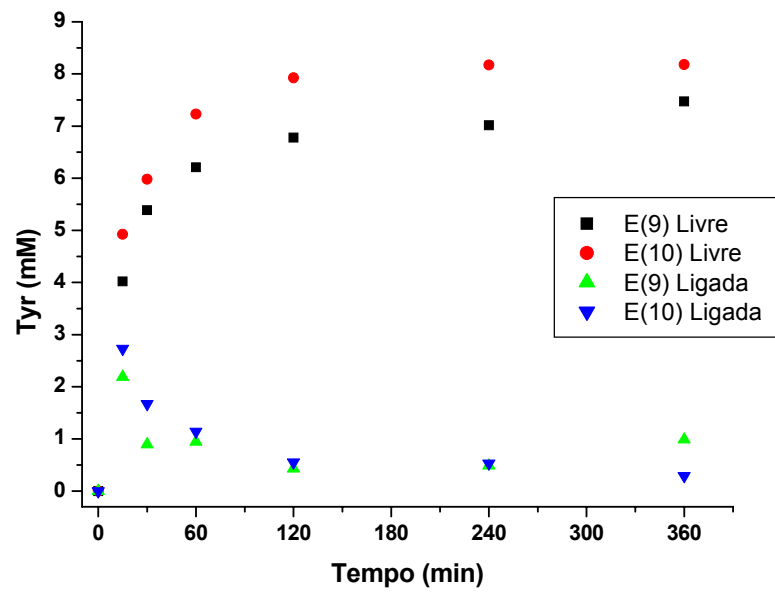




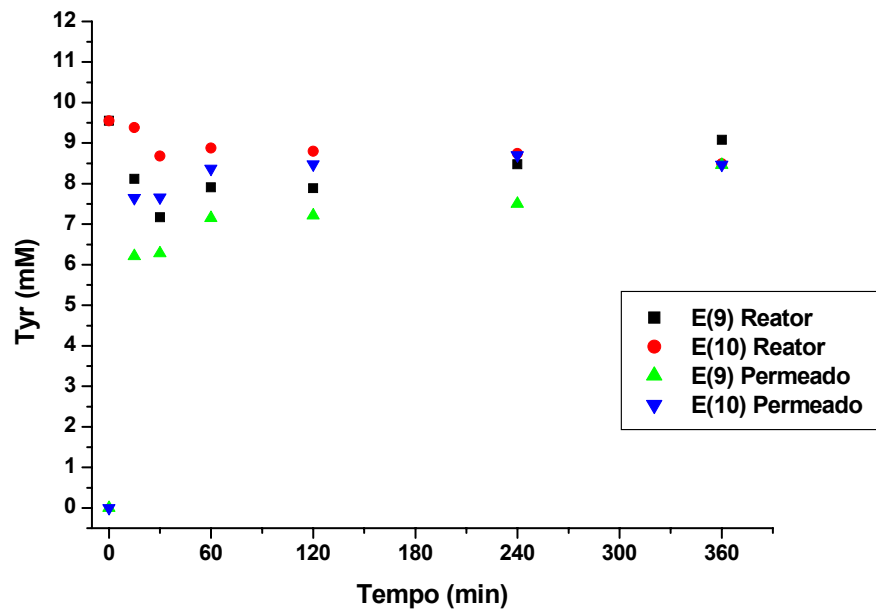
**Figura A3.2:** Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr Total dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



**Figura A3.3:** Concentração de Tyr livre e ligada no reator dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.

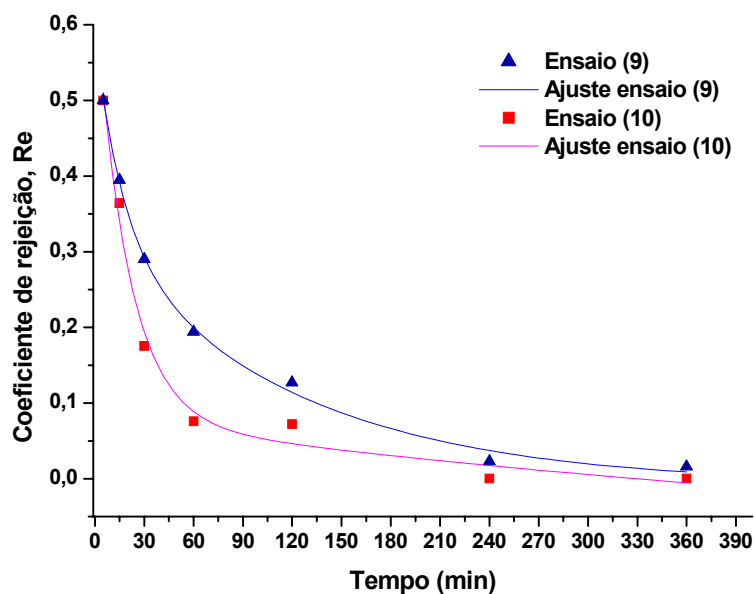


**Figura A3.4:** Concentração de Tyr livre e ligada no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



**Figura A3.5:** Concentração de Tyr Total no reator e permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.

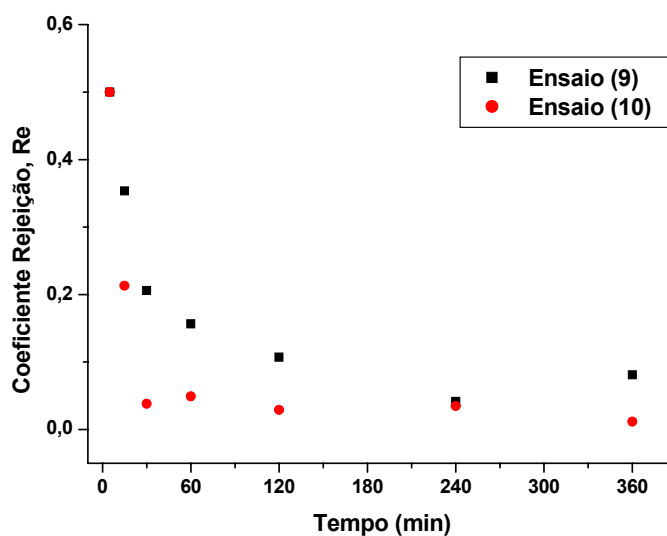
Os resultados da comparação dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de placa plana para Leucina (Leu) serão apresentados a seguir:



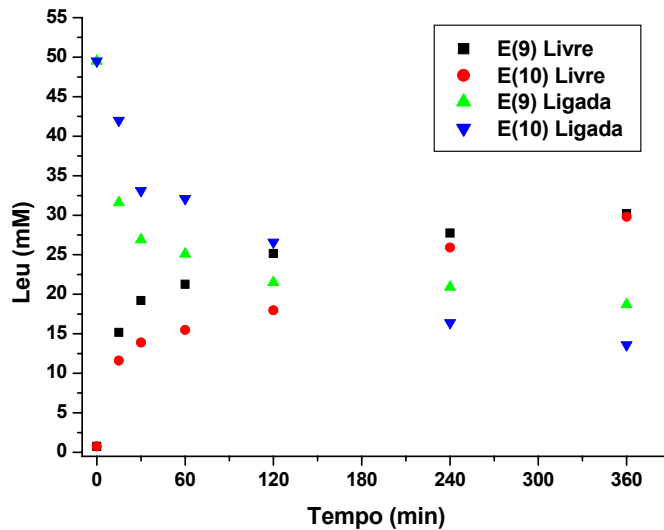
**Figura A3.6:** Coeficiente de rejeição (Re) da Leu livre dos ensaios (9) e (10), ajustados a uma equação de decaimento exponencial de Segundo ordem.

**Tabela A3.2:** Constantes do ajuste do Re da Leu dos ensaios (9) e (10)

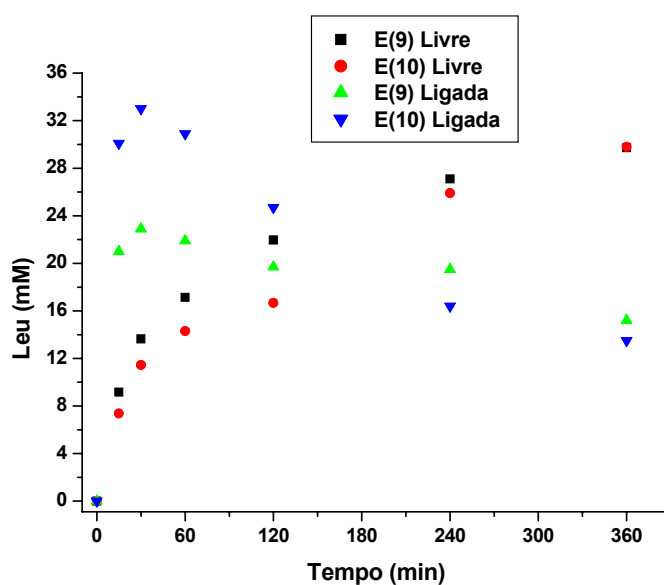
Constantes	Ensaio (9)	Ensaio (10)
$Y_0$	-0,00769	-0,11586
$A_1$	0,32839	0,194
$A_2$	0,26152	0,55699
$X_1$	120,82016	640,60701
$X_2$	16,89056	20,02723



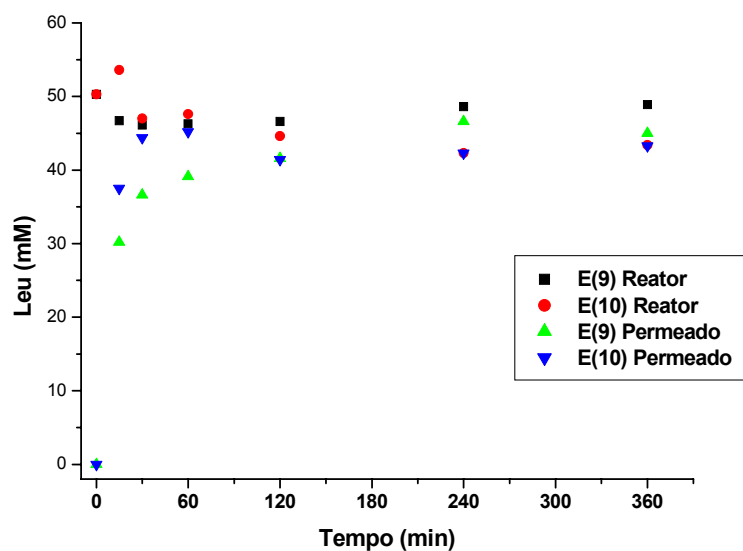
**Figura A3.7:** Coeficiente de rejeição (Re) da Leu total dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



**Figura A3.8:** Concentração de Leu livre e ligada no reator dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.

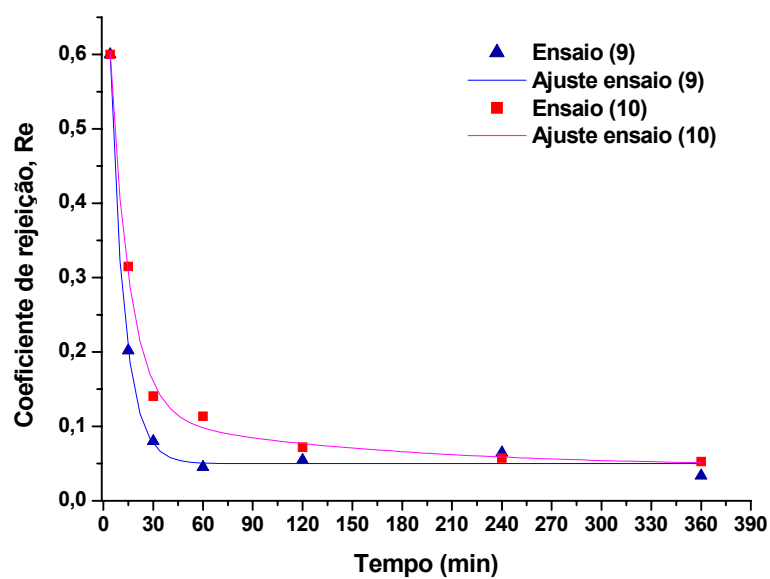


**Figura A3.9:** Concentração de Leu livre e ligada no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



**Figura A3.10:** Concentração de Leu total no reator e permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.

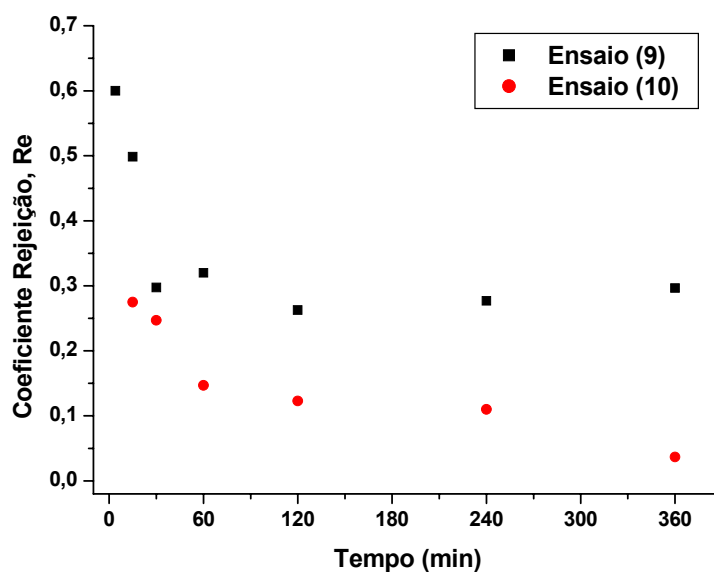
Os resultados da comparação dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de placa plana para Isoleucina (Ileu) serão apresentadas a seguir:



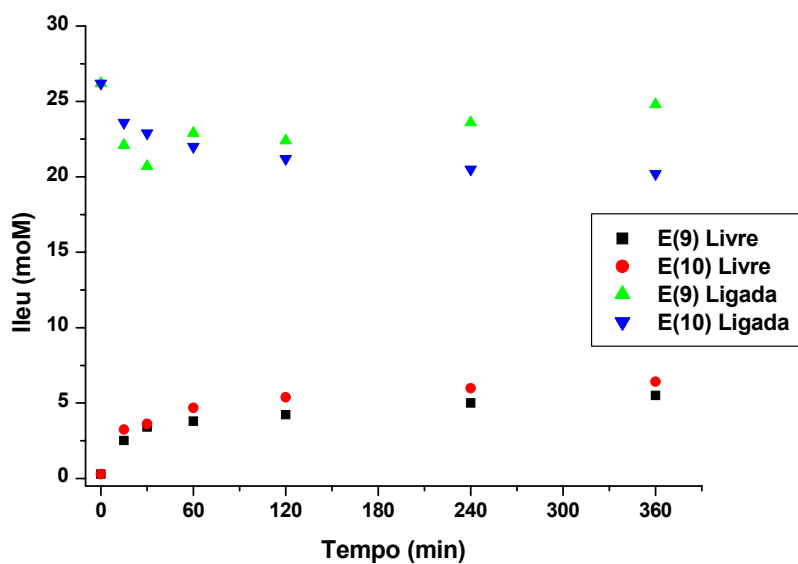
**Figura A3.11:** Coeficiente de rejeição ( $Re$ ) da Ileu livre dos ensaios (9) e (10), ajustados a uma equação de decaimento exponencial de segundo ordem.

**Tabela A3.3:** Constantes do ajuste do  $Re$  da Ileu dos ensaios (9) e (10)

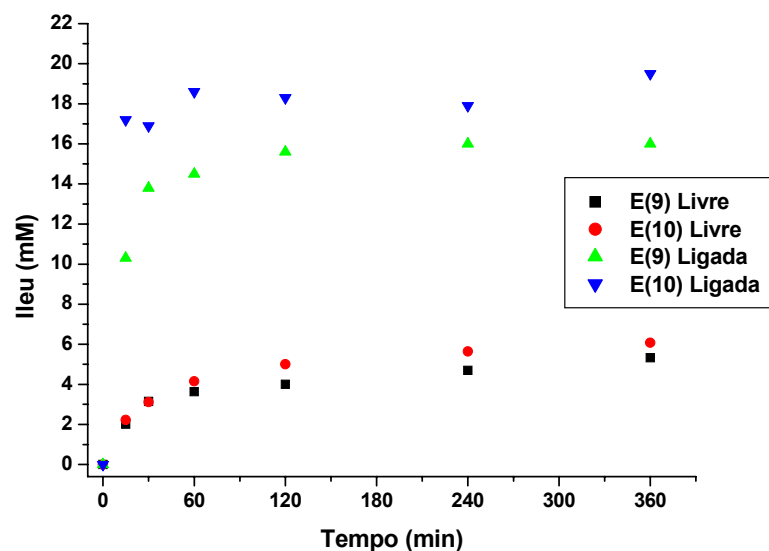
Constantes	Ensaio (9)	Ensaio (10)
$Y_0$	0,04982	0,04536
$A_1$	0,43756	0,07378
$A_2$	0,43756	0,67926
$X_1$	8,95139	141,01564
$X_2$	8,27493	11,89389



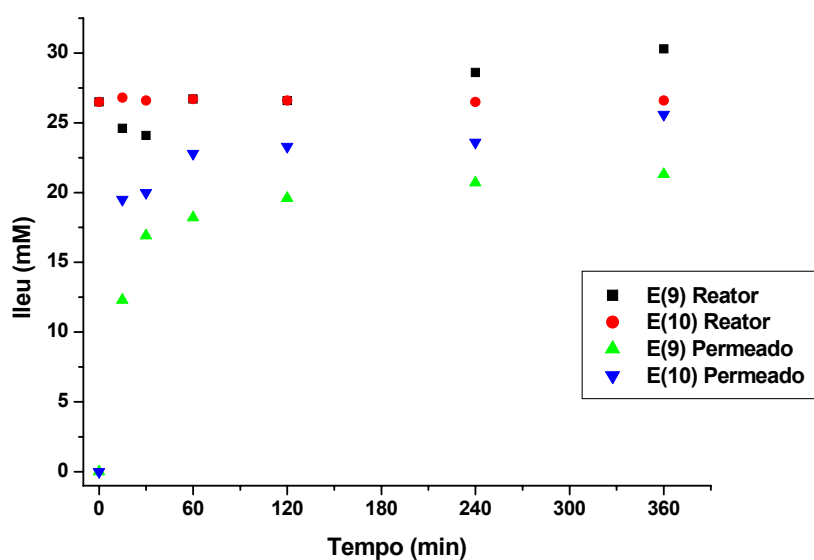
**Figura A3.12:** Coeficiente de rejeição (Re) da Ileu total dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



**Figura A3.13:** Concentração de Ileu livre e ligada no reator dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.

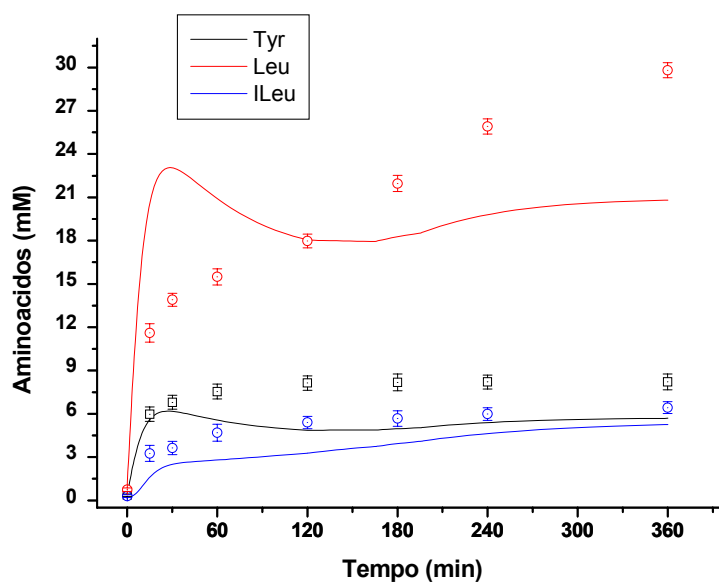


**Figura A3.14:** Concentração de Ileu livre e ligada no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



**Figura A3.15:** Concentração de Ileu total no reator e no permeado dos ensaios (9) e (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*.



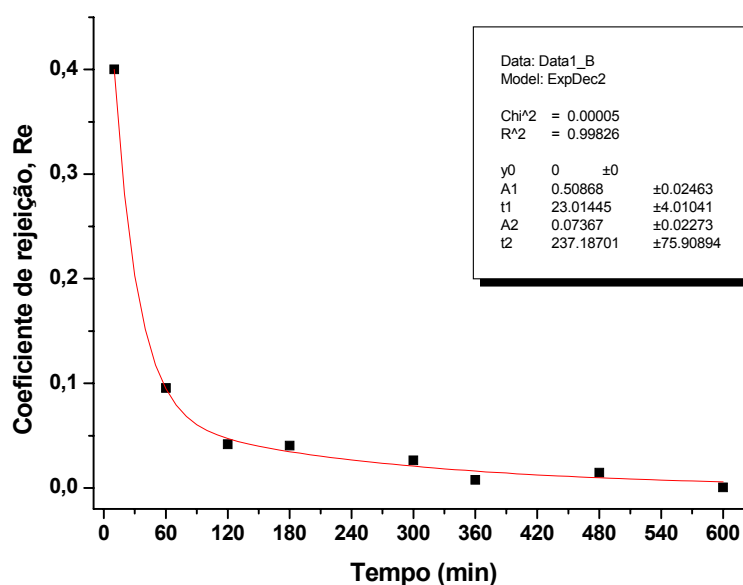


**Figura A3.16:** Concentração de aminoácidos livre do modelo predito (linhas) e dados experimentais (símbolos) do ensaio (10) da hidrólise com CPA no REM de *placa plana*. As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicatas.

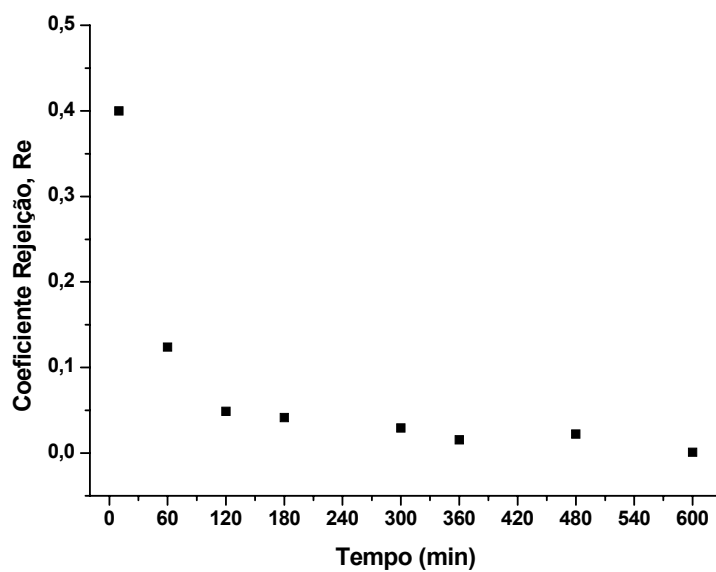
## ANEXO IV

**Hidrólise com Carboxipeptidase A no Reator Enzimático com Membrana de Fibra Oca**

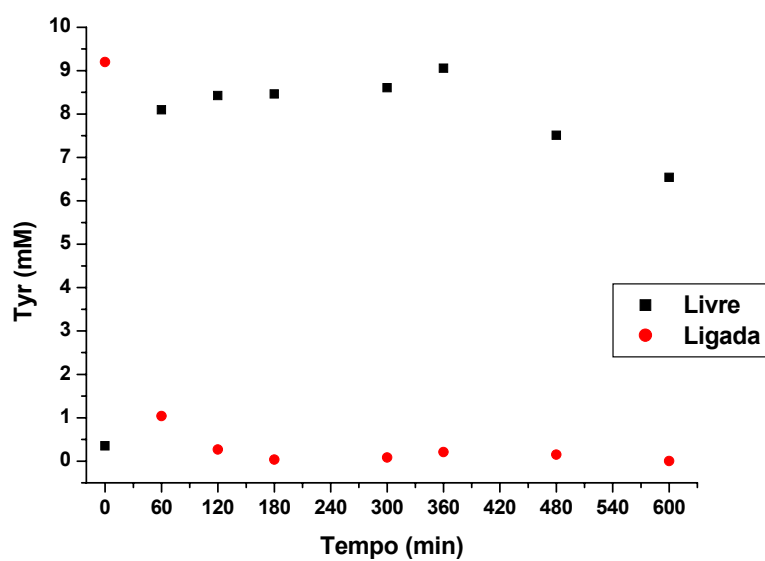
No presente anexo são apresentados os gráficos dos aminoácidos tirosina (Tyr), leucina (Leu) e isoleucina (Ileu) resultantes do ensaio (11) da hidrólise seqüencial com quimotripsina e carboxipeptidase A (CPA) realizado no reator de membrana com *fibra oca* (1 kDa, polisulfona, 52 cm<sup>2</sup>).



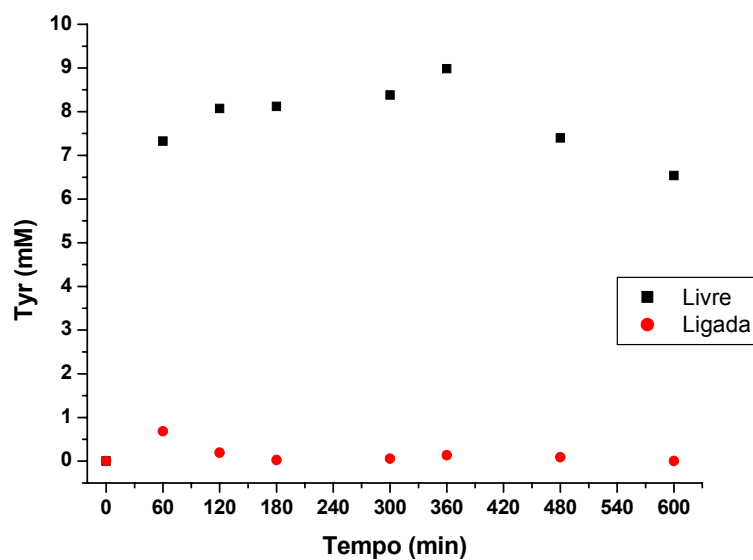
**Figura A4.1:** Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr livre do ensaio (11), ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem.



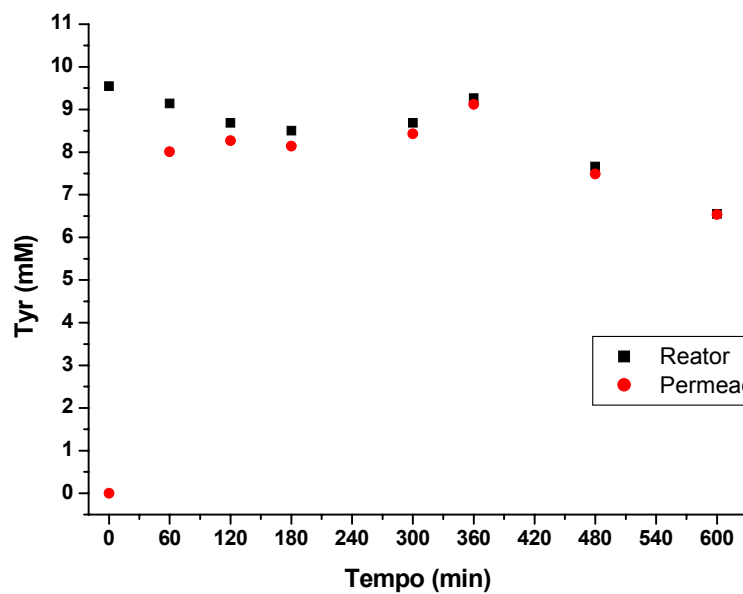
**Figura A4.2:** Coeficiente de rejeição (Re) da Tyr Total do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.



**Figura A4.3:** Concentração de Tyr livre e ligada no reator do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

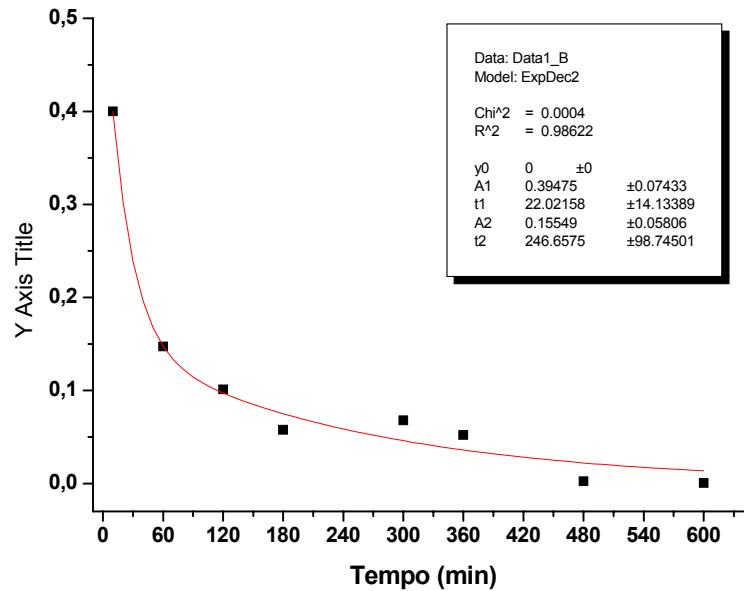


**Figura A4.4:** Concentração de Tyr livre e ligada no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

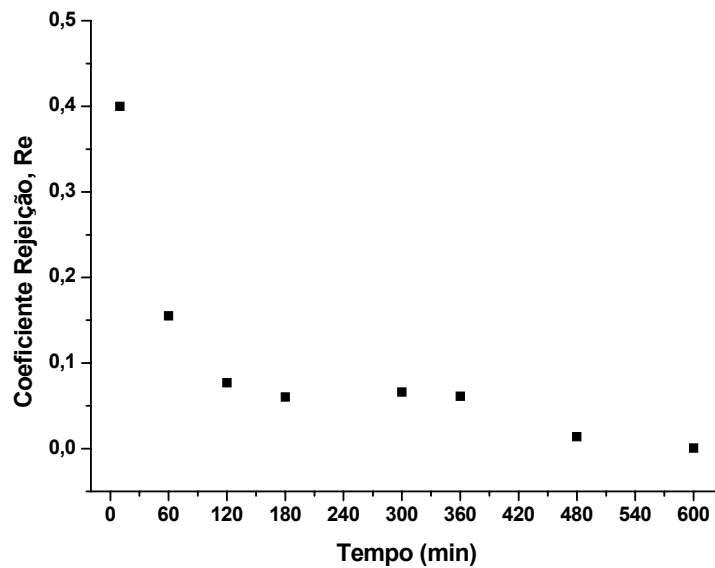


**Figura A4.5:** Concentração de Tyr total no reator e no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

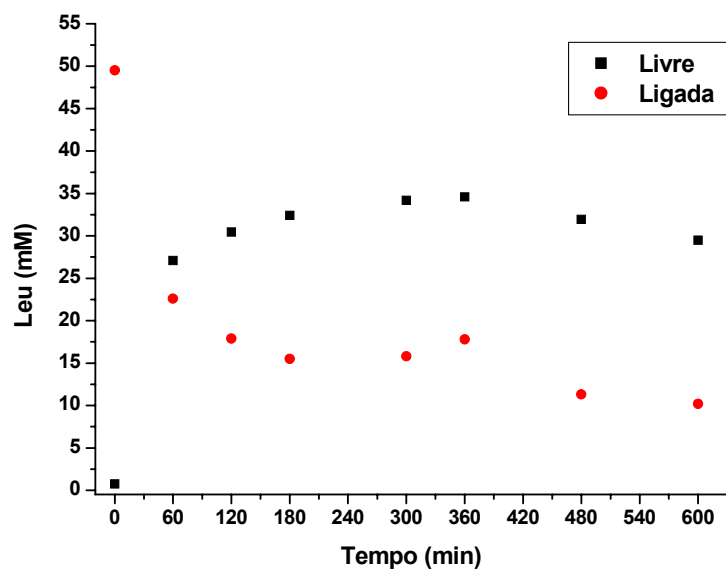
Os gráficos da isoleucina (Leu) na hidrólise com CPA no REM de *fibra oca* são apresentadas a seguir:



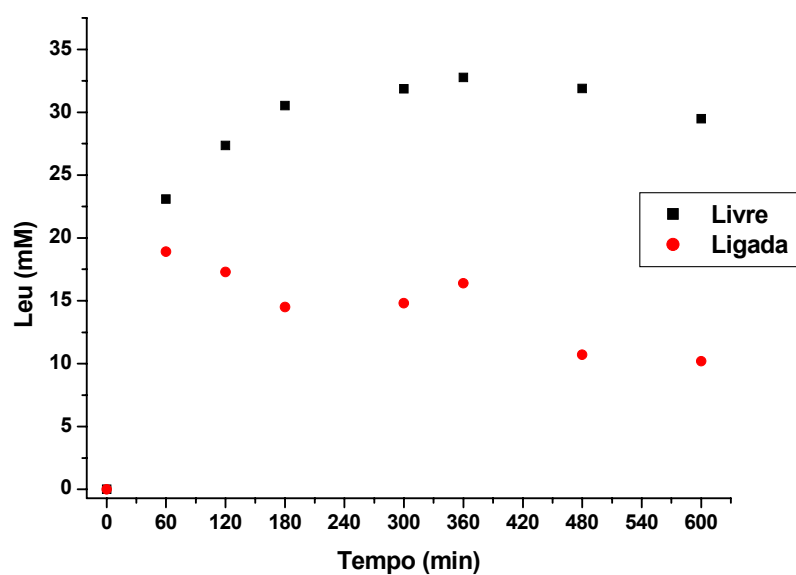
**Figura A4.6:** Coeficiente de rejeição (Re) da Leu livre do ensaio (11), ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem.



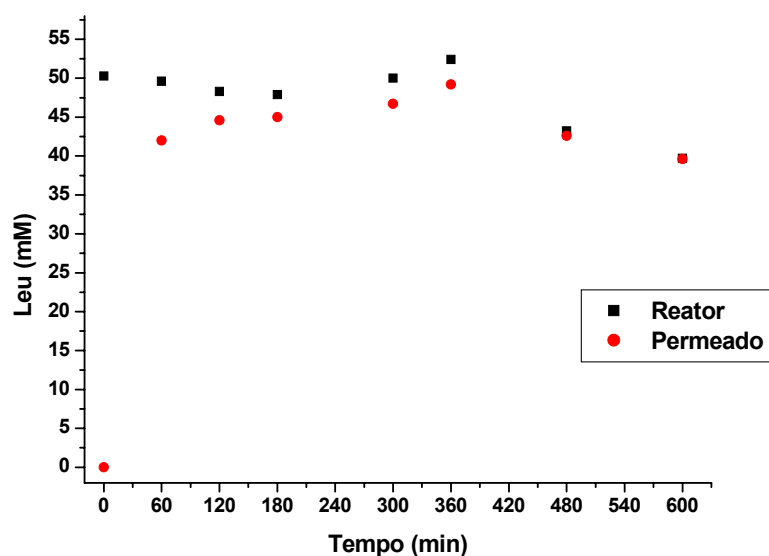
**Figura A4.7:** Coeficiente de rejeição (Re) da Leu total do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.



**Figura A4.8:** Concentração de Leu livre e ligada no reator do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

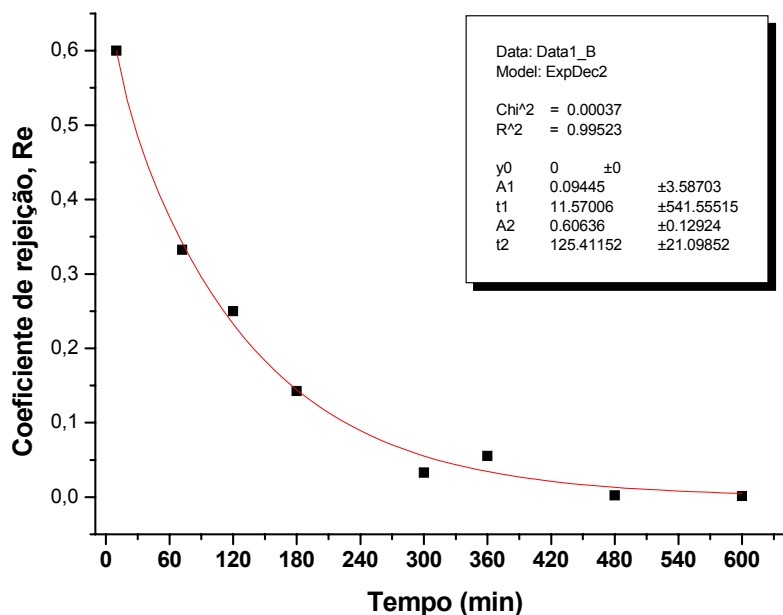


**Figura A4.9:** Concentração de Leu livre e ligada no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

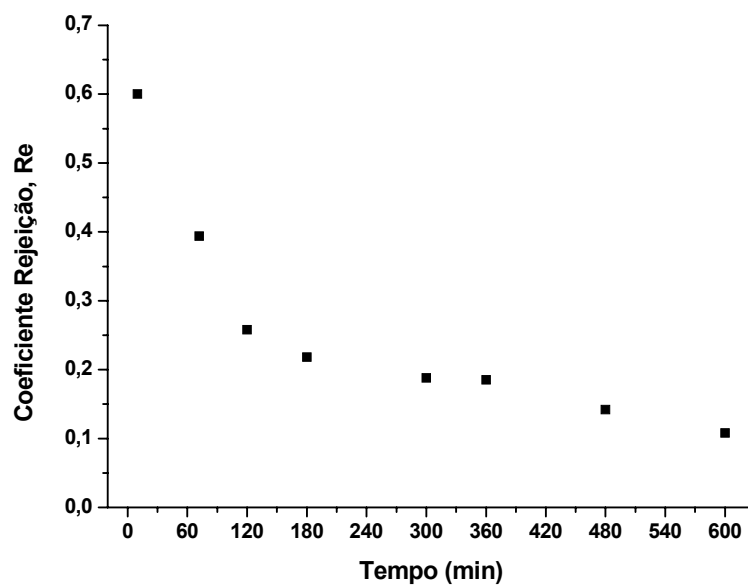


**Figura A4.10:** Concentração de Leu total no reator e no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

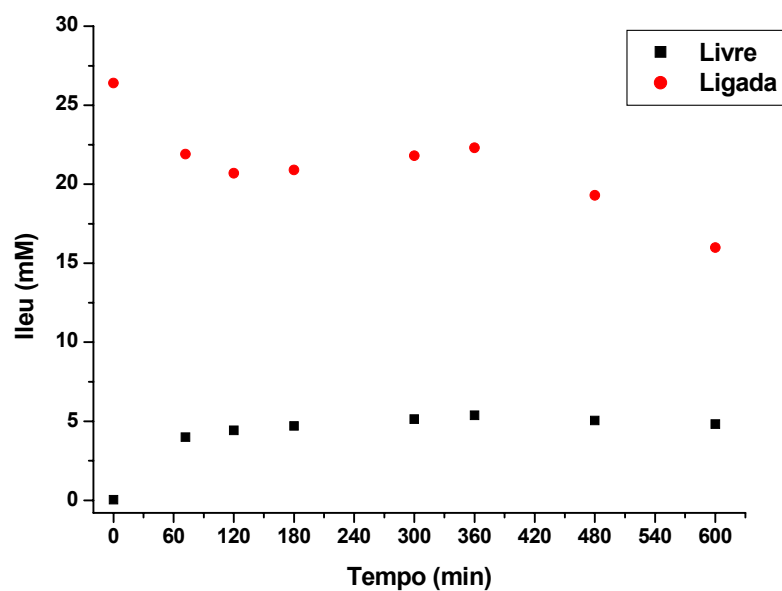
Os gráficos da isoleucina (Ileu) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca* são apresentadas a seguir:



**Figura A4.11:** Coeficiente de rejeição (Re) da Ileu livre do ensaio (11), ajustado a uma equação de decaimento exponencial de segunda ordem.

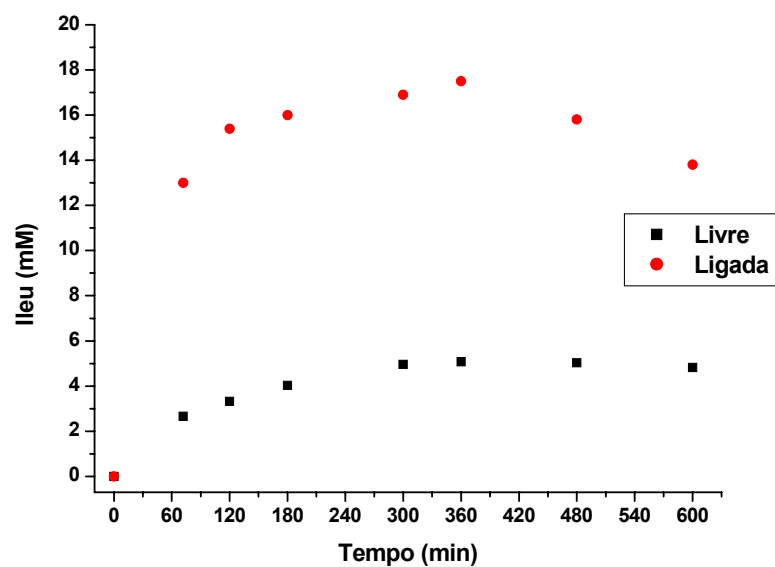


**Figura A4.12:** Coeficiente de rejeição (Re) da Ilea total do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

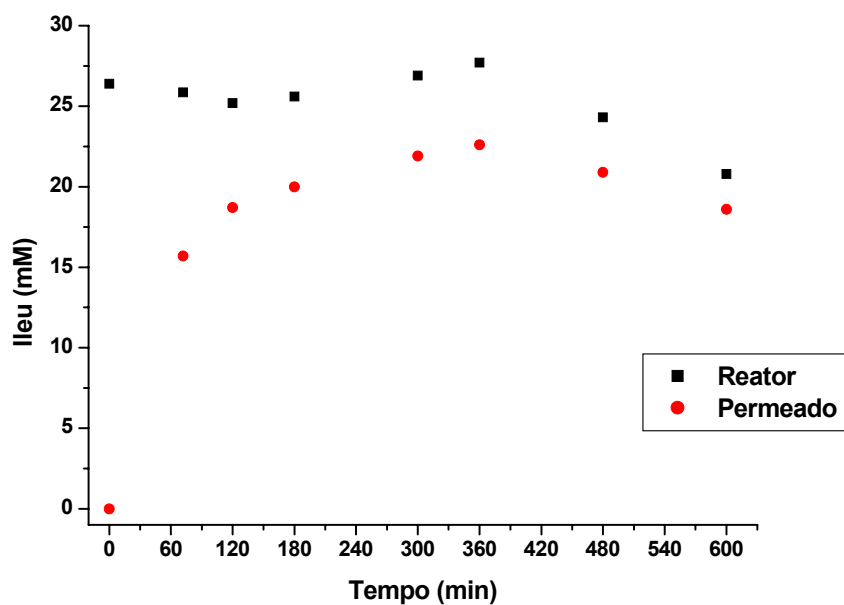


**Figura A4.13:** Concentração de Ilea livre e ligada no reator do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.

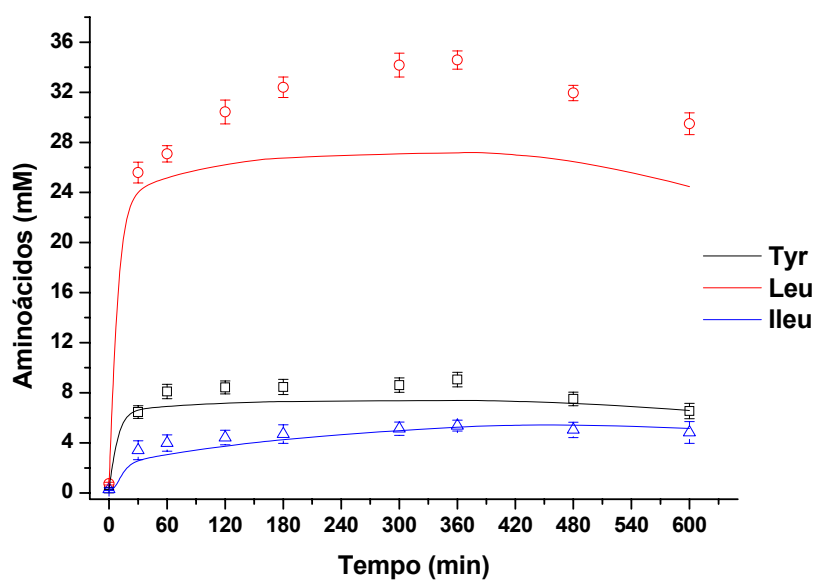




**Figura A4.14:** Concentração de Ileu livre e ligada no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.



**Figura A4.15:** Concentração de Ileu total no reator e no permeado do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*.



**Figura A4.16:** Concentração de aminoácidos livres do modelo predito (linhas) e dados experimentais (símbolos) do ensaio (11) da hidrólise com CPA no REM de *fibra oca*. As barras de erro representam o desvio padrão de medidas em triplicatas.