

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

**BIOREFINARIA DE SORO DE QUEIJO:  
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E SISTEMAS APLICADA À  
TRANSFORMAÇÃO DE UM RESÍDUO POLUENTE  
EM PRODUTOS COM VALOR AGREGADO**

**Gilson Alexandre Pinto**

SÃO CARLOS – SP  
2008

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

**BIOREFINARIA DE SORO DE QUEIJO:  
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E SISTEMAS APLICADA À  
TRANSFORMAÇÃO DE UM RESÍDUO POLUENTE  
EM PRODUTOS COM VALOR AGREGADO**

**Gilson Alexandre Pinto**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à 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  
2008

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

P659bs

Pinto, Gilson Alexandre.

Biorefinaria de soro de queijo: engenharia de bioprocessos e sistemas aplicada à transformação de um resíduo poluente em produtos com valor agregado / Gilson Alexandre Pinto. -- São Carlos : UFSCar, 2008.  
246 f.

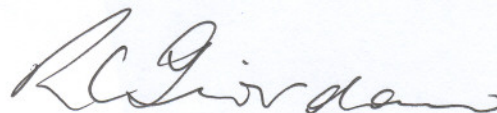
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Engenharia de produção. 2. Modelagem computacional e simulação. 3. Cinética enzimática. 4. Enzimas imobilizadas. 5. Soro de queijo. I. Título.

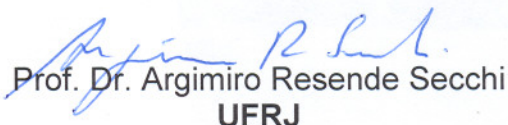
CDD: 660 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **GILSON ALEXANDRE PINTO**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 17 DE OUTUBRO DE 2008.

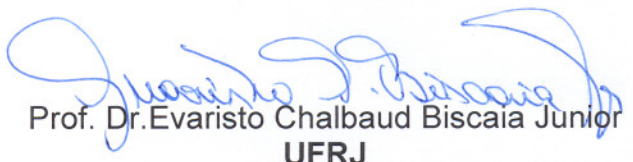
BANCA EXAMINADORA:



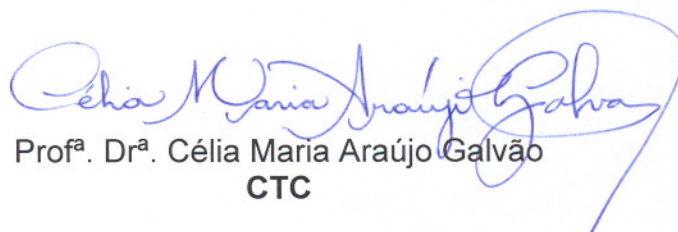
Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano  
**Presidente, PPG-EQ/UFSCar**



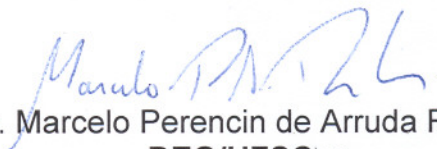
Prof. Dr. Argimiro Resende Secchi  
**UFRJ**



Prof. Dr. Evaristo Chalbaud Biscaia Junior  
**UFRJ**



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



Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro  
**DEQ/UFSCar**

“A fé e a razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de O conhecer a Ele, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio”.

Sumo Pontífice João Paulo II  
(trecho extraído da Carta Encíclica *Fides et Ratio*)

***Dedico este trabalho aos meus pais  
e minhas irmãs.***

## Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao professor Roberto de Campos Giordano, referência pessoal e profissional. Pela sua orientação, amizade, generosidade e paciência.

À professora Raquel de Lima Camargo Giordano pela orientação, críticas e desafios que muito contribuíram para os resultados obtidos neste trabalho.

À Dra. Célia Galvão pelas importantes sugestões e observações durante os ensaios de hidrólise enzimática. Agradeço à Rebeca pelo trabalho em conjunto, confiança e paciência na obtenção de grande parte dos dados experimentais aqui apresentados.

Aos amigos da área de simulação Charles, Edson, Marcelo e Thiago pelo excelente ambiente de trabalho e valorosas discussões.

Aos amigos do DEQ: Tonin, Geísa, Juliana, Renata, Marquinho, Dasciana, Wellington e Oldair pela amizade e ótimos momentos.

À Priscila, que esteve presente em grande parte desta minha conquista.

Aos demais colegas, pesquisadores e técnicos do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos, Laboratório de Desenvolvimento de Processos Enzimáticos e demais laboratórios do DEQ/UFSCar pela ajuda e momentos de descontração.

Aos colegas da Chemtech (Marcela e Luiz Antônio) e da Petrobras (Zanin e Lincoln) por compreenderem quando os estudos exigiam minha ausência do trabalho.

À Vanessa, minha namorada: você, sem dúvida, foi a grande “fã” deste trabalho! Muito obrigado por sempre se fazer presente (de todas as maneiras que lhe eram possíveis). Seu amor, carinho e incentivo foram e são fundamentais, *vitais!*

Aos meus pais João e Nice, irmãs Ariane, Elisângela e Geysa, e cunhados, pelo carinho e apoio incondicional.

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

## Resumo

O contínuo avanço no processamento computacional vem proporcionando nos últimos anos o desenvolvimento e aplicação de ferramentas cada vez mais elaboradas de análise e simulação de processos. O uso consistente dessas ferramentas demanda, entre outras competências, a capacidade de interação com uma hierarquia de sistemas pré-definida pela engenharia de processos. Por outro lado, é imprescindível, nesse contexto, validar os cálculos matemáticos com dados reais de processo.

Esta tese propõe um ambiente integrado, utilizando a Internet como plataforma de desenvolvimento, para simulação, monitoramento, controle e otimização do processo de refino do soro de queijo, utilizando enzimas imobilizadas em suporte inerte como catalisadores. O processo de refino aqui apresentado, dentro do escopo de uma planta multipropósito denominada *biorefinaria de soro de queijo*, disponibiliza como produtos, além da lactose, concentrados e hidrolisados protéicos com aplicação vasta em formulações alimentícias e farmacêuticas. Assim, agrega-se valor a um importante resíduo da indústria queijeira, altamente poluente se descartado *in natura* no meio ambiente.

Paralelamente, aspectos relevantes das reações enzimáticas envolvidas na biorefinaria do soro de queijo foram aprofundados. O agrupamento de moléculas de substrato em pseudocomponentes, utilizando-se um enfoque híbrido fenomenológico-neuronal para descrição da complexa cinética de despolimerização enzimática, é a proposta para o acompanhamento dinâmico dos processos ocorrendo na biorefinaria. Durante o procedimento de estimativa paramétrica desses modelos cinéticos, algoritmos globais de busca e diferentes ferramentas de análise estatística pós-ajuste foram implementadas e avaliadas.

O trabalho, assim, se insere em dois dos principais dilemas/desafios do presente milênio: redução do impacto ambiental provocado por resíduos agroindustriais (soro de queijo) e desenvolvimento de processos para produção de alimentos a partir de fontes alternativas (refino do soro). Nesse contexto, com o aplicativo aqui desenvolvido, pequenas e médias empresas interessadas em implementar o processo de beneficiamento do soro de queijo têm acesso a dados para dimensionamento dos equipamentos, estimativa do custo de produção e do retorno de investimento, com base em atualizações em tempo real de preços, custos e taxas de juros pela própria Internet. Com rotinas avançadas de monitoramento e controle agregadas, o ambiente integrado também pode se tornar atrativo para grandes

indústrias de laticínios que tenham várias unidades fisicamente descentralizadas. Nesse caso, cada unidade poderia ser monitorada à distância, por exemplo, por um núcleo central de engenharia (conceito este que pode ser ampliado até níveis globais, com plantas de produção em diferentes países).

Todos os algoritmos de monitoração e controle remotos implementados nesta tese foram validados em ensaios experimentais em escala de laboratório. Da mesma forma, os modelos cinéticos das reações enzimáticas também foram testados, em ensaios independentes de validação. Com base no conjunto de resultados apresentados, pode-se afirmar que ficou demonstrada tanto a robustez do ambiente computacional integrado, como a propriedade dos enfoques utilizados para descrição das reações de proteólise enzimática.



## Abstract

The continuous advances in process computing have provided in recent years several sophisticated tools for process analysis and simulation. The effective use of these tools demands the capability to interface with a pre-existent process system hierarchy. Within this perspective, an important issue is to provide meaningful and useful simulation and optimization applications for complex systems that require integration with data-intensive experimentation.

This study proposes an integrated environment, using Internet as development platform, for simulation, monitoring, control and optimization of a cheese whey refinery, employing immobilized and stabilized enzymes as catalysts. The multipurpose process described here, the *cheese whey biorefinery*, provides, besides lactose, whey protein concentrates and hydrolysates that can be applied in food and pharmaceutical formulae. In these circumstances, it is possible to add value to this significant by-product of the dairy industry, avoiding its disposal *in natura* (what is mostly done by small cheese manufacturers).

In parallel, relevant aspects of the enzymatic reactions within the cheese whey biorefinery were investigated. The lumping of substrate molecules in pseudo-components, using a hybrid phenomenological-neural approach for description of the enzymatic depolymerization kinetics, is the suggestion to follow the complex reaction dynamics in biorefinery. During the estimative of model parameters, global search algorithms and different post-fitting statistical strategies were implemented and evaluated.

The work, thus, is concerned with two of the main dilemmas/challenges of the present millennium: reduction of environmental problems related to the disposal of agro-industrial residues (i.e., cheese whey) and development of processes for food production from alternative sources (whey refinery). The integrated web application here presented may allow small companies to access a remote “engineering centre”, with know-how on plant design, economic evaluation and advanced control/optimization techniques. The idea can also be extended to large dairy companies, providing the remote control of sites of production geographically sparse.

All implemented algorithms for remote process monitoring and control were validated with data from laboratory-scale assays. The validation of the hydrolytic kinetic models followed the same procedure. According to the achieved results, is possible to conclude that

the robustness of the integrated computational environment was demonstrated. The prediction capability of the approaches employed for description of the proteolytic enzymatic reactions was verified, as well.

# Sumário

<b>1 – Introdução</b> .....	1
<b>2 – Hidrólise Enzimática</b> .....	8
2.1 – REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1.1 – ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E CONCEITOS BÁSICOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	9
2.1.1.1 – Imobilização de Enzimas.....	12
2.1.2 – MODELAGEM CINÉTICA DE REAÇÕES PROTEOLÍTICAS.....	13
2.1.2.1 – Tratamento Matemático.....	14
2.1.2.2 – Efeitos de Transporte de Massa na Velocidade Aparente de Reação.....	18
2.1.3 – MODELAGEM HÍBRIDA FENOMENOLÓGICO-NEURONAL PARA REAÇÕES PROTEOLÍTICAS.....	18
2.2 – METODOLOGIA.....	20
2.2.1 – CONCENTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E SEU TEOR DE PROTEÍNAS.....	20
2.2.1.1 – Método de Kjeldahl.....	21
2.2.2 – METODOLOGIAS PARA ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO COM QUIMOTRIPSINA.....	22
2.2.2.1 – Grau de Hidrólise e Concentração Molar de Ligações Hidrolisadas.....	22
2.2.2.2 – Acompanhamento da Distribuição das Massas Molares dos Peptídeos Formados.....	24
2.2.3 – METODOLOGIAS PARA ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO COM CARBOXIPEPTIDASE A.....	25
2.2.3.1 – Análise de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Troca Iônica.....	25
2.2.3.2 – Grau de Hidrólise e Concentração Molar de Ligações Hidrolisadas.....	26
2.2.4 – METODOLOGIA PARA ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO COM ALCALASE®.....	27
2.2.5 – PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE LIGAÇÕES HIDROLISADAS – EQUACIONAMENTO.....	27
2.2.5.1 – Efeitos Difusivos sobre a Cinética da Reação com Quimotripsina Imobilizada em Gel Glioxil-Agarose.....	31
2.2.6 – ENFOQUE HÍBRIDO FENOMENOLÓGICO-NEURONAL.....	33
2.2.7 – OTIMIZAÇÃO NÃO-LINEAR: ALGORITMOS E PARÂMETROS DE SINTONIA.....	34
2.2.7.1 – <i>Simulated Annealing</i> (SA).....	34
2.2.7.2 – Enxame de Partículas (PSO).....	35
2.2.7.3 – Evolução Diferencial (ED).....	35
2.2.8 – ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS – FORMULAÇÃO, RESOLUÇÃO DO PROBLEMA DE AJUSTE NOS CASOS NÃO-LINEARES E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
2.2.8.1 – Cálculos dos intervalos e das regiões de confiança dos parâmetros.....	38
2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44

2.3.1 – PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE LIGAÇÕES HIDROLISADAS DURANTE A PROTEÓLISE COM QUIMOTRIPSINA-GLIOXIL-AGAROSE.....	44
2.3.1.1 – Modelagem Cinética com Derivado de Baixa Carga.....	46
2.3.1.2 – Modelagem com Derivado de Alta Carga – Inclusão dos Efeitos Difusivos Intra-Partícula na Cinética da Reação.....	60
2.3.1.3 – Análise de Desempenho dos Algoritmos de Busca empregados durante a Estimativa Paramétrica.....	74
2.3.2 – MODELAGEM HÍBRIDA FENOMENOLÓGICO-NEURONAL.....	78
2.3.2.1 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição dos Perfis de Aminoácidos Liberados durante Hidrólise com CPA.....	80
2.3.2.2 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição da Distribuição de Massas Molares dos Hidrolisados Formados ao longo da Hidrólise com Quimotripsina.....	84
2.3.2.3 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição da Distribuição de Massas Molares dos Hidrolisados Formados ao longo da Hidrólise com Alcalase®.....	90
2.3.3 – COEFICIENTES DE RENDIMENTO PARA PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE AMINOÁCIDOS LIBERADOS DURANTE A PROTEÓLISE COM CPA-GLIOXIL-AGAROSE.	97
2.3.3.1 – Modelagem da Velocidade Global de Clivagem das Ligações Peptídicas Carboxi-Terminais.....	98
2.3.3.2 – Coeficientes de Rendimento para Predição dos Perfis de Aminoácidos Liberados durante Hidrólise com CPA-Glioxil-Agarose.....	102
2.4 – CONCLUSÕES.....	110
2.4.1 – MODELAGEM DAS LIGAÇÕES HIDROLISADAS EM REAÇÕES PROTEOLÍTICAS.....	110
2.4.2 – ALGORITMOS DE ESTIMAÇÃO PARAMÉTRICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DURANTE MODELAGEM NÃO-LINEAR.....	111
2.4.3 – ACOMPANHAMENTO DETALHADO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES.....	112
<b>3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo.....</b>	<b>113</b>
3.1 – REVISÃO DA LITERATURA.....	116
3.1.1 – SÍNTESE E SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS.....	116
3.1.1.1 – Síntese de Bioprocessos.....	116
3.1.1.2 – Simulação de Bioprocessos.....	117
3.1.2 – ANÁLISE ECONÔMICA DE PROCESSOS.....	118
3.1.2.1 – Estimativa do Investimento de Capital.....	118
3.1.2.2 – Análise de Investimentos.....	120
3.1.3 – TECNOLOGIA JAVA: APRESENTAÇÃO.....	121
3.1.3.1 – J2SE: Applet, JDBC e APIs de Redes.....	122
3.1.3.2 – Servlets, JavaServer Page (JSP) e JavaBeans.....	122
3.2 – PADRÃO DE ARQUITETURA DO AMBIENTE INTEGRADO E <i>SOFTWARES</i> UTILIZADOS..	125
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
3.3.1 – MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA BIOREFINARIA DO SORO DE QUEIJO.....	127

3.3.2 – AMBIENTE INTEGRADO.....	148
3.3.2.1 – Monitoramento e Controle em Tempo Real.....	150
3.3.2.2 – Simulação e Otimização da Biorefinaria.....	153
3.4 – CONCLUSÕES.....	157
<b>4 – Conclusões Gerais.....</b>	<b>158</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>161</b>
<b>Apêndice</b> .....	<b>173</b>
OTIMIZAÇÃO NÃO-LINEAR.....	173
MÉTODOS BASEADOS NO GRADIENTE.....	175
MÉTODOS DIRETOS.....	177
Simulated Annealing (SA) .....	178
Enxame de Partículas (PSO) .....	179
Evolução Diferencial (ED) .....	181
REDES NEURONAIS ARTIFICIAIS.....	185
COMPONENTES DE UM NEURÔNIO.....	186
REDE PERCEPTRONS MULTICAMADAS (MLP) .....	187
<b>Anexo A: Modelagem do Processo de Refino do Soro.....</b>	<b>191</b>
<b>Anexo B: Listagem dos Métodos de Otimização Estocásticos.....</b>	<b>209</b>
<b>Anexo C: Regiões de Confiança Paramétrica.....</b>	<b>219</b>
<b>Anexo D: Perfis Intra-Partícula e Efetividade da Reação.....</b>	<b>228</b>
<b>Anexo E: Pesos das Redes Neurais.....</b>	<b>232</b>

## Lista de Figuras

### 1 – Introdução

Figura 1.1 – Perspectiva temporal da valorização do soro de leite.....	3
Figura 1.2 – Proposta da biorefinaria do soro de queijo.....	4

### 2 – Hidrólise Enzimática

Figura 2.1 – Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por uma enzima proteolítica.....	10
Figura 2.2 – Sistema imobilização-estabilização.....	13
Figura 2.3 – Modelo chave-fechadura.....	15
Figura 2.4 – Hipótese do encaixe induzido de Koshland.....	15
Figura 2.5 – Dispersão dos dados para a curva de calibração.....	24
Figura 2.6 – Diagrama esquemático do modelo híbrido fenomenológico-neuronal.....	33
Figura 2.7 – Fator de Efetividade em função da carga enzimática do suporte glioxil-agarose para a quimotripsina imobilizada.....	45
Figura 2.8 – Velocidades iniciais durante hidrólises das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0.....	47
Figura 2.9 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Integração numérica de $dP/dt = -V_N$ (Equação 2.21).....	48
Figura 2.10 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Integração numérica de $dP/dt = -V_N$ (Equação 2.21).....	49
Figura 2.11 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Integração numérica de $dP/dt = -V_N$ (Equação 2.21).....	50
Figura 2.12 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a).....	51
Figura 2.13 – Evolução da concentração dos componentes, $C_E$ , $C_{EN}$ , $C_{EP}$ , $C_{ENN}$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0.....	52
Figura 2.14 – Análise dos dados experimentais na investigação da ordem da reação.....	54

Figura 2.15 – Regiões de confiança (95 %) para os parâmetros cinéticos do sistema completo de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a) na modelagem com quimotripsina baixa carga.....	57
Figura 2.16 – Sensibilidade das respostas do modelo com relação aos seu parâmetros durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0.....	58
Figura 2.17 – Sensibilidade das respostas do modelo com relação aos seu parâmetros durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0.....	59
Figura 2.18 – Velocidade inicial de reação em função da concentração enzimática de quimotripsina no reator ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0; 10 mL de soro de queijo concentrado ( $50,0 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ).....	61
Figura 2.19 – Velocidades iniciais durante hidrólises das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0.....	62
Figura 2.20 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ e pH 8,0. Integração numérica de $dP/dt = -V_N$ (Equação 2.21).....	63
Figura 2.21 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose a ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) $55^\circ\text{C}$ e pH 8,0. Integração numérica de $dP/dt = -V_N$ (Equação 2.21).....	64
Figura 2.22 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ e pH 8,0. Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a).....	66
Figura 2.23 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ e pH 8,0. Modelo reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com Equação 2.21).....	68
Figura 2.24 – Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ e pH 8,0. Modelo reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com equações 2.15 a 2.20).....	69
Figura 2.25 – Evolução da concentração dos componentes, $C_E$ , $C_{EN}$ , $C_{EP}$ , $C_{ENN}$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0.....	71
Figura 2.26 – Regiões de confiança (95 %) para os parâmetros cinéticos e de transporte de massa do modelo reativo-difusivo (Equações 2.15 a 2.20, 2.24 e 2.25) na modelagem com quimotripsina alta carga.....	73
Figura 2.27 – Ilustração da característica multimodal para o Problema #4.....	76
Figura 2.28 – Análise de desempenho dos algoritmos de busca estocástica <i>Simulated Annealing</i> (SA), Enxame de Partículas (PSO) e Evolução Diferencial (ED).....	77
Figura 2.29 – Exemplo de inconsistência na integração numérica após treinamento de rede MLP.....	79
Figura 2.30 – Esquema do algoritmo de treinamento das redes MLP adotado para os modelos fenomenológico-neuronais.....	80

Figura 2.31 – Cromatograma típico obtido após 10 horas de hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 U_{H-PHE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $45^{\circ}C$ , pH 7,0.....	81
Figura 2.32 – Esquema do modelo híbrido fenomenológico-neuronal empregado na hidrólise com CPA-glioxil-agarose.....	82
Figura 2.33 – Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Phe, Trp e Tyr liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 U_{H-PHE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $45^{\circ}C$ , pH 7,0.....	83
Figura 2.34 – Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Leu, ILeu e Val liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 U_{H-PHE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $45^{\circ}C$ , pH 7,0.....	83
Figura 2.35 – Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Met, Thr, Asn, His e Ala liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 U_{H-PHE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $45^{\circ}C$ , pH 7,0.....	84
Figura 2.36 – Cromatogramas típicos obtidos durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 mg_{quimotripsina} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $55^{\circ}C$ , pH 8,0.....	86
Figura 2.37 – Esquema do modelo híbrido fenomenológico-neuronal empregado na hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose.....	87
Figura 2.38 – Dispersão dos dados de teste nas predições da distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólises das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 mg_{quimotripsina} \cdot g_{gel}^{-1}$ ).....	88
Figura 2.39 – Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 mg_{quimotripsina} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) $55^{\circ}C$ , pH 7,8.....	89
Figura 2.40 – Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 mg_{quimotripsina} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) $55^{\circ}C$ , pH 8,0.....	89
Figura 2.41 – Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 mg_{quimotripsina} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) $55^{\circ}C$ , pH 8,5.....	90
Figura 2.42 – Cromatogramas típicos obtidos durante hidrólise com Alcalase®-glioxil-agarose ( $2,8 U_{BAEE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $40^{\circ}C$ , pH 8,5.....	91
Figura 2.43 – Diagrama esquemático do modelo fenomenológico-neuronal utilizado no monitoramento da hidrólise com a Alcalase®.....	93
Figura 2.44 – Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com Alcalase®-glioxil-agarose ( $2,8 U_{BAEE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ).....	94
Figura 2.45 – Diagrama esquemático do sistema utilizado para partida do reator contínuo de mistura.....	95
Figura 2.46 – Validação da modelagem fenomenológico-neuronal durante partida de reator contínuo de mistura com Alcalase®.....	96
Figura 2.47 – Velocidades iniciais nas hidrólises de ligações peptídicas carboxi-terminais com CPA-glioxil-agarose ( $84 U_{H-PHE} \cdot g_{gel}^{-1}$ ) a $45^{\circ}C$ , pH 7,0.....	99



Figura 2.48 – (a) Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0. (b) Dispersão dos dados. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática no reator de $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ .....	100
Figura 2.49 – (a) Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0. (b) Dispersão dos dados. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ ..	101
Figura 2.50 – Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Phe, Trp e Tyr liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0.....	104
Figura 2.51 – Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Leu, Ileu e Val liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0.....	105
Figura 2.52 – Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Met, Thr, Asn, His e Ala liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0.....	105
Figura 2.53 – (a) Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas, $C_p$ , durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $101 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0; Modelo (—): Integração numérica do sistema de EDOs (equações 2.15a a 2.20a, parâmetros listados na Tabela 2.7). (b) Evolução da concentração molar de Phe; Modelo (—): Coeficientes de Rendimento.....	107
Figura 2.54 – Evolução da concentração molar de Phe no sistema reator com membrana durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $101 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0.....	109
 <b>3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo</b>	
Figura 3.1 – Sistema hierárquico de controle de processos e possibilidades de interação via Internet.....	114
Figura 3.2 – Ilustração da interpretação dos <i>bytecodes</i> pela Máquina Virtual Java.....	122
Figura 3.3 – Modelo de arquitetura em três camadas (padrão MVC).....	125
Figura 3.4 – Fluxograma básico de processo para o refino do soro de queijo.....	127
Figura 3.5 – Polinômios para inferência da concentração enzimática em função do tempo de reação.....	131
Figura 3.6 – Custo operacional do reator R-101 (Alcalase®-glioxil-agarose) em função do tempo de reação..	132
Figura 3.7 – Custo operacional do reator R-102 (quimotripsina-glioxil-agarose) em função do tempo de reação.....	133
Figura 3.8 – Custo operacional do reator R-103 (CPA-glioxil-agarose) em função do tempo de reação.....	133
Figura 3.9 – Esquema da planta multipropósito com variáveis $p_{CPS}$ e $p_{HPS}$ em destaque.....	134
Figura 3.10 – Influência das variáveis $p_{CPS}$ e $p_{HPS}$ no projeto da biorefinaria do soro de queijo.....	136
Figura 3.11 – Valor presente líquido do projeto em função da vazão de soro de queijo à montante da biorefinaria.....	138

Figura 3.12 – Comparação de desempenho entre os métodos estocásticos ED/PSO e o algoritmo SQP.....	140
Figura 3.13 – Comparação do VPL “ótimo” de projeto antes e após a utilização da programação quadrática sucessiva.....	141
Figura 3.14 – Valores determinados por cada método de otimização para as variáveis $p_{CPS}$ (a), $p_{HPS}$ (b) e para os tempos operacionais dos reatores R-101 (c), R-102 (d) e R-103 (e).....	144
Figura 3.15 – Restrições de mercado para o produtos CPS (a), HPS (b) e BTPhe (c) definidas de acordo com equações 3.15 a 3.17.....	146
Figura 3.16 – Impacto econômico da variação de alguns parâmetros no projeto da biorefinaria do soro de queijo.....	148
Figura 3.17 – Paradigmas circulares de processamento Servidor-Processo e Servidor-Cliente empregados na solução do ambiente integrado.....	149
Figura 3.18 – Solução computacional para o ambiente integrado.....	150
Figura 3.19 – Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o monitoramento da distribuição de massas molares dos pseudocomponentes ao longo da hidrólise com Alcalase®-glicoxil-agarose.....	151
Figura 3.20 – Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o monitoramento da distribuição de massas molares dos pseudocomponentes ao longo da hidrólise com quimotripsina-glicoxil-agarose.....	152
Figura 3.21 – Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o monitoramento da concentração molar de Phe liberada ao longo da hidrólise com CPA-glicoxil-agarose em reator de membrana (com retirada do aminoácido) .....	152
Figura 3.22 – Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o controle remoto via Internet do reator para produção de CPS: alteração no <i>set-point</i> do pH reacional.....	153
Figura 3.23 – Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado. Simulação do projeto da biorefinaria do soro de queijo: balanços de massa, dimensionamento, custo fixo e operacional dos principais equipamentos.....	154
Figura 3.24 – Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado. Índices econômicos do processo e impacto de variações em parâmetros operacionais do mesmo. Configuração ótima calculada pela Evolução Diferencial.....	155

## Apêndice

Figura 1 – Listagem do algoritmo <i>Simulated Annealing</i> .....	179
Figura 2 – Evolução do enxame no algoritmo PSO (Medeiros, 2005). (a) Iterações iniciais: investigação de várias regiões do espaço de busca; (b) convergência do método: busca local em torno do ponto mais promissor.....	181

Figura 3 – Listagem do algoritmo PSO.....	181
Figura 4 – O indivíduo no algoritmo genético. Os genes do indivíduo podem ser as próprias variáveis do problema de otimização $x_i$ (codificação “real”) ou sua codificação na forma binária.....	182
Figura 5 – Listagem do Algoritmo Genético.....	183
Figura 6 – Anatomia de um neurônio que transfere a entrada $y_i$ para a saída $y_j$ através de um fator de peso $w_{ji}$ e uma função de transferência $\varphi_j(v_j)$ .....	186
Figura 7 – Arquitetura de uma rede MLP com duas camadas ocultas.....	187
Figura 8 – Ilustração da técnica de parada antecipada associada à validação cruzada.....	189

## Lista de Tabelas

### 1 – Introdução

Tabela 1.1 – Composição média do soro de queijo doce.....	2
Tabela 1.2 – Composição média de aminoácidos totais (livres e ligados) em concentrados protéicos do soro	2

### 2 – Hidrólise Enzimática

Tabela 2.1 – Parâmetros cinéticos e intervalos de confiança para o sistema completo de EDOs.....	55
Tabela 2.2 – Limites superiores e inferiores dos parâmetros cinéticos (restrições da busca não-linear).....	75
Tabela 2.3 – Parâmetros de sintonia utilizados pelos algoritmos de otimização.....	76
Tabela 2.4 – Classificação das redes MLP treinadas para diferentes valores de pH e temperatura na reação com Alcalase®-glioxil-agarose.....	92
Tabela 2.5 – Parâmetros cinéticos ajustados para sistema de EDOs na hidrólise com CPA-glioxil-agarose de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4%.....	102
Tabela 2.6 – Relação entre o rendimento individual de cada aminoácido $Y_i$ e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais.....	103
Tabela 2.7 – Parâmetros cinéticos ajustados para sistema de EDOs na hidrólise com CPA-glioxil-agarose de pré-hidrolisados com quimotripsina 15,3%.....	108

### 3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo

Tabela 3.1 – Cargas fixadas para cada catalisador enzima-glioxil-agarose e grau de hidrólise de projeto (GH).....	130
---	-----

### Apêndice

Tabela 1 – Relação entre a matriz Hessiana, $\nabla_{xx} f(\underline{x}^*)$ , e seus autovalores no ponto estacionário $\underline{x}^*$ .....	175
---	-----

## 1 – Introdução

Neste doutorado, o tema central de estudo foi o desenvolvimento de soluções computacionais para o processo aqui denominado de *refino do soro doce de queijo*. Buscou-se definir e implementar um ambiente integrado, na plataforma Internet, capaz de simular e otimizar uma planta de refino em estado estacionário, além de incorporar algoritmos para controle e monitoramento do processo em tempo real. Simultaneamente, foi aprofundado o conhecimento de aspectos cruciais do processo, particularmente da cinética das reações enzimáticas envolvidas, com auxílio de técnicas de otimização não-linear e de redes neurais artificiais.

Segundo estimativas recentes, produzem-se mundialmente 286.000 toneladas de soro de queijo (também conhecido como soro de leite) por dia. Uma produção em tal escala pode gerar algo em torno de 2,4 milhares de toneladas de proteínas, potencialmente capaz de satisfazer as necessidades protéicas diárias de aproximadamente 35 milhões de pessoas (Torres, 2005).

Do ponto de vista industrial, existem dois tipos de soro de leite: se a remoção da caseína presente no soro é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro é denominado *soro ácido*; se feita pela ação da enzima renina tem-se o *soro doce*, que contém, em geral, maior quantidade de pequenos peptídeos e aminoácidos livres (resultantes da ação da renina sobre as caseínas).

Devido ao seu rico conteúdo nutricional, como atesta a Tabela 1.1, o reaproveitamento do soro de leite bovino vem sendo visto com grande interesse pelas indústrias de alimentos e farmacêutica nas últimas três décadas (Korhonen, 2002; Kim *et al.*, 1987). Por outro lado, o tratamento do soro para descarte como resíduo é altamente oneroso (girando em torno de US\$ 107 por tonelada; [http://www.geafiltration.com/library/quality\\_membrane\\_filtration.asp](http://www.geafiltration.com/library/quality_membrane_filtration.asp)). Esse custo elevado de tratamento se explica pelo seu próprio conteúdo nutricional, responsável por sua alta demanda biológica de oxigênio (aproximadamente  $4 \times 10^4 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ , cerca de duas ordens de grandeza maior que o esgoto doméstico; Siso, 1996).

Com relação à distribuição de proteínas, Kim *et al.*, 1987, apontaram que  $\beta$ -Lactoglobulina representa 49% da composição protéica média do soro em base mássica, seguida pela  $\alpha$ -Lactalbumina (16%), imunoglobulinas (10%) e soro albumina bovina, SAB (5%). Adler-Nissen, 1986, apresentou a distribuição média dos aminoácidos presentes nos concentrados protéicos do soro de queijo mostrada na Tabela 1.2.

**Tabela 1.1:** Composição média do soro de queijo doce (Galvão, 2004).

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Sólidos totais	66
Proteína total	6,57
Nitrogênio não protéico	0,37
Lactose	52,3
Gordura	0,2
Minerais	5,0
Cálcio	0,5
Fosfato	1,0
Sódio	0,53

**Tabela 1.2:** Composição média de aminoácidos totais (livres e ligados) em concentrados protéicos do soro (Adler-Nissen, 1986).

	<b>Gramas de aminoácidos livres e ligados por 100 g de proteína</b>
<b><i>Resíduos ácidos</i></b>	
Asp/Asn	12,30
Glu/Gln	20,41
<b><i>Resíduos hidrofóbicos volumosos</i></b>	
Val	6,42
Leu	14,01
Ileu	6,92
Phe	3,82
Tyr	3,50
Trp	2,60
Pro	5,18
<b><i>Resíduos contendo enxofre</i></b>	
Met	2,64
Cys	2,51
<b><i>Resíduos básicos</i></b>	
Lys	11,20
Arg	3,01
His	2,05
<b><i>Resíduos neutros pequenos</i></b>	
Gly	1,92
Ala	6,11
Ser	4,76
Thr	6,18

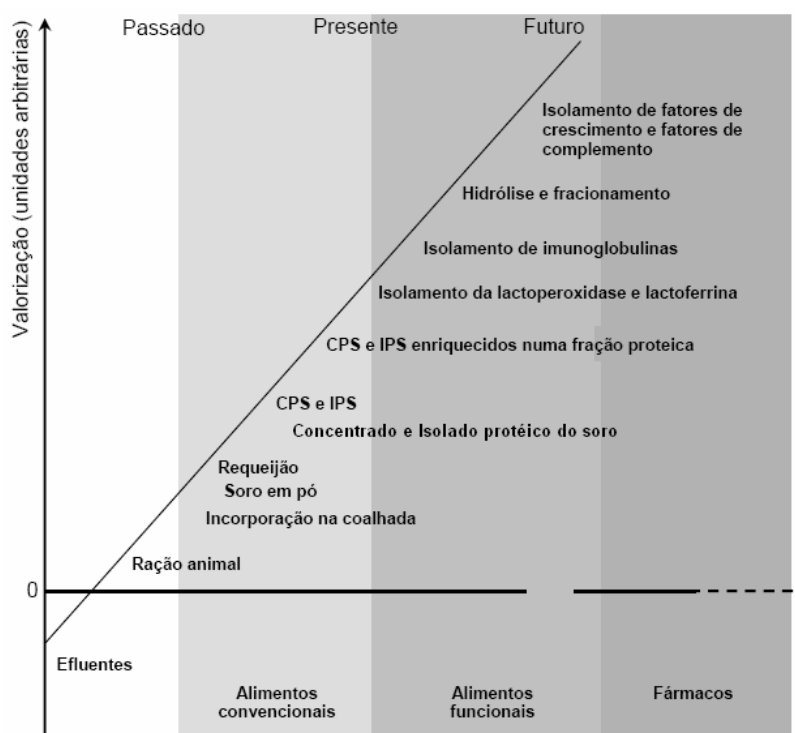
O Brasil não dispõe atualmente de estatísticas oficiais de produção consolidada de queijo, em razão da configuração do mercado produtor, onde há centenas de microlaticínios que atuam regionalmente e muitas vezes fora do âmbito do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura (SIF). Os dados de produção em geral se referem tão somente aos estabelecimentos registrados no SIF/DIPOA do Ministério da Agricultura (Divisão de

Inspeção de Produtos de Origem Animal), que representam, conforme projeções feitas por especialistas, apenas 60% do mercado produtor nacional (<http://www.abiq.com.br>).

Segundo Siso, 1996, para a fabricação de um quilo de queijo necessitam-se em média 10 litros de leite e, dependendo da quantidade de água utilizada na fabricação, recuperam-se de 9 a 12 litros de soro. Estima-se dessa forma a geração no Brasil de aproximadamente 7,4 milhões de toneladas de soro de queijo em 2007 (<http://www.abiq.com.br>). O estudo de técnicas para reaproveitamento desse importante resíduo da indústria queijeira é, portanto, amplamente justificável no âmbito nacional.

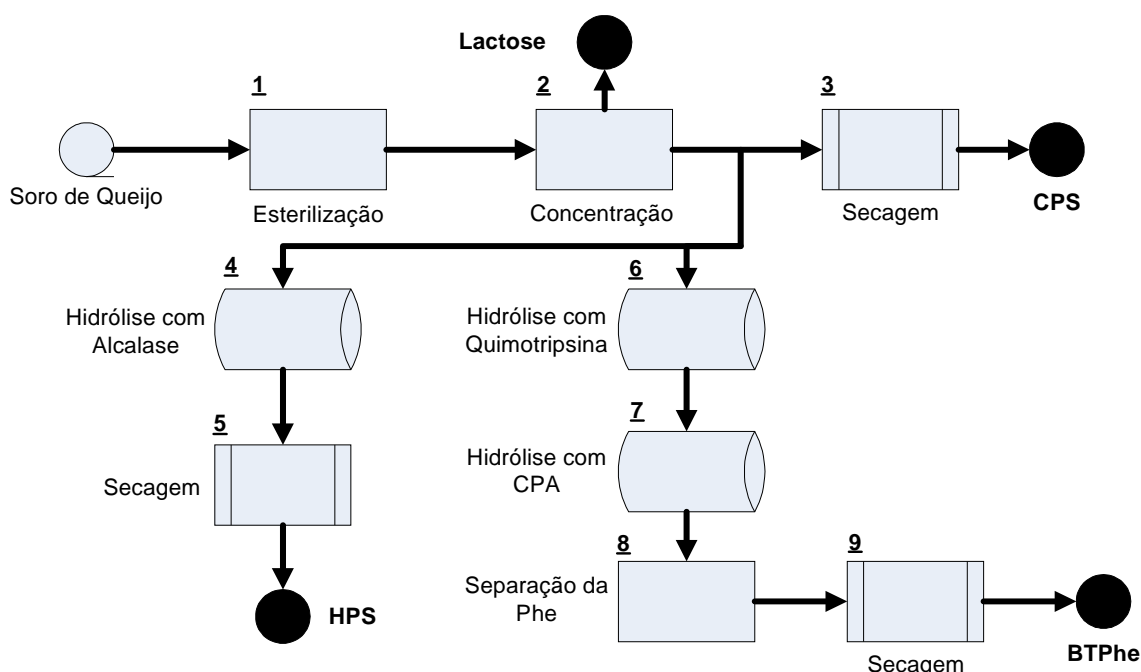
Nas três últimas décadas, foram desenvolvidos vários processos que permitem a obtenção de produtos com alto teor de proteínas nativas a partir do soro, preservando suas propriedades intrínsecas: os concentrados e os isolados de proteínas do soro. Os processos desenvolvidos empregam essencialmente sistemas com membranas semipermeáveis, nos quais a separação dos componentes do soro é baseada no tamanho molecular dos compostos. A produção dos ingredientes protéicos combina, basicamente, três processos com membranas, a saber: osmose reversa, ultrafiltração e microfiltração. Cromatografia de troca iônica é usada na produção de isolados de proteínas do soro; nesse caso, a separação se baseia na carga eletrostática e no caráter anfotérico das proteínas (Huffman e Harper, 1999).

Em uma perspectiva temporal, as aplicações para o soro de queijo podem ser vislumbradas no esquema da Figura 1.1:



**Figura 1.1:** Perspectiva temporal da valorização do soro de leite (Torres, 2005).

Há alguns anos o emprego racional do soro doce de queijo na forma de complementos protéicos produzidos a partir de hidrólises enzimáticas controladas vem sendo objeto de estudo nos Laboratórios para Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio, coordenado pelo Prof. Roberto C. Giordano) e de Engenharia dos Processos Enzimáticos (LaBenz, coordenado pela Profa. Raquel L. C. Giordano), ambos pertencentes ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar). A proposta da planta multipropósito apresentada em forma de diagrama de blocos na Figura 1.2 é, de certa forma, o compêndio dos vários estudos desenvolvidos ao longo dos últimos anos nesses laboratórios (Silva, 2000; Resende, 2002; Sousa, 2003; Tardioli, 2003; Galvão, 2004; Vieira, 2004; Padilla, 2007; Adriano, 2008).



**Figura 1.2:** Proposta da biorefinaria do soro de queijo.

No diagrama da Figura 1.2, soro *in natura* é micro- (etapa 1) e ultrafiltrado (etapa 2), sendo aí separada a lactose. A lactose refinada, obtida do permeado da ultrafiltração, pode ser utilizada na indústria farmacêutica: confere compressibilidade, lubrificação e firmeza na confecção de comprimidos, no revestimento de pílulas; pode ser substrato em cultivos microbianos, inclusive como indutor da produção de proteínas recombinantes; e tem amplo uso na fabricação de cosméticos, entre outras aplicações. Na indústria de processos químicos e bioquímicos, tem emprego na produção de ácido lático, ácido cítrico, corantes e espumas de poliuretano; e na indústria alimentícia (Atra *et al.*, 2005). A hidrólise da lactose com a enzima



$\beta$ -galactosidase permite, por exemplo, a obtenção de derivados lácteos para pessoas intolerantes à lactose (Gekas e Lopez-Leiva, 1995).

O retentado da ultrafiltração tem seus solutos constituídos por aproximadamente 85% de proteína (p/p) e 15% de lactose (p/p), além de minerais e vitaminas (Galvão, 2004). Após a secagem do retentado (etapa 3), um concentrado protéico é obtido (CPS, Concentrado Protéico do Soro). CPSs são usualmente empregados como ingredientes para fins farmacêuticos, médicos e alimentares tais como alimentação infantil, bebidas e complemento para a dieta de desportistas. Peters, 2005, estudou a viabilidade econômica da produção de CPS para plantas norte-americanas de pequeno (processamento de 100 toneladas de leite por dia) e grande porte (2700 toneladas de leite por dia). A produção de CPS mostrou-se promissora para indústrias de pequeno porte, enquanto apenas um rendimento marginal foi estimado para grandes indústrias queijeiras norte-americanas.

As proteínas do soro concentrado podem ser submetidas a hidrólises controladas com auxílio de enzimas imobilizadas e estabilizadas (Galvão, 2004; Tardioli, 2003). Utilizando a protease Alcalase® (etapa 4), obtém-se um hidrolisado protéico contendo uma mistura de aminoácidos e majoritariamente pequenos peptídeos (HPS, Hidrolisado Protéico do Soro). HPSs têm grande importância no tratamento de pacientes com distúrbios estomacais ou problemas na mucosa intestinal, bem como em lactentes desnutridos, muitas vezes com quadro alérgico. Nesses casos, deve-se ressaltar que as dietas não devem ser constituídas apenas por aminoácidos livres, pois, assim tornar-se-iam hiperosmóticas, provocando secreção intestinal e diarreia. Conhecimentos atuais do mecanismo de absorção intestinal indicam que os di- e tripeptídeos são mais facilmente absorvidos que os aminoácidos livres. Outros fatos já amplamente conhecidos relacionam-se a problemas de alergenicidade, devido à presença no hidrolisado protéico de proteínas e peptídeos de massa molecular elevada, e ao sabor amargo produzido durante a hidrólise, associado aos aminoácidos livres com resíduos hidrofóbicos (Clemente, 2000; Schmidt e Poll, 1991).

Com a enzima quimotripsina (etapa 6), é possível disponibilizar peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos em sua porção carboxi-terminal (Barber e Fisher, 1972); em seguida, a enzima carboxipeptidase A (CPA, etapa 7) pode remover os sobreditos aminoácidos. Com subsequente separação desses e secagem do produto (etapas 8 e 9), tem-se o produto final: BTPhe (Baixos Teores de Fenilalanina), um hidrolisado contendo pequenos peptídeos, livre ou com baixos teores de fenilalanina, que pode ser usado na dieta de pacientes com fenilcetonúria (PKU, da sigla em inglês, usualmente utilizada). Trata-se de uma das mais nobres aplicações dos hidrolisados das proteínas do soro: uma dieta com baixo teor de

fenilalanina (Phe) pode efetivamente ser usada para controlar a ingestão desse aminoácido, proporcionando às crianças portadoras de PKU bom crescimento e desenvolvimento além de evitar problemas neurológicos (Clemente, 2000; Mahmoud, 1994). O tratamento dietético para portadores de PKU é caro e atualmente os produtos específicos disponíveis no mercado são adquiridos apenas via importação. São constituídos por misturas de aminoácidos, cujo sabor desagradável tem de ser atenuado de alguma forma, utilizando açúcares e flavorizantes para esse fim.

Ora, o diagrama esboçado na Figura 1.2 é conceitualmente análogo ao hoje utilizado no processo de refino de petróleo, isto é, o emprego de uma série de etapas operacionais objetivando a separação de produtos em frações de composição com maior aplicação comercial e, por conseguinte, maior valor agregado. Mais especificamente, o termo **biorefinaria de soro de queijo** foi utilizado para descrição do processo em estudo. O conceito de biorefinaria, já de uso corrente na literatura para denominar um complexo industrial gerador de combustíveis renováveis, energia elétrica e outros materiais, a partir de biomassa/lignocelulose (Yang, 2007; Ohara, 2003), foi aqui ampliado para definir a planta multipropósito de recuperação da lactose e produção de hidrolisados de composição controlada a partir da despolimerização das proteínas presentes no principal resíduo da indústria queijeira – soro de queijo – em uma “rota verde”, que reduz significativamente impactos ambientais, com o auxílio de enzimas imobilizadas-estabilizadas em suporte inerte.

Quanto à apresentação da presente tese, devido à diversidade de temas abordados, optou-se por organizá-la em quatro capítulos: **1 – Introdução**, **2 – Hidrólise Enzimática**, **3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo** e **4 – Conclusões Gerais**.

A proposta de modelagem dinâmica para as três reações proteolíticas envolvidas na biorefinaria do soro de queijo é apresentada no capítulo **2 – Hidrólise Enzimática**. Apresenta-se uma revisão dos temas pertinentes à modelagem cinética com enzimas imobilizadas, a metodologia experimental empregada, os resultados obtidos e conclusões parciais.

O capítulo **3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo** apresenta um ambiente integrado para simulação e otimização estacionária da biorefinaria do soro e para o monitoramento e controle em tempo real dos reatores, utilizando a Internet como plataforma. Com base nos resultados obtidos no capítulo anterior, é também disponibilizada análise econômica da planta multipropósito em diferentes condições operacionais. Além da apresentação e discussão dos resultados, uma revisão dos principais temas envolvidos, a metodologia utilizada e conclusões específicas complementam o capítulo.

No apêndice desta tese fez-se uma descrição sucinta de aspectos relevantes da otimização não-linear e de redes neuronais artificiais, dois temas utilizados no decorrer dos estudos e comuns a ambos os capítulos de resultados.

## 2 – Hidrólise Enzimática

Modelos cinéticos são ferramentas importantes durante a análise e desenvolvimento de processos químicos e bioquímicos. A investigação do mecanismo catalítico e de possíveis efeitos inibidores da reação são apenas algumas das motivações encontradas durante a elaboração do modelo cinético (Maria, 2004). Particularmente nas reações enzimáticas, com o crescente interesse nas duas últimas décadas em se operar os reatores no modo contínuo ou semi-contínuo, modelos precisos são considerados estratégicos para o projeto do reator e na busca por pontos de operação que acarretem maior produtividade do processo (Vasic-Racki *et al.*, 2003).

A modelagem matemática da cinética enzimática pode ser classificada como fenomenológica (pertencente ou não ao tipo Michaelis-Menten), puramente empírica, ou semi-empírica (Baş *et al.*, 2007a; Schulz, 1994). Nas reações proteolíticas, todavia, a elaboração de modelos puramente fenomenológicos é ainda restrita: o elevado número de ligações peptídicas rompidas no curso da reação define um limiar natural para a estimativa de parâmetros puramente mecanísticos. Se o modelo é muito complexo do ponto de vista de seus numerosos parâmetros, perde-se em confiabilidade estatística; por outro lado, modelos demasiadamente simples ficam limitados a uma estreita faixa de validade (Márquez e Vasquez, 1999).

Os diversos casos tipicamente encontrados durante a modelagem de reações proteolíticas permeiam o presente capítulo. Diante da dificuldade em se modelar a dinâmica de um substrato complexo e multicomponente como o soro de queijo, a adoção de pseudocomponentes parece ser uma alternativa bastante razoável. Mesmo sob tal simplificação, a definição dos parâmetros cinéticos dos modelos da velocidade de reação – sejam eles fenomenológicos ou empíricos – requer o emprego de técnicas eficientes de regressão não-linear. De outra parte, toda análise e validação da modelagem proposta devem ser feitas com critérios estatísticos (Van Boekel, 1996).

Quanto à organização do capítulo, o mesmo traz uma revisão da literatura sobre a modelagem cinética de reações com enzimas imobilizadas (2.1), descreve as metodologias adotadas durante os ensaios experimentais e o desenvolvimento dos modelos cinéticos (2.2), apresenta e discute os resultados obtidos (2.3) e, por fim, apresenta conclusões parciais (2.4).

## 2.1 – REVISÃO DA LITERATURA

O refino do soro de queijo só se tornará um projeto viável do ponto de vista econômico se catalisadores adequados forem utilizados nos reatores enzimáticos. As enzimas devem ser estáveis nas condições operacionais das reações. Se imobilizadas, simplificam sobremaneira as operações unitárias requeridas a jusante do reator. A subseção **2.1.1** traz uma revisão das enzimas envolvidas no decorrer do estudo e de alguns conceitos básicos envolvidos na imobilização dessas.

Para a modelagem cinética das reações proteolíticas, é comum o agrupamento das proteínas e peptídeos em um único pseudo-substrato denominado *ligações hidrolisáveis*. Apesar de se tratar de uma abstração, esse recurso é útil para fins de modelagem em reações macromoleculares, e essencial para projeto, controle e otimização dos reatores enzimáticos contemplados na biorefinaria. A subseção **2.1.2**, intitulada “Modelagem Cinética de Reações Proteolíticas”, apresenta uma revisão sobre as metodologias e hipóteses observadas durante a modelagem cinética dessas reações.

Para o acompanhamento detalhado do produto reacional, informação indispensável na formulação de produtos alimentícios e fármacos, modelos híbridos fenomenológico-neuronais foram desenvolvidos. A subseção **2.1.3** discute brevemente o tema e sua motivação no bojo da quantificação da hidrólise enzimática.

### 2.1.1 – ENZIMAS PROTEOLÍTICAS E CONCEITOS BÁSICOS DE IMOBILIZAÇÃO

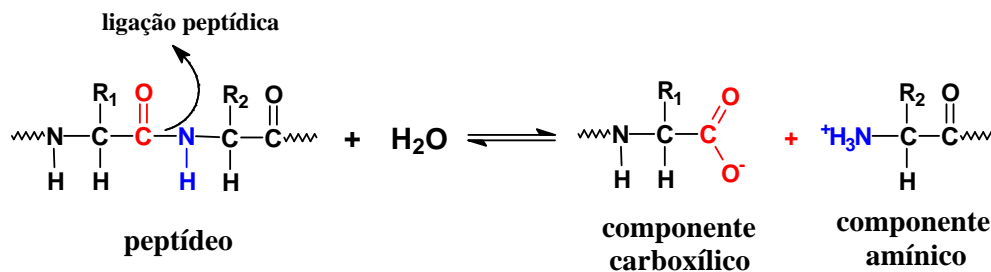
No projeto da biorefinaria de soro de queijo, as reações enzimáticas constituem as etapas cruciais do processo: são as enzimas proteolíticas que promovem as alterações necessárias nas proteínas e peptídeos do soro para o seu reaproveitamento efetivo como produtos alimentícios e funcionais. Por outro lado, a imobilização possibilita o reuso da enzima e reduz custos operacionais, facilitando sua separação do produto reacional, simplificando as operações unitárias a jusante do reator enzimático e permitindo a operação do mesmo em modo contínuo. Ainda, a estabilização da enzima imobilizada faculto o uso de temperaturas mais altas no bioreator, evitando sua contaminação e aumentando a velocidade da reação (produtividade).

As enzimas proteolíticas, produzidas por bactérias, plantas e animais, constituem um grupo grande e complexo de enzimas, as quais diferem entre si por sua especificidade pelo

substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, e estabilidade quanto à temperatura e ao pH (Stryer, 1992).

Integrantes desse grupo, a pepsina, tripsina, quimotripsina e as carboxipeptidases e aminopeptidases são responsáveis, no trato digestivo, pela hidrólise de proteínas ingeridas. Além disso, são de grande importância também no processamento industrial de alimentos, sendo usadas, por exemplo, na produção de queijos e amaciamento de carnes (Whitaker, 1994).

A reação comumente catalisada por esse grupo de enzimas é a hidrólise de ligações peptídicas de uma proteína (Figura 2.1), mas também hidrolisam ligações éster (-COOR), tiol-éster (-COSR) e amina (-NH<sub>2</sub>). Podem também, eventualmente, catalisar as reações reversas, funcionando como transferases.



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

A natureza dos grupos R<sub>1</sub> ou R<sub>2</sub> é o fator diferenciador das enzimas proteolíticas. Por exemplo, quimotripsina hidrolisa rapidamente ligações peptídicas quando o grupo R<sub>1</sub> for um resíduo de tirosina, fenilalanina ou triptofano. Tripsina será ativa quando o grupo R<sub>1</sub> for um resíduo de lisina ou arginina. Por outro lado, pepsina e carboxipeptidase A têm especificidades baseadas na natureza do grupo R<sub>2</sub>. Ambas hidrolisam ligações peptídicas a uma velocidade máxima se o grupo R<sub>2</sub> for um resíduo hidrofóbico, em particular, fenilalanina. A diferença entre as duas é que para a carboxipeptidase A o resíduo deverá ser carboxi-terminal. (Whitaker, 1994).

Com base na posição da ligação peptídica que hidrolisam, as enzimas proteolíticas são divididas em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases (por exemplo, tripsina e quimotripsina) hidrolisam ligações peptídicas no interior da proteína, enquanto as exopeptidases (por exemplo, carboxipeptidases e aminopeptidases) hidrolisam ligações peptídicas carboxi- ou amino-terminais (Whitaker, 1994). As enzimas proteolíticas são ainda

subdivididas em quatro grupos, com base em seu mecanismo catalítico: serina-proteases, tiol ou cisteínas proteases, metalo-proteases e carboxil-proteases ou proteases ácidas.

A seguir apresenta-se uma breve descrição de cada enzima proteolítica utilizada no decorrer deste estudo.

### ***Alcalase®***

A Alcalase® é uma preparação enzimática comercial, produzida pela Novozymes, usada em formulações de detergentes para remover manchas à base de proteínas, como por exemplo, sangue e vários alimentos (ovos, molhos, etc.). A enzima Alcalase® converte as proteínas presentes nas manchas em peptídeos que são facilmente dissolvidos ou dispersos no líquido de lavagem.

Segundo a Novozymes, a Alcalase®, classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), é uma serina-protease, massa molecular de aproximadamente 27 kDa, caracterizada pelo seu excelente desempenho a altas temperaturas e moderada alcalinidade, e é produzida por fermentação submersa de um microorganismo não patogênico do gênero *Bacillus*. A preparação enzimática comercial é disponível na forma granular e líquida. Enzimas granuladas são tratadas com tiosulfato de sódio, quando na forma líquida, e revestidas com sulfato de sódio após granulação. As enzimas líquidas encontram-se diluídas em um meio composto por monopropilenoglicol ou glicerol (Enzyme Business, 1994).

Embora a Alcalase® seja amplamente utilizada, sua especificidade ainda não foi totalmente caracterizada. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico, podendo ser utilizada eficientemente na produção de um preparado contendo pequenos peptídeos a partir das proteínas do soro, por exemplo (Adler-Nissen, 1986).

### ***Quimotripsina***

A quimotripsina (EC 3.4.21.1) é uma protease sintetizada no pâncreas de todas as espécies superiores na forma inativa de quimotripsinogênio e apresenta massa molecular de aproximadamente 25 kDa. Essa 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, embora também catalise a síntese de peptídeos, esterificação de aminoácidos e síntese de hidrazidas (Sanchez, 1995).

### ***Carboxipeptidase A (CPA)***

A carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase com massa molar de aproximadamente 34,5 kDa pertencente à classe das metalo-proteases, pois possui um íon zinco fortemente ligado cujo papel é fundamental para 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 CPA remove rapidamente os aminoácidos aromáticos carboxi-terminais Tyr, Phe e Trp, mas também e com menor velocidade os aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos volumosos, tais como Leu, Ileu, Met, Thr, Gln, His, Ala e Val (Barber e Fisher, 1972). Além desses, a CPA também remove lentamente Asn, Ser, Lys, Gly, Asp e Glu (Tardioli, 2003).

#### **2.1.1.1 – Imobilização de Enzimas**

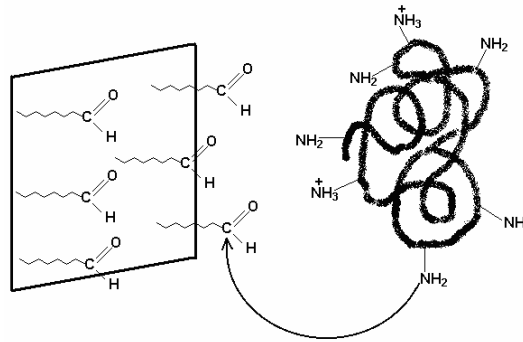
Discussões amplas sobre os conceitos de imobilização e técnicas utilizadas neste trabalho podem ser encontradas em Galvão, 2004, para o derivado quimotripsina-glioxil-agarose; e Tardioli, 2003, para os derivados Alcalase®- e CPA-glioxil-agarose.

A ligação da enzima em suportes pode ser feita por absorção ou ligação química (iônica, covalente ou metálica). Na ligação covalente, o suporte ativado liga-se quimicamente a grupos funcionais específicos da enzima, dependendo dos grupos ativos disponíveis no suporte (ligante).

Métodos de ativação, preferencialmente realizada no suporte, têm por objetivo introduzir grupos reativos na superfície do suporte capazes de se ligarem aos grupos reativos da enzima. As ativações mais usuais são feitas com brometo de cianogênio, reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos (glicidol, por exemplo).

A ativação do suporte com grupos aldeídos, usando glicidol (2,3-epoxi-propanol) como reagente bifuncional, vem sendo amplamente usada nas últimas duas décadas. Uma das grandes vantagens em se utilizar suportes ativado com grupos glioxil na imobilização de enzimas é que as ligações enzima-suporte (amino-aldeído) provocam uma mínima distorção da estrutura tridimensional da proteína. Por conseguinte, é possível preparar derivados muito mais ativos (Guisán, 1988). A Figura 2.2 apresenta o sistema imobilização-estabilização proposto por Guisán *et al.*, 1993.





**Figura 2.2:** Sistema imobilização-estabilização (Guisán *et al.*, 1993).

Quanto ao suporte dos catalisadores aqui empregados – gel de agarose – esse compõe parte do ágar, um polímero natural obtido a partir de algas vermelhas e constituído por duas frações: agarose e agarpectina. Suas características não dependem unicamente das algas utilizadas, mas também da época da coleta, do local e do método de extração (Painter, 1985). A agarose é formada pela repetição de aproximadamente 400 unidades de agarobiose, atingindo massa molar em torno de 120 kDa.

Dentre as principais vantagens de se utilizar os géis de agarose, pode-se destacar: estabilidade mecânica; grande área superficial; dimensão dos poros superior à de outros géis; resistência à degradação microbiana; transparência ótica tanto na região do ultravioleta quanto no visível (o que viabiliza a quantificação da atividade enzimática por espectrofotometria); fácil ativação e atoxicidade. Porém, algumas desvantagens também podem ser associadas ao 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 (justificando a pesquisa em suportes alternativos e viáveis economicamente; Adriano, 2008).

Mateo *et al.*, 2006, trazem uma ampla discussão sobre os derivados de glioxil-agarose. Os autores reafirmam a eficácia desse suporte em prover catalisadores altamente estáveis na imobilização de proteases e apontam algumas questões ainda em aberto para o seu uso em escala industrial.

### 2.1.2 – MODELAGEM CINÉTICA DE REAÇÕES PROTEOLÍTICAS

Modelos que quantificam a velocidade enzimática de proteólise devem, necessariamente, estar embasados em abordagens simplificadas. O grande número de ligações peptídicas rompidas durante a hidrólise enzimática da maioria das moléculas poliméricas representa uma limitação natural à possibilidade de estimativa de parâmetros cinéticos

derivados puramente de modelos fenomenológicos – um problema geral no estabelecimento de modelos cinéticos para a hidrólise de substratos macromoleculares com etapas de despolimerização (Chen *et al.*, 2007; Gallifuoco *et al.*, 2004; Silvestre, 1997). Além disso, um modelo muito complexo dificilmente apresentará confiabilidade estatística satisfatória a partir de simples ensaios cinéticos, que não medem, por exemplo, concentrações de espécies intermediárias. Tipicamente, a correlação entre seus (numerosos) parâmetros será alta.

O tratamento matemático do problema exposto é geralmente contornado utilizando técnicas de agrupamento de moléculas (do inglês, *lumping*) em um único pseudo-substrato: “ligações hidrolisáveis” e em um pseudoproduto, “ligações hidrolisadas”. As concentrações desses pseudocomponentes são obtidas a partir da medição do grau de hidrólise (Adler-Nissen, 1986).

A modelagem cinética apurada das “ligações hidrolisáveis”, cuja expressão de velocidade comumente utiliza relações empíricas ou equações do tipo Michaelis-Menten, é fundamental no projeto do reator enzimático e no desenvolvimento de estratégias para controle e otimização do mesmo (Márquez e Vázquez, 1999; Margot *et al.*, 1997; GonzálezTello *et al.*, 1994).

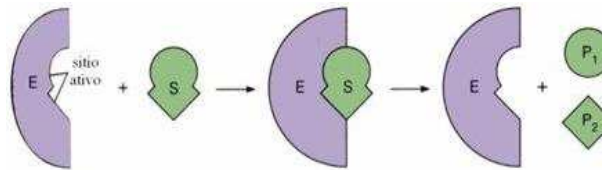
### 2.1.2.1 – Tratamento Matemático

Entende-se por cinética enzimática a quantificação, em alguma forma funcional, dos efeitos relevantes para definir a velocidade da reação catalítica. Concentração de enzima, de substrato(s), de co-fatores e de inibidor(es), temperatura, pH, força iônica são alguns fatores que influenciam a cinética enzimática intrínseca. Por outro lado, na presença de efeitos de transporte de massa no filme externo ao biocatalisador, a velocidade de agitação (em reatores agitados) ou de escoamento (em reatores de leito fixo) pode ser um parâmetro importante para a cinética aparente de reação.

Enzimas são catalisadores biológicos (biomoléculas) que reduzem seletivamente as energias de ativação das reações químicas vitais. Energia de ativação se contextualiza aqui como a energia mínima necessária para que uma molécula de substrato (reagente) *S* alcance o estado de transição *SP* e se torne o produto *P*. Tipicamente, uma reação catalisada por enzima pode se processar, a 25°C,  $10^8$  a  $10^{11}$  vezes mais rapidamente que a mesma reação não catalisada.

O alto grau de seletividade/especificidade das enzimas originou a hipótese “*templete*” ou da analogia “chave-fechadura” (Fischer, 1894 *apud* Schulz, 1994). O modelo, Figura 2.3,

considera que a enzima possui uma região chamada **sítio ativo**, a qual é complementar em tamanho, forma e natureza química à molécula de substrato.



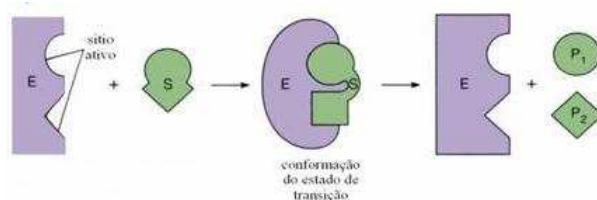
**Figura 2.3:** Modelo chave-fechadura (<http://www.ciagri.usp.br/~luagalho/Enzimas2.htm>).

Embasado no modelo chave-fechadura, Brown, 1902, *apud* Schulz, 1994, propôs o mecanismo apresentado na Equação 2.1 para uma reação catalisada com enzimas (uma só enzima e um só substrato):



Sendo:  $E$  – a enzima;  $S$  – o substrato;  $ES$  – o complexo de transição enzima-substrato;  $P$  – o produto da reação;  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  – os parâmetros cinéticos da reação.

Posteriormente, Koshland, 1958, propôs a teoria do encaixe induzido. A teoria sugere que, quando formado o complexo enzima-substrato, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage, como ilustra a Figura 2.4. Essa mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico.



**Figura 2.4:** Hipótese do encaixe induzido de Koshland

(<http://www.ciagri.usp.br/~luagalho/Enzimas2.htm>).

O mecanismo no qual se baseou o modelo de Michaelis-Menten foi proposto por Brown e teve sua formulação feita através de um brilhante tratamento matemático dado por Henri, real autor da equação freqüentemente atribuída a Michaelis e Menten, que

reconheceram que seus propósitos foram apenas fornecer evidência experimental ao modelo matemático formulado por Henri (Schulz, 1994).

O tratamento matemático que se apresenta a seguir foi dado por Briggs e Haldane (Schulz, 1994), que ao formularem a **hipótese de estado pseudo-estacionário** para o complexo  $ES$ , permitiram que fosse obtida uma derivação mais geral da equação. A formulação de Henri, que utiliza a hipótese de equilíbrio rápido da primeira etapa (a etapa controladora seria a segunda, a decomposição do complexo  $ES$ , vide Equação 2.1), só torna a equação aplicável a sistemas onde a velocidade de decomposição do complexo na direção do produto seja muito menor que a decomposição do complexo para regenerar  $E + S$  ( $k_2 \ll k_{-1}$ ). Outras hipóteses de Briggs-Haldane são: concentração de enzima “*muito menor*” que a concentração de substrato e decomposição do complexo  $ES$  em  $E + P$  irreversível (Bailey e Ollis, 1977). Obtém-se, assim, uma expressão matemática analítica para a variação da velocidade da reação com a concentração de substrato. A curva que representa essa equação tem a mesma forma geral para a grande maioria das enzimas (hipérbole retangular) e pode ser expressa algebricamente pela Equação de Michaelis-Menten (Equação 2.2):

$$r = \frac{k_2 \cdot C_{E_0} \cdot C_S}{K_M + C_S} \quad (2.2)$$

Sendo:  $r$  – a velocidade de consumo de substrato;  $C_{E_0}$  – a concentração inicial de enzima;  $C_S$  – a concentração de substrato;  $K_M$  – a constante de Michaelis-Menten  $\left( K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right)$ .

Em alguns casos ainda são observados efeitos inibitórios, quando estão presentes agentes que interferem na reação, reduzindo sua velocidade. Exemplos típicos de inibidores enzimáticos são: a inibição competitiva pelo produto, a incompetitiva, a não-competitiva e a inibição pelo produto e substrato simultaneamente (inibição mista). Para esses casos, expressões para a velocidade de reação de forma funcional semelhante à de Michaelis-Menten podem ser obtidas a partir do enfoque de Briggs-Haldane (Schulz, 1994).

O vasto emprego da Equação 2.2 na modelagem enzimática em muito se deve à independência temporal entre  $r$  e  $C_S$ , o que permite, via método das “velocidades iniciais” e técnicas de regressão linear, a estimativa dos parâmetros  $k_2$  e  $K_M$  (Segel, 1975). Entretanto, a falta de critérios claros na literatura especializada para a faixa de aplicabilidade da Equação 2.2 pode conduzir a estimativas de parâmetros imprecisas para reações enzimáticas que ocorrem fora da faixa onde as considerações para a derivação da expressão de Michaelis-

Menten são válidas (Tzafriri e Edelman, 2007; Ritchie e Prvan, 1996). Os autores Asprey e Naka, 1999 e Buzzi-Ferraris, 1999, ainda argumentam que, quando técnicas de parametrização e de regressão linear são necessárias para o ajuste, interpretações errôneas nos valores nominais dos parâmetros podem ocorrer.

Como alternativas à modelagem cinética clássica de Michaelis-Menten e/ou às técnicas de regressão linear destacam-se:

- (i) a obtenção de equações analíticas aproximadas com auxílio do método da perturbação singular: para muitos sistemas reacionais o decaimento das variáveis “rápidas”, comumente as espécies intermediárias, ocorre em uma escala de tempo de pouca importância para a inferência do decaimento das variáveis “lentas”, geralmente as espécies de interesse na reação (Rice e Do, 1994). Daí, um conjunto reduzido de equações pode ser obtido para representar o sistema (Schnell e Maini, 2002; Li *et al.*, 1993);
- (ii) métodos “diferenciais”, onde dados na forma de velocidade de reação contra concentração dos componentes presentes no sistema são ajustados diretamente na equação de velocidade da reação proposta (Koerber e Fink, 1986; Cornish-Bowden, 1972);
- (iii) estimativa da velocidade da reação sem o emprego de um modelo fenomenológico. Nesse caso, redes neurais artificiais são comumente aplicadas. Tal abordagem, apesar de não permitir extrapolações, descreve com relativa precisão a evolução temporal dos componentes em sistemas enzimáticos (Pinto *et al.*, 2007; Baughman e Liu, 1995);
- (iv) o sistema de equações diferenciais que descreve a reação enzimática pode ser integrado numericamente e seus parâmetros cinéticos ajustados diretamente na curva de concentração de substrato/produto *versus* tempo por métodos de regressão não-linear (Duggleby 1995; Zimmerle e Frieden, 1989).

Com o crescente avanço tecnológico no processamento computacional, o método *iv* combinado com técnicas de otimização não-linear para estimativa dos parâmetros cinéticos é considerado atualmente uma alternativa interessante e cada vez mais factível nos casos em que a velocidades de reação preditas por expressões do tipo Michaelis-Menten mostram-se imprecisas (Schnell e Maini, 2003; Asprey e Naka, 1999; Buzzi-Ferraris, 1999).

### 2.1.2.2 – Efeitos de Transporte de Massa na Velocidade Aparente de Reação

No caso de enzimas imobilizadas, é comum que a cinética observada não seja governada exclusivamente por interações entre a enzima e o substrato, mas também pela velocidade de difusão do substrato à superfície do suporte (efeito difusivo externo), ou, internamente por entre os poros do suporte (efeito difusivo intra-partícula). Nesse caso, a concentração real de substrato que está em equilíbrio com a enzima imobilizada (sistema heterogêneo) é menor que a que haveria caso reagente e catalisador fossem solúveis (sistema homogêneo; Bailey e Ollis, 1977). A hipótese do estado pseudo-estacionário, por exemplo, merece cuidado especial em sistemas onde a limitação por difusão é relevante (Georgakis e Aris, 1975).

Como, usualmente, a área efetiva da superfície interna da partícula é superior à da camada limite externa, a velocidade global de reação pode ser afetada efetivamente pela facilidade do reagente em chegar ao sítio ativo da enzima imobilizada, isto é, pela velocidade de difusão intra-partícula (Forni, 1999). Já considerando a tortuosidade dos poros, a lei de Fick é comumente adotada para descrever a velocidade de difusão interna:  $-D_e(\partial C/\partial \zeta)$ , sendo  $C$  a concentração da espécie,  $\zeta$  a coordenada da difusão e  $D_e$  a difusividade efetiva.

Define-se também o fator de efetividade  $\eta$  para análise de efeitos difusivos na cinética da reação. O parâmetro  $\eta$  relaciona a velocidade reacional observada com a velocidade teórica livre dos efeitos de transferência de massa (Bailey e Ollis, 1977).

### 2.1.3 – MODELAGEM HÍBRIDA FENOMENOLÓGICO-NEURONAL PARA REAÇÕES PROTEOLÍTICAS

Uma dificuldade importante para modelar processos biotecnológicos reside na descrição precisa de sua cinética. É comum em processos industriais a utilização de um conjunto diferente de parâmetros cinéticos para determinado período ao longo do ano em um único modelo. Com o objetivo de descrever o comportamento dinâmico do processo por longos períodos, os modelos requerem uma nova estimativa de seus parâmetros à medida que ocorrem alterações nas condições operacionais e na composição do substrato. Nesse quadro geral, modelos robustos só podem ser obtidos quando a abordagem utilizada na modelagem e o procedimento de reajuste de seus parâmetros são de fácil implementação e repetidos periodicamente (Rivera *et al.*, 2007).

Particularmente nas reações de hidrólise do soro de queijo, a variabilidade na composição da matéria-prima é alta e depende do laticínio, do tipo de queijo produzido e de

fatores sazonais e climáticos. Apesar da modelagem utilizando a concentração molar de ligações hidrolisáveis ser de grande valia na otimização, projeto e controle do reator enzimático, uma descrição mais detalhada dos produtos formados ao longo da reação é indispensável para se gerar produtos de forma controlada, com propriedades dentro de especificações pré-estabelecidas e, portanto, com maior valor comercial (Margot *et al.*, 1994). Nesse caso, um modelo cinético puramente fenomenológico esbarraria em limitações como o grande número de parâmetros cinéticos necessários e a alta correlação entre os mesmos. Ainda, devido à complexidade da composição do substrato, a modelagem só se torna factível com a adoção de pseudocomponentes (Chen *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2003).

A limitação em se modelar fenomenologicamente a cinética proteolítica dos pseudocomponentes conduz naturalmente a abordagens empíricas ou semi-empíricas. Nesse sentido, as redes neuronais artificiais, RNAs, são frequentemente utilizadas como estimadoras de estado ou de parâmetros (Baş *et al.*, 2007b; Zander *et al.*, 1999; Eerikainen *et al.*, 1993).

O emprego de redes neuronais artificiais tem sido eficaz na predição e otimização de processos onde a modelagem fenomenológica falha em testes de validação (Baughman e Liu, 1995; Bhat e McAvoy, 1990). A combinação de balanços de conservação de massa fenomenológicos em reatores bioquímicos com a capacidade de predição das RNAs para a cinética pode prover modelos híbridos capazes de relacionar diferentes variáveis que afetam a cinética enzimática – como temperatura, pH, etc. (Pinto *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2007; Zander *et al.*, 1999; Eerikainen *et al.*, 1993).

Na seção **Redes Neuronais Artificiais** do apêndice desta tese apresenta-se uma revisão dedicada ao tema.

## 2.2 – METODOLOGIA

Nesta seção estão descritos os procedimentos experimentais e metodologias utilizadas no decorrer dos estudos das proteólises. Devido à diversidade de experimentos realizados e à variabilidade das condições operacionais praticadas ao longo deste trabalho, detalhes de cada experimento serão disponibilizados durante a apresentação dos resultados.

Prática de rotina para determinação do teor protéico no soro de queijo, o método de Kjeldahl é descrito na seção 2.2.1. Nas três subseções seguintes, 2.2.2, 2.2.3 e 2.2.4 são apresentadas as metodologias empregadas para acompanhamento cinético das três reações estudadas: concentração molar de ligações hidrolisadas calculada via medição do grau de hidrólise ou detalhamento dos produtos reacionais com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Na seqüência, são apresentados os procedimentos utilizados para construção dos modelos para predição da concentração molar de ligações hidrolisadas (2.2.5) e dos modelos cinético-neuronais para detalhamento dos produtos reacionais (2.2.6).

As duas últimas seções tratam dos algoritmos de otimização (2.2.7) e dos procedimentos adotados durante o ajuste cinético dos parâmetros e cálculo de seus intervalos e regiões de confiança estatística (2.2.8).

### 2.2.1 – CONCENTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E SEU TEOR DE PROTEÍNAS

O soro de queijo *in natura* utilizado ao longo de todo o estudo foi gentilmente cedido pela Cooperativa de Laticínios São Carlos e era microfiltrado em membrana de 0,2 µm (modelo CFP-2-E-8A, Amersham Biosciences) para esterilização da matéria-prima e, posteriormente, concentrado por ultrafiltração em membrana com corte de 10 kDa (Sistema Millipore-Pellicon2®).

Rotineiramente, a determinação da concentração de proteínas totais no soro de queijo foi feita segundo o método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883 *apud* Bradstreet, 1965) descrito a seguir.



### 2.2.1.1 – Método de Kjeldahl

O método de Kjeldahl para quantificação do teor protéico pode ser dividido em três etapas descritas a seguir, a saber: digestão, destilação e titulação da amostra em análise (Kjeldahl, 1883 *apud* Bradstreet, 1965).

#### *Digestão da Amostra*

Nos tubos de digestão foram colocados 2,5 mL de amostra, 25 mL de ácido sulfúrico concentrado, 2 g de catalisador (preparado com uma parte de  $\text{CuSO}_4$  para três partes de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) e esferas de ebulição. Em seguida, a mistura, que apresentava coloração marrom bastante intensa, era digerida em temperatura elevada até que atingisse uma tonalidade verde suave (após aproximadamente 2,5 horas). Uma vez digeridas as amostras, aguardava-se os tubos atingirem temperatura ambiente para destilação subsequente.

#### *Destilação da Amostra*

Para a destilação das amostras foram preparadas soluções de ácido bórico 2% (2 g em 100 mL) e NaOH 32% (32 g em 100 mL). Os erlenmeyers contendo 100 mL de ácido bórico e 5 gotas de indicador misto foram, juntamente com os tubos, posicionados na unidade de destilação para se iniciar o processo. O tempo requerido por tubo para destilação foi em torno de 6 min.

#### *Titulação da Amostra*

Concluída a destilação, o conteúdo dos erlenmeyers era titulado com HCL 0,1N (volume de aproximadamente 14 mL para  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de proteína). De posse dos dados da titulação e da Equação 2.3, determinava-se a concentração de proteína presente nas amostras:

$$C_{\text{Proteína}} = 6,38 \frac{14V_{\text{HCL}}C_{\text{HCL}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (2.3)$$

Sendo:  $C_{\text{Proteína}}$  – a concentração de proteína total; 6,38 – o fator de conversão de nitrogênio total para nitrogênio protéico para proteínas do leite; 14 – o peso molecular do nitrogênio;  $V_{\text{HCL}}$  – o volume de ácido gasto na titulação;  $C_{\text{HCL}}$  – a concentração do ácido usado na titulação;  $V_{\text{amostra}}$  – o volume de amostra.

## 2.2.2 – METODOLOGIAS PARA ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO COM QUIMOTRIPSINA

A endoprotease Quimotripsina, *E.C. 3.4.21.1*, de pâncreas bovino, tipo II (Sigma Chemical Co., C-4129), era imobilizada em gel glioxil-agarose 6%. Os protocolos adotados para imobilização multipontual e para dosagem da atividade recuperada estão descritos em Galvão, 2004. Após cada ensaio cinético, era medida a atividade remanescente do derivado quimotripsina-glioxil-agarose. Quando a mesma atingia 80% de sua atividade inicial, novos catalisadores eram preparados.

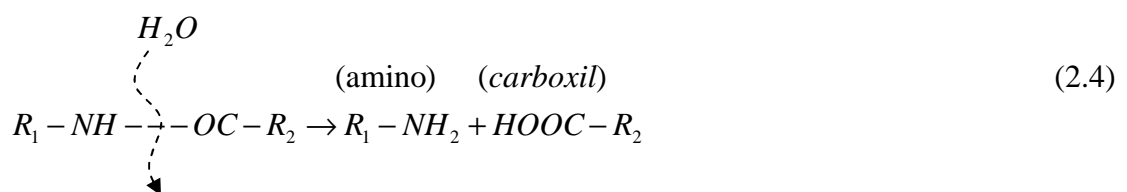
Duas abordagens foram utilizadas no estudo cinético da reação com a enzima quimotripsina: concentração molar de ligações peptídicas hidrolisadas e distribuição das massas molares dos hidrolisados formados durante a reação. As metodologias para acompanhamento de ambos os enfoques são descritas na seqüência.

### 2.2.2.1 – Grau de Hidrólise e Concentração Molar de Ligações Hidrolisadas

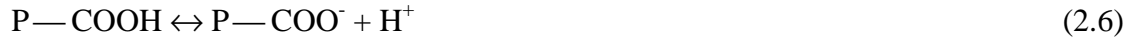
Uma das primeiras aplicações que quantificava o número de ligações peptídicas rompidas como critério da eficiência do grau de hidrólise foi citada por Calvery, 1933, *apud* Adler-Nissen, 1986. Desde então, essa técnica tem sido padrão para muitos trabalhos que envolvem reações proteolíticas.

Muitos autores têm mostrado que a extensão nas quais as propriedades funcionais de uma proteína podem ser alteradas por hidrólise está diretamente relacionada ao grau de hidrólise por elas, proteínas, sofrido. Define-se grau de hidrólise como a porcentagem do número total de ligações peptídicas em uma proteína que foi rompida durante o processo de hidrólise, levando-se em conta a especificidade da enzima utilizada e a quantidade de resíduos que são substratos para a mesma (Adler-Nissen, 1986).

Para a medição do grau de hidrólise, a técnica do pHstato ou de titulação dos prótons liberados é uma das mais utilizadas (Silvestre, 1997). Para as proteínas do soro, a reação de hidrólise pode ser generalizada na seguinte equação:



Após a hidrólise, ocorre a protonação/desprotonação dos grupos amino e carboxil terminais, equações 2.5 e 2.6:



A técnica do pHstato vale-se do fato de que quando a hidrólise ocorre em pH neutro ou alcalino, a dissociação de prótons de grupos amino livres é favorecida, Equação 2.5. A liberação de prótons conduz à redução do pH do meio. Assim, o número de ligações peptídicas clivadas pode ser estimado pela quantidade de base requerida para manter o pH controlado durante a reação (Adler-Nissen, 1986).

Hidrólises das proteínas do soro de queijo concentrado com quimotripsina imobilizada sobre glioxil-agarose foram desenvolvidas utilizando-se a técnica do pHstato, na qual o consumo de base durante a reação resulta diretamente no grau de hidrólise  $GH_{QuimoT}$  calculado por (Adler-Nissen, 1986):

$$GH_{QuimoT} = V_{Base} C_{Base} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{MP} \frac{1}{h_{tot}} \quad (2.7)$$

Sendo:  $V_{base}$  – o volume de base consumido durante a reação (mL);  $C_{base}$  – a concentração da base titulante (mol.L<sup>-1</sup>);  $\alpha$  – o grau de dissociação médio dos grupos  $\alpha$ -NH, função do pH e da temperatura de trabalho (disponível em Adler-Nissen, 1986, página 123);  $MP$  – a massa de proteína (g<sub>proteína</sub>);  $h_{tot}$  – o número total de ligações peptídicas no substrato protéico: 8,8 mmol.g<sub>proteína</sub><sup>-1</sup> para proteínas do soro (Adler-Nissen, 1986, página 17).

A concentração molar de ligações hidrolisadas pela quimotripsina  $C_P$  e a concentração inicial de ligações hidrolisáveis  $C_{N0}$  eram calculadas, respectivamente, pelas equações 2.8 e 2.9:

$$C_P = C_{Proteína} h_{tot} GH_{QuimoT} \quad (2.8)$$

$$C_{N0} = C_{Proteína} h_{tot} GH_{Max,QuimoT} \quad (2.9)$$

Sendo:  $GH_{Max,QuimoT}$  – o grau de hidrólise máximo que se pode obter pela ação da enzima nas proteínas do soro de queijo (19,5% para a quimotripsina; Galvão *et al.*, 2001).

### 2.2.2.2 – Acompanhamento da Distribuição das Massas Molares dos Peptídeos Formados

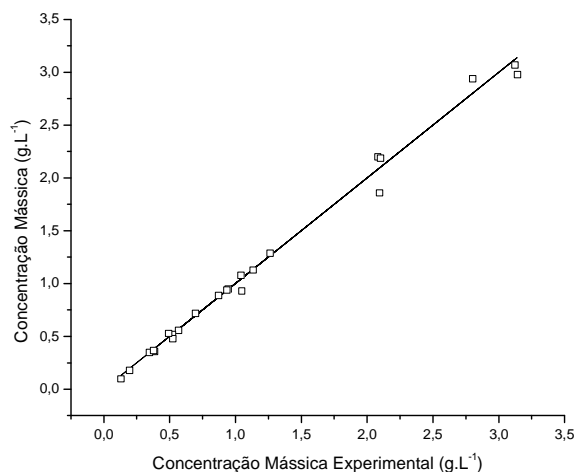
Vinte e cinco microlitros de cada amostra de hidrolisado com quimotripsina foram injetados em uma coluna de separação por exclusão de tamanho Superdex Peptide 10/300 GL (GE Biosciences). Utilizou-se como fase móvel o tampão fosfato 0,02 M, pH 7,2 com 0,25 M de NaCl a uma vazão de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>. Após duas horas de análise, os peptídeos detectados a 214 nm eram agrupados em faixas de massas molares de acordo com a curva de calibração descrita a seguir.

Após a injeção de seis padrões de proteínas/peptídeos com distintas massas molares (soro albumina bovina – 67000 Da;  $\beta$ -lactoglobulina – 18300 Da;  $\alpha$ -lactalbumina – 14000 Da; insulina – 5800 Da; angiotensina II – 1003 Da e leucina encefalina – 560 Da) foi possível a obtenção de uma equação que relaciona a concentração mássica  $C$  como função da área cromatográfica  $A_C$  e do tempo de retenção  $t_R$ :

$$C = (1,625 \cdot 10^{-8} - 1,426 \cdot 10^{-10} t_R) A_C \quad (2.10)$$

Sendo:  $C$  em g.L<sup>-1</sup>;  $A_C$  em Volt.min;  $t_R$  em min.

A Figura 2.5 apresenta a dispersão do ajuste para a Equação 2.10 durante o procedimento de calibração:



**Figura 2.5:** Dispersão dos dados para a curva de calibração.

### 2.2.3 – METODOLOGIAS PARA ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO COM CARBOXIPEPTIDASE A

A exoprotease Carboxipeptidase A, *E.C. 3.4.17.1*, do pâncreas bovino, tipo II (Sigma Chemical Co., C-0386), foi imobilizada multipontualmente em gel glioxil-agarose 6%. Os protocolos utilizados para imobilização e para dosagem da atividade recuperada após imobilização são reportados em Tardioli, 2003, onde o autor adota uma unidade de hipuril-L-fenilalanina ( $U_{H-PHE}$ ) como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de hipuril-L-fenilalanina por minuto a 25 °C e pH 7,5. Após cada ensaio cinético, era medida a atividade remanescente do derivado CPA-glioxil-agarose. Quando a mesma atingia 80% de sua atividade inicial, novos catalisadores eram preparados.

Pré-hidrolisados de quimotripsina foram submetidos à ação da CPA imobilizada a 45°C e pH 7. Amostras eram coletadas durante os ensaios e a concentração molar dos aminoácidos liberados era determinada por cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica. A concentração molar das ligações hidrolisadas também foi calculada.

#### 2.2.3.1 – Análise de Aminoácidos por Cromatografia Líquida de Troca Iônica

Inicialmente, proteínas e peptídeos presentes nas amostras de hidrolisados com CPA eram precipitados pela adição de ácido tricloroacético 2,4 M para uma razão final amostra/ácido de 1/1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante era diluído para uma faixa apropriada com tampão citrato de sódio 0,2 N (pH 2,2) e filtrado em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ . Dez microlitros das amostras eram automaticamente injetados na coluna e um gradiente apropriado<sup>1</sup> era aplicado por 72 minutos. A temperatura de análise era de 60 °C e os aminoácidos detectados por fluorescência (excitação a 350 nm e emissão a 450 nm).

Foi utilizada a pré-coluna Shim-pack ISC-30/50504 Na (Shimadzu), a coluna Shim-pack ISC-30 amino-Na (Shimadzu) e as fases móveis A (tampão citrato de sódio 0,2 N, pH 3,2 ajustado com ácido perclórico), B (citrato de sódio 0,6 N e ácido bórico, pH 10 ajustado com hidróxido de sódio 4 N) e C (hidróxido de sódio 0,2 N) a uma vazão de 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Foram usados para derivatização pós-coluna as soluções RA (solução de ácido bórico – ácido carbônico, pH 10, contendo 0,04% (p/v) de hipoclorito de sódio comercial) e RB (solução de

---

<sup>1</sup> Os valores tabelados do gradiente podem ser encontrados no Manual de instrução para análise de aminoácidos em HPLC LC-10A/C-R7A SHIMADZU, cap. 3, pág. 3-19.

0,8 mg.mL<sup>-1</sup> de o-ftaldeído, contendo 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> de Bry-35 e 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol) a uma vazão total de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>.

A concentração de aminoácidos era determinada por meio de curvas-padrão, obtidas para vinte aminoácidos (padrão Sigma Chemical Co., A-2908).

### 2.2.3.2 – Grau de Hidrólise e Concentração Molar de Ligações Hidrolisadas

Quantificada por cromatografia líquida a concentração molar dos aminoácidos liberados durante a reação, o grau de hidrólise para hidrolisados com CPA,  $GH_{CPA}$ , era calculado pela Equação 2.11:

$$GH_{CPA} = \frac{M_{AA,L}}{M_{AA,T}} \quad (2.11)$$

Sendo:  $M_{AA,L}$  – a massa (em gramas) de aminoácidos liberados pela CPA por grama de proteína oferecida;  $M_{AA,T}$  – a massa total de aminoácidos disponível por grama de proteínas do soro ( $M_{AA,T} = 1,1554 \text{ g}_{AA} \cdot \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$ ; valor médio estimado por Adler-Nissen, 1986).

A concentração molar de ligações peptídicas hidrolisadas  $C_P$  e a concentração molar inicial de ligações peptídicas hidrolisáveis  $C_{N0}$  eram calculadas com as equações 2.12 e 2.13:

$$C_P = C_{\text{Proteína}} h_{\text{tot}} GH_{CPA} \quad (2.12)$$

$$C_{N0} = C_{\text{Proteína}} h_{\text{tot}} (GH_{\text{Max,CPA}} - GH_{\text{QuimoT}}) \quad (2.13)$$

Sendo:  $C_{\text{proteína}}$  – a concentração inicial de proteínas no pré-hidrolisado com quimotripsina;  $GH_{\text{QuimoT}}$  – o grau de hidrólise obtido pela ação prévia da quimotripsina;  $GH_{\text{Max,CPA}}$  – o grau de hidrólise máximo obtido para as proteínas do soro pela ação sequencial de quimotripsina e da CPA, neste trabalho foram observados valores para  $GH_{CPA}$  até 30%, sendo esse o adotado para  $GH_{\text{Max,CPA}}$ .

### 2.2.4 – METODOLOGIA PARA ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO COM ALCALASE®

Foram desenvolvidos neste trabalho modelos híbridos fenomenológico-neuronais para predição da distribuição das massas molares durante a hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo concentrado catalisada pela enzima Alcalase® imobilizada em gel glioxil-agarose 10% (protocolos de imobilização e de medição da atividade descritos por Tardioli, 2003). Tardioli, 2003, também adotou uma unidade de N-benzoil-L-arginina ( $U_{BAEE}$ ) como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de N-benzoil-L-arginina por minuto a 25 °C e pH 7,6.

Amostras foram periodicamente coletadas e analisadas conforme metodologia descrita no item 2.2.2.2 (utilizando, nesse caso, a coluna por exclusão de tamanho Pharmacia Biotech Superdex Peptide HR 10/30 e a curva de calibração apresentada por Sousa, 2003). Os ensaios foram realizados em vaso encamisado de vidro de 50 mL acoplado a pHstato, Titrino Metrohm® e temperatura controlada por banho termostático; quando a solução (de 30 mL e concentração de 60  $\text{g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) atingia o equilíbrio térmico, 1,44  $\text{g}_{\text{gel}}$  contendo 2,8  $U_{BAEE} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  era adicionado e o controle automático de pH do reator iniciado.

As amostras analisadas proviam concentrações mássicas classificadas em cinco faixas de massa molares  $MM_i$  pré-definidas ( $MM_1 \leq 650\text{Da}$ ;  $650\text{Da} < MM_2 \leq 1050\text{Da}$ ;  $1050\text{Da} < MM_3 < 4150\text{Da}$ ;  $4150\text{Da} \leq MM_4 < 14000\text{Da}$ ;  $14000\text{Da} \leq MM_5$ ).

### 2.2.5 – PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE LIGAÇÕES HIDROLISADAS – EQUACIONAMENTO

Neste capítulo são descritas as equações dos modelos matemáticos utilizados na modelagem para predição da concentração molar de ligações hidrolisadas durante as proteólises do soro de queijo concentrado utilizando as enzimas quimotripsina ou CPA imobilizadas em suporte inerte glioxil-agarose.

Duas abordagens foram utilizadas e comparadas na modelagem das reações enzimáticas supracitadas: o sistema completo de equações diferenciais ordinárias não-lineares – EDOs – oriundo do mecanismo apresentado na Equação 2.14; e a equação analítica para a velocidade de reação do tipo Michaelis-Menten, obtida quando adotada a hipótese do estado pseudo-estacionário para o mesmo mecanismo reacional.



Sendo:  $N$  – o pseudo-substrado que representa as ligações hidrolisáveis;  $P$  – o pseudoproduto que representa as ligações hidrolisadas;  $E$  – a enzima presente no reator;  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$  são espécies intermediárias na reação;  $k_1$ ,  $k_p$ ,  $k_N$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-p}$ ,  $k_{-N}$  – são os parâmetros cinéticos.

O mecanismo apresentado na Equação 2.14 para ambas as reações foi adotado com base em observações prévias de Tardioli, 2003, para a clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais com CPA e Galvão, 2004, para a quebra das ligações peptídicas com quimotripsina. O mecanismo, que considera inibição simultânea por substrato e produto (inibição mista), é derivado após o uso da técnica de agrupamento de moléculas (do inglês, *lumping*) em um único pseudo-substrato: “ligações hidrolisáveis”,  $N$ , cuja concentração molar inicial é inferida a partir da medição do grau de hidrólise máximo da reação (Adler-Nissen, 1986). Apesar de tal abstração não prover uma descrição detalhada das concentrações das numerosas espécies presentes no curso da reação, um modelo apurado para a predição da concentração molar das ligações hidrolisadas é importante para o projeto do reator enzimático e útil no desenvolvimento de seus algoritmos de controle e otimização (Sousa, 2003; Vasic-Racki *et al.*, 2003). Ainda, como será discutido no item 2.3.3, um modelo apurado para a evolução temporal da espécie  $P$  é fundamental para a inferência das concentrações molares dos aminoácidos liberados durante a hidrólise com CPA.

Como as etapas da reação esquematizada na Equação 2.14 são consideradas elementares, as velocidades de formação ou desaparecimento de cada espécie são dadas pelas equações 2.15 a 2.20:

$$V_N = k_{-1} \cdot C_{EN} + k_{-N} \cdot C_{ENN} - k_1 \cdot C_E \cdot C_N - k_N \cdot C_{EN} \cdot C_N \tag{2.15}$$

$$V_E = k_{-1} \cdot C_{EN} + k_2 \cdot C_{EN} + k_{-p} \cdot C_{EP} - k_1 \cdot C_E \cdot C_N - k_p \cdot C_E \cdot C_P \tag{2.16}$$

$$V_{EN} = k_1 \cdot C_E \cdot C_N + k_{-N} \cdot C_{ENN} - k_{-1} \cdot C_{EN} - k_N \cdot C_{EN} \cdot C_N - k_2 \cdot C_{EN} \tag{2.17}$$



$$V_{EP} = k_P \cdot C_E \cdot C_P - k_{-P} \cdot C_{EP} \quad (2.18)$$

$$V_{ENN} = k_N \cdot C_{EN} \cdot C_N - k_{-N} \cdot C_{ENN} \quad (2.19)$$

$$V_P = k_2 \cdot C_{EN} + k_{-P} \cdot C_{EP} - k_P \cdot C_E \cdot C_{EP} \quad (2.20)$$

Sendo:  $C_N$  – a concentração molar de ligações hidrolisáveis ( $\text{mmol.L}^{-1}$ );  $C_P$  – a concentração molar de ligações hidrolisadas ( $\text{mmol.L}^{-1}$ );  $C_E$  – a concentração de enzima no reator ( $\text{mmol.L}^{-1}$ );  $C_{EN}$ ,  $C_{EP}$ , e  $C_{ENN}$  – as concentrações das espécies intermediárias presentes no mecanismo reacional adotado ( $\text{mmol.L}^{-1}$ );  $V_i$  – a velocidade de reação da espécie  $i$  ( $\text{mmol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

Para um reator batelada, a taxa de acúmulo de cada componente se iguala à respectiva velocidade de reação. Assim, supondo invariante a densidade do sistema reacional, chega-se a um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs) semelhante ao descrito pelo conjunto de equações 2.15 a 2.20, isto é:

$$dC_N / dt = V_N = k_{-1} \cdot C_{EN} + k_{-N} \cdot C_{ENN} - k_1 \cdot C_E \cdot C_N - k_N \cdot C_{EN} \cdot C_N \quad (2.15a)$$

$$dC_E / dt = V_E = k_{-1} \cdot C_{EN} + k_2 \cdot C_{EN} + k_{-P} \cdot C_{EP} - k_1 \cdot C_E \cdot C_N - k_P \cdot C_E \cdot C_P \quad (2.16a)$$

$$dC_{EN} / dt = V_{EN} = k_1 \cdot C_E \cdot C_N + k_{-N} \cdot C_{ENN} - k_{-1} \cdot C_{EN} - k_N \cdot C_{EN} \cdot C_N - k_2 \cdot C_{EN} \quad (2.17a)$$

$$dC_{EP} / dt = V_{EP} = k_P \cdot C_E \cdot C_P - k_{-P} \cdot C_{EP} \quad (2.18a)$$

$$dC_{ENN} / dt = V_{ENN} = k_N \cdot C_{EN} \cdot C_N - k_{-N} \cdot C_{ENN} \quad (2.19a)$$

$$dC_P / dt = V_P = k_2 \cdot C_{EN} + k_{-P} \cdot C_{EP} - k_P \cdot C_E \cdot C_{EP} \quad (2.20a)$$

Utilizando o enfoque dado por Briggs e Haldane, onde se supõe o estado pseudo-estacionário para as espécies  $E$ ,  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$ , uma equação algébrica para a velocidade de reação  $V_N$  do tipo Michaelis-Menten (Equação 2.21) pode ser obtida (Schulz, 1994).

$$V_N = -\frac{k \cdot C_{E0} \cdot C_N}{K_M \left(1 + \frac{C_P}{K_P}\right) + C_N \left(1 + \frac{C_N}{K_N}\right)} \quad (2.21)$$

Sendo:  $V_N$  – a velocidade de reação da ligação hidrolisável  $N$ ;  $k$ ,  $K_M$ ,  $K_N$  e  $K_P$  – os parâmetros cinéticos da reação;  $C_{E0}$  – a concentração inicial de enzima no reator.

A hipótese do estado pseudo-estacionário reduz drasticamente um sistema descrito por seis equações (2.15 a 2.20), para um modelo simplificado constituído de uma única equação algébrica (Equação 2.21), o que facilita consideravelmente o tratamento matemático. Os parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  podem ser estimados, por exemplo, utilizando dados de velocidades iniciais, restando apenas o parâmetro de inibição pelo produto  $K_P$  para ser ajustado diretamente em curvas de concentração molar contra o tempo – ou, alternativamente, a partir de velocidades iniciais na presença de produto. Entretanto, como toda simplificação, as condições das hipóteses necessárias para obtenção da Equação 2.21 devem ser respeitadas sob pena de estimativas errôneas para os parâmetros cinéticos quando não observadas (Schnell e Maini, 2003; Li *et al.*, 1993). Uma revisão das hipóteses consideradas para dedução do modelo pseudo-estacionário é apresentada na subseção 2.1.2 deste capítulo.

Quanto ao ajuste dos parâmetros cinéticos para os ensaios de longa duração (parâmetros  $k$ ,  $K_M$ ,  $K_N$  e  $K_P$  para Equação 2.21; ou parâmetros  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_P$ ,  $k_{-P}$ ,  $k_N$  e  $k_{-N}$  para equações 2.15a a 2.20a), a função-objetivo,  $\phi$ , foi definida como a soma dos quadrados dos resíduos. Essa era então calculada pela soma dos quadrados das diferenças entre os valores experimentais e preditos pelo modelo em questão para a concentração molar de ligações hidrolisadas  $C_P$ , como mostra a Equação 2.22.

$$\phi = \sum_{i=1}^{ne} \left[ \sum_{j=1}^{n_i} \left( \frac{C_{P,j}^{\text{exp},i} - C_{P,j}^i}{C_{P,j}^{\text{exp},i}} \right)^2 \right] \quad (2.22)$$

Sendo:  $ne$  – o número de experimentos;  $n_i$  – o número de observações experimentais do experimento  $i$ ;  $C_{P,j}^{\text{exp},i}$  – a observação experimental  $j$  da concentração molar de  $P$ ;  $C_{P,j}^i$  – o valor inferido de  $P$  pelo modelo. Quando o desvio-padrão do erro experimental  $\sigma_{P,j}^{\text{exp},i}$  associado à cada medida  $C_{P,j}^{\text{exp},i}$  era conhecido para todos os  $n_i$  dados experimentais do ensaio  $i$ , utilizava-se o valor do mesmo no denominador da função ao invés de  $C_{P,j}^{\text{exp},i}$ .

Quando os parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  da Equação 2.21 foram estimados via método das velocidades iniciais, a seguinte função-objetivo foi utilizada:

$$\phi = \sum_{i=1}^{ne} \left[ \sum_{j=1}^{n_i} (V_{NO,j}^{\text{exp},i} - V_{NO,j}^i)^2 \right] \quad (2.23)$$

Sendo:  $ne$  – o número de experimentos;  $n_i$  – o número de observações experimentais do experimento  $i$ ;  $V_{NO,j}^{\text{exp},i}$  – a observação experimental  $j$ ;  $V_{NO,j}^i$  – o valor inferido de  $V_{NO}$  pelo modelo.

Uma revisão sobre os fundamentos observados para a utilização das equações 2.22 e 2.23 é apresentada no item 2.2.8 (página 36 do presente texto).

### 2.2.5.1 – Efeitos Difusivos sobre a Cinética da Reação com Quimotripsina Imobilizada em Gel Glioxil-Agarose

Na reação de hidrólise das proteínas do soro de queijo com quimotripsina imobilizada em gel glioxil-agarose, Galvão, 2004, notou que para cargas de enzima imobilizada acima de  $10 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  existe limitação por efeitos difusivos na velocidade de reação. Como a carga enzimática utilizada neste trabalho foi, em alguns casos, de  $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ , um estudo aprofundado do sistema reacional, com inclusão dos efeitos difusivos, mostrou-se pertinente.

Para a elaboração do modelo reativo-difusivo considerou-se o reator isotérmico, operando em batelada e perfeitamente agitado com o gel de agarose homogeneamente suspenso no meio (velocidade de agitação de 750 r.p.m.). Supõe-se também que a enzima está uniformemente imobilizada nos poros do gel. O modelo prediz as concentrações dos compostos ao longo do tempo, no seio do fluido e no interior da partícula. Com uma velocidade de agitação de 750 r.p.m., a resistência externa pode ser desprezada (Galvão *et al.*, 2008). Na superfície externa do gel, a Equação 2.24 representa os balanços de massa para o componente  $i$  considerado no mecanismo descrito na Equação 2.14:

$$\left. \frac{dC_i(t)}{dt} = \frac{-3}{R_{\text{Gel}}^2} \frac{(1-\varepsilon_R)}{\varepsilon_R} \varepsilon_{\text{Gel}} \cdot D_{e,i} \frac{\partial \tilde{C}_i(t, \zeta)}{\partial \zeta} \right|_{\zeta=1} \quad (2.24)$$

$$\text{Condição inicial: } t = 0; \tilde{C}_i(0,1) = C_i(0) \quad (2.24a)$$

Sendo:  $\tilde{C}_i$  – a concentração do componente  $i$  no interior do gel;  $C_i$  – a concentração do componente  $i$  no seio do fluido, supondo reator de mistura perfeita;  $R_{Gel}$  – o raio da partícula de agarose ( $0,249 \times 10^{-3}$  m; Fernandez-Sanchez, 2000);  $\varepsilon_R$  – a porosidade do reator;  $\varepsilon_{Gel}$  – a porosidade do gel de agarose (0,919; Fernandez-Sanchez, 2000);  $\zeta$  – o raio adimensional da partícula;  $D_{e,i}$  – a difusividade efetiva do componente  $i$  na partícula de agarose,  $D_{e,i} \equiv 0$  para a enzima,  $E$ , e para as espécies intermediárias  $EN$ ,  $EP$ , e  $ENN$ .

A Equação 2.25 representa o balanço de massa para os componentes no interior do gel. Como a difusão nos poros é complexa, pois os poros não são iguais, supõe-se que o processo de difusão pode ser satisfatoriamente representado pela equação de Fick tendo poros cilíndricos, de tamanhos iguais e com enzimas homoganeamente distribuídas (Forni, 1999). A tortuosidade dos poros, que corrige esse modelo simplificado, é implicitamente considerada no parâmetro  $D_{e,i}$  (difusividade efetiva), que é constante para cada componente  $i$ .

$$\frac{\partial \tilde{C}_i(t, \zeta)}{\partial t} = \frac{1}{R_{Gel}^2} \frac{D_{e,i}}{\zeta^2} \frac{\partial}{\partial \zeta} \left[ \zeta^2 \cdot \frac{\partial \tilde{C}_i(t, \zeta)}{\partial \zeta} \right] - \frac{\rho_{Gel} V_i}{\varepsilon_{Gel}} \quad (2.25)$$

$$\text{Condição inicial: } t = 0, \tilde{C}_i(0, \zeta) = C_i(0) \quad (2.25a)$$

$$\text{Condição de contorno 1: } \zeta = 0, \frac{\partial \tilde{C}_i(t, 0)}{\partial \zeta} = 0 \quad (2.25b)$$

$$\text{Condição de contorno 2: } \zeta = 1, \tilde{C}_i(t, 1) = C_i(t) \quad (2.25c)$$

Sendo:  $\rho_{Gel}$  – a densidade do gel de agarose ( $1081 \text{ g}_{Gel} \cdot \text{L}_{Gel}^{-1}$ ; Fernandez-Sanchez, 2000)

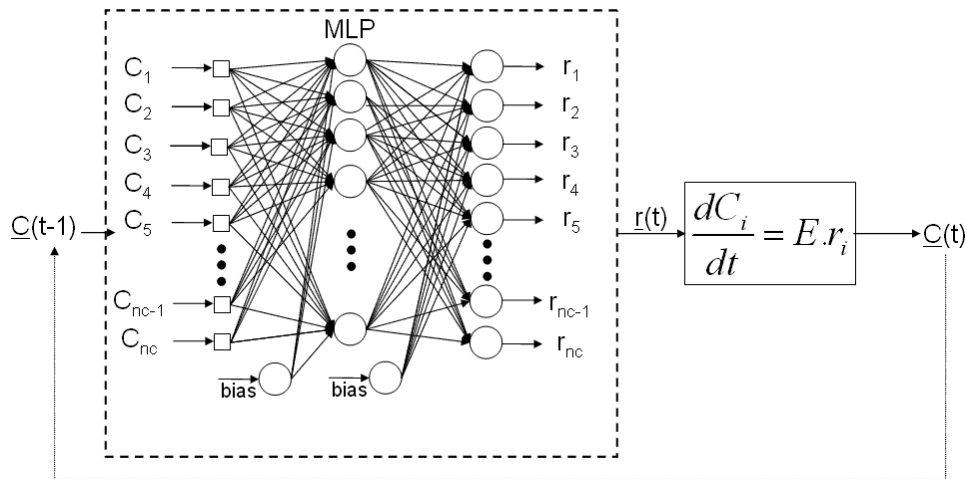
O sistema descrito pelas equações 2.24 e 2.25 foi resolvido numericamente, discretizando as equações no raio por aproximação polinomial ( $\alpha = 1,0$ ;  $\beta = 0,5$ ; Villadsen e Michelsen, 1978). Implementado em FORTRAN, o algoritmo foi utilizado por Ferreira, 2004, e Gonçalves *et al.*, 1997, e se mostrou robusto para casos de complexidade numérica semelhantes ao aqui estudado.

Para o cálculo da velocidade  $V_i$ , utilizada no balanço material para o componente  $i$  no interior do gel (Equação 2.25), duas abordagens foram testadas: o sistema completo para o mecanismo reacional considerado (equações 2.15 a 2.20), e a sua simplificação quando adotada a hipótese do estado pseudo-estacionário para os componentes enzimáticos (Equação

2.21). Como discutido por Georgakis e Aris, 1975, a modelagem pseudo-estacionária precisa ser avaliada com cuidado, especialmente em sistemas reativo-difusivos.

### 2.2.6 – ENFOQUE HÍBRIDO FENOMENOLÓGICO-NEURONAL

Para a modelagem cinética com detalhamento dos produtos reacionais, cujos dados experimentais eram obtidos via cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizadas abordagens híbridas que combinam RNAs do tipo MLP (*multilayer perceptrons*; Haykin, 1999) e balanços de massa fenomenológicos dos reatores enzimáticos. A Figura 2.6 ilustra a estrutura do modelo híbrido:



**Figura 2.6:** Diagrama esquemático do modelo híbrido fenomenológico-neuronal (no esquema,  $E$  é a concentração enzimática no reator).

No esquema da Figura 2.6, a rede MLP mapeia o vetor de concentrações  $\underline{C}$  em um vetor de saída  $\underline{r}$  constituído pelas velocidades de reação dos  $nc$  componentes considerados na modelagem. Em seguida, o sistema de equações diferenciais ordinárias, oriundo do balanço material para cada componente no reator enzimático, é resolvido numericamente utilizando o vetor das velocidades de reação  $\underline{r}$  previsto pela rede (na Figura 2.6 o balanço material apresentado é para um reator batelada e  $E$  representa a concentração enzimática no reator).

O algoritmo proposto por Hagan e Menhaj, 1994, foi utilizado nos treinamentos das redes MLP (rotina *trainlm* do Matlab® 6.5). Esse incorpora ao tradicional algoritmo *backpropagation* (MBP) o algoritmo de Levenberg-Marquardt para o treinamento de redes MLP no modo intermitente.

Para o cálculo das velocidades de reação utilizadas no treinamento das redes, curvas experimentais de concentração contra tempo em um reator batelada foram previamente

suavizadas (algoritmo descrito em Pinto *et al.*, 2005). Com o pacote matemático Microcal Origin 6.0 (Microcal Software), as velocidades eram então obtidas após a diferenciação direta dessas curvas suavizadas.

### 2.2.7 – OTIMIZAÇÃO NÃO-LINEAR: ALGORITMOS E PARÂMETROS DE SINTONIA

Nos problemas de ajuste de parâmetros cinéticos, o algoritmo *lsqnonlin* da biblioteca de otimização do Matlab® 6.5 foi utilizado. O algoritmo *lsqnonlin* utiliza a proposta de Levenberg-Marquardt para a otimização de funções não-lineares sem restrições.

Nos métodos estocásticos de busca a facilidade de implantação do algoritmo é contrastada com a dificuldade em determinar os seus parâmetros de sintonia (uma analogia à necessidade de uma boa estimativa inicial das variáveis para o desempenho eficaz dos métodos locais). Apesar do grande esforço em generalizar metodologias para a escolha desses parâmetros, o que se verifica na prática é que os resultados de sucesso relatados em trabalhos da área são específicos para o caso investigado. Nelles, 2001, ponderou que a experiência do usuário com o problema em questão é fundamental para a sintonia dos parâmetros e seus ajustes ocorrem quase que naturalmente à medida que se explora o método de otimização.

Nesse contexto e com base em resultados reportados na vasta literatura da área, são discutidos a seguir guias gerais utilizados para a implementação dos algoritmos estocásticos estudados, e para sintonia de seus parâmetros. O procedimento padrão foi adotar o algoritmo na sua forma original e acrescentar algumas heurísticas já consolidadas para cada estratégia de busca direta, dando ênfase apenas ao ajuste dos parâmetros de sintonia mais relevantes para cada método.

As implementações, em linguagem FORTRAN, dos três algoritmos de busca direta constam do Anexo B.

#### 2.2.7.1 – *Simulated Annealing* (SA)

A definição da temperatura inicial,  $T_0$ , e do esquema de redução da mesma ao longo do processo de recozimento (*annealing*) são as duas principais etapas para a eficácia do SA.

Ben-Ameur, 2004, listou vários trabalhos na literatura que buscam determinar um valor factível para  $T_0$  e o melhor esquema para redução de  $T$ . Quanto ao parâmetro  $T_0$ , foi adotada neste trabalho a proposta de Kirkpatrick *et al.*, 1983. Essa consiste em determinar o valor de  $T_0$  que promova uma razão de aceite inicial pré-fixada  $\chi_0$  para variações de energia

positiva (geralmente,  $\chi_0 = 0,8$ ). Primeiramente, é escolhido um valor “alto” para  $T_0$  (recorde-se que  $T_0$  tem as mesmas dimensões da função-objetivo); realiza-se então um número de transições do algoritmo SA com o valor de  $T_0$  fixo; após essas transições compara-se a razão de aceite obtida com o valor pré-fixado para  $\chi_0$ , caso o valor da razão alcançada não seja superior ao de  $\chi_0$ , dobra-se  $T_0$ . O procedimento é repetido até a razão de aceite observada atingir  $\chi_0$ .

Além da proposta original (Equação 2.26), para o esquema de redução de temperatura adotou-se também o descrito pela Equação 2.27, o mais comumente utilizado nas implantações de SA por possibilitar rápida convergência (Nelles, 2001; Cardoso *et al.*, 1996):

$$T^k = T_0 / \ln(k) \quad (2.26)$$

$$T^{k+1} = \alpha T^k \quad (2.27)$$

Sendo:  $\alpha$  – o parâmetro de controle de redução de  $T$  a cada iteração  $k$  ( $0,8 \leq \alpha \leq 0,99$ ).

### 2.2.7.2 – Enxame de Partículas (PSO)

No algoritmo PSO, além do número de partículas do enxame, precisam ser fixados os parâmetros de sintonia  $w$ ,  $c_1$  e  $c_2$ . Os fatores de aprendizado cognitivo e social, respectivamente,  $c_1$  e  $c_2$ , são corriqueiramente iguais a 2 na maioria expressiva dos estudos que utilizam o algoritmo PSO, mas valores na faixa de 1 a 5 também podem ser encontrados (Chen *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2001).

O fator de inércia  $w$  foi calculado conforme a Equação 2.28 (Shi e Eberhart, 1998):

$$w^k = w_{\max} - (w_{\max} - w_{\min})(k / it_{\max}) \quad (2.28)$$

Sendo:  $w^k$  – o peso de inércia na iteração  $k$ ;  $w_{\max}$  e  $w_{\min}$  – respectivamente os valores máximo e mínimo (0,9 e 0,4);  $it_{\max}$  – o número máximo de iterações do algoritmo.

### 2.2.7.3 – Evolução Diferencial (ED)

Dependendo do critério para perturbação do indivíduo, do número de indivíduos utilizado na etapa de mutação e do tipo de recombinação escolhida, diferentes estratégias de evolução diferencial podem ser construídas. Babu e Jehan, 2003, apontaram que a estratégia mais comumente utilizada é a *ED/aleatório/1/binomial*, isto é, a evolução diferencial com 1

indivíduo escolhido aleatoriamente e recombinado de forma binomial. Essa arquitetura para a estratégia de evolução, apresentada no apêndice desta tese (página 181), foi a aqui utilizada.

Após a escolha da estratégia de evolução, tem-se ainda a determinação de seus parâmetros de sintonia, que para o caso da combinação *ED/aleatório/1/binomial* são:

- Fator utilizado na combinação linear ( $F$ ; com  $F \in [0, \infty]$ ): é recomendada a faixa de 0,4 a 1; sendo  $F = 0,5$  a escolha padrão (Babu e Munawar, 2007);

- Probabilidade de mutação ( $P_r$ ; com  $P_r \in [0, 1]$ ): um valor próximo de 0,5 é considerado uma boa estimativa inicial, mas  $P_r$  deve ser tão próximo de 1 quanto possível para facilitar a exploração de novas regiões no domínio de busca do problema de otimização (Storn e Price, 1997). Storn e Price, 1997, também alegaram que a ED é muito mais sensível ao parâmetro  $F$  do que à probabilidade  $P_r$ , reservando a  $P_r$  a qualidade de um parâmetro de “sintonia fina” no problema de otimização. Como será discutido no decorrer deste trabalho, o acoplamento de um método de busca baseado no gradiente também pode refinar a busca estocástica, eliminando nesse caso um ajuste rigoroso para  $P_r$ .

- Número de indivíduos da população: de maneira geral, deve ser de 5 a 10 vezes maior que o número de variáveis do problema de otimização (Salman *et al.*, 2007; Storn e Price, 1997).

### **2.2.8 – ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS – FORMULAÇÃO, RESOLUÇÃO DO PROBLEMA DE AJUSTE NOS CASOS NÃO-LINEARES E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Em partes deste trabalho, a soma dos quadrados dos resíduos  $\phi$  foi utilizada como função-objetivo para avaliar o desempenho dos modelos cinéticos e algoritmos de busca estudados (por exemplo, equações 2.22 e 2.23). Para uma análise estatística rigorosa do ajuste, os intervalos de confiança dos parâmetros também foram calculados.

Apesar da estimativa de parâmetros cinéticos ser classicamente formulada como um problema do tipo mínimos quadrados, algumas hipóteses devem ser observadas para o uso apropriado de tal método com rigor estatístico (Van Boekel, 1996):

1. O modelo  $\eta$  é exato, possui forma funcional conhecida e é constituído apenas por variáveis significativas para o cálculo de sua resposta.



2. As respostas experimentais observadas, ou variáveis dependentes,  $\underline{Y}$  ( $\underline{Y} = [Y_1, Y_2, \dots, Y_n]$ ), são representadas pelas respostas do modelo  $\underline{\eta}$  acrescidas de um erro experimental  $\underline{\varepsilon}$  não-observável e aleatório:

$$\underline{Y} = \underline{\eta}(\underline{z}_i, \underline{\beta}) + \underline{\varepsilon} \quad (2.29)$$

Sendo:  $\underline{z}$  – a matriz de variáveis independentes com dimensão  $n \times q$ , isto é,  $n$  observações experimentais e  $q$  variáveis independentes;  $\underline{\beta}$  – um vetor com os  $m$  parâmetros do modelo  $\underline{\eta}$ .

3. Cada medida da variável independente  $\underline{z}$  é exata, ou seja, não possui erro experimental associado. Geralmente, em estudos cinéticos, o tempo da reação e as concentrações iniciais dos componentes presentes caracterizam as variáveis independentes e, nesse caso, a hipótese de erro nulo associado é admissível ou controlável (ou ao menos com erro muito menor que o associado à variável dependente  $\underline{Y}$ ).
4. A distribuição dos erros experimentais associados a  $\underline{Y}$  é normal. Isto é, se  $r$  replicatas do experimento forem realizadas, a distribuição para cada variável independente  $Y_i$  medida  $r$  vezes terá uma forma funcional gaussiana. A hipótese 4 merece especial atenção quando métodos de transformação de variáveis são aplicados em  $\underline{Y}$ . A transformação logarítmica, por exemplo gráficos de Lineweaver-Burk para dados de velocidades iniciais, pode levar uma distribuição originalmente gaussiana a apresentar uma forma funcional diferente (não gaussiana). A soma, subtração e multiplicação são as únicas transformações que não alteram uma distribuição originalmente gaussiana. As variáveis independentes podem sofrer alterações sem problemas, desde que a hipótese 3 seja respeitada.
5. Os pontos experimentais amostrados não possuem erros sistemáticos associados.
6. Os erros nas medidas não são correlacionados, ou seja, a medida  $Y_i$  não depende da medida  $Y_{i-1}$ .

Observadas as hipóteses listadas acima, comumente todo problema de estimativa de parâmetros recai em um caso de otimização descrito por uma função-objetivo  $\phi$  do tipo

mínimos quadrados ponderados (Equação 2.30). A rotina de otimização então busca, basicamente, encontrar o conjunto de parâmetros  $\underline{\beta}^*$  que minimize a diferença residual entre os dados experimentais  $\underline{Y}$  e os preditos pelo modelo em questão  $\underline{\eta}$ , isto é:

$$\phi = \sum_{i=1}^n w_i [Y_i - \eta_i(\underline{z}_i, \underline{\beta})]^2 \quad (2.30)$$

Sendo:  $w_i$  – um peso para cada observação experimental  $Y_i$  (tipicamente,  $w_i = 1 / \sigma_{Y_i}^2$ ).

Somente na observação de todas as hipóteses previamente listadas, minimizar a função-objetivo da equação acima é equivalente a maximizar uma função densidade de probabilidade com o método da máxima verossimilhança na busca do conjunto ótimo de parâmetros  $\underline{\beta}^*$  (Himmelblau, 1970).

Quando o modelo é composto por apenas uma variável dependente, é comum adotar  $w_i = 1$  para todas as medidas na Equação 2.30 e a variância  $\sigma_Y^2$  é calculada a posteriori no procedimento de ajuste de acordo com a Equação 2.31 (nesse caso:  $\sigma_Y^2 = \sigma_{Y_1}^2 = \sigma_{Y_2}^2 = \dots = \sigma_{Y_n}^2$ ).

$$\sigma_Y^2 = \frac{1}{n-m} \sum_{i=1}^n [Y_i - \eta_i(\underline{z}_i, \underline{\beta})]^2 \quad (2.31)$$

### 2.2.8.1 – Cálculos dos intervalos e das regiões de confiança dos parâmetros

Determinar o conjunto ótimo de parâmetros  $\underline{\beta}^*$  que minimize a função-objetivo  $\phi$  é apenas parte do problema de otimização paramétrico. Em muitos casos, uma análise estatística dos parâmetros ajustados faz-se necessária para a compreensão de seus valores nominais e da limitação do modelo em pauta.

Para avaliação da região de confiança paramétrica, o método clássico adotado na literatura emprega durante seu procedimento de cálculo a matriz variância-covariância  $\underline{Cvr}$  definida na Equação 2.32 (Himmelblau, 1970):

$$\underline{Cvr} = (\underline{X}^T \cdot \underline{V}_Y^{-1} \cdot \underline{X})^{-1} \quad (2.32)$$

Na Equação 2.32,  $\underline{\underline{V}}_Y$  representa a matriz de covariância das medidas experimentais associadas a  $\underline{Y}$ . Assumindo que as medidas não são correlacionadas,  $\underline{\underline{V}}_Y$  torna-se uma matriz diagonal constituída pelas variâncias  $\sigma_{Y_i}^2$ . Para um modelo composto apenas por uma variável dependente, é comum  $\underline{\underline{V}}_Y$  ser representada por uma matriz identidade.

Ainda com relação ao cálculo da matriz  $\underline{\underline{C}}_{vr}$ ,  $\underline{X}$  representa a matriz de sensibilidade paramétrica do modelo definida na equação abaixo. Os valores das derivadas  $\frac{\partial \eta_{i,j}}{\partial \beta_{i,j}}$  que compõem a matriz de sensibilidade são tipicamente estimados numericamente para os casos não-lineares (Edgar *et al.*, 2001).

$$\underline{\underline{X}} = \begin{bmatrix} \left( \frac{\partial \eta_1}{\partial \beta_1^*} \right) & \cdots & \left( \frac{\partial \eta_1}{\partial \beta_m^*} \right) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \left( \frac{\partial \eta_n}{\partial \beta_1^*} \right) & \cdots & \left( \frac{\partial \eta_n}{\partial \beta_m^*} \right) \end{bmatrix} \quad (2.33)$$

A abordagem clássica aproxima a região de confiança por uma função quadrática (forma funcional da função-objetivo), ou seja, na proximidade de  $\underline{\beta}^*$  o modelo é considerado linear com relação a  $\underline{\beta}$ . Nesse caso, a região é definida pelo hiperelipsóide gerado a partir das soluções  $\underline{\Omega}$  da seguinte equação matricial para uma dada estatística  $F_{m,n-m}^{1-\alpha}$  de Fisher (com nível de confiança  $\alpha$ ,  $m$  parâmetros e  $n - m$  graus de liberdade; Himmelblau, 1970):

$$(\underline{\Omega} - \underline{\beta}^*)^T (\underline{\underline{C}}_{vr}^{-1}) (\underline{\Omega} - \underline{\beta}^*) \leq \phi^* \frac{m}{n - m} F_{m,n-m}^{1-\alpha} \quad (2.34)$$

Sendo:  $\phi^*$  – o valor da função-objetivo avaliada em  $\underline{\beta}^*$ .

O desvio-padrão  $\sigma_i$  de cada parâmetro  $\beta_i^*$ ,  $i = 1, 2, \dots, m$ , e seu intervalo de confiança  $\delta_i$  são então calculados, respectivamente, pelas equações 2.35 e 2.36. Nessa abordagem implicitamente se supõe que os parâmetros não são correlacionados, uma vez que, de acordo com a Equação 2.35, a variância de cada parâmetro é numericamente igual ao elemento diagonal da matriz variância-covariância  $\underline{\underline{C}}_{vr}$ .

$$\sigma_i = \sqrt{Cvr(i, i)} \quad (2.35)$$

$$\delta_i = \pm t_{n-m}^{1-(\alpha/2)} \sqrt{Cvr(i, i)} \quad (2.36)$$

Sendo:  $t_{n-m}^{1-(\alpha/2)}$  – proveniente da distribuição  $t$  de Student.

A partir da matriz variância-covariância  $\underline{\underline{Cvr}}$  também é possível obter uma análise qualitativa da correlação entre os parâmetros, onde cada elemento  $c$  da matriz de correlação paramétrica é definido como:

$$c(i, j) = \frac{Cvr(i, j)}{\sqrt{[Cvr(i, i)Cvr(j, j)]}}; i = 1, \dots, m; j = 1, \dots, m. \quad (2.37)$$

A matriz de correlação paramétrica permite um diagnóstico mais rigoroso da qualidade do ajuste. Valores de  $c$  em módulo próximos de zero sugerem que a estimação paramétrica foi eficiente, valendo a conclusão contrária à medida que o valor de  $c$  se aproxima de 1. Em contrapartida, para os casos não-lineares muitas vezes a alta correlação paramétrica é inerente ao modelo e a redução na dimensão paramétrica do mesmo é inadequada sob pena de perda de sua consistência.

Correlações entre os parâmetros acima de 0,99 em módulo indicam que a matriz resultante do produto matricial  $\underline{\underline{X}}^T \cdot \underline{\underline{V}}_Y^{-1} \cdot \underline{\underline{X}}$  pode ser singular. Tal comportamento, que ocorre com certa frequência nos modelos não-lineares, prejudica toda a análise estatística baseada na matriz de covariância devido a erros numéricos durante o procedimento de inversão da matriz  $\underline{\underline{X}}^T \cdot \underline{\underline{V}}_Y^{-1} \cdot \underline{\underline{X}}$  (Rodriguez-Fernandez *et al.*, 2006).

A região de confiança paramétrica definida na Equação 2.34 e o intervalo de confiança simétrico  $\delta_i$  estimado de acordo com a Equação 2.36 serão tão precisos quanto a aproximação linear do modelo na região de  $\underline{\underline{\beta}}^*$ , ou seja, o valor é inexato para casos não-lineares, que podem, inclusive, apresentar intervalos de confiança “reais” assimétricos (Johnson, 1983).

Johnson, 1983, propôs a busca da região de confiança sem o uso de uma forma funcional pré-definida. Nesse procedimento, intervalos de confiança eram procurados apenas na direção de cada parâmetro  $\beta_i$  sob a condição de que a razão entre as variâncias calculadas

em  $\underline{\beta}$  e  $\underline{\beta}^*$  fosse menor ou igual a uma estatística  $F_{m,n-m}^{1-\alpha}$  definida a priori (se as incertezas de ambas as variâncias seguem uma distribuição *chi-quadrado*, a razão entre elas apresenta uma distribuição F de Fisher). Os intervalos de confiança obtidos com tal metodologia eram então comparados com os das projeções em cada eixo paramétrico do hiperelipsóide da Equação 2.34, e o maior valor era adotado para o intervalo do parâmetro  $\beta_i^*$ . Como o tempo de processamento requerido pelo método é proporcional ao número de parâmetros  $m$ , a busca pode se tornar computacionalmente lenta para problemas com  $m$  muito elevado (Van Boekel, 1996).

Também fundamentados na aproximação quadrática da função-objetivo e observando a distribuição F, Schwaab *et al.*, 2008, sugerem o emprego da Equação 2.38 para o cômputo da região de confiança, cuja forma não é restringida à elíptica (critério de Beale – Beale, 1960). Quanto ao tempo de processamento, os autores ponderam que com o auxílio de um método de otimização estocástico durante o procedimento de ajuste, um elevado número de pontos é avaliado na região de  $\underline{\beta}^*$  e, portanto, podem satisfazer a equação abaixo. Dessa forma, tem-se como aliada uma das maiores desvantagens dos métodos estocásticos, que é o elevado número de avaliações da função-objetivo durante o processo de busca.

$$\phi \leq \phi^* \left( 1 + \frac{m}{n-m} F_{m,n-m}^{1-\alpha} \right) \quad (2.38)$$

As metodologias discutidas até este ponto do texto, baseadas na comparação do espaço das variâncias ou da função-objetivo para uma dada estatística de corte  $F_{m,n-m}^{1-\alpha}$ , só são válidas sob a hipótese de que as incertezas paramétricas seguem uma distribuição normal, isto é, se o experimento for repetido muitas vezes, cada repetição fornecerá um valor  $\beta_i$ , e o conjunto de valores para o parâmetro  $\beta_i$  será normalmente distribuído (Alper e Gelb, 1990). Tal hipótese é factível se os erros associados às medidas também assumirem uma distribuição normal e o modelo for linear com relação a  $\beta_i$  (ou linearizado na região de  $\beta_i^*$ ).

Se uma estimativa da magnitude do erro experimental associado à medida  $Y_i$  for conhecida, a função de distribuição dos parâmetros  $\underline{\beta}^*$  também pode ser obtida a partir de *simulações de Monte Carlo* (Straume e Johnson, 1992; Alper e Gelb, 1990). Nesse caso, a partir de dados experimentais simulados ou “sintéticos” é possível obter a função de probabilidade dos parâmetros, que pode ou não assumir uma distribuição normal. Alper e

Gelb, 1990, propuseram os seguintes passos para implementação do método (adotando incertezas apenas nas medidas das variáveis dependentes):

**1.** Com um algoritmo de programação não-linear, estimar o conjunto ótimo de parâmetros  $\underline{\beta}^*$ .

**2a.** Gerar um conjunto de dados “sintéticos”  $\underline{Y}^k$  de acordo com a seguinte equação:

$$\underline{Y}^k = \underline{Y} + \underline{e}^k \quad (2.39)$$

Sendo:  $\underline{Y}$  – as  $n$  observações experimentais,  $\underline{Y} = [Y_1, Y_2, \dots, Y_n]$ ;  $\underline{Y}^k$  – o  $n$  dados sintéticos gerados na iteração  $k$  do método,  $\underline{Y}^k = [Y_1^k, Y_2^k, \dots, Y_n^k]$ ;  $\underline{e}^k$  – um conjunto de erros aleatórios da iteração  $k$ ,  $\underline{e}^k = [e_1^k, e_2^k, \dots, e_n^k]$ , sendo que  $e_i^k$  deve ser da mesma ordem de grandeza do erro experimental de  $Y_i$ .

Como sugestão dos autores, a Equação 2.40 pode ser utilizada para cálculo de  $\underline{e}^k$  (método de Box-Muller):

$$e_i^k = \sigma_{Y_i} [-2 \ln(r_1)]^{1/2} \cos(2\pi r_2); \quad (i = 1, \dots, n) \quad (2.40)$$

Sendo:  $\sigma_{Y_i}$  – o desvio-padrão associado a cada medida experimental  $Y_i$ .  $r_1$  e  $r_2$  – dois números aleatório obtidos a partir de uma distribuição uniforme em  $[0,1]$ .

Na Equação 2.40, o termo  $[-2 \ln(r_1)]^{1/2} \cos(2\pi r_2)$  possui uma distribuição uniforme com média = 0 e variância = 1, ou seja,  $E\{e_i^k\} = 0$ .

**2b.** Com o mesmo algoritmo de programação não-linear empregado no passo **1**, estimar o conjunto ótimo de parâmetros  $\underline{A}^k$  para os dados “sintéticos”  $\underline{Y}^k$ .

**3.** Repetir  $L$  vezes o passo **2**.

Após um total de  $L$  simulações, a ordenação numérica de cada coluna da matriz  $\underline{A}$  (dimensão  $L$  por  $m$ ) representa por definição a função de distribuição de cada parâmetro  $\beta$  (Alper e Gelb, 1990). Assumindo que a distribuição para cada parâmetro seja idêntica em

torno da média, o intervalo de confiança pode ser estimado com base no desvio-padrão calculado para cada coluna de  $\underline{A}$ .

O procedimento de cálculo proposto por Alper e Gelb, 1990, indica que para uma função de distribuição factível, maior será o número de simulações necessário à medida que se aumentar o nível de confiança  $\alpha$  do intervalo (68,3%, 90%, 95%, etc.). Como regra prática, o número de simulações  $L$  deve ser incrementado até garantir que os intervalos de confiança estimados pelo método permaneçam invariantes.

Como a cada iteração uma nova busca dos parâmetros é realizada (passo **2b**), o método demanda um tempo elevado de processamento computacional para problemas não-lineares de complexidade moderada. Por outro lado, com o método de *Monte Carlo* estimativas mais precisas dos intervalos podem ser obtidas quando comparado com os enfoques tradicionais baseados na linearização do modelo na região do ajuste, pois se eliminam as considerações de que as incertezas dos parâmetros também sigam uma distribuição normal e de que a variância do ajuste representa a variância experimental (Sung *et al.*, 2004; Van Boekel, 1996; Straume e Johnson, 1992; Alper e Gelb, 1990).

A menos que explicitado, qualquer desvio-padrão ou intervalo de confiança apresentado na seção de resultados deste capítulo foi calculado, respectivamente, de acordo com as equações 2.35 e 2.36 (aproximação linear do modelo baseado na matriz variância-covariância). Por outro lado, em virtude da importância do tópico, o item 2.3.1.1 (Tabela 2.1, página 55) apresenta um estudo de caso comparativo onde os intervalos de confiança  $\delta$  calculados segundo a Equação 2.36 também foram avaliados via simulações de *Monte Carlo*.

## 2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 – PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE LIGAÇÕES HIDROLISADAS DURANTE A PROTEÓLISE COM QUIMOTRIPSINA-GLIOXIL-AGAROSE

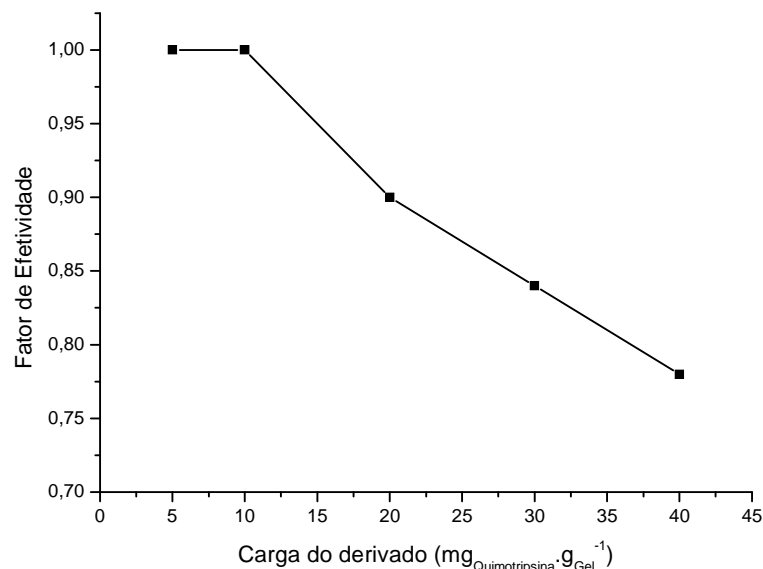
Como será aprofundado no decorrer desta subseção, o estudo cinético da hidrólise das proteínas do soro de queijo concentrado com a enzima quimotripsina imobilizada em matriz inerte de glioxil-agarose mostrou-se peculiar. Galvão, 2004, já havia relatado particularidades para a reação durante a busca por um modelo genérico que representasse o comportamento do sistema. Como o uso de equações derivadas a partir da hipótese pseudo-estacionária de Briggs-Haldane para os complexos intermediários, tipo Michaelis-Menten, apresentaram limitações na predição temporal da concentração molar de ligações hidrolisadas,  $C_P$ , a autora propôs um enfoque *ad-hoc* para expressar as velocidades da reação. Com parâmetros cinéticos aparentes, a modelagem empírica representou a evolução de  $C_P$  com precisão nos ensaios de validação em reator batelada.

Apesar de expressões empíricas serem comumente empregadas para modelar a cinética de reações proteolíticas, a elaboração de um modelo mecanístico, quando possível, sempre apresentará vantagens para qualquer estudo cinético: o significado físico dos parâmetros ajustados, uma melhor interpolação no domínio experimental, além da possibilidade de aprofundar o conhecimento da dinâmica do sistema e explorar melhorias (Maria, 2004).

Na hidrólise de proteínas do soro de queijo concentrado a 55 °C, a quimotripsina na sua forma solúvel apresenta um tempo de meia-vida inferior a 50 minutos (Galvão *et al.*, 2001). Com esse quadro, a metodologia clássica para estimativa de parâmetros cinéticos intrínsecos fica impraticável: no curso da reação não é possível distinguir em que parcela contribuem para queda na velocidade da reação os efeitos inibitórios e a redução na atividade da enzima solúvel. Além disso, e mais importante, a imobilização pode promover mudanças – mesmo que mínimas – na estrutura tridimensional e na afinidade da enzima pelo(s) substrato(s) e inibidor(es) e, portanto, os parâmetros cinéticos intrínsecos para a quimotripsina solúvel não seriam idênticos aos inerentes para o catalisador imobilizado (Berendsen *et al.*, 2006; Blanch e Clark, 1997).



Para o derivado quimotripsina-glioxil-agarose (14000 vezes mais estável que a quimotripsina solúvel), Galvão, 2004, também estudou o fator de efetividade em função da carga do suporte, Figura 2.7. Na metodologia descrita pela autora, considerou-se que o derivado com  $5 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  estaria livre de possíveis efeitos difusivos e, desse modo, foi considerado como derivado padrão. As efetividades mostradas na figura abaixo foram então calculadas como a razão entre a velocidade inicial medida para cada derivado e o padrão. Como o catalisador com  $10 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  também apresentou efetividade unitária, concluiu-se que os efeitos difusivos para derivados com cargas inferiores são reduzidos. Com uma velocidade de agitação experimental próxima de 750 r.p.m. estão praticamente eliminadas as resistências ao transporte de massa no filme externo às partículas (Galvão *et al.*, 2008).



**Figura 2.7:** Fator de Efetividade em função da carga enzimática do suporte glioxil-agarose para a quimotripsina imobilizada. Condições da reação: 25 mL de soro de queijo concentrado ( $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1,5 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$  (Galvão, 2004).

No primeiro item desta seção, com um derivado de baixa carga ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) e, portanto, livre de efeitos difusivos, mostra-se que só foi possível modelar a cinética da reação em pauta, com o mecanismo proposto na Equação 2.14, quando se relaxa a hipótese de Briggs e Haldane, a qual supõe o estado pseudo-estacionário para as espécies enzimáticas ( $E$ ,  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$ ).

Já o derivado com carga de  $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  apresentou efetividade da ordem de 80% (vide Figura 2.7). Para aplicações industriais, como a biorefinaria do soro de queijo, o objetivo é sempre trabalhar com derivados de alta carga, onde se obtêm altas concentrações de enzima por volume de gel. Portanto, para a modelagem cinética coerente do reator com catalisador de alta carga, ou se estimam parâmetros aparentes, ou limitações pelo transporte de massa no interior do gel de agarose devem ser consideradas.

Com o mesmo mecanismo reacional aplicado para o derivado de baixa carga, porém agora com um catalisador contendo  $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}}$  por grama de gel de agarose (alta carga), comparou-se no segundo item a capacidade de predição do modelo com parâmetros aparentes e com a inclusão de efeitos difusivos intra-partícula. Novamente, com o enfoque dado por Briggs e Haldane, mostra-se a limitação da equação do tipo Michaelis-Menten na tentativa de representar a cinética da reação. Resultados consistentes só foram alcançados quando a hipótese do estado pseudo-estacionário foi relaxada e o sistema completo de EDOs derivado a partir do mecanismo reacional proposto foi utilizado para o cálculo da velocidade proteolítica (equações 2.15a a 2.20a).

Como as funções-objetivo nesta seção apresentaram característica multimodal, quatro algoritmos de busca foram utilizados em paralelo durante os procedimentos de ajuste paramétrico à guisa de evitar mínimos locais: Levenberg-Marquardt (LM), *Simulated Annealing* (SA), Enxame de Partículas (PSO) e Evolução Diferencial (ED). Os desempenhos dos algoritmos para os problemas estudados nesta subseção são comparados no item 2.3.1.3.

Durante a leitura da seção é importante manter em mente que os ensaios nela apresentados foram realizados com o objetivo primeiro de definir um modelo cinético que representasse a cinética da reação em condições experimentais próximas de condições industriais, ou seja, com altas concentrações de enzima no reator. Outros experimentos poderiam ser conduzidos com concentrações menores de enzima para se verificar, por exemplo, um limite prático para a hipótese pseudo-estacionária dos componentes intermediários da proteólise, em contrapartida, não teriam utilidade prática para os objetivos aqui pré-definidos: um modelo realista que proporcionasse um melhor entendimento da hidrólise em condições próximas das de operação do reator enzimático.

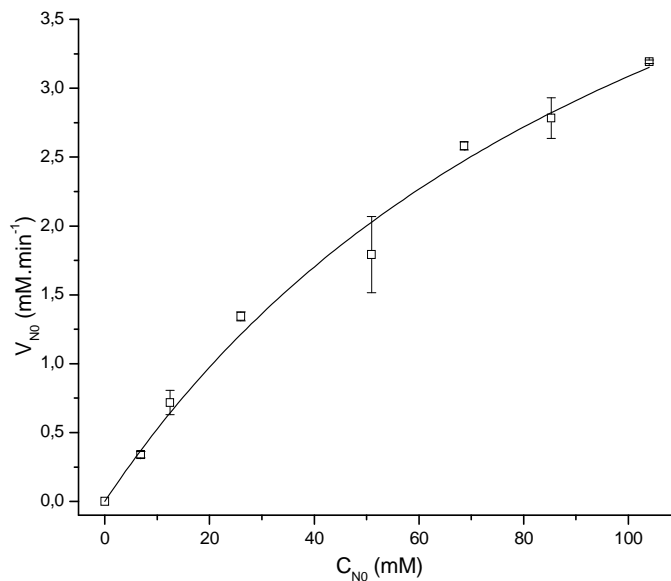
### 2.3.1.1 – Modelagem Cinética com Derivado de Baixa Carga

Na tentativa de se modelar a cinética da reação com um derivado contendo  $3 \text{ mg}$  de quimotripsina por grama de gel glioxil-agarose, foram realizados ensaios de velocidades

iniciais (triplicatas). Para o estudo com esse catalisador, também foram utilizados dois ensaios de longa duração (300 minutos), que se diferenciavam em relação à concentração inicial de proteínas no soro: **ensaio 1** contendo  $7,27 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e **ensaio 2** com  $15,03 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

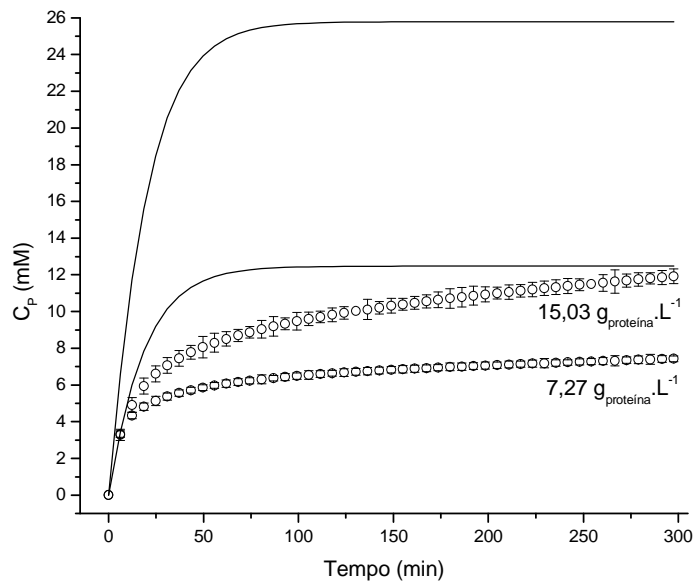
Os dados de velocidades iniciais foram utilizados para estimar os parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  da Equação 2.21 (assumindo concentração inicial nula do produto;  $C_P = 0$ ). O resultado do ajuste cinético é mostrado na Figura 2.8 com os seguintes parâmetros:  $k = 6,74 \pm 1,2 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 118,35 \pm 35,2 \text{ mM}$  e  $K_N = 1,0 \times 10^5 \text{ mM}$ .

O elevado valor de  $K_N$  para o ajuste na figura abaixo sugere pouca influência da inibição pela concentração inicial de substrato na reação ( $C_{N0}$ ). O valor fixado para  $K_N$  é, na prática, a restrição superior definida durante seu ajuste ( $1,0 \times 10^5 \text{ mM}$ ; vide Tabela 2.2 na página 75). Em contrapartida, na Figura 2.9 a integração numérica da Equação 2.21 com os parâmetros estimados via os dados de velocidades iniciais indica claramente o efeito de inibição pelo produto ( $C_P$ ).



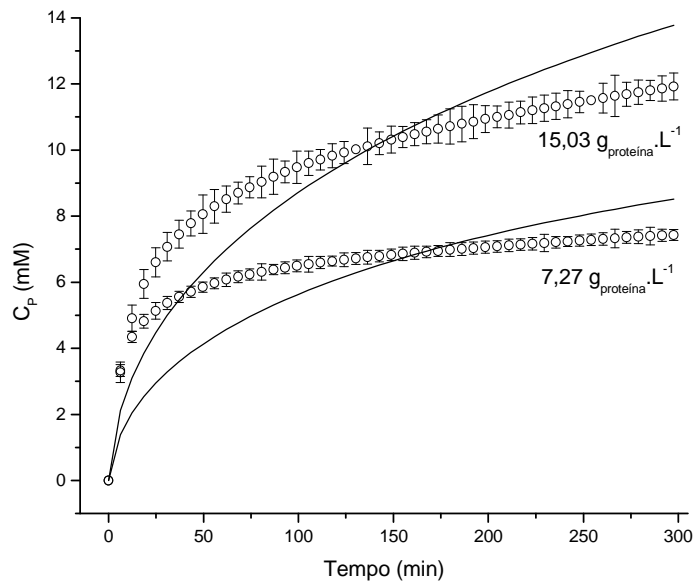
**Figura 2.8:** Velocidades iniciais durante hidrólises das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 10 mL de soro concentrado ( $4\text{-}60 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) eram hidrolisados com  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$  durante 3 min utilizando o método do pHstato. Modelo (—): Michaelis-Menten com inibição por substrato (Equação 2.21;  $k = 6,74 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 118,35 \text{ mM}$ ;  $K_N = 1,0 \times 10^5 \text{ mM}$ ).

Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.



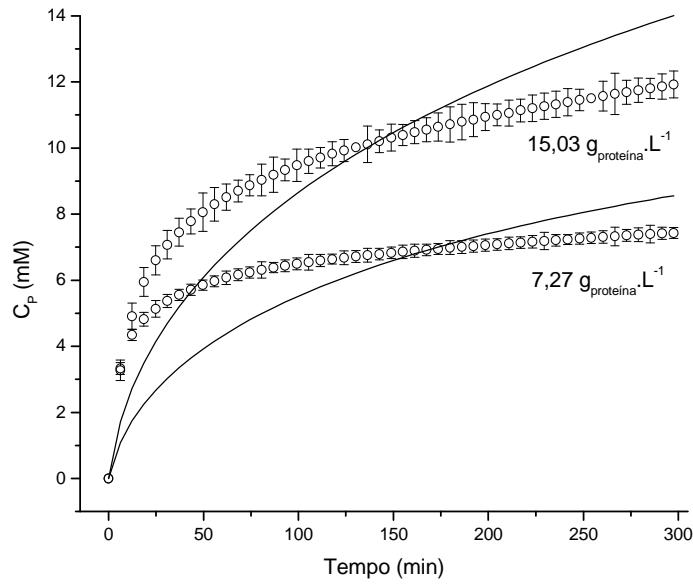
**Figura 2.9:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato, concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  (Equação 2.21;  $k = 6,74 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 118,35 \text{ mM}$ ;  $K_N = 1,0 \times 10^5 \text{ mM}$ ;  $K_P \rightarrow \infty$ ). Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

Fixados os parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  obtidos com os dados de velocidades iniciais, estimou-se o parâmetro de inibição pelo produto da Equação 2.21 com os dois experimentos de longa duração. Nesse caso, o problema de otimização paramétrica era definido de acordo com Equação 2.22, de modo a encontrar o valor de  $K_P$  que proporcionasse o melhor ajuste para ambos os ensaios simultaneamente. O resultado do ajuste na Figura 2.10 ( $K_P = 0,37 \pm 2,0 \times 10^{-2} \text{ mM}$ ), mostra desvios sistemáticos relevantes entre modelo e dados experimentais para ambos os ensaios.



**Figura 2.10:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato, concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  (Equação 2.21 – ajuste de  $K_P$ ;  $k = 6,74 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 118,35 \text{ mM}$ ;  $K_N = 1 \times 10^5 \text{ mM}$ ;  $K_P = 0,37 \text{ mM}$ ).  $\phi = 2,21 \times 10^3$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

Mesmo quando os quatro parâmetros da Equação 2.21 são ajustados diretamente nos dois ensaios de longa duração (sem utilização dos dados de velocidades iniciais), desvios sistemáticos entre modelo e dados experimentais persistem para  $k = 22,57 \pm 1 \times 10^4 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 962,32 \pm 5 \times 10^5 \text{ mM}$ ;  $K_N = 2,66 \pm 1 \times 10^3 \text{ mM}$  e  $K_P = 1,02 \pm 3,1 \text{ mM}$  (Figura 2.11).

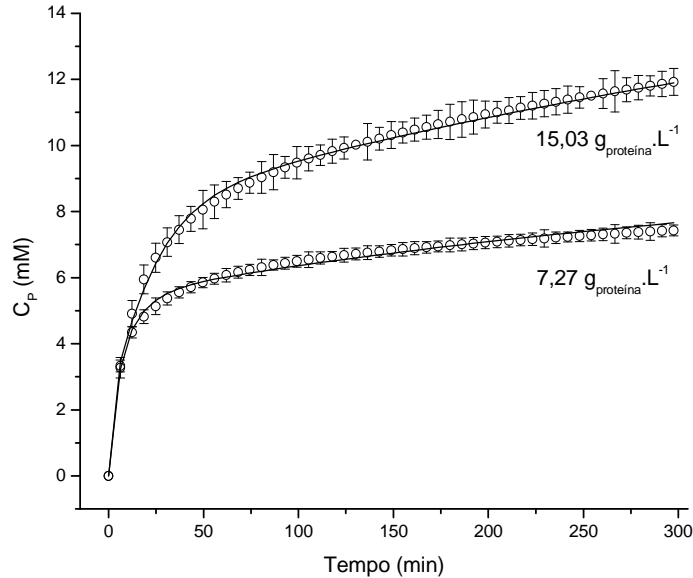


**Figura 2.11:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato, concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  (Equação 2.21 – ajuste simultâneo dos quatro parâmetros;  $k = 22,57 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 962,32 \text{ mM}$ ;  $K_N = 2,66 \text{ mM}$ ;  $K_P = 1,02 \text{ mM}$ ).  $\phi = 2,77 \times 10^3$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

Os resultados apresentados anteriormente sugerem que, para as condições experimentais empregadas nos ensaios de longa duração, o modelo de Michaelis-Menten com inibição mista por substrato e produto não se aplica. Apesar da Equação 2.21 representar com relativa precisão as velocidades iniciais da reação em pauta em função da concentração de substrato inicial (Figura 2.8), quando a mesma equação é utilizada para os ensaios de longa duração, a integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  mostra desvios sistemáticos significativos com relação aos pontos experimentais (Figura 2.9 a Figura 2.11). Como já discutido, acredita-se que com um derivado contendo  $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ , os efeitos difusivos na velocidade da reação estariam eliminados ou, em última análise, muito reduzidos e, logo, um modelo puramente cinético derivado a partir da hipótese do estado pseudo-estacionário seria suficiente para prever as velocidades da reação se tal hipótese fosse observada.

A comparação entre dados experimentais e respostas da integração numérica do modelo na Figura 2.12 mostra que previsões acuradas de  $C_P$  ao longo do tempo foram obtidas quando a hipótese do estado pseudo-estacionário foi relaxada para o mecanismo reacional da

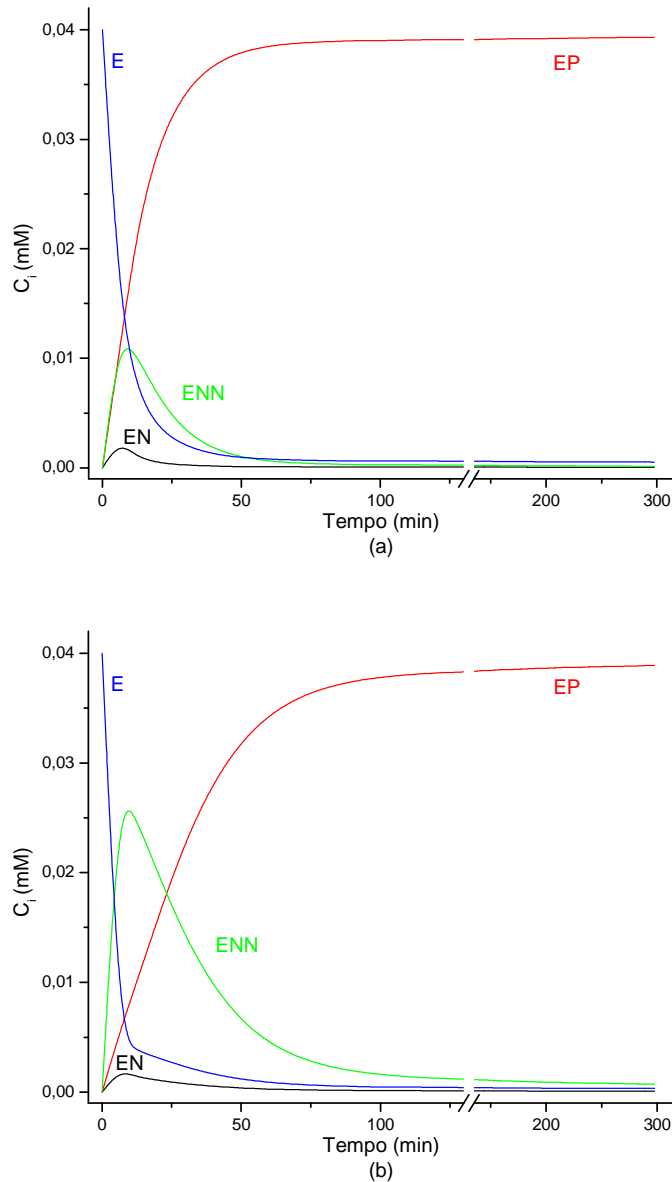
Equação 2.14 e o sistema completo de equações diferenciais ordinárias é utilizado na estimativa de seus parâmetros (equações 2.15a a 2.20a):



**Figura 2.12:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato, concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a – ajuste simultâneo dos sete parâmetros;  $k_I = 2,228 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 4,620 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 122,79 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 4,546 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 4,570 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 6,008 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 9,646 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ).  $\phi = 21,75$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

Os perfis simulados de concentração de enzima e dos complexos enzimáticos, mostrados na próxima figura, sugerem um tempo relativamente elevado para que os componentes  $E$ ,  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$  atinjam seus estados estacionários para ambos os ensaios contemplados. De fato, é prevista na teoria da cinética enzimática uma fase pré-estacionária que precede a fase pseudo-estacionária para os complexos enzimáticos, porém com ordem de grandeza “bem menor” que essa última (Noethen e Walcher, 2007). Entretanto, para os perfis aqui simulados ambas as fases apresentam ordens de grandeza elevadas e semelhantes e, portanto, a fase pré-estacionária não poderia ser negligenciada – uma das condições para derivação da equação de Michaelis-Menten (Schulz, 1994). Com relação à duração da fase pré-estacionária, valores próximos de 100 minutos são observados na Figura 2.13, o que seria um período demasiadamente alto mesmo para a proteólise aqui estudada (de maneira geral,

relatos na literatura dão conta de valores na ordem de *milisegundos* para a fase pré-estacionária; Blanch e Clarck, 1997).

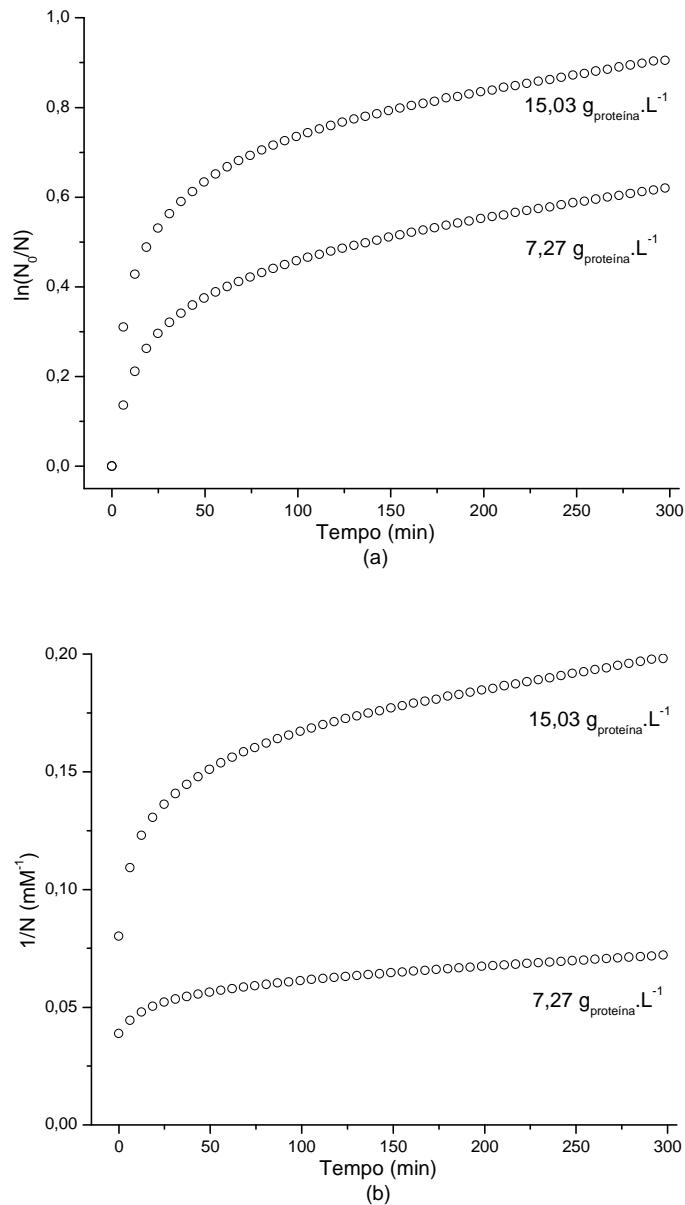


**Figura 2.13:** Evolução da concentração dos componentes,  $C_E$ ,  $C_{EN}$ ,  $C_{EP}$ ,  $C_{ENN}$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato, concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . (a)  $7,27 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b)  $15,03 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a;  $k_I = 2,228 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 4,620 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 122,79 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 4,546 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 4,570 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 6,008 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 9,646 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ).



Outra condição para obtenção da Equação 2.21 versa sobre a relação enzima/substrato inicial ser suficientemente “pequena”. Os valores de trabalho para os experimentos com  $7,27 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e com  $15,03 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  foram, respectivamente, de  $3,2 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{mmol}_{\text{NO}}^{-1}$  e de  $1,6 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{mmol}_{\text{NO}}^{-1}$ . Quando efeitos inibitórios estão presentes na reação, são raros na literatura critérios estabelecidos para adoção do modelo pseudo-estacionário e, por conseguinte, para mensurar o quão pequena deva ser a relação enzima/substrato inicial. Mesmo para o modelo simples  $E + S \rightleftharpoons ES \Rightarrow E + P$ , sem inibidores, apesar de alguns autores sugerirem que valores abaixo de  $10^{-2}$  para E/S são suficientes (Schnell e Maini, 2003), um tratamento matemático amplo sobre o tema ainda permanece em aberto (Noethen e Walcher, 2007). Por outro lado, a ordem de grandeza de  $10^{-3}$  para E/S, também mantém o estudo distante das técnicas aplicadas quando as concentrações de enzima e substrato possuem a mesma ordem de grandeza (Schnell e Maini, 2000; Blanch e Clarck, 1997).

Outro fenômeno que afetaria a dinâmica do início da reação e não considerado no mecanismo reacional com inibição mista por substrato e produto seria o efeito “zipper”, onde a hidrólise das primeiras ligações – *fase lenta* – serve para “abrir” a proteína e expor resíduos hidrofóbicos que serão posteriormente atacados – *fase rápida*, porém já na presença de inibidores (Vorob’ev *et al.*, 1996). No caso de uma cinética tipo “zipper”, Vorob’ev *et al.*, 1996, mostraram que, ao menos no início da reação, a velocidade da mesma seria de primeira ordem com relação à concentração de substrato, fato que não é observado de acordo com a análise da Figura 2.14 para velocidades de reação de primeira e segunda ordem. Se a reação seguisse uma tendência de primeira ou segunda ordem, a relação entre a abscissa e a ordenada de cada gráfico na Figura 2.14 seria linear; ainda, os dados deveriam se sobrepor para ambos os ensaios (independente da concentração inicial de substrato).



**Figura 2.14:** Análise dos dados experimentais na investigação da ordem da reação. (a)

cinética de primeira ordem:  $\ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = k.t$ ; (b) cinética de segunda ordem:  $\frac{1}{N} = k.t$ . Se a

cinética fosse de primeira ou segunda ordem, a tendência dos dados seria linear com relação ao tempo para um dos casos.

Do ponto de vista prático, o conjunto de EDOs sem a adoção do estado pseudo-estacionário para os complexos enzimáticos conseguiu efetivamente representar a dinâmica dos dois experimentos. Deve-se ressaltar, entretanto, que o uso de um pseudocomponente (concentração de ligações hidrolisáveis) como substrato dificulta a interpretação mecanística

dos resultados cinéticos. Com isso, a conclusão de que a etapa pré-estacionária é de fato longa, como mostram as simulações na Figura 2.13, deve ser colocada em perspectiva, pois não se está quantificando a concentração de um produto (ou reagente) controlado. Assim, técnicas experimentais para detecção da evolução da reação na fase pré-estado estacionário (por exemplo, métodos do tipo *stopped flow*, *rapid quenching*, dentre outros – Blanch e Clark, 1997) não são aplicáveis aqui, uma vez que o grau de hidrólise, medido em pHstato, é dado pelo volume de base adicionada para manter constante o pH, e esse controlador tem sua própria dinâmica. Provavelmente, os longos tempos para estabilização das concentrações dos intermediários, mostrados na Figura 2.13, refletem vários fenômenos – incluindo possíveis efeitos alostéricos, alterações na cinética conforme diminui o tamanho médio dos peptídeos hidrolisados e, ainda, por que não, uma real demora no estabelecimento de um estado pseudo-estacionário para um substrato complexo como este.

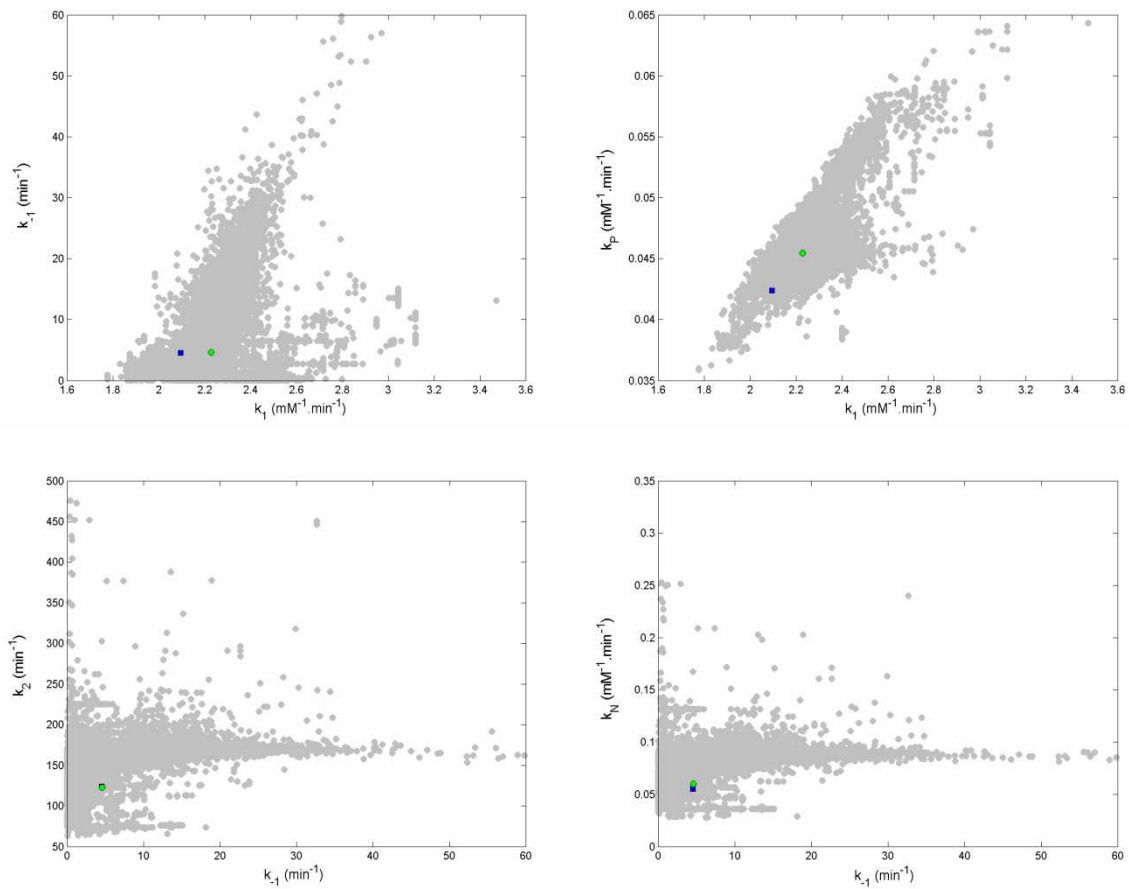
A Tabela 2.1 apresenta os parâmetros cinéticos para os resultados mostrados na Figura 2.12 e Figura 2.13. São também comparados os intervalos de confiança dos parâmetros quando estimados com auxílio da matriz covariância (Equação 2.36) e via simulações de Monte Carlo ( $L \approx 12000$  simulações).

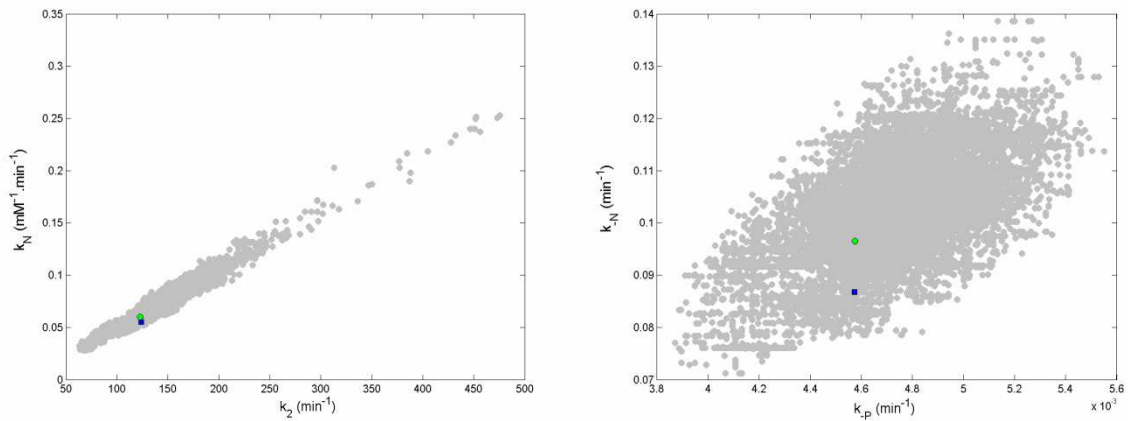
**Tabela 2.1:** Parâmetros cinéticos e intervalos de confiança para o sistema completo de EDOs (equações 2.15a a 2.20a).

Parâmetros	Intervalo de Confiança (95 %)	
	Calculado com o elemento diagonal da Matriz Covariância	Obtido via Simulações de Monte Carlo ( $L \approx 12000$ simulações)
$K_I = 2,228 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$\pm 11$	$\pm 0,25$
$k_{-I} = 4,620 \text{ min}^{-1}$	$\pm 629$	$\pm 1,22$
$k_2 = 122,79 \text{ min}^{-1}$	$\pm 1042$	$\pm 20,0$
$k_P = 4,546 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$\pm 5,29 \times 10^{-2}$	$\pm 0,58 \times 10^{-2}$
$k_{-P} = 4,570 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$\pm 0,79 \times 10^{-3}$	$\pm 0,48 \times 10^{-3}$
$k_N = 6,008 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$\pm 56 \times 10^{-2}$	$\pm 0,94 \times 10^{-2}$
$k_{-N} = 9,646 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$\pm 7,11 \times 10^{-2}$	$\pm 1,44 \times 10^{-2}$

Com base nos resultados da tabela acima, nota-se que a estatística dos parâmetros calculada de acordo com a matriz covariância é conservativa com relação à obtida via simulações de Monte Carlo. A discrepância entre os métodos apenas evidencia a já familiar dificuldade em se analisar estatisticamente modelos do tipo não-linear. Como três algoritmos estocásticos foram utilizados em paralelo durante o procedimento de ajuste, um elevado

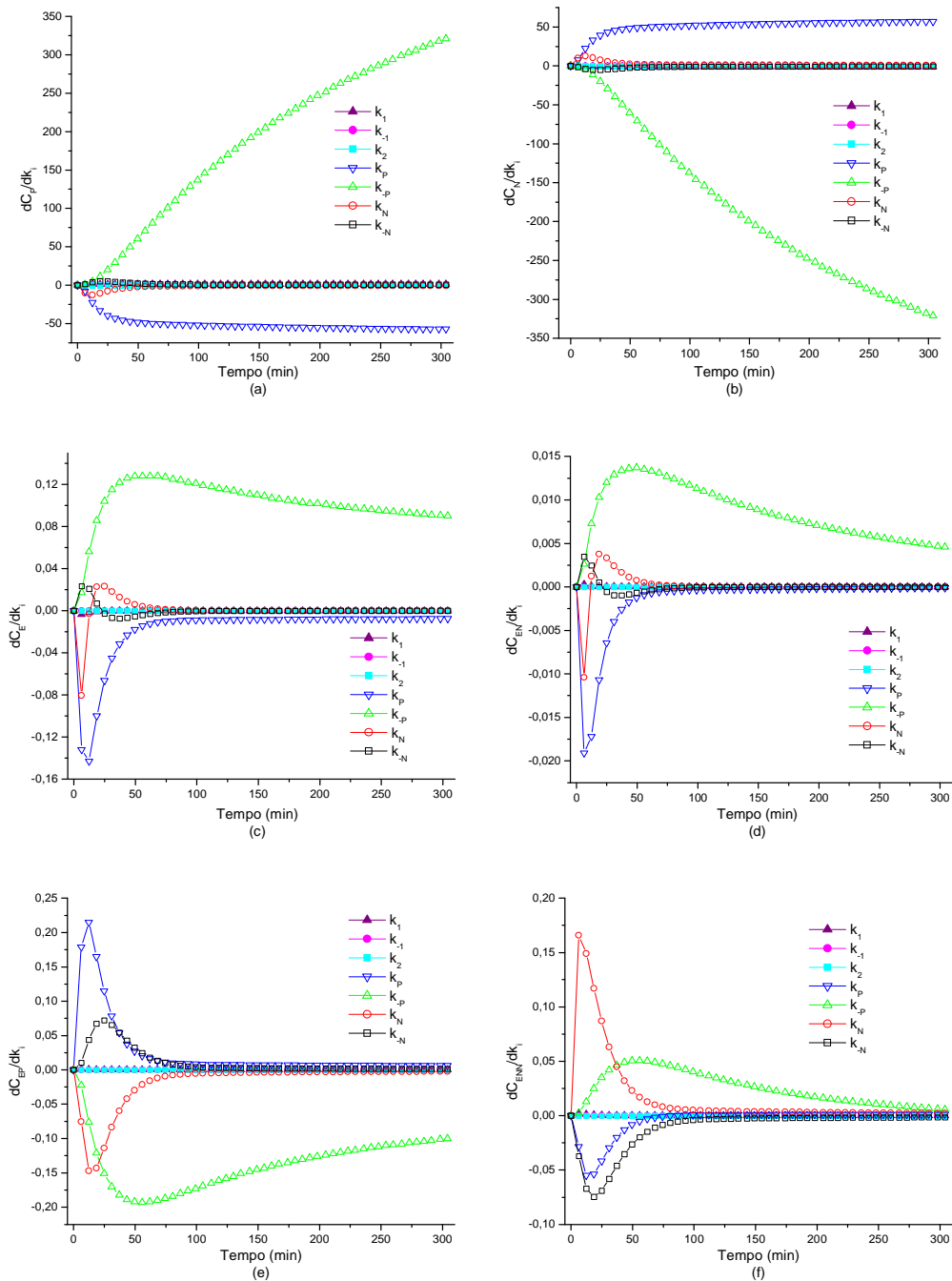
número de pontos foi avaliado e possibilitou a construção de regiões de confiança definidas de acordo com o critério da Equação 2.38. Nesse caso, as regiões mostradas a seguir para alguns pares de parâmetros trazem informação mais detalhada acerca da alta correlação entre os mesmos e da precisão de seus valores nominais (o Anexo C1 disponibiliza o conjunto completo das regiões de confiança). Na Figura 2.15 se observa a complexa forma de algumas dessas regiões. Note ainda nas figuras que os valores ótimos dos parâmetros cinéticos são próximos dos valores médios obtidos com a metodologia de Monte Carlo.



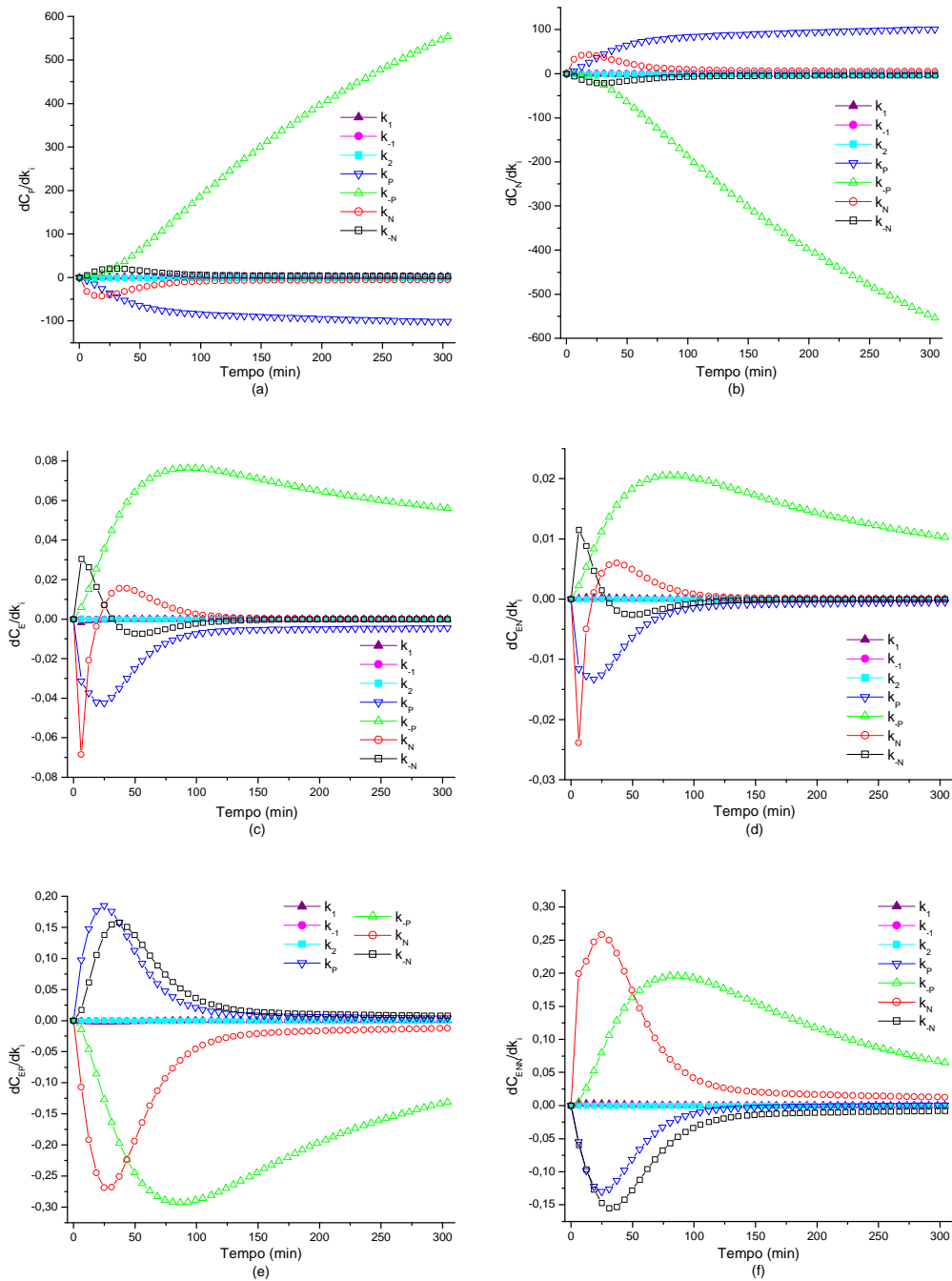


**Figura 2.15:** Regiões de confiança (95 %) para os parâmetros cinéticos do sistema completo de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a) na modelagem com quimotripsina baixa carga. [●] valores ótimos; [■] valores médios calculados via simulações de Monte Carlo. Regiões construídas de acordo com o critério de Beale (Equação 2.38). O Anexo C1 disponibiliza o conjunto completo das regiões de confiança para os pares de parâmetros.

Uma análise qualitativa quanto à precisão de cada parâmetro estimado também pode ser efetuada com a inspeção das curvas de sensibilidade do modelo com relação aos seus parâmetros. Com auxílio do algoritmo DASPK (Maly e Petzold, 1996), a Figura 2.16 e a Figura 2.17 apresentam a sensibilidade das respostas do sistema completo de EDOs com relação aos parâmetros  $k_I$ ,  $k_{-I}$ ,  $k_2$ ,  $k_P$ ,  $k_{-P}$ ,  $k_N$  e  $k_{-N}$  no curso da reação para ambos os ensaios experimentais. Definida de acordo com a Equação 2.22, apenas os valores de  $C_P$  influenciam diretamente na função-objetivo. Por outro lado, a Figura 2.16a e a Figura 2.17a mostram que  $C_P$  é bastante sensível somente aos parâmetros  $k_P$  e  $k_{-P}$ , com pouca influência dos demais parâmetros do modelo. Fica aqui salientada, portanto, a limitação do ajuste de parâmetros cinéticos com o sistema completo de EDOs: como, por limitações experimentais, nem todos os componentes podem ser mensurados analiticamente e incluídos na métrica do problema de ajuste, os valores determinados para alguns parâmetros apresentam pouca confiabilidade estatística.



**Figura 2.16:** Sensibilidade das respostas do modelo com relação aos seus parâmetros durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato ( $7,27 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo: Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a;  $k_I = 2,228 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 4,620 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 122,79 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_p = 4,546 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-p} = 4,570 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 6,008 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 9,646 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ).



**Figura 2.17:** Sensibilidade das respostas do modelo com relação aos seus parâmetros durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato ( $15,03 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo: Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a;  $k_I = 2,228 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 4,620 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 122,79 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_p = 4,546 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-p} = 4,570 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 6,008 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 9,646 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ).

### 2.3.1.2 – Modelagem com Derivado de Alta Carga – Inclusão dos Efeitos Difusivos Intra-Partícula na Cinética da Reação

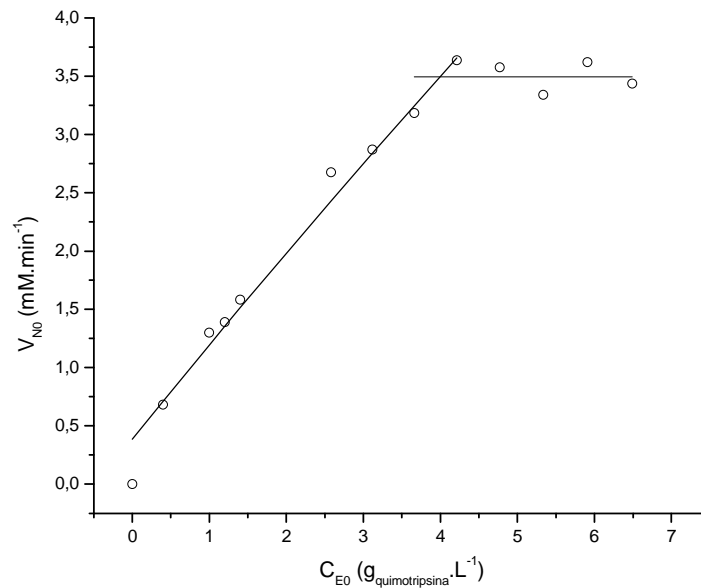
Os resultados apresentados no item interior, para um derivado de baixa carga, indicaram falha na adoção da hipótese estacionária para os componentes enzimáticos  $E$ ,  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$ , na reação com o catalisador quimotripsina-glioxil-agarose. Neste item repetiram-se os procedimentos de ajuste para um derivado de alta carga, onde os efeitos difusivos intra-partícula podem afetar a cinética da proteólise. Primeiramente, foi justificado o uso da concentração enzimática próxima de 4 gramas de enzima por litro. Em seguida, estudou-se o desempenho da cinética de Michaelis-Menten, Equação 2.21, e do modelo completo de EDOs, equações 2.15a a 2.20a, na modelagem aparente – sem a inclusão no equacionamento de efeitos difusionais. Por fim, com o equacionamento que inclui o transporte de massa no interior da partícula de catalisador (equações 2.24 e 2.25), fez-se uma análise do modelo reativo-difusivo. Nesse último caso, novamente ambas as maneiras de se calcular a velocidade da reação  $V_P$  são comparadas (Equação 2.21 ou equações 2.15 a 2.20).

Para verificar a capacidade de generalização do modelo, além dos ensaios de velocidades iniciais (triplicatas), dois ensaios de longa duração foram realizados com o derivado de alta carga. No primeiro ensaio,  $E/S_1$ , a relação inicial enzima/substrato foi de  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mmol}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{mmol}_{\text{N0}}^{-1}$  (contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ); já no segundo,  $E/S_2$ , a relação experimental foi  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{mmol}_{\text{N0}}^{-1}$  (contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

#### ***Determinação da concentração enzimática de processo***

Ensaio de proteólise em pHstato foram realizados visando-se determinar a concentração de quimotripsina a ser utilizada nos demais ensaios cinéticos com derivado de alta carga. No experimento, 10 mL de soro de queijo ( $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi hidrolisado por um período de 3 minutos, variando-se em cada ensaio a concentração inicial de enzima no reator (carga do derivado fixa em todos os ensaios com  $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ). A Figura 2.18 mostra a variação das velocidades iniciais em função da concentração de enzima no reator.





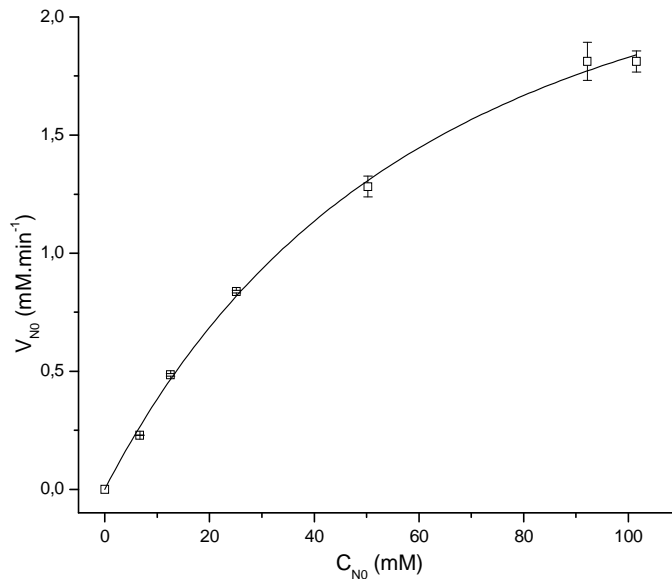
**Figura 2.18:** Velocidade inicial de reação em função da concentração enzimática de quimotripsina no reator ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^{\circ}\text{C}$ , pH 8,0; 10 mL de soro de queijo concentrado ( $50,0 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Na Figura 2.18 nota-se a variação linear da velocidade com a concentração de enzima até o limite de aproximadamente  $4,5 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ , comportamento típico de cinéticas que seguem a forma funcional descrita por equações do tipo Michaelis-Menten (Bailey e Ollis, 1977). Galvão, 2004, obteve resultados semelhantes aos da figura acima, porém com soro concentrado contendo  $15 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  como substrato. Observe que o fator de efetividade para a carga enzimática de  $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  é de aproximadamente 0,8 (Figura 2.7), e ficará invariante para qualquer concentração de quimotripsina no reator, uma vez que o aumento de concentração enzimática é obtido acrescentando-se mais partículas do catalisador, e não aumentando a carga do derivado. Por outro lado, se a influência da resistência ao transporte de massa no filme externo fosse importante, ao se aumentar o número de partículas de catalisador (e, portanto, a área de troca disponível para o substrato no meio), a velocidade de reação deveria aumentar mais que linearmente – efeito oposto ao observado.

Devido ao comportamento anômalo observado na Figura 2.18, a concentração enzimática utilizada nos ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos com derivado de alta carga ficou restrita ao limite superior de  $4,5 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Além disso, como também verificado na figura, nenhum ganho na velocidade inicial é obtido para concentrações enzimáticas superiores a  $4,5 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Modelagem aparente para derivado com alta carga**

Repetindo-se o procedimento do item 2.3.1.1 para o derivado com baixa carga enzimática, os parâmetros  $k = 3,45 \pm 1,1 \text{ mmol.g}_{\text{quimotripsina}}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 81,27 \pm 33,0 \text{ mM}$  e  $K_N = 1,10 \times 10^3 \pm 3,4 \times 10^3 \text{ mM}$  foram estimados via o método das velocidades iniciais quando utilizado o derivado com alta carga. A Figura 2.19 indica a boa qualidade do modelo com inibição mista por substrato e produto nas reações com derivado alta carga (Equação 2.21).

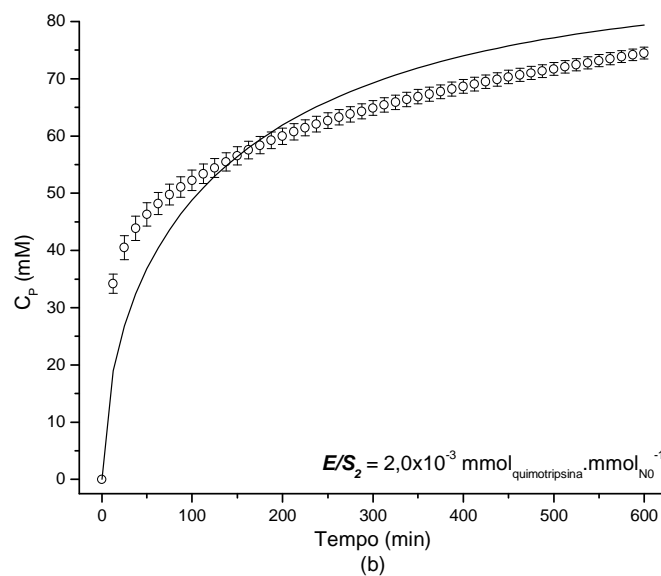
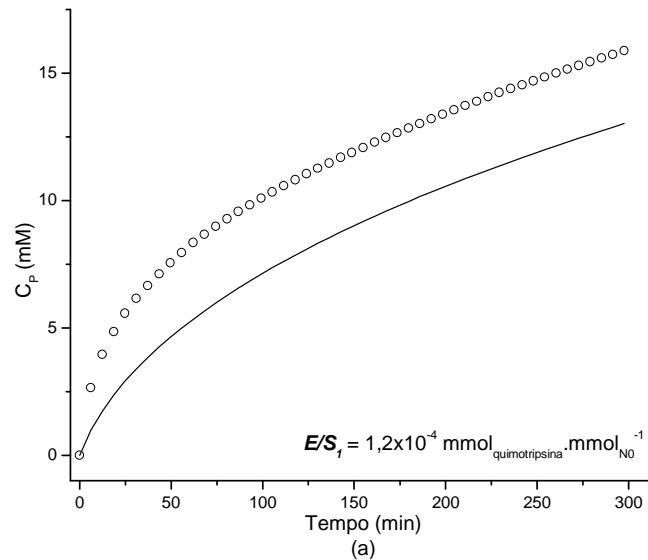


**Figura 2.19:** Velocidades iniciais durante hidrólises das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}}.\text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 10 mL de soro concentrado ( $4\text{-}60 \text{ g}_{\text{proteína}}.\text{L}^{-1}$ ) eram hidrolisados com  $1,01 \text{ g}_{\text{quimotripsina}}.\text{L}^{-1}$  durante 3 min utilizando o método do pHstato. Modelo (—): Michaelis-Menten com inibição por substrato (Equação 2.21;  $k = 3,45 \text{ mmol.g}_{\text{quimotripsina}}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 81,27 \text{ mM}$ ;  $K_N = 1,10 \times 10^3 \text{ mM}$ ).

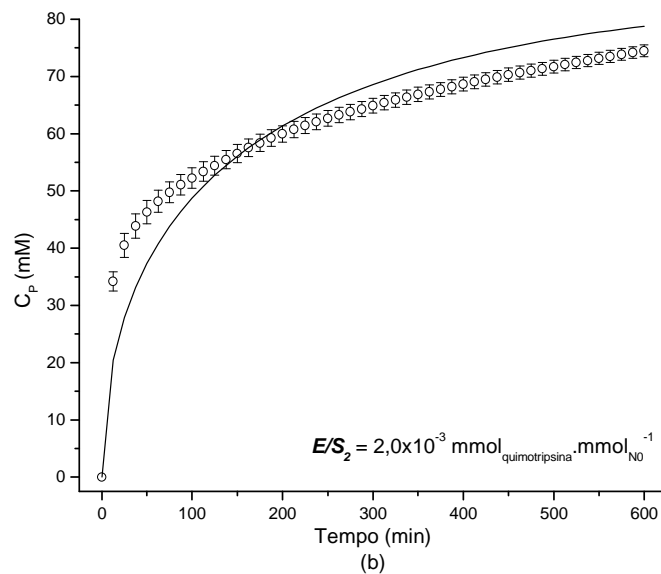
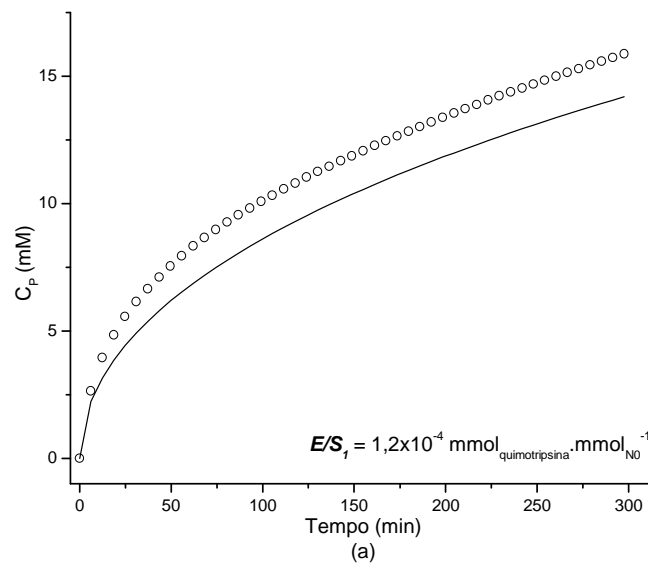
Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

Nos ensaios de longa duração, entretanto, a integração numérica da Equação 2.21 ( $dP/dt = -V_N$ ) não forneceu predições coerentes com os pontos experimentais. Na Figura 2.20, os parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  obtidos com os ensaios de velocidades iniciais foram fixados e estimou-se  $K_P = 1,45 \pm 0,1 \text{ mM}$ . Mesmo na tentativa de determinar simultaneamente os quatro parâmetros da Equação 2.21, desvios sistemáticos são observados entre modelo e experimentos para  $k = 467,77 \pm 511,1 \text{ mmol.g}_{\text{quimotripsina}}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 36,30 \pm 2097 \text{ mM}$ ;  $K_N =$

$1 \times 10^5$  mM (restrição superior – vide Tabela 2.2 na página 75) e  $K_P = 4,36 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-1}$  mM (Figura 2.21).



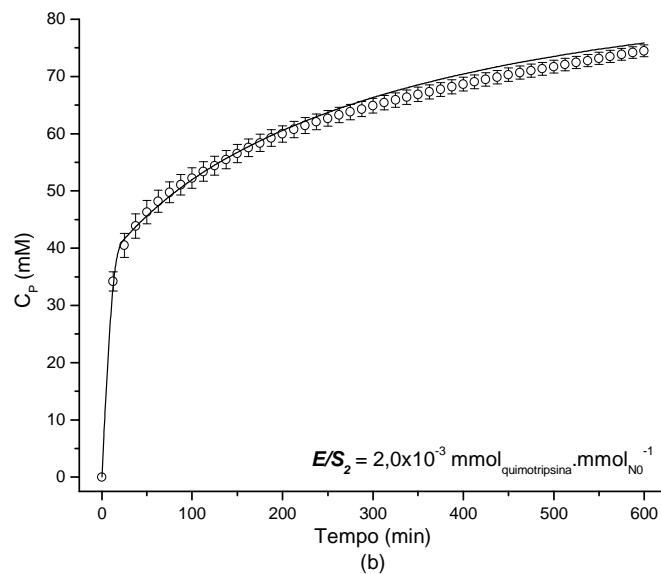
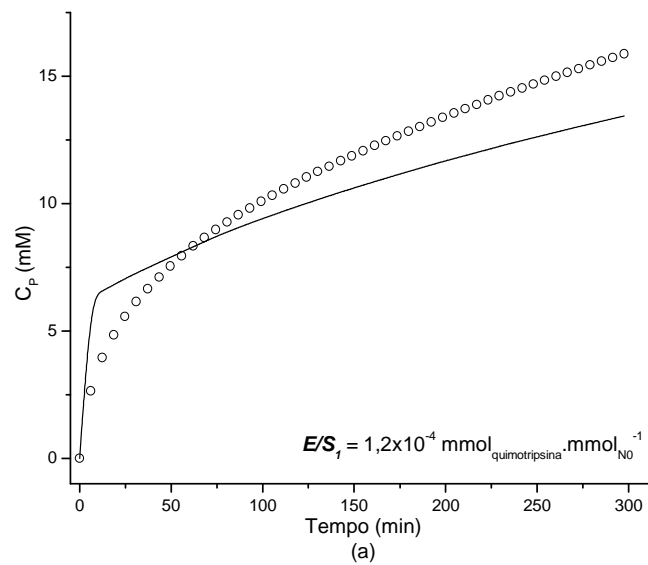
**Figura 2.20:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$  e pH 8,0. Condições da reação: (a) 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b) 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  (Equação 2.21 – ajuste de  $K_P$ ;  $k = 3,45 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 81,27 \text{ mM}$ ;  $K_N = 1,10 \times 10^3 \text{ mM}$  e  $K_P = 1,45 \text{ mM}$ ).  $\phi = 5,00$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.



**Figura 2.21:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose a ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ )  $55^\circ\text{C}$  e pH 8,0. Condições da reação: (a) 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b) 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  (Equação 2.21 – ajuste simultâneo dos quatro parâmetros;  $k = 467,77 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 36,30 \text{ mM}$ ;  $K_N = 1 \times 10^5 \text{ mM}$  e  $K_P = 4,36 \times 10^{-3} \text{ mM}$ ).  $\phi = 1,50$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

A Figura 2.22 mostra que o resultado do ajuste paramétrico aparente para o modelo constituído pelo conjunto de EDOs – equações 2.15a a 2.20a – apresenta relativa precisão apenas no segundo ensaio experimental ( $E/S_2$ ). Já no caso do primeiro ensaio,  $E/S_1$ , a predição do modelo é incoerente ao longo da proteólise. Os parâmetros estimados foram:  $k_I = 970,17 \pm 1239 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 1178 \pm 3044 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 1493 \pm 3852 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 7,99 \pm 10,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 1,49 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,02 \times 10^{-4} \pm 5,3 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $k_{-N} = 0,216 \pm 1 \text{ min}^{-1}$ .

Ao contrário dos resultados obtidos no item anterior, onde o modelo puramente cinético derivado sem a adoção da hipótese pseudo-estacionária foi capaz de descrever a dinâmica da proteólise em dois ensaios com derivado quimotripsina-glioxil-agarose de baixa carga, os resultados deste item indicam que ambas as equações para a velocidade de proteólise, equações 2.15 a 2.20 ou Equação 2.21, falham na tentativa de se modelar a cinética da reação em duas condições experimentais distintas para o derivado com alta carga enzimática. Tais resultados sugerem que no caso do derivado com alta carga apenas o relaxamento da hipótese quase-estacionária não garante a capacidade do modelo em representar a reação adequadamente e os efeitos difusivos intra-partícula precisam ser considerados durante a modelagem.



**Figura 2.22:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$  e pH 8,0. Condições da reação: (a) 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b) 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica do sistema de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a – ajuste simultâneo dos sete parâmetros;  $k_I = 970,17 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 1178 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 1493 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 7,99 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 1,49 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,02 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $k_{-N} = 0,216 \text{ min}^{-1}$ ).  $\phi = 3,24$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

### **Modelagem intrínseca para derivado com alta carga**

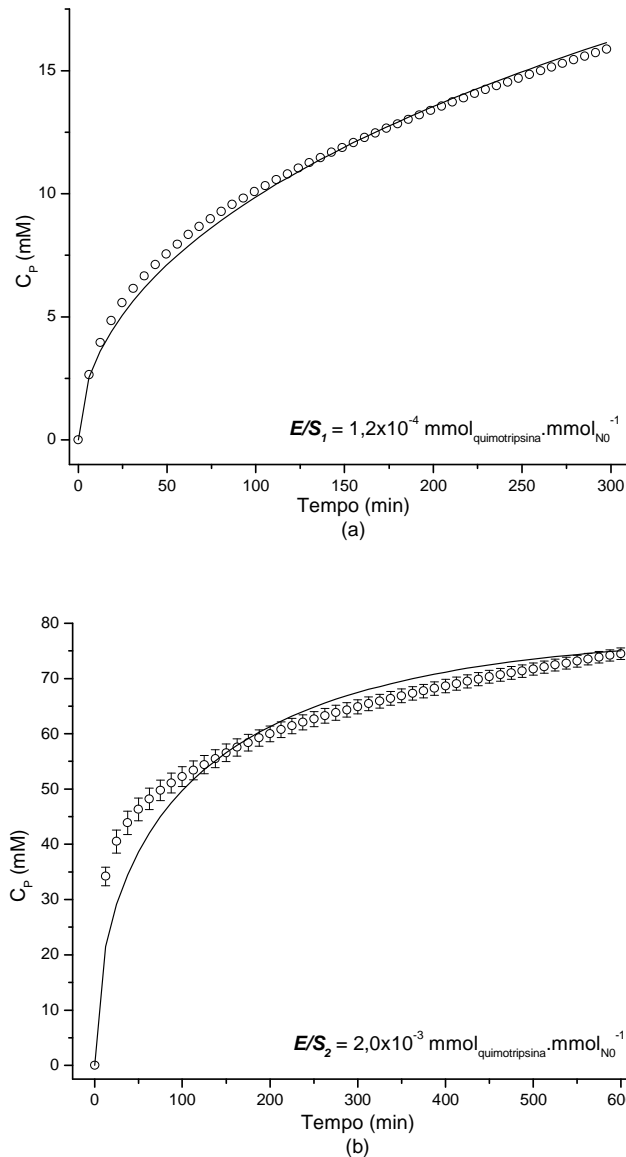
No modelo reativo-difusivo descrito pelas equações 2.24 e 2.25, além dos parâmetros cinéticos utilizados no cálculo da velocidade reacional, as difusividades efetivas  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  dos pseudocomponentes  $N$  e  $P$  também devem ser determinadas. Geralmente, em um problema clássico de modelagem cinética com difusão, a difusividade efetiva é estimada em ensaios independentes ou via correlações empíricas (Berendsen *et al.*, 2006).

A adoção de pseudocomponentes, entretanto, limita experimentalmente a determinação de difusividades efetivas para  $N$  e  $P$ . Aproximar  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  para valores médios de difusividades obtidas com componentes controlados de pesos moleculares semelhantes aos de  $N$  e  $P$  caracteriza uma hipótese que não permitiria concluir se uma eventual falha na predição do modelo estaria relacionada com os valores aproximados para  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  ou com a expressão para a velocidade da reação – estrutura do modelo (objetivo primeiro neste estudo). Dessa forma, optou-se por incluir na formulação do problema de ajuste, além dos parâmetros cinéticos, os parâmetros de transporte de massa  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  (mesmo sob pena de perda da confiabilidade estatística no ajuste). Como os dois ensaios utilizados para estudo se encontram em condições experimentais distintas, a prova de conceito para o modelo reativo-difusivo deve ser a capacidade de predição simultânea em ambas as situações.

No primeiro caso, a hipótese de Briggs-Haldane foi utilizada para predição da velocidade da reação (Equação 2.21). O problema de estimação paramétrica consistia em encontrar os valores de  $k$ ,  $K_M$ ,  $K_N$ ,  $K_P$ ,  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  que minimizasse a diferença residual definida na Equação 2.22. O conjunto de parâmetros que apresentou os melhores resultados foi:  $k = 6,92 \times 10^4 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 1600 \text{ mM}$ ;  $K_N = 5,49 \times 10^4 \text{ mM}$ ;  $K_P = 1,91 \times 10^{-3} \text{ mM}$ ;  $D_{e,N} = 9,95 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,P} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ .

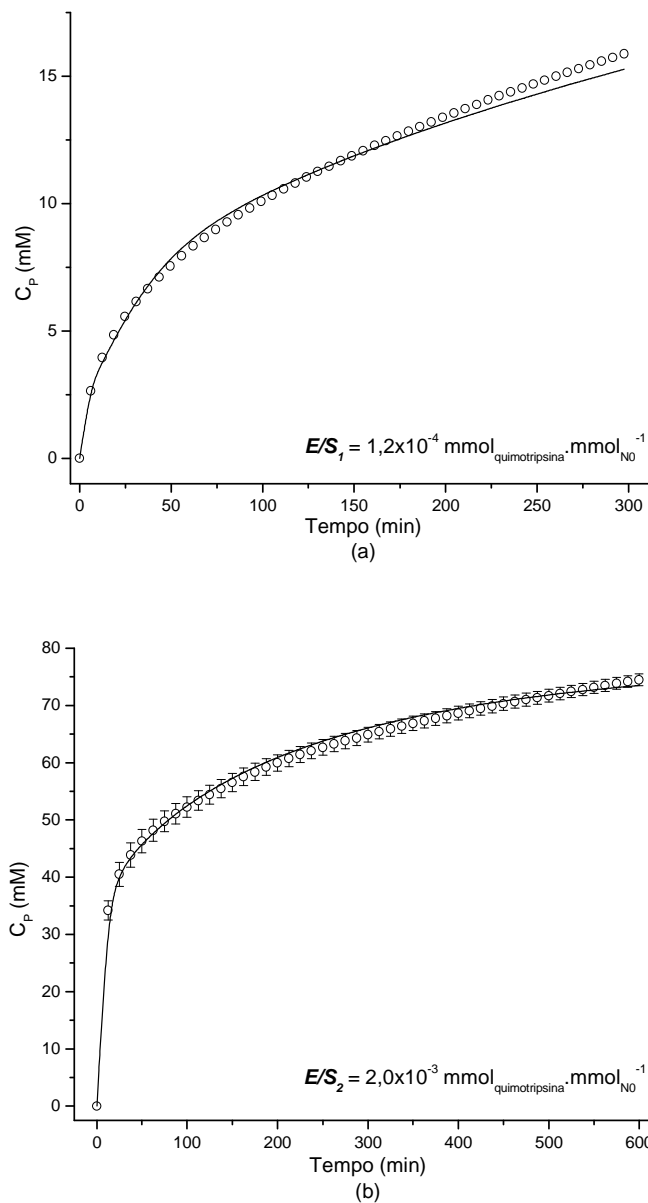
A Figura 2.23 compara os resultados do modelo reativo-difusivo e dados experimentais. Note que apenas no caso da *baixa* relação enzima-substrato, ensaio  $E/S_1$ , a hipótese quase-estacionária provê resultados relativamente adequados com os pontos experimentais. Com uma revisão dos resultados apresentados até este ponto nesta seção, é possível verificar que o ensaio  $E/S_1$  foi o único ensaio de longa duração onde a Equação 2.21 apresentou resultados satisfatórios. Curiosamente, a relação enzima-substrato empregada em  $E/S_1$  foi a única na ordem  $10^{-4}$ ; para  $E/S_2$  a relação foi de  $2,0 \times 10^{-3}$  e para os ensaios de baixa carga foi de  $3,2 \times 10^{-3}$  e  $1,6 \times 10^{-3} \text{ mmol}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{mmol}_{\text{N0}}^{-1}$ . O modelo reativo-difusivo com a Equação 2.21, entretanto, apresenta imprecisão para o ensaio  $E/S_2$ . Recorde-se que uma predição precisa para esse experimento é importante, pois o mesmo reúne as condições mais próximas de uma situação industrial, isto é, alta concentração de proteína com derivado de

alta carga e concentração enzimática próxima do limiar de 4 gramas de quimotripsina por volume útil de reator.



**Figura 2.23:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$  e pH 8,0. Condições da reação: (a) 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b) 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com Equação 2.21 – ajuste simultâneo dos seis parâmetros;  $k = 6,92 \times 10^4 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_M = 1600 \text{ mM}$ ;  $K_N = 5,49 \times 10^4 \text{ mM}$ ;  $K_P = 1,91 \times 10^{-3} \text{ mM}$ ;  $D_{e,N} = 9,95 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,P} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ).  $\phi = 0,42$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.





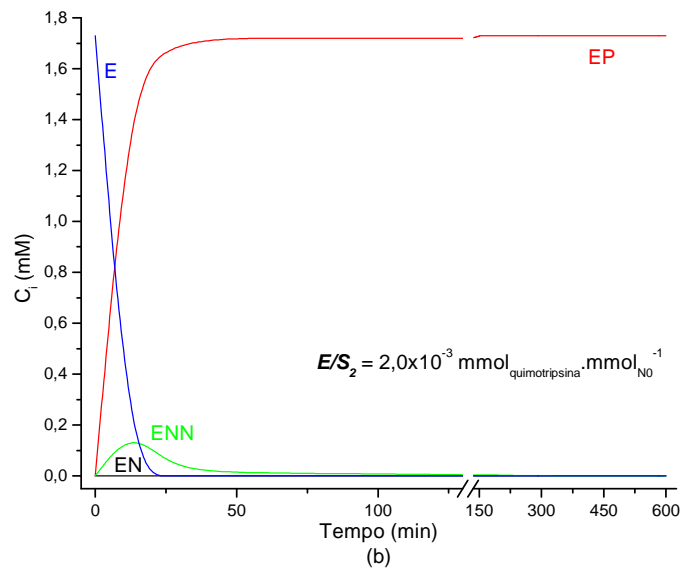
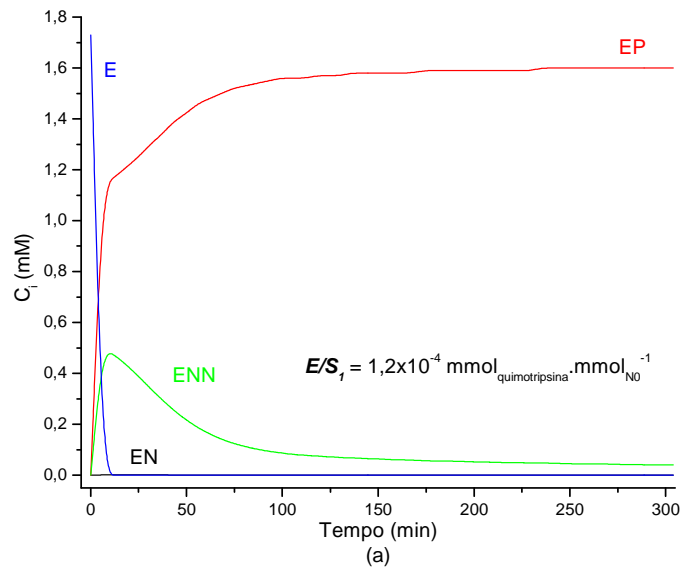
**Figura 2.24:** Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$  e pH 8,0. Condições da reação: (a) 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b) 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com equações 2.15 a 2.20 – ajuste simultâneo dos nove parâmetros;  $k_I = 2,105 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 1,134 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 2,722 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 4,878 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 3,875 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,440 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 0,264 \text{ min}^{-1}$ ;  $D_{e,N} = 6,234 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,P} = 9,251 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ).  $\phi = 0,05$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.

O procedimento de ajuste foi repetido para quando a hipótese pseudo-estacionária não é considerada, ou seja, equações 2.15 a 2.20 para cálculo das velocidades da reação. A Figura 2.24 apresenta as respostas do modelo reativo-difusivo no seio do fluido com os seguintes parâmetros:  $k_I = 2,105 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 1,134 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 2,722 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 4,878 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 3,875 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,440 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 0,264 \text{ min}^{-1}$ ;  $D_{e,N} = 6,234 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,P} = 9,251 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ .

Na Figura 2.24 nota-se a concordância do modelo com os dados experimentais ao longo de toda a reação realizada com a condição experimental próxima à situação real do processo ( $E/S_2$ ). No ensaio  $E/S_1$ , desvios sistemáticos são verificados no final da reação; já no seu período inicial a predição do modelo é bastante coerente. Aqui vale destacar que quando a hipótese pseudo-estacionária é adotada o modelo é falho justamente no período inicial da proteólise (observe Figura 2.23a). O fato do valor médio estimado para a difusividade efetiva do produto ( $D_{e,P} = 9,251 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ) ser superior ao do substrato ( $D_{e,N} = 6,234 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ) também corrobora para a validade dos parâmetros ajustados em uma reação de despolimerização como a estudada.

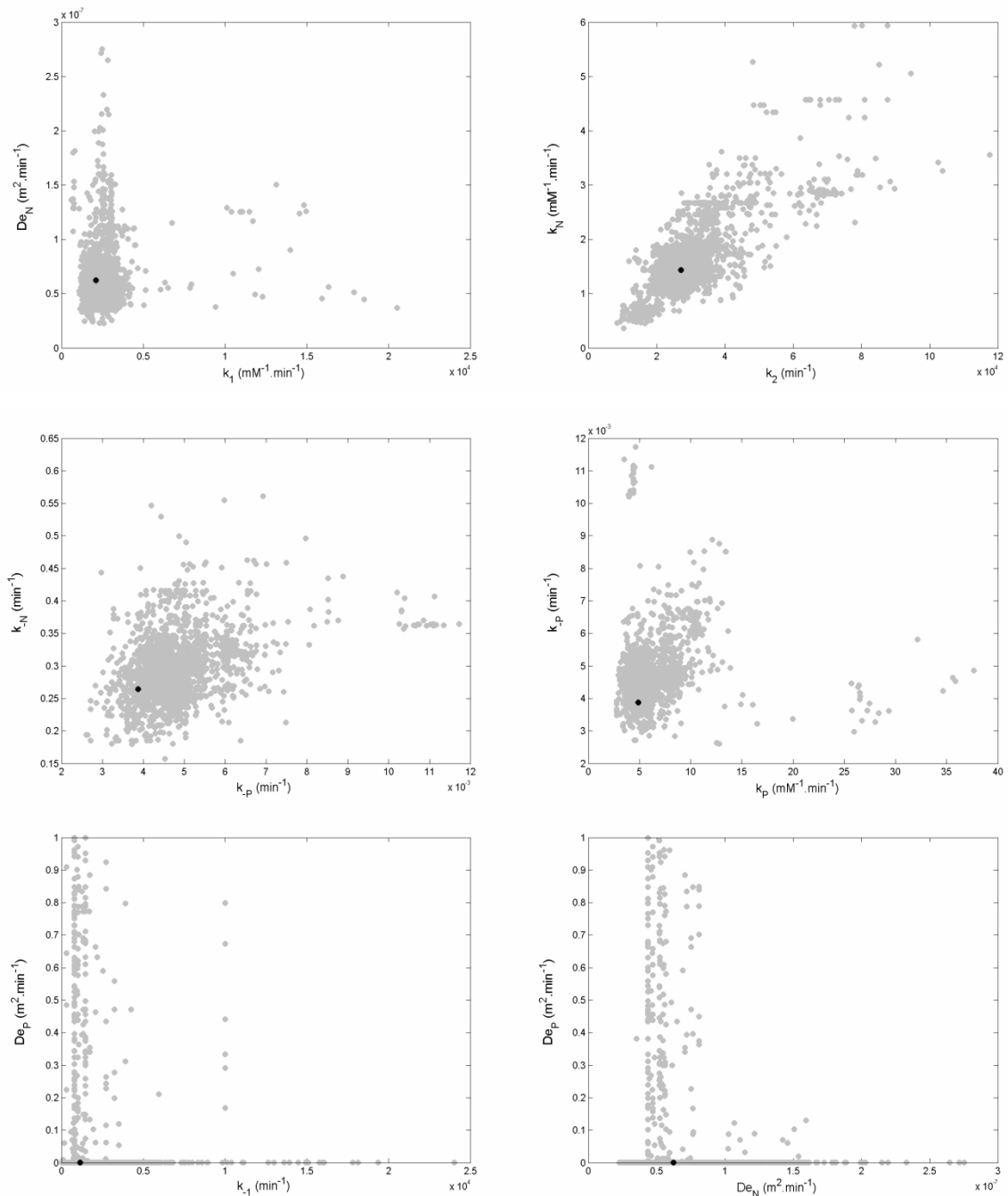
Os perfis simulados dos componentes  $E$ ,  $EN$ ,  $EP$  e  $ENN$  com o modelo reativo-difusivo sem adoção da hipótese de Briggs-Haldane são mostrados na Figura 2.25. Para cada componente, as concentrações mostradas na figura ao longo do tempo representam uma concentração média dos valores obtidos no interior do gel em cada ponto de colocação ortogonal (8 pontos). Um retrato detalhado dos perfis simulados em função do ponto de colocação é disponibilizado no Anexo D.

A duração da fase pré-estacionária para ambos os ensaios com derivado de alta carga está em concordância com aquela obtida para os experimentos com derivado de baixa carga (próxima de 100 minutos). Apesar de novamente se destacar o valor excessivamente elevado para a duração dessa fase – se apenas o tempo requerido para formação dos complexos estivesse nela interferindo – o fato de ensaios realizados em condições experimentais distintas com catalisadores de cargas diferentes apresentarem fases pré-estacionárias semelhantes consolida a percepção de uma falha da hipótese pseudo-estacionária para a proteólise do soro de queijo com quimotripsina-glioxil-agarose.



**Figura 2.25:** Evolução da concentração dos componentes,  $C_E$ ,  $C_{EN}$ ,  $C_{EP}$ ,  $C_{ENN}$ , durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. As concentrações representam uma concentração média dos valores obtidos no interior do gel em cada ponto de colocação ortogonal. Condições da reação: (a) 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b) 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com equações 2.15 a 2.20;  $k_I = 2,105 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-I} = 1,134 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 2,722 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_P = 4,878 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-P} = 3,875 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,440 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 0,264 \text{ min}^{-1}$ ;  $D_{e,N} = 6,234 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,P} = 9,251 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ).

As regiões de confiança para alguns pares de parâmetros são mostradas na Figura 2.26 (o conjunto completo está disponível no Anexo C2). A análise mostra muitas regiões não-convexas e sem limite superior. Devido à complexidade do modelo reativo-difusivo – reunindo parâmetros cinéticos e de transporte de massa – há pouca confiabilidade estatística, em virtude da correlação entre seus nove parâmetros. Por outro lado, a adoção de pseudocomponentes para a representação da cinética dificulta a determinação das difusividades efetivas via ensaios independentes (como já discutido). Novamente, do ponto de vista prático, o modelo baseado no conjunto completo de EDOs para expressão das velocidades de reação representou adequadamente os perfis de  $C_P$  em diferentes condições operacionais e com catalisadores de diferentes cargas – com e sem influência dos efeitos difusivos intra-partícula na velocidade reacional.



**Figura 2.26:** Regiões de confiança (95 %) para os parâmetros cinéticos e de transporte de massa do modelo reativo-difusivo (Equações 2.15 a 2.20, 2.24 e 2.25) na modelagem com quimotripsina alta carga. [●] valores ótimos. Regiões construídas de acordo com o critério de Beale (Equação 2.38). O Anexo C2 disponibiliza o conjunto completo das regiões de confiança para os pares de parâmetros.

### 2.3.1.3 – Análise de Desempenho dos Algoritmos de Busca empregados durante a Estimativa Paramétrica

Como discutido no início desta seção, como muitas das funções-objetivo apresentaram característica multimodal, quatro algoritmos de busca foram utilizados em paralelo na procura do melhor ajuste para cada conjunto de ensaio. Essa busca em paralelo proporcionou um histórico de dados suficiente para uma análise comparativa de desempenho entre os quatro métodos de otimização.

A seguir, são classificados os problemas de estimação paramétrica estudados nesta seção:

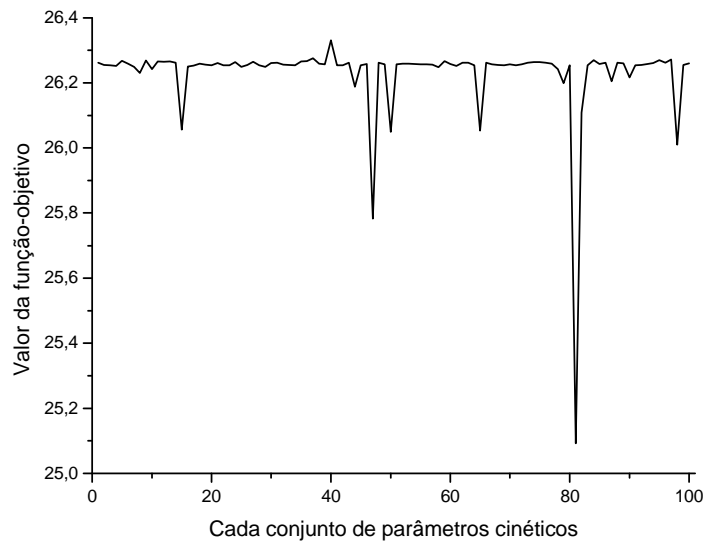
- **Problema #1:** estimativa dos parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  via o método das velocidades iniciais para quimotripsina baixa carga (Figura 2.8);
- **Problema #2:** estimativa do parâmetro  $K_P$  com ensaios de longa duração para quimotripsina baixa carga (Figura 2.9);
- **Problema #3:** estimativa dos parâmetros  $k$ ,  $K_M$ ,  $K_N$  e  $K_P$  com ensaios de longa duração para quimotripsina baixa carga (Figura 2.11);
- **Problema #4:** estimativa dos parâmetros  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_P$ ,  $k_{-P}$ ,  $k_N$  e  $k_{-N}$  com ensaios de longa duração para quimotripsina baixa carga (Figura 2.12);
- **Problema #5:** estimativa dos parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  via o método das velocidades iniciais para quimotripsina alta carga (Figura 2.19);
- **Problema #6:** estimativa do parâmetro  $K_P$  com ensaios de longa duração para quimotripsina alta carga (Figura 2.20);
- **Problema #7:** estimativa dos parâmetros  $k$ ,  $K_M$ ,  $K_N$  e  $K_P$  com ensaios de longa duração para quimotripsina alta carga (Figura 2.21);
- **Problema #8:** estimativa dos parâmetros  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_P$ ,  $k_{-P}$ ,  $k_N$  e  $k_{-N}$  com ensaios de longa duração para quimotripsina alta carga (Figura 2.22);
- **Problema #9:** estimativa dos parâmetros  $k$ ,  $K_M$ ,  $K_N$ ,  $K_P$ ,  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  com ensaios de longa duração para quimotripsina alta carga (Figura 2.23);
- **Problema #10:** estimativa dos parâmetros  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_P$ ,  $k_{-P}$ ,  $k_N$ ,  $k_{-N}$ ,  $D_{e,N}$  e  $D_{e,P}$  com ensaios de longa duração para quimotripsina alta carga (Figura 2.24).

A Tabela 2.2 apresenta os limites inferiores e superiores dos parâmetros cinéticos utilizados durante cada ajuste:

**Tabela 2.2:** Limites superiores e inferiores dos parâmetros cinéticos (restrições da busca não-linear).

<b>Problema</b>	<b>Limite Inferior (L<sub>S</sub>)</b>	<b>Limite Superior (L<sub>S</sub>)</b>
<b>Problema #1</b> (k, K <sub>M</sub> e K <sub>N</sub> )	[0; 0; 0]	[50; 1x10 <sup>3</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ]
<b>Problema #2</b> (K <sub>P</sub> )	[0]	[30]
<b>Problema #3</b> (k, K <sub>M</sub> , K <sub>N</sub> e K <sub>P</sub> )	[0; 0; 0; 0]	[1x10 <sup>5</sup> ; 1x10 <sup>3</sup> ; 1x10 <sup>2</sup> ; 1x10 <sup>6</sup> ]
<b>Problema #4</b> (k <sub>1</sub> , k <sub>-1</sub> , k <sub>2</sub> , k <sub>P</sub> , k <sub>-P</sub> , k <sub>N</sub> e k <sub>-N</sub> )	[0; 0; 0; 0; 0; 0; 0]	[1x10 <sup>4</sup> ; 1x10 <sup>4</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ; 1; 1; 1; 1]
<b>Problema #5</b> (k, K <sub>M</sub> e K <sub>N</sub> )	[0; 0; 0]	[50; 1x10 <sup>3</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ]
<b>Problema #6</b> (K <sub>P</sub> )	[0]	[30]
<b>Problema #7</b> (k, K <sub>M</sub> , K <sub>N</sub> e K <sub>P</sub> )	[0; 0; 0; 0]	[1x10 <sup>3</sup> ; 1x10 <sup>3</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ; 1x10 <sup>2</sup> ]
<b>Problema #8</b> (k <sub>1</sub> , k <sub>-1</sub> , k <sub>2</sub> , k <sub>P</sub> , k <sub>-P</sub> , k <sub>N</sub> e k <sub>-N</sub> )	[0; 0; 0; 0; 0; 0; 0]	[1x10 <sup>4</sup> ; 1x10 <sup>4</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ; 10; 10; 10; 10]
<b>Problema #9</b> (k, K <sub>M</sub> , K <sub>N</sub> , K <sub>P</sub> , D <sub>e,N</sub> e D <sub>e,P</sub> )	[0; 0; 0; 0; 0; 0]	[1x10 <sup>5</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ; 1x10 <sup>5</sup> ; 1; 1]
<b>Problema #10</b> (k <sub>1</sub> , k <sub>-1</sub> , k <sub>2</sub> , k <sub>P</sub> , k <sub>-P</sub> , k <sub>N</sub> , k <sub>-N</sub> , D <sub>e,N</sub> e D <sub>e,P</sub> )	[0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0; 0]	[1x10 <sup>6</sup> ; 1x10 <sup>6</sup> ; 1x10 <sup>6</sup> ; 1x10 <sup>2</sup> ; 1x10 <sup>2</sup> ; ; 1x10 <sup>2</sup> ; 1x10 <sup>2</sup> ; 1; 1]

A Figura 2.27 ilustra a característica multimodal de um caso típico (Problema #4), onde vários conjuntos de parâmetros – gerados de forma aleatória dentro de seus limites definidos na Tabela 2.2 – foram utilizados como estimativas iniciais para o algoritmo LM (Levenberg-Marquardt). Na figura a seguir, a convergência do algoritmo LM para cada estimativa inicial gerada aleatoriamente é apresentada.



**Figura 2.27:** Ilustração da característica multimodal para o Problema #4. Cada ponto na abscissa do gráfico representa estimativas iniciais para o algoritmo LM dos sete parâmetros cinéticos previstos no modelo.

A Tabela 2.3 resume os parâmetros de sintonia utilizados por cada algoritmo de otimização nos problemas de estimativa paramétrica para a quimotripsina.

**Tabela 2.3:** Parâmetros de sintonia utilizados pelos algoritmos de otimização (a seção 2.2.7 descreve o significado de cada parâmetro de sintonia)\*.

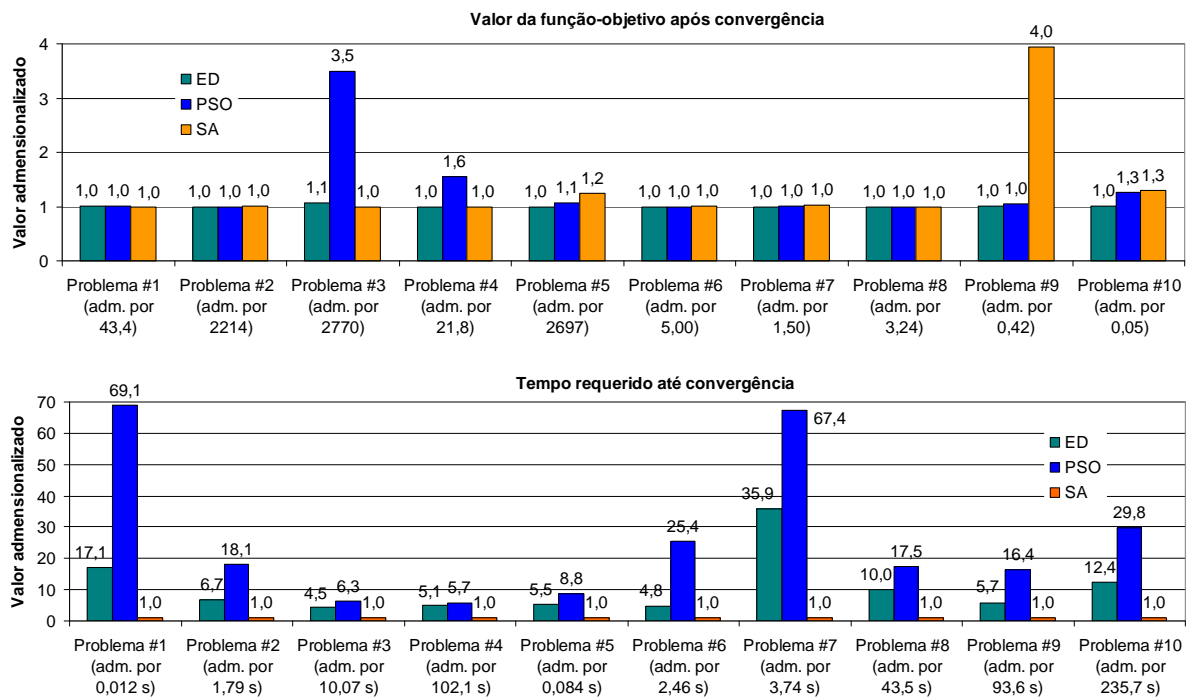
Problema	DE	LM**	PSO	SA
<b>Problema #1</b>	NP = 30	NP = 30	NP = 30	$T_0 = 5 \times 10^2$ ; $it_{\max} = 30000$
<b>Problema #2</b>	NP = 10	NP = 50	NP = 10	$T_0 = 4 \times 10^3$ ; $it_{\max} = 10000$
<b>Problema #3</b>	NP = 40	NP = 40	NP = 40	$T_0 = 4 \times 10^3$ ; $it_{\max} = 30000$
<b>Problema #4</b>	NP = 70	NP = 70	NP = 70	$T_0 = 5 \times 10^2$ ; $it_{\max} = 70000$
<b>Problema #5</b>	NP = 30	NP = 30	NP = 30	$T_0 = 1 \times 10^5$ ; $it_{\max} = 30000$
<b>Problema #6</b>	NP = 10	NP = 50	NP = 10	$T_0 = 1 \times 10^2$ ; $it_{\max} = 10000$
<b>Problema #7</b>	NP = 40	NP = 40	NP = 40	$T_0 = 1 \times 10^2$ ; $it_{\max} = 40000$
<b>Problema #8</b>	NP = 70	NP = 70	NP = 70	$T_0 = 1 \times 10^2$ ; $it_{\max} = 70000$
<b>Problema #9</b>	NP = 60	NP = 60	NP = 60	$T_0 = 1 \times 10^5$ ; $it_{\max} = 60000$
<b>Problema #10</b>	NP = 90	NP = 90	NP = 90	$T_0 = 1 \times 10^5$ ; $it_{\max} = 90000$



<b>Todos</b>	$F = 0,7; P_r = 0,9;$ $it_{\max} = 1000$	$it_{\max} = NP * 1000$	$C_1 = 2; c_2 = 2;$ $it_{\max} = 1000$	$\alpha = 0,98$
--------------	---	-------------------------	---	-----------------

\*Qualquer dos métodos era interrompido se o número de iterações atingisse seu limite máximo ( $it_{\max}$ ), ou se em  $0,2it_{\max}$  não ocorresse nenhuma variação na função-objetivo.

\*\*Para o algoritmo LM, o parâmetro  $NP$  representa o número de “chutes iniciais” utilizados. Ou seja,  $NP = 30$ , representa que 30 “chutes iniciais” foram gerados aleatoriamente e 30 chamadas do algoritmo foram realizadas (uma para cada “chute inicial”); após  $NP$  chamadas do algoritmo LM, apenas a que apresentasse o menor valor para a função-objetivo era selecionada.



**Figura 2.28:** Análise de desempenho dos algoritmos de busca estocástica *Simulated Annealing* (SA), Enxame de Partículas (PSO) e Evolução Diferencial (ED).

A análise da figura acima indica claramente que o algoritmo SA é o que requer menor tempo computacional; em alguns casos, todavia, convergiu para resultados sub-ótimos: problemas #5, #9 e #10. De maneira mais consistente, a estratégia evolucionária ED convergiu para os melhores resultados em todos os problemas, requerendo, entretanto, um maior tempo computacional.

Já o algoritmo *lsqnonlin*, que utiliza a proposta de Levenberg-Marquardt, apresentou alta sensibilidade às estimativas iniciais e seu desempenho não foi comparado na Figura 2.28. Uma possível explicação para o desempenho limitado do algoritmo baseado no cálculo do gradiente frente aos métodos estocásticos seria a não normalização das variáveis (incógnitas do problema), gerando casos de otimização com parâmetros cinéticos de diferentes ordens de grandeza e, por conseguinte, prejudicando o desempenho do algoritmo *lsqnonlin*.

Sob a perspectiva de uma análise estatística do ajuste, uma vantagem interessante dos métodos estocásticos é a possibilidade da construção de regiões de confiança de acordo com o critério de Beale (Equação 2.38). Como um elevado número de pontos é analisado no espaço de busca dos parâmetros durante o procedimento de ajuste, a construção das regiões de confiança ocorre naturalmente e sem acréscimo importante de tempo computacional.

Acredita-se que qualquer um dos três métodos estocásticos de otimização contemplados possivelmente teria seu desempenho melhorado após uma investigação criteriosa de seus parâmetros de sintonia para os problemas aqui estudados. Entretanto, como a questão de estimativa paramétrica e definição de uma estrutura para o modelo já apresentavam relativa complexidade, os algoritmos foram usados em sua forma padrão com valores de sintonia tipicamente recomendados.

### **2.3.2 – MODELAGEM HÍBRIDA FENOMENOLÓGICO-NEURONAL**

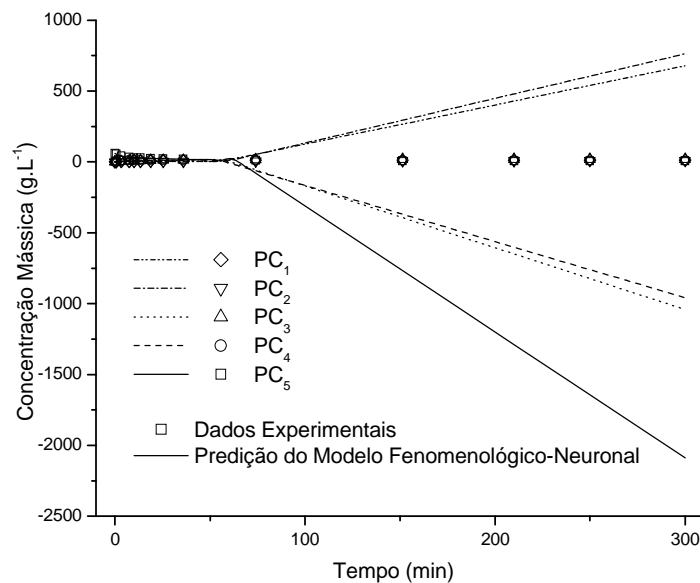
Embora a modelagem cinética utilizando a concentração molar de ligações hidrolisáveis seja importante para o projeto, controle e otimização dos reatores enzimáticos presentes na biorefinaria do soro de queijo, uma descrição mais detalhada dos produtos formados nos cursos das reações é preponderante para o controle de qualidade dos mesmos.

Por causa da relativa complexidade na composição dos substratos estudados (soro de queijo para reações com a Alcalase® e quimotripsina e pré-hidrolisados com quimotripsina para hidrólises com CPA), uma abordagem híbrida fenomenológico-neuronal foi utilizada para o acompanhamento cinético. Enquanto a dinâmica de cada reator foi modelada com o emprego de balanços materiais dos componentes presentes, RNAs inferiram a cinética da reação com base no estado do sistema. Pormenores das arquiteturas das RNAs empregadas para cada uma das três reações estudadas serão apresentados nas subseções seguintes.

Variando o número de camadas, o número de neurônios em cada camada e as funções de transferência, várias arquiteturas de redes MLP foram testadas (a definição de uma topologia adequada faz-se importante, pois aumenta a precisão das predições do modelo durante a validação). Para acelerar o procedimento de seleção, as redes foram treinadas com a técnica de parada antecipada (Haykin, 1999). Para maior concisão, apenas as estruturas que proporcionaram os melhores resultados serão apresentadas. Dados de entrada e de saída foram normalizados entre 0 e 1 quando a função de transferência era linear ou sigmoideal e entre -1 e 1 no caso da tangente hiperbólica (respectivamente, equações 12, 13 e 14 do apêndice desta tese – página 187). O desempenho de cada rede era avaliado com base na soma dos quadrados

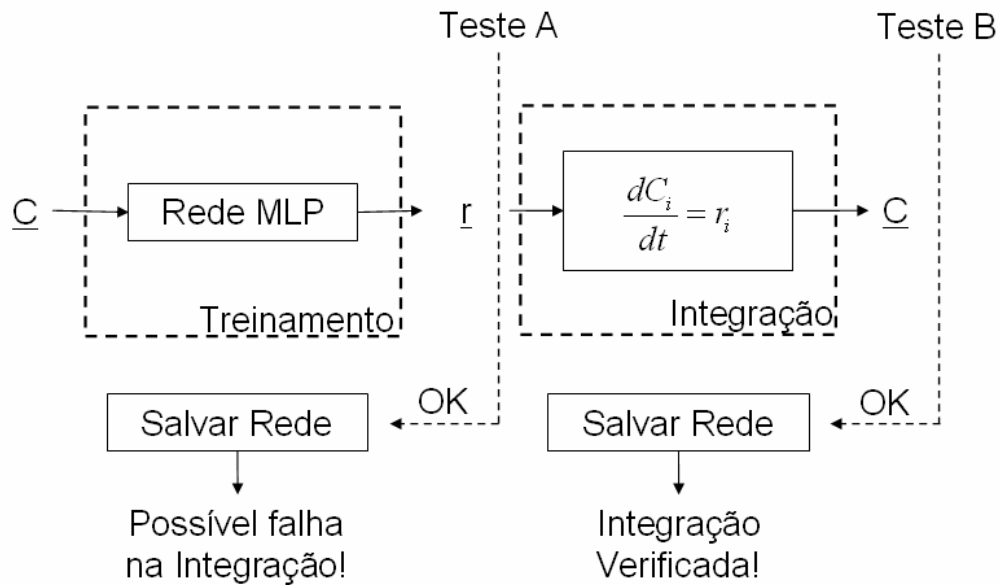
dos resíduos calculados pelas diferenças entre as concentrações experimentais e as previstas após a integração numérica.

Durante os treinamentos das redes MLP notou-se que apesar do adequado mapeamento das concentrações mássicas em um vetor de saída constituído das respectivas velocidades de reação, quando as redes com os pesos já ajustados eram utilizadas em conjunto com os balanços de massa do reator, a integração numérica fornecia resultados inconsistentes, em alguns casos e aleatoriamente, como ilustra a Figura 2.29.



**Figura 2.29:** Exemplo de inconsistência na integração numérica após treinamento de rede MLP (Dados da hidrólise das proteínas do soro de queijo concentrado com Alcalase®-glioxil-agarose).

Para contornar o problema de cálculo observado na integração, foi utilizado o algoritmo de treinamento na forma esquematizada no diagrama de blocos ilustrado na Figura 2.30. Como anteriormente descrito, a falha na integração ocorria quando era realizado apenas o Teste A para aceitar uma rede MLP a ser utilizada posteriormente na integração numérica dos balanços materiais dos componentes no reator. Utilizando em conjunto os testes A e B, porém, foi possível garantir resultados coerentes na integração, ou seja, a rede MLP treinada só é aceita se mapear adequadamente as concentrações no vetor de saída das respectivas velocidades de reação (Teste A) e inferir resultados coerentes durante a integração (Teste B).



**Figura 2.30:** Esquema do algoritmo de treinamento das redes MLP adotado para os modelos fenomenológico-neuronais.

Nos próximos itens são apresentados os resultados do enfoque híbrido fenomenológico-neuronal no acompanhamento dinâmico das três reações enzimáticas estudadas.

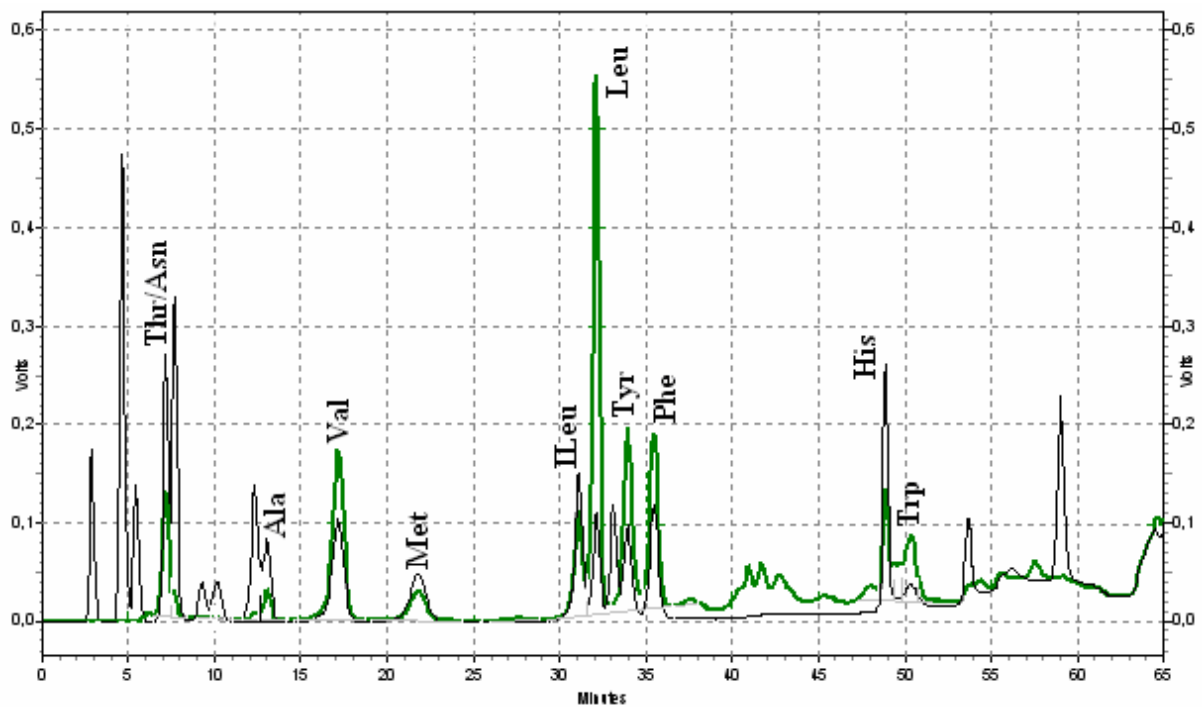
### 2.3.2.1 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição dos Perfis de Aminoácidos Liberados durante Hidrólise com CPA

Como previsto no projeto da biorefinaria do soro de queijo, para obtenção de um concentrado protéico com baixo teor do aminoácido fenilalanina (Phe) em sua composição, duas hidrólises são necessárias: hidrólise das proteínas do soro de queijo concentrado com quimotripsina-glioxil-agarose e, na seqüência, hidrólise do produto dessa reação com o catalisador CPA-glioxil-agarose. Portanto, o substrato da segunda reação foi aqui tratado como um pré-hidrolisado de quimotripsina 12,4%, sendo 12,4% o valor do grau de hidrólise atingido durante a reação com a endoprotease.

O grau de hidrólise a ser obtido com a quimotripsina é um parâmetro de muita importância para o projeto da biorefinaria do soro de queijo. Enquanto Galvão, 2004, obteve máxima liberação de Phe com um pré-hidrolisado de quimotripsina 12,4%, Padilla, 2007, só conseguiu rendimentos semelhantes na liberação do aminoácido quando um pré-hidrolisado de quimotripsina com grau de hidrólise próximo de 15% era utilizado. Como um dos objetivos desta tese foi o desenvolvimento de algoritmos para a inferência de estado dos

reatores enzimáticos, a variabilidade na condição experimental tornou-se interessante para validar a metodologia em diferentes situações. O pré-hidrolisado majoritariamente utilizado foi aquele com grau de hidrólise de 12,4%, visto que os estudos de Padilla, 2007, ocorreram em paralelo com os aqui desenvolvidos. Não obstante, a necessidade de modelos robustos, porém com procedimentos adequados para reajuste de seus parâmetros à medida que ocorrem modificações nas condições operacionais do processo, fica salientada nesse caso e endossa os estudos aqui apresentados.

Após 10 h de hidrólise com CPA imobilizada em gel glioxil-agarose um quadro típico da distribuição dos aminoácidos liberados em um reator batelada é exposto no cromatograma da Figura 2.31.

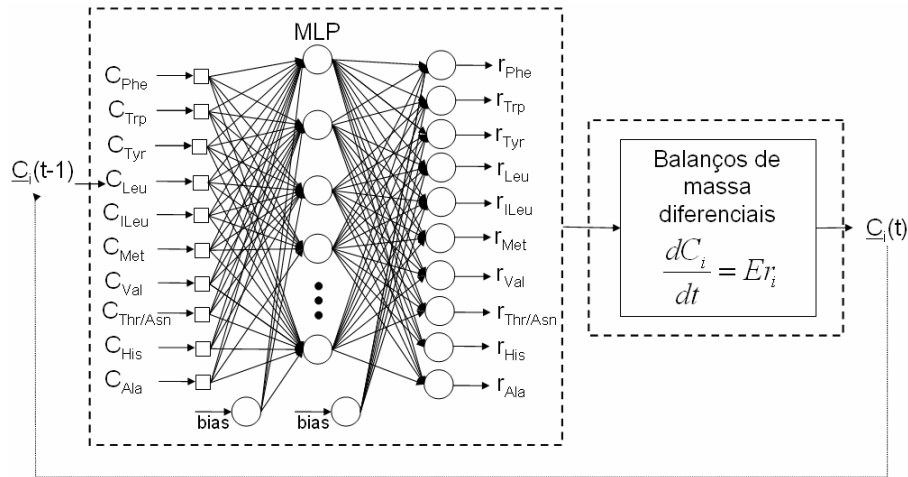


**Figura 2.31:** Cromatograma típico obtido após 10 h de hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

(—) Padrão de aminoácidos; (—) Hidrolisado.

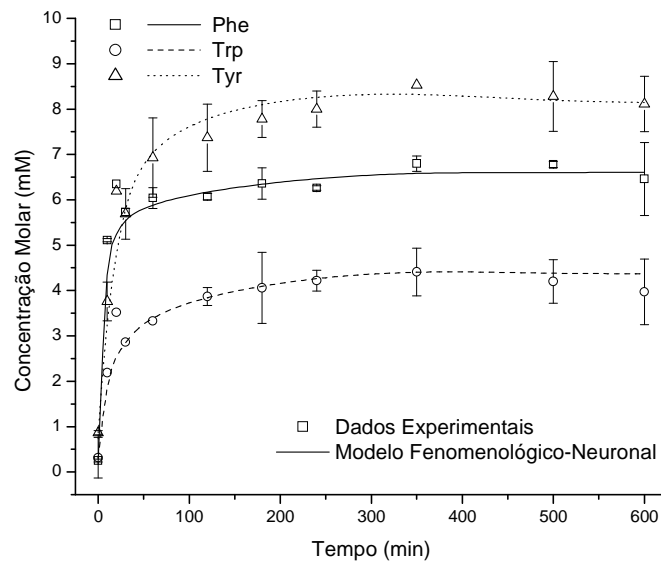
Amostras retiradas durante toda a reação forneceram cromatogramas semelhantes ao da Figura 2.31. Perfis de concentração ao longo do tempo de reação foram então obtidos para onze aminoácidos: Phe, Trp, Tyr, Leu, Ileu, Val, Met, Thr, Asn, His e Ala. Depois de suavizados, esses perfis foram utilizados para o cálculo das velocidades de hidrólise para treinamento da rede MLP. Essa era constituída, tanto na camada oculta quanto na camada de

saída, por dez neurônios, com a função sigmóide em ambas. A Figura 2.32 ilustra o modelo híbrido com a RNA utilizada e seus pesos ajustados constam do Anexo E.1. Na mesma figura o balanço material para cada aminoácido é mostrado para o reator batelada:  $E$  representa a concentração do catalisador em  $U_{H-PHE}.L^{-1}$ ;  $C_i$  e  $r_i$ , respectivamente, a concentração molar em mM e a velocidade de reação do aminoácido  $i$  em  $mmol.U_{H-PHE}^{-1}.min^{-1}$  (total de dez equações).

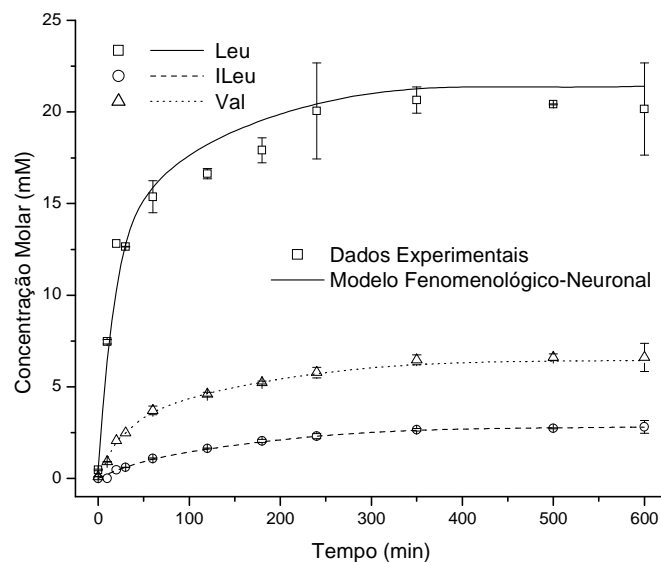


**Figura 2.32:** Esquema do modelo híbrido fenomenológico-neuronal empregado na hidrólise com CPA-glioxil-agarose.

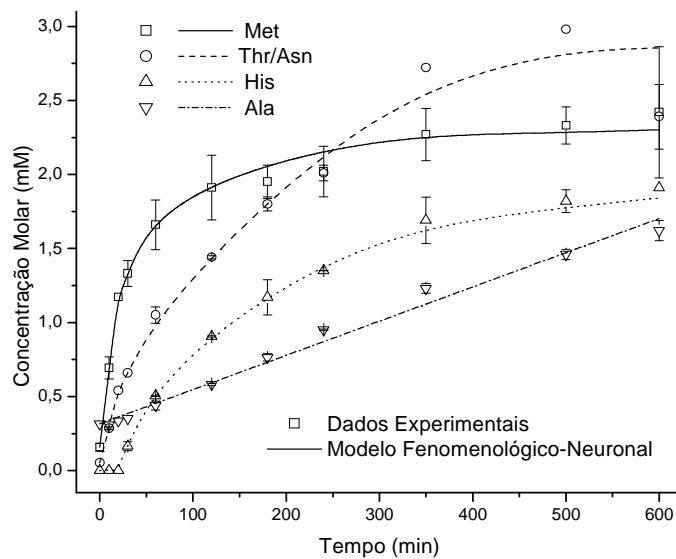
Treinada a rede MLP, o algoritmo híbrido fenomenológico-neuronal foi então utilizado para predição dos perfis de cada aminoácido. Os resultados das integrações numéricas são apresentados nas próximas três figuras, onde se nota o bom desempenho da abordagem. Para cada aminoácido, duas concentrações foram utilizadas apenas para validação do modelo, e não integravam o conjunto de dados durante os procedimentos de treinamento da rede MLP.



**Figura 2.33:** Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Phe, Trp e Tyr liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Fenomenológico-Neuronal. Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.



**Figura 2.34:** Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Leu, ILeu e Val liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Fenomenológico-Neuronal. Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.



**Figura 2.35:** Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Met, Thr, Asn, His e Ala liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Fenomenológico-Neuronal.

Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

Ainda neste capítulo, outra abordagem baseada em coeficientes de rendimento será apresentada para acompanhamento dos aminoácidos liberados durante a hidrólise com a enzima CPA. Tratando-se também de um modelo semi-empírico a modelagem que emprega coeficientes de rendimento foi a de fato escolhida para ensaios de validação em reator contínuo de mistura com membrana (Padilla, 2007). Por outro lado, os bons resultados obtidos com o modelo híbrido fenomenológico-neuronal na proteólise com CPA mostram que essa metodologia é factível para substratos complexos em reações de despolimerização como é o caso nas hidrólises com quimotripsina e Alcalase®, cujos resultados são apresentados na seqüência.

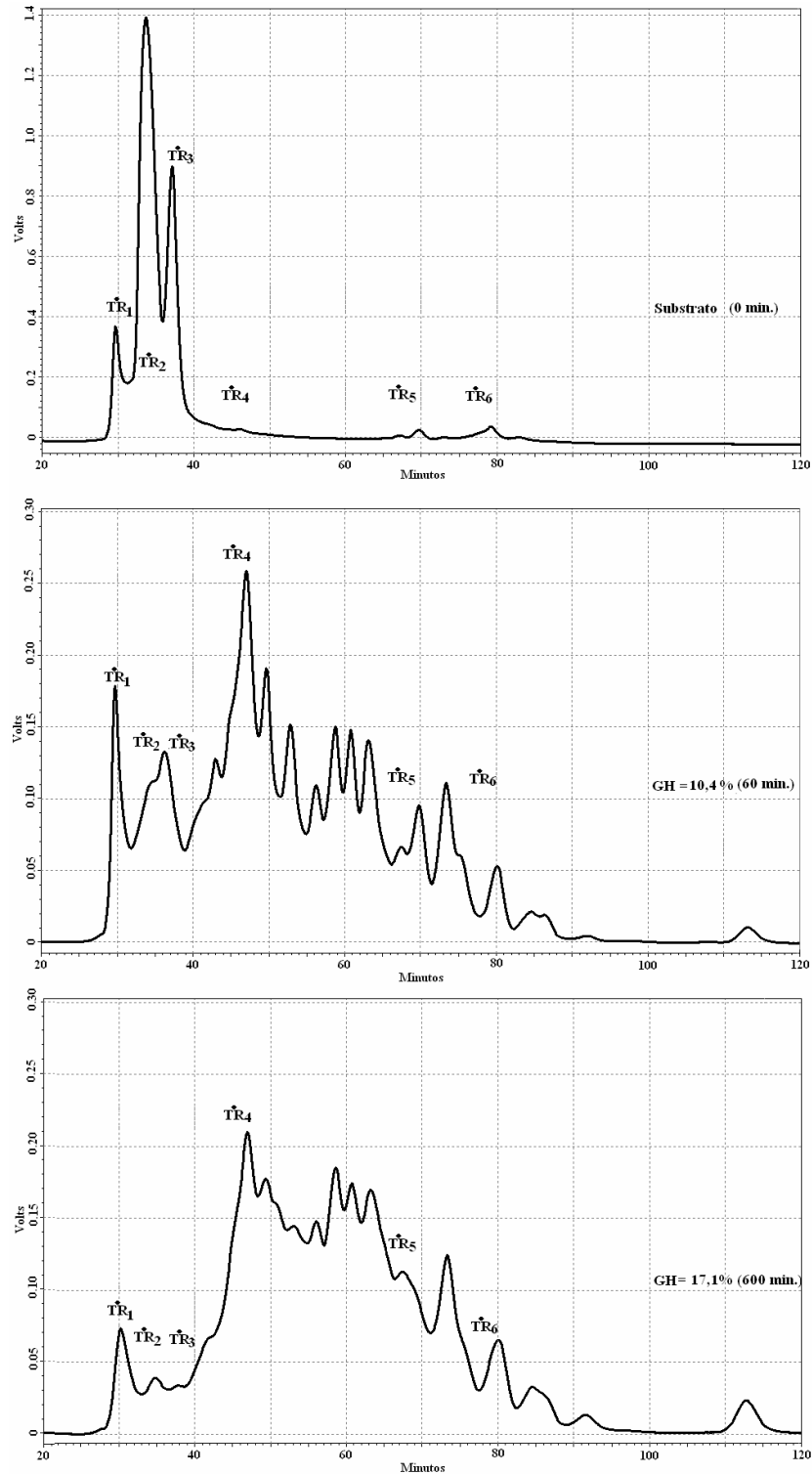
### 2.3.2.2 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição da Distribuição de Massas Molares dos Hidrolisados Formados ao longo da Hidrólise com Quimotripsina

Ao contrário da reação com CPA onde os aminoácidos liberados podem ser individualmente identificados via análise em HPLC, na reação com quimotripsina parte-se de uma complexa mistura contendo inicialmente lactose e as proteínas  $\alpha$ -Lactoalbumina,  $\beta$ -Lactoglobulina, soro albumina bovina e imunoglobulinas para, no decorrer da hidrólise, obter-



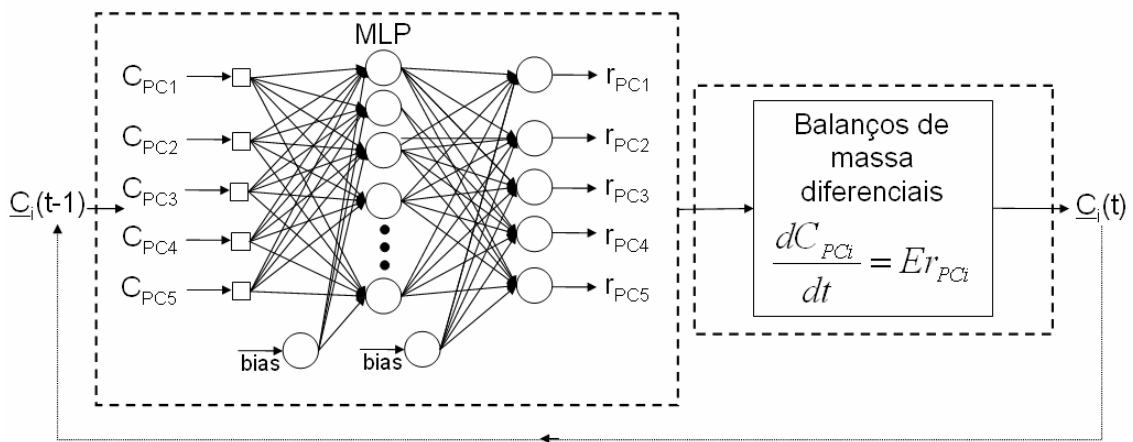
se uma mistura de peptídeos contendo principalmente Phe, Tyr e Trp em suas porções carboxi-terminais. Cromatogramas típicos do hidrolisado ao longo da reação com quimotripsina são apresentados na Figura 2.36, onde a complexa mistura de componentes com diferentes tamanhos presentes no produto reacional fica evidente.

Com o quadro apresentado na Figura 2.36, a alternativa natural para o acompanhamento cinético foi agrupar os componentes em faixas de massas molares pré-especificadas com padrões de proteínas e peptídeos. Os hidrolisados formados durante a proteólise foram agrupados em cinco pseudocomponentes  $PC_i$ , a saber:  $PC_1$ ,  $MM_1 \leq 560$  Da;  $PC_2$ ,  $560$  Da  $< MM_2 \leq 1003$  Da;  $PC_3$ ,  $1003$  Da  $< MM_3 \leq 5800$  Da;  $PC_4$ ,  $5800$  Da  $< MM_4 \leq 14000$  Da;  $PC_5$ ,  $14000$  Da  $< MM_5$ .  $MM_i$  refere-se à massa molar do pseudocomponente  $i$ .



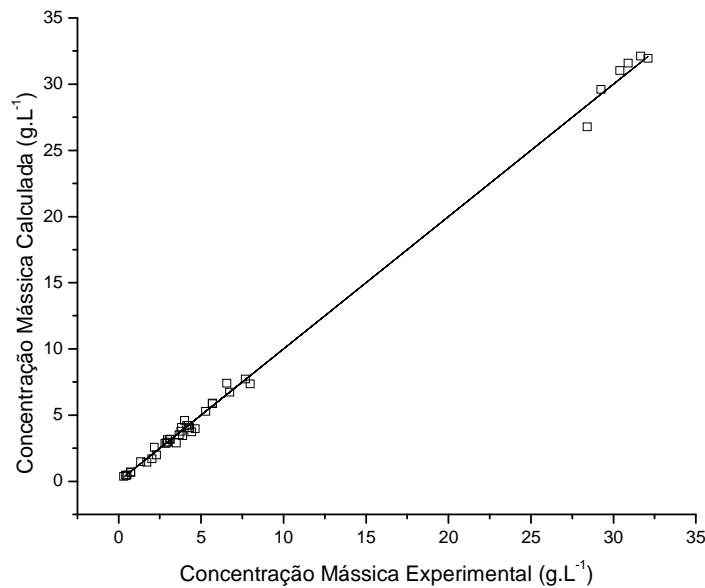
**Figura 2.36:** Cromatogramas típicos obtidos durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato ( $50,0 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Na figura, **GH** refere-se a grau de hidrólise e **TR** ao tempo de retenção médio dos seguintes padrões: soro albumina bovina ( $\text{TR}_1 = 29 \text{ min}$ );  $\beta$ -lactoglobulina ( $\text{TR}_2 = 34 \text{ min}$ );  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\text{TR}_3 = 38 \text{ min}$ ); insulina ( $\text{TR}_4 = 45 \text{ min}$ ); angiotensina II ( $\text{TR}_5 = 67 \text{ min}$ ) e leucina encefalina ( $\text{TR}_6 = 77 \text{ min}$ ).

Três redes do tipo MLP foram treinadas para prever as velocidades de reação de cada pseudocomponente  $PC_i$  durante a hidrólise, uma para cada valor de pH: 7,8; 8,0 e 8,5. Cada rede MLP consistia de uma camada oculta (doze neurônios) e uma camada de saída (cinco neurônios), e a sigmóide foi a função de ativação em ambas as camadas. A Figura 2.37 ilustra o modelo empregado. Na figura, o balanço material para cada pseudocomponente é mostrado para o reator batelada:  $E$  representa a concentração de quimotripsina em  $\text{g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{PCi}$  e  $r_{PCi}$ , respectivamente, a concentração mássica em  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  e a velocidade de reação do pseudocomponente  $i$  em  $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{quimotripsina}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (total de 5 equações diferenciais ordinárias).



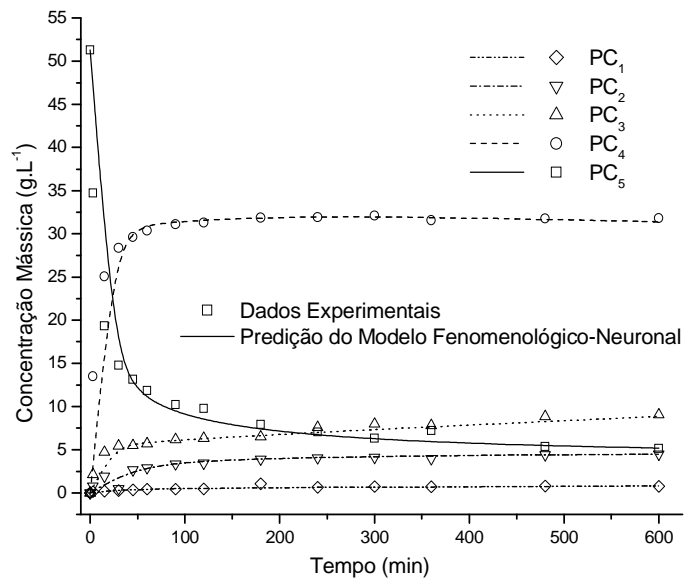
**Figura 2.37:** Esquema do modelo híbrido fenomenológico-neuronal empregado na hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose.

A Figura 2.38 mostra a baixa dispersão do conjunto de dados utilizado para validação dos modelos fenomenológico-neuronais, assegurando a qualidade do ajuste. No treinamento de cada rede MLP, doze dados experimentais de cada pseudocomponente foram utilizados para treinamento e dois dados para teste (os pesos das três redes constam do Anexo E.2).

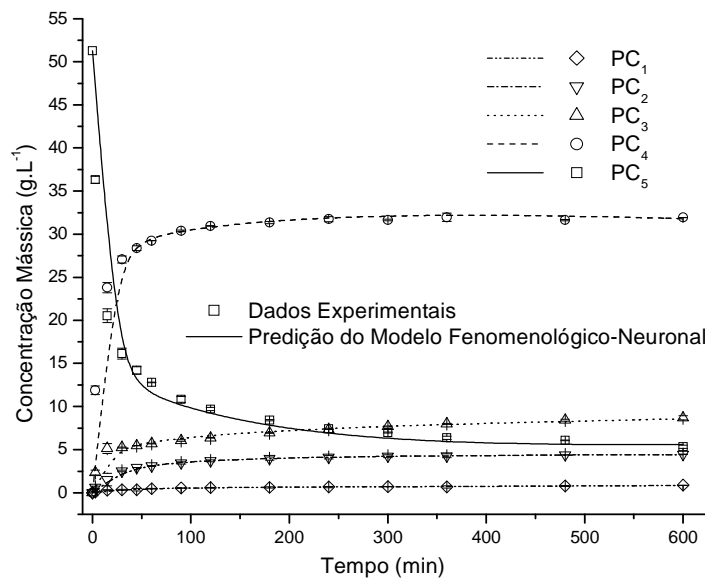


**Figura 2.38:** Dispersão dos dados de teste nas predições da distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólises das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ). Dados não utilizados para treinamento das redes MLP.

Nas três figuras seguintes, os perfis experimentais e inferidos por cada modelo para os cinco pseudocomponentes considerados são comparados. Nas figuras é possível constatar o bom desempenho preditivo dos modelos. Como será enfatizado na subseção seguinte, que trata do acompanhamento cinético durante a hidrólise com a Alcalase®, é preferível utilizar um modelo híbrido para cada valor de pH a incluir essa variável como entrada em uma rede MLP de topologia um pouco mais complexa. Como no processo em particular a variabilidade do substrato é alta, modelos com estruturas simples, porém com parâmetros facilmente reajustáveis, são preferíveis. Já para valores intermediários de pH, procede-se a interpolação linear entre os valores de velocidades de reação preditos pelas redes MLP (interpolação também descrita no próximo item).

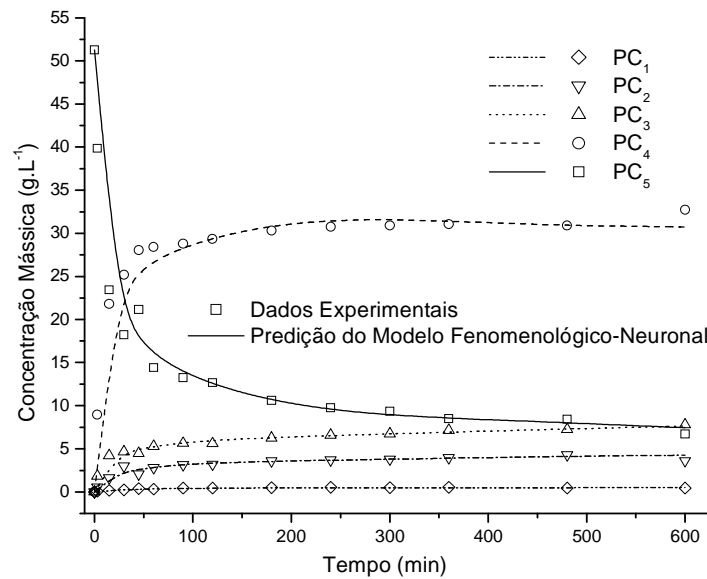


**Figura 2.39:** Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ )  $55^\circ\text{C}$ , pH 7,8. Condições da reação: 25 mL de substrato ( $50,0 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ .



**Figura 2.40:** Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ )  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato ( $50,0 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.



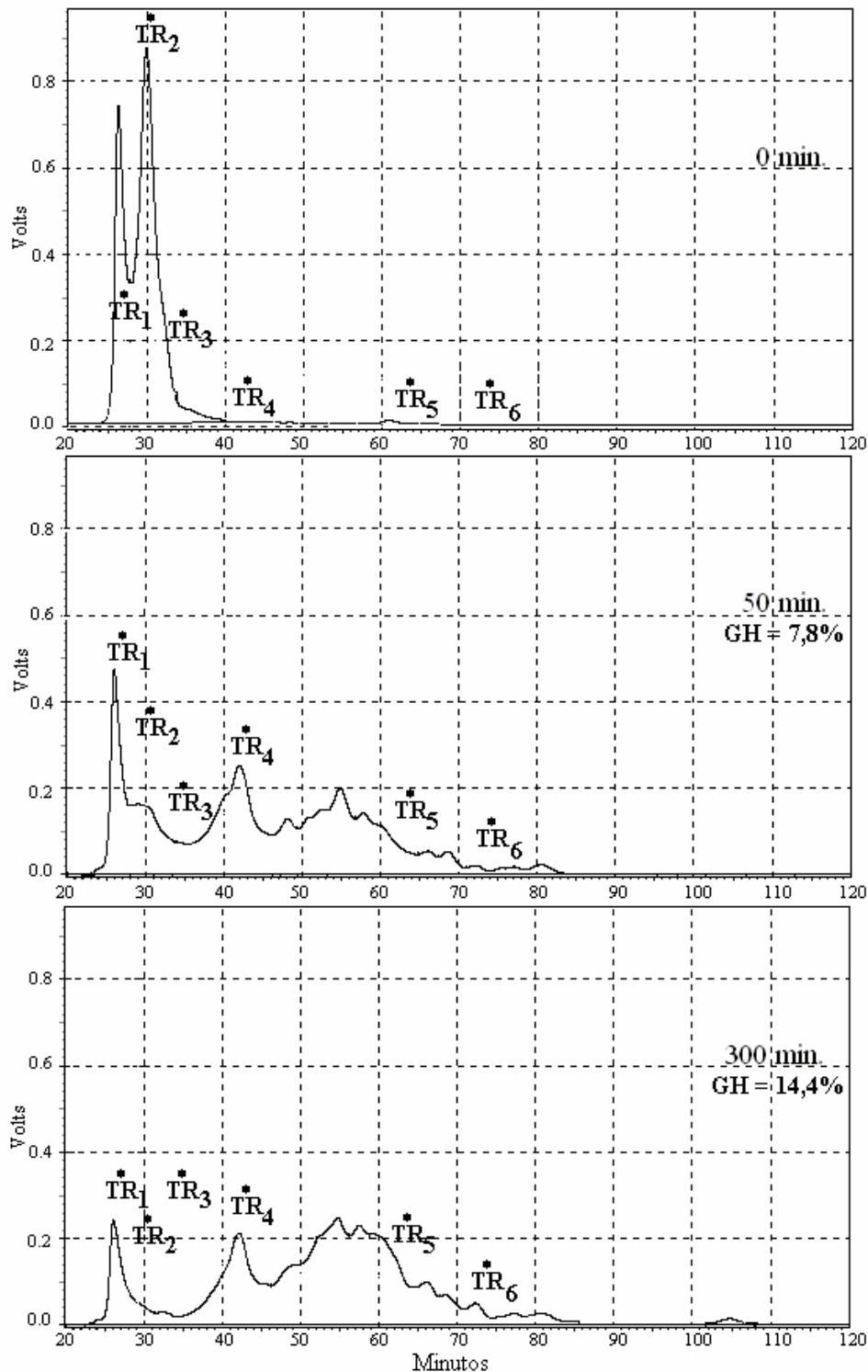
**Figura 2.41:** Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ )  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,5. Condições da reação: 25 mL de substrato ( $50,0 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### 2.3.2.3 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição da Distribuição de Massas Molares dos Hidrolisados Formados ao longo da Hidrólise com Alcalase®

Como proteínas do soro de queijo concentrado são substratos comuns para as hidrólises com quimotripsina e Alcalase®, o quadro descrito para essa última é semelhante ao daquela: uma complexa mistura de proteínas e peptídeos se origina à medida que se avança o grau da reação – como ilustram os cromatogramas típicos da hidrólise na Figura 2.42.

O modelo fenomenológico-neuronal proposto aqui para a Alcalase® expande a abordagem descrita por Sousa, 2003, que considerou efeitos de variações de pH no valor da velocidade de reação prevista pelas redes MLP (pH entre 7 e 10). Aqui foram contabilizados também possíveis efeitos de variações de temperatura durante a reação, de forma a atender às condições operacionais do reator enzimático da proteólise com Alcalase®-glioxil-agarose: pH 9,5 e temperatura de  $50^\circ\text{C}$  (Sousa *et al.*, 2004).

Cinco pseudocomponentes,  $PC_i$ , foram utilizados para a modelagem:  $PC_1$ ,  $MM_1 \leq 650 \text{ Da}$ ;  $PC_2$ ,  $650\text{Da} < MM_2 \leq 1050\text{Da}$ ;  $PC_3$ ,  $1050\text{Da} < MM_3 \leq 4150\text{Da}$ ;  $PC_4$ ,  $4150\text{Da} < MM_4 \leq 14000\text{Da}$ ;  $PC_5$ ,  $14000\text{Da} \leq MM_5$ ;  $MM_i$  refere-se à massa molar do pseudocomponente  $i$ .



**Figura 2.42:** Cromatogramas típicos obtidos durante hidrólise com Alcalase®-glicoxil-agarose ( $2,8 \text{ U}_{\text{BAEE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $40^\circ\text{C}$ , pH 8,5. Condições da reação: 30 mL de substrato ( $53,0 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $134,4 \text{ U}_{\text{BAEE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Na figura, **GH** refere-se a grau de hidrólise e **TR** ao tempo de retenção médio dos seguintes padrões: soro albumina bovina ( $\text{TR}_1 = 27 \text{ min}$ );  $\beta$ -lactoglobulina ( $\text{TR}_2 = 31 \text{ min}$ );  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\text{TR}_3 = 35 \text{ min}$ ); insulina ( $\text{TR}_4 = 42 \text{ min}$ ); angiotensina II ( $\text{TR}_5 = 64 \text{ min}$ ) e leucina encefalina ( $\text{TR}_6 = 74 \text{ min}$ ).

A Tabela 2.4 classifica as sete redes MLP treinadas de acordo com uma estrutura fenomenológico-neuronal análoga à definida para a quimotripsina na Figura 2.37.

**Tabela 2.4:** Classificação das redes MLP treinadas para diferentes valores de pH e temperatura na reação com Alcalase®-glioxil-agarose.

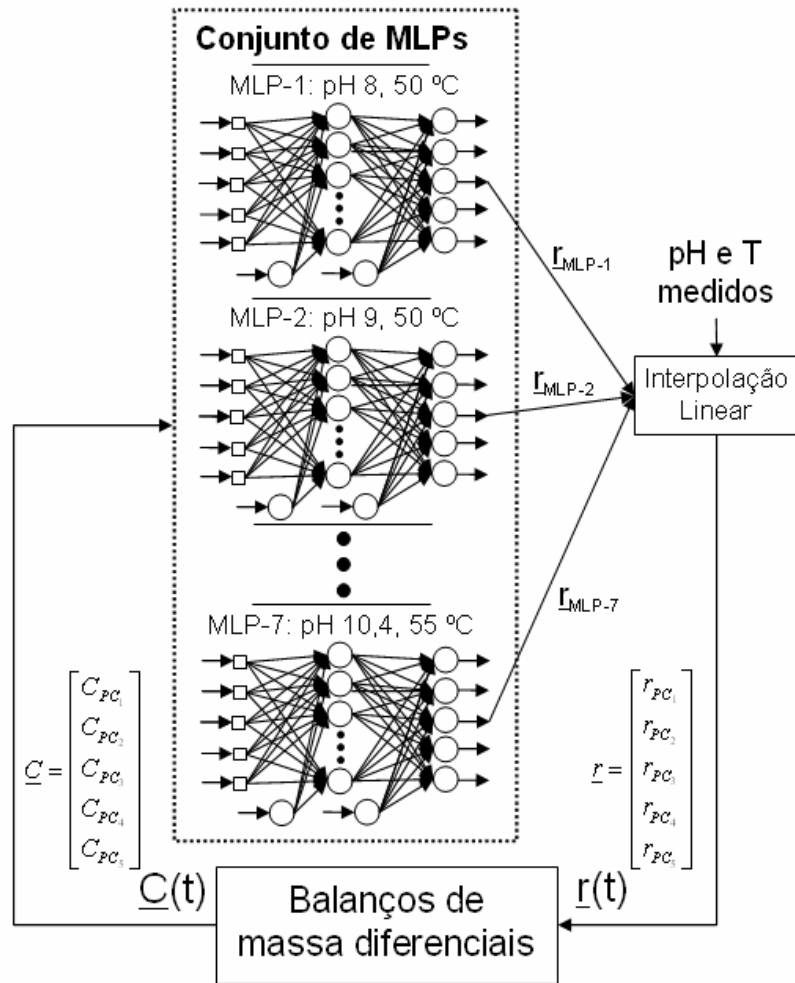
<b>Rede MLP</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
MLP-1	8,00	50,0
MLP-2	9,00	50,0
MLP-3	10,0	50,0
MLP-4	8,5	40,0
MLP-5	10,4	40,0
MLP-6	8,5	55,0
MLP-7	10,4	55,0

A topologia de cada rede MLP possuía uma camada oculta com nove neurônios e uma camada de saída com cinco (pesos ajustados constam do Anexo E.3). Assim como nas outras duas reações estudadas, a função do tipo sigmoideal foi utilizada em ambas as camadas da rede MLP.

A Figura 2.43 ilustra o esquema do modelo híbrido quando todas as redes MLP são utilizadas. Os efeitos de pH e temperatura são considerados via interpolação linear. Por exemplo: se  $\text{pH} = 9,3$  e  $T = 53\text{ °C}$ , as predições das redes MLP-6 e MLP-7 são interpoladas no pH ( $T = 55\text{ °C}$ ); repete-se o procedimento para as redes MLP-2 e MLP-3 ( $T = 50\text{ °C}$ ) e, finalmente, os resultados dessas duas interpolações no pH são novamente interpolados, agora com relação à temperatura. Somente o resultado final é fornecido ao balanço material no reator enzimático.

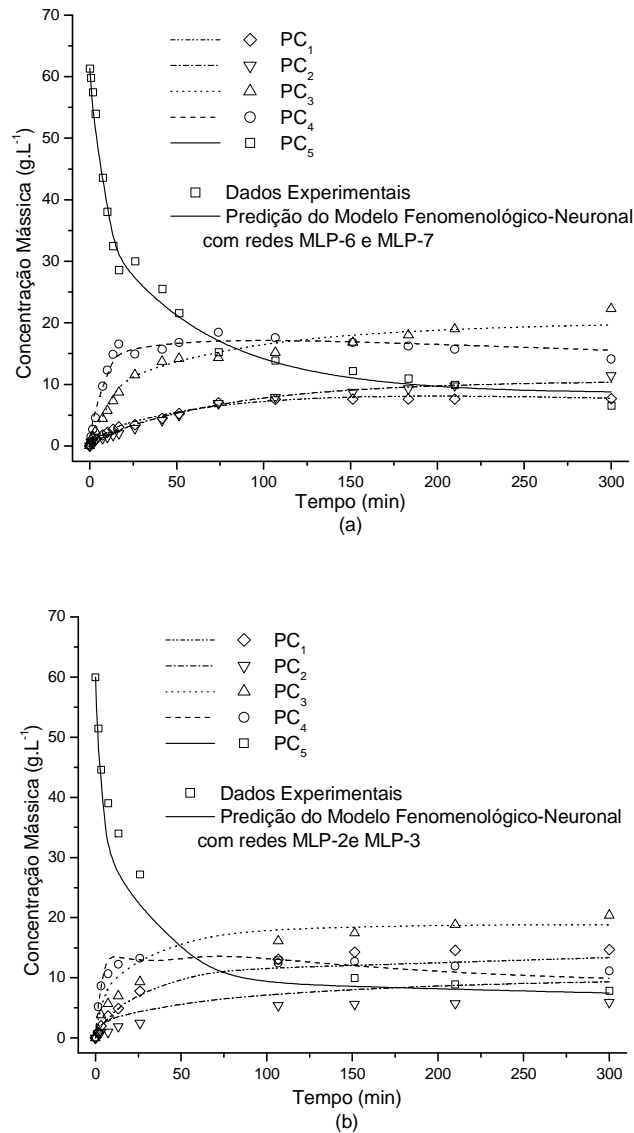
Interpolações exponenciais foram também testadas, com resultados muito próximos às lineares que, por conveniência, foram adotadas como padrão (Pinto *et al.*, 2007).





**Figura 2.43:** Diagrama esquemático do modelo fenomenológico-neuronal utilizado no monitoramento da hidrólise com a Alcalase®.

A Figura 2.44 mostra o bom desempenho do modelo híbrido esquematizado na Figura 2.43 em ensaios de validação do sistema. Em ambos os experimentos, utiliza-se um valor de pH intermediário, 9,5, não usado durante a fase de treinamento. Para o cálculo das velocidades de reação nesse valor de pH, interpolações lineares das previsões das redes MLP-6 e MLP-7 são utilizadas no primeiro caso (Figura 2.44a) e das redes MLP-2 e MLP-3 no segundo (Figura 2.44b).



**Figura 2.44:** Distribuição das massas molares dos hidrolisados durante hidrólise das proteínas do soro com Alcalase®-glioxil-agarose (2,8 U<sub>BAEE</sub>.g<sub>gel</sub><sup>-1</sup>). Condições da reação: 30 mL de substrato, concentração enzimática de 134,4 U<sub>BAEE</sub>.L<sup>-1</sup>. (a) 61,0 g<sub>proteína</sub>.L<sup>-1</sup>; pH 9,5 (55 °C); (b) 60,0 g<sub>proteína</sub>.L<sup>-1</sup>; pH 9,5 (50 °C). Dados de teste, não utilizados para treinamento das redes MLP.

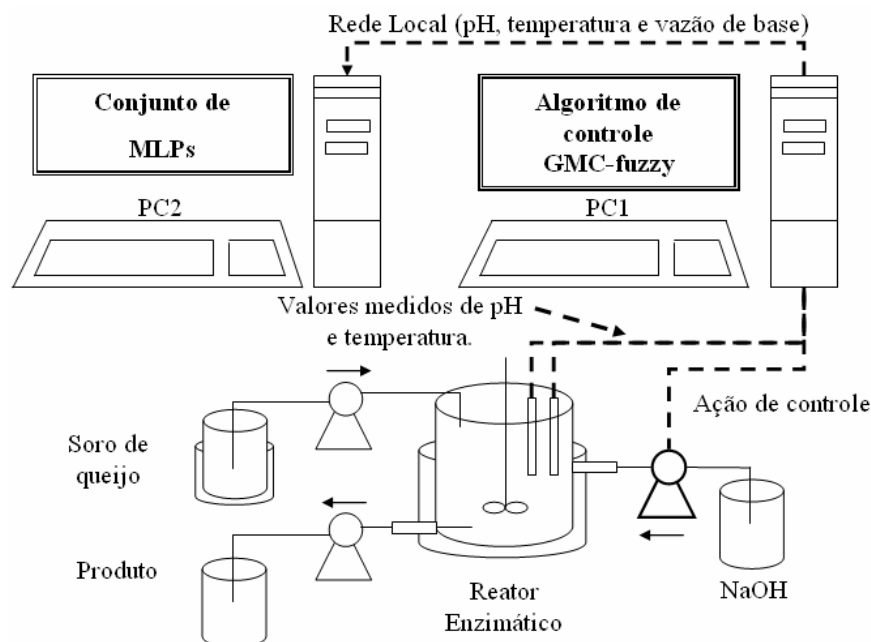
Finalmente, a qualidade de predição da abordagem fenomenológico-neuronal foi testada durante a partida de um reator contínuo de mistura. No caso, os balanços de massa dos pseudocomponentes são dados pelas equações diferenciais ordinárias 2.41 e 2.42.

$$\frac{dC_{PCi}}{dt} = E \cdot r_{PCi} - \frac{q_F + q_C}{V} C_{PCi}, i = 1, \dots, 4 \quad (2.41)$$

$$\frac{dC_{PC5}}{dt} = E \cdot r_{PC5} - \frac{q_F + q_C}{V} C_{PC5} + \frac{q_F}{V} C_{PC5}^F \quad (2.42)$$

Sendo:  $C_{PCi}$  – a concentração mássica do pseudocomponente  $i$ ;  $r_{PCi}$  – a velocidade de reação (interpolada pelas redes definidas na Tabela 2.4);  $E$  – a concentração de Alcalase® no reator;  $q_F$  e  $q_C$  – respectivamente, as vazões de alimentação do substrato e de base (utilizada para controlar o pH do meio reacional);  $V$  – o volume do reator;  $C_{PC5}^F$  – a concentração do pseudocomponente 5 (soro concentrado) na vazão de alimentação.

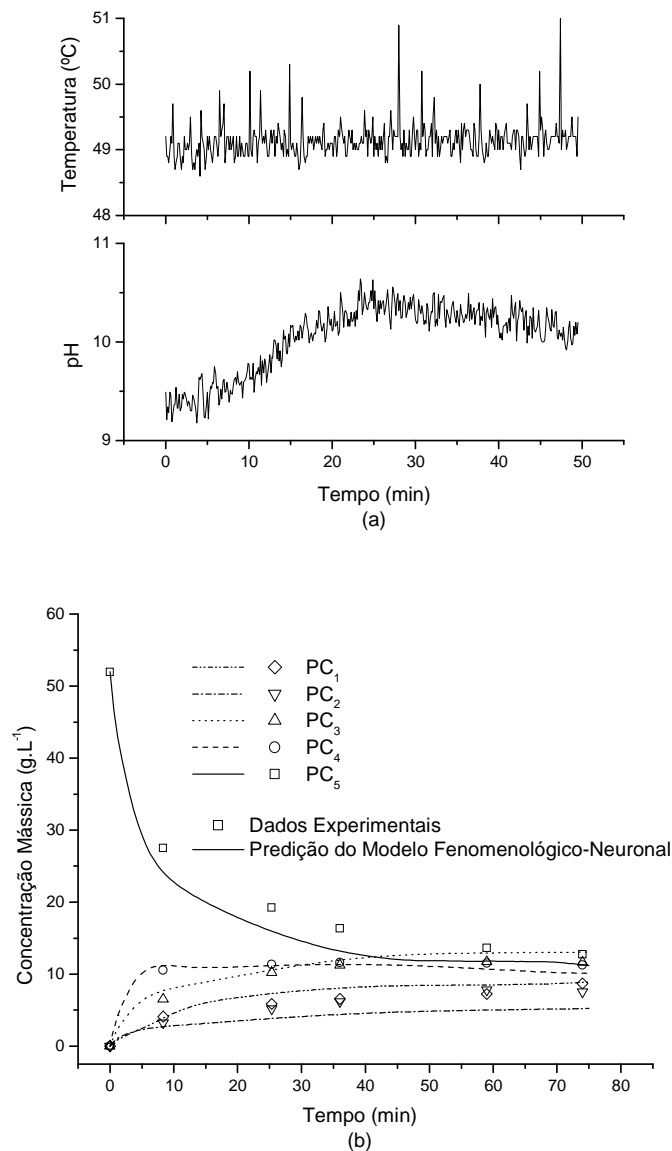
Detalhes do aparato experimental utilizado para aquisição e transmissão de dados, monitoramento e controle do reator são fornecidos por Sousa, 2003. Um esquema ilustrativo do sistema é dado na Figura 2.45.



**Figura 2.45:** Diagrama esquemático do sistema utilizado para partida do reator contínuo de mistura. Hidrólise das proteínas do soro de queijo concentrado com Alcalase®-glioxil-agarose. As redes neurais ficam no computador dedicado (PC2).

A Figura 2.46b compara o bom desempenho do modelo com dados experimentais amostrados durante a partida do reator operado no modo contínuo. A Figura 2.46a apresenta os perfis de pH e temperatura obtidos durante o ensaio, onde se nota os ruídos associados às medidas (desvio padrão,  $\sigma = 0,35$  para o pH e  $\sigma = 0,26$  °C para a temperatura). Com os sinais adquiridos de pH e temperatura ao longo do experimento, os valores de velocidades de reação inferidos pelas sete redes definidas na Tabela 2.4 eram interpolados linearmente e utilizados

na integração numérica dos balanços materiais do reator enzimático representado pelas equações 2.41 e 2.42. Mesmo com o modelo utilizando sinais ruidosos de pH e de temperatura, os perfis suavizados para os pseudocomponentes indicam a capacidade do sistema híbrido em atenuar a rápida dinâmica dos ruídos associados às medidas, uma propriedade importante das redes do tipo MLP (Nelles, 2001).



**Figura 2.46:** Validação da modelagem fenomenológico-neuronal durante partida de reator contínuo de mistura com Alcalase®. Condições da reação: 500 mL de substrato (52,0 g<sub>proteína</sub>.L<sup>-1</sup>), concentração enzimática de 149,5 U<sub>BAEE</sub>.L<sup>-1</sup>. (a) qualidade dos sinais adquiridos de pH e temperatura durante experimento; (b) distribuição de massas molares dos peptídeos formados durante hidrólise das proteínas do soro com Alcalase®-glicoxil-agarose (2,8 U<sub>BAEE</sub>.g<sub>gel</sub><sup>-1</sup>).

Na modelagem fenomenológico-neuronal apresentada em toda esta seção (para as três proteólises), o fator chave foi a interpolação linear de predições de redes com topologias reduzidas ao invés de acrescentar os valores de pH e temperatura como parâmetros no vetor de entrada de uma rede MLP de complexidade superior. Um modelo de complexidade reduzida é preferível para um substrato com alta variabilidade em sua composição como o soro de queijo, pois torna o procedimento de reajuste de seus parâmetros (no caso os pesos das redes MLP) uma rotina de fácil repetição, por exemplo, durante o monitoramento de um reator industrial. Nesse contexto, amostras coletadas para análise em HPLC seriam necessárias apenas durante as etapas de treinamento e teste das novas redes MLPs, ficando a cargo do modelo híbrido fenomenológico-neuronal o monitoramento em tempo real do reator para diferentes composições no substrato.

### **2.3.3 – COEFICIENTES DE RENDIMENTO PARA PREDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE AMINOÁCIDOS LIBERADOS DURANTE A PROTEÓLISE COM CPA-GLIOXIL-AGAROSE**

A operação ótima do reator enzimático onde se processa a liberação de aminoácidos hidrofóbicos com o catalisador CPA-glioxil-agarose demanda um modelo cinético acurado do processo. Em uma concepção integrada reator e membrana, onde a separação dos aminoácidos liberados é realizada de forma simultânea com a reação, o desenvolvimento de um modelo cinético que descreva com precisão a composição do meio reacional constitui uma etapa importante no estudo de condições operacionais economicamente viáveis para o sistema (Padilla, 2007).

No quadro geral descrito acima, uma alternativa é o esquema híbrido de modelagem, onde, para o caso específico do acompanhamento cinético, balanços materiais dos componentes presentes no reator são acoplados a modelos empíricos usualmente responsáveis pela predição das velocidades de reação. Como mostrado no item **2.3.2.1 – Abordagem Fenomenológico-Neuronal para Predição dos Perfis de Aminoácidos Liberados durante Hidrólise com CPA**, modelos híbridos fenomenológico-neuronais podem prever com precisão a concentração molar dos aminoácidos durante a hidrólise com CPA. Nesta seção, entretanto, outra possível abordagem para a concepção híbrida é apresentada conforme descrita por Tardioli, 2003. Nela o autor definiu o rendimento individual de cada aminoácido  $Y_i$ , como a razão entre a velocidade de liberação do aminoácido  $i$  e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais como mostrado na Equação 2.43:

$$Y_i = \frac{V_i(t)}{V_P(t)} \quad (2.43)$$

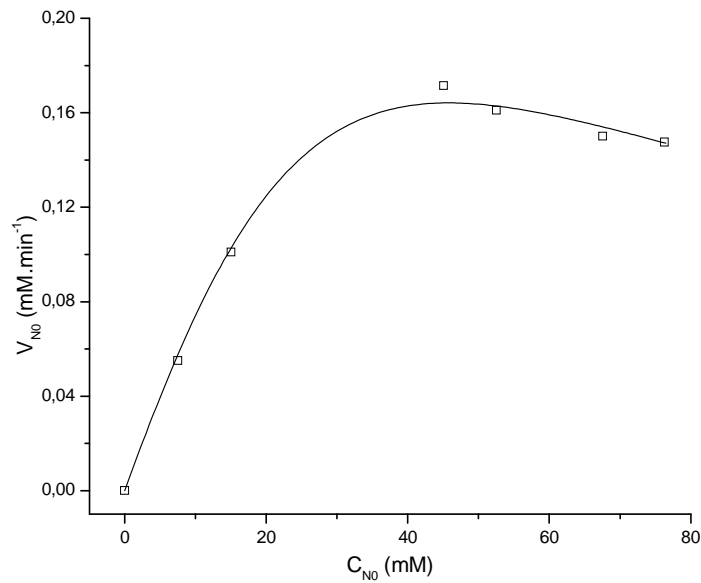
Sendo:  $V_i$  – a velocidade de liberação de cada aminoácido no instante  $t$ ;  $V_P$  – a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais.

Como indicado na equação acima, expressões cinéticas para  $V_P$  e para cada aminoácido,  $V_i$ , devem ser definidas para o cálculo de  $Y_i$ . No primeiro item desta seção são mostrados os resultados para a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais  $V_P$ . No item seguinte são apresentados os resultados da modelagem baseada em coeficientes de rendimento para a predição da concentração molar dos aminoácidos em reator batelada e a validação da metodologia em um sistema reator com membrana.

### 2.3.3.1 – Modelagem da Velocidade Global de Clivagem das Ligações Peptídicas Carboxi-Terminais

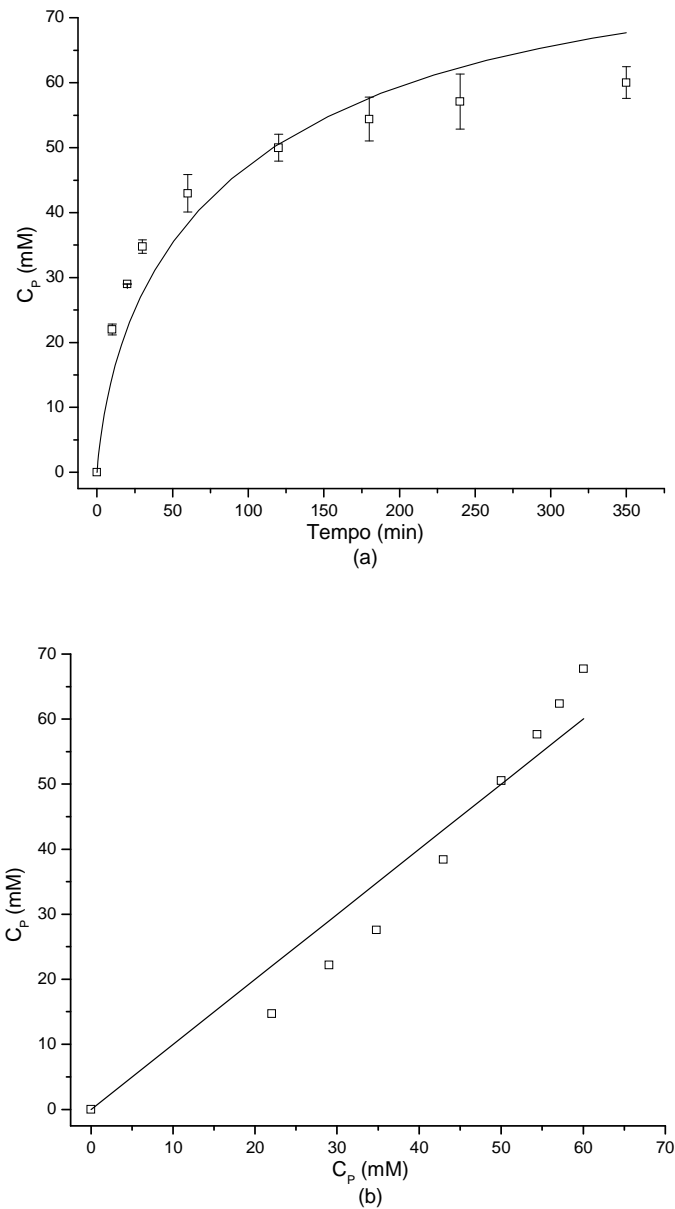
Repetiu-se aqui a metodologia empregada na modelagem cinética de ligações hidrolisadas com quimotripsina: assumindo uma cinética de Michaelis-Menten ajustou-se os parâmetros  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  da Equação 2.21 com dados de velocidades iniciais e com um ensaio de longa duração para determinação do quarto parâmetro da mesma equação,  $K_P$ .

Estimativas dos parâmetros cinéticos  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$ , foram obtidas aplicando o método das velocidades iniciais  $V_N$  versus  $C_{N0}$  (Equação 2.21; com  $C_P$  igual a zero). O bom ajuste obtido é apresentado na Figura 2.47 com os seguintes parâmetros:  $k = 2,48 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-2}$  mmol.min<sup>-1</sup>.U<sub>H-PHE</sub><sup>-1</sup>;  $K_M = 150,0 \pm 419$  mM e  $K_N = 14,0 \pm 42$  mM. Como de praxe para equações do tipo Michaelis-Menten, os três parâmetros mostram desvios-padrão estimados na mesma ordem de magnitude de seus valores nominais.



**Figura 2.47:** Velocidades iniciais nas hidrólises de ligações peptídicas carboxi-terminais com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 25 mL de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% ( $5\text{-}50,8 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) eram hidrolisados com  $50 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$  durante 30 min e amostras eram retiradas durante esse tempo para análise em HPLC. Modelo (—): Michaelis-Menten com inibição por substrato (Equação 2.21;  $k = 2,48 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{U}_{\text{H-PHE}}^{-1}$ ;  $K_M = 150,0 \text{ mM}$ ;  $K_N = 14,0 \text{ mM}$ ).

De posse dos valores estimados para  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$ , o parâmetro  $K_P$  da Equação 2.21 foi ajustado com dados de um ensaio batelada de longa duração. O algoritmo híbrido de busca *Simulated Annealing*-Levenberg-Marquardt foi usado para estimativa de  $K_P$ :  $1,91 \pm 3 \times 10^{-4} \text{ mM}$  (o desvio de  $K_P$  foi calculado assumindo os valores de  $k$ ,  $K_M$  e  $K_N$  invariantes). A Figura 2.48 mostra que, assim como na hidrólise com quimotripsina, a hipótese de estado pseudo-estacionário falha na predição da concentração molar das ligações hidrolisadas na reação com CPA, apresentando desvios sistemáticos no curso de toda a hidrólise.

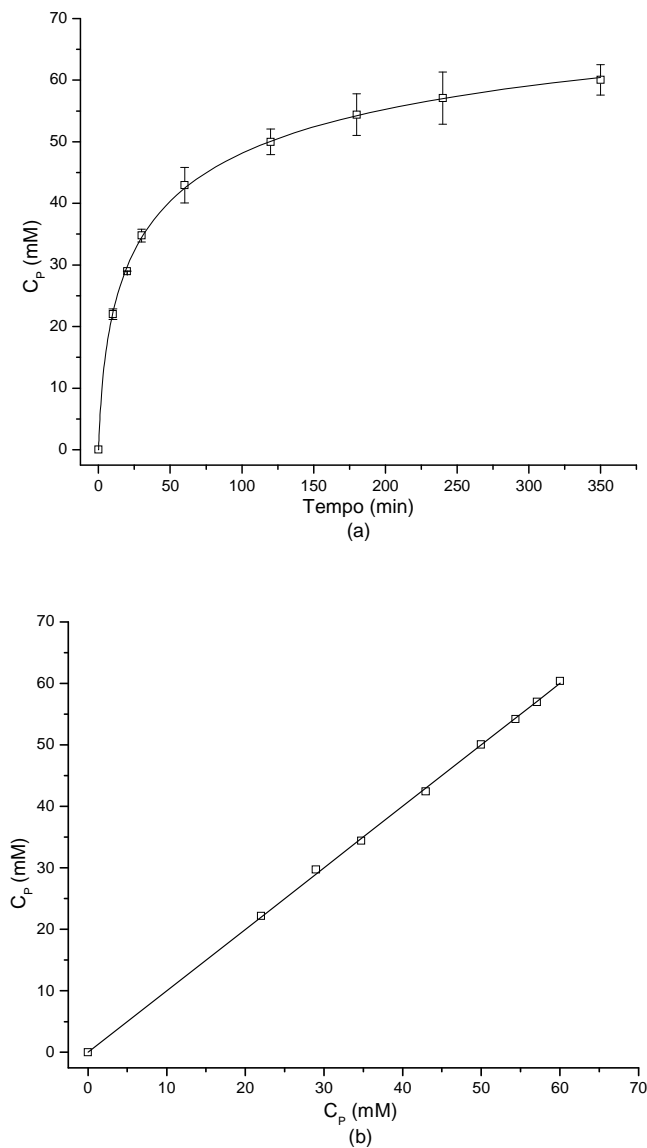


**Figura 2.48:** (a) Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_p$ , durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0. (b) Dispersão dos dados. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática no reator de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica de  $dP/dt = -V_N$  (Equação 2.21 – ajuste de  $K_P$ ;  $k = 2,48 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{U}_{\text{H-PHE}}^{-1}$ ;  $K_M = 150,0 \text{ mM}$ ;  $K_N = 14,0 \text{ mM}$ ;  $K_P = 1,91 \text{ mM}$ ).  $\phi = 0,25$ .

Relaxada a hipótese do estado pseudo-estacionário, estimou-se os parâmetros do sistema de EDOs, equações 2.15a a 2.20a, para a predição do perfil da concentração molar das



ligações hidrolisadas durante hidrólise com CPA. O algoritmo de busca utilizado foi o *Simulated Annealing-Levenberg-Marquardt*.



**Figura 2.49:** (a) Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_P$ , durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0. (b) Dispersão dos dados. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Integração numérica do sistema de EDOs (equações 2.15a a 2.20a – ajuste simultâneo dos sete parâmetros listados na Tabela 2.5).  $\phi = 1 \times 10^{-3}$ .

Nota-se que, da mesma forma que para a quimotripsina, a abordagem utilizando as EDOs é profícua para o caso com CPA, Figura 2.49. Os parâmetros estimados estão listados na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5:** Parâmetros cinéticos ajustados para sistema de EDOs na hidrólise com CPA-glioxil-agarose de pré-hidrolisados com quimotripsina 12,4% (equações 2.15a a 2.20a).

Parâmetro	Valor
$k_1$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$304 \pm 97$
$k_{-1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$3905 \pm 6$
$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$505 \pm 308$
$k_P$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$0,43 \pm 3$
$k_{-P}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$1,16 \pm 7,2$
$k_N$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$2,3 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$
$k_{-N}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0

Nota-se, pelos valores obtidos para  $k_N$  e  $k_{-N}$ , que o efeito de inibição pelo substrato não se revelou importante para o modelo – apesar dos resultados apresentados na Figura 2.47. Essa contradição, na verdade, é reflexo do enfoque empírico que se é forçado a adotar para este complexo sistema, pois certamente agrupar todo substrato em um pseudocomponente “ligações hidrolisáveis” não é, com certeza, uma base apropriada para interpretações mecanísticas do comportamento do sistema reacional.

### 2.3.3.2 – Coeficientes de Rendimento para Predição dos Perfis de Aminoácidos Liberados durante Hidrólise com CPA-Glioxil-Agarose

Com o coeficiente de rendimento definido na Equação 2.43, foram determinadas relações empíricas entre a velocidade de liberação de cada aminoácido e a velocidade global de clivagem  $V_P$ . A técnica de ajuste das equações e dos parâmetros listados na Tabela 2.6 consistia em resolver numericamente o balanço de massa de cada aminoácido (definido na Equação 2.44 para o reator batelada), com auxílio dos rendimentos individuais  $Y_i$ , de forma a diminuir a diferença residual entre a concentração predita e experimental para cada aminoácido (novamente o método de busca *Simulated Annealing*-Levenberg-Marquardt foi utilizado).

As relações empíricas mostradas na Tabela 2.6 entre o rendimento individual de cada aminoácido  $Y_i$  e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais  $V_P$  foram obtidas com base em observações prévias de Tardioli, 2003, e Pinto *et al.*, 2008a.

$$\frac{dC_{AAi}}{dt} = Y_i(C_{E0}, V_P) \cdot V_P \quad (2.44)$$

Sendo:  $C_{AAi}$  – a concentração molar de cada aminoácido;  $Y_i$  – o rendimento listado na Tabela 2.6;  $V_P$  – a velocidade global calculada com as equações 2.15 a 2.20 (parâmetros listados na Tabela 2.5).

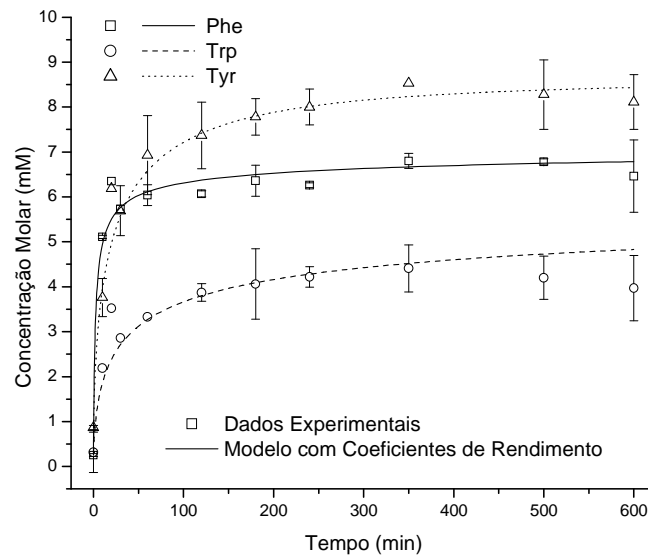
**Tabela 2.6:** Relação entre o rendimento individual de cada aminoácido  $Y_i$  e a velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais. Na tabela,  $V = V_P/C_{E0}$ ; sendo  $C_{E0}$  a concentração inicial de CPA no reator em  $U_{H-PHE} \cdot L^{-1}$ .

Aminoácido	Equação	Parâmetros
<b>Phe</b>	$Y_{Phe} = a + bV$	a = 0,025 ± 0,003 b = 63,96 ± 2,07*
<b>Tyr</b>	$Y_{Tyr} = \frac{aV}{b + V}$	a = 0,142 ± 0,005 b = 3,76x10 <sup>-5</sup> ± 1,58x10 <sup>-5**</sup>
<b>Trp</b>	$Y_{Trp} = a$	a = 0,070 ± 0,002
<b>Leu</b>	$Y_{Leu} = a$	a = 0,340 ± 0,005
<b>ILeu</b>	$Y_{ILeu} = a + bV$	a = 0,073 ± 0,005 b = -24,67 ± 3,06*
<b>Met</b>	$Y_{Met} = a + bV$	a = 0,040 ± 0,003 b = -3,59 ± 1,54*
<b>Val</b>	$Y_{Val} = a + bV$	a = 0,161 ± 0,007 b = -44,62 ± 4,25*
<b>Thr/Asn</b>	$Y_{Thr / Asn} = a + bV$	a = 0,051 ± 0,011 b = -12,19 ± 6,53*
<b>His</b>	$Y_{His} = a + b \exp\left(-\frac{V}{c}\right)$	a = 0 b = 0,088 ± 0,005 c = 3,11x10 <sup>-4</sup> ± 0,26x10 <sup>-4**</sup>
<b>Ala</b>	$Y_{Ala} = \frac{a}{E_0V}$	a = 2322x10 <sup>-6</sup> ± 3x10 <sup>-6***</sup>

- \* em min.U<sub>H-PHE</sub>.mmol<sup>-1</sup>.  
 \*\* em mmol.U<sub>H-PHE</sub><sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.  
 \*\*\* em mM.min<sup>-1</sup>.

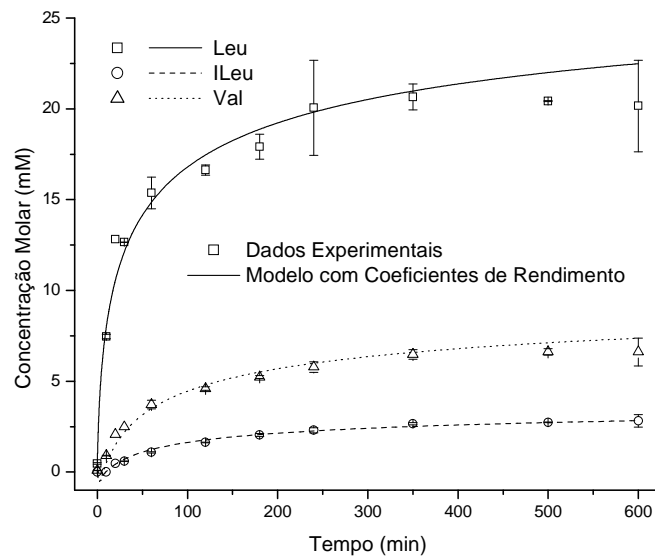
As próximas três figuras mostram o bom desempenho da abordagem utilizando coeficientes de rendimento na predição da concentração molar dos aminoácidos liberados

durante a hidrólise com CPA-glioxil-agarose. Apenas para os aminoácidos Thr e Asn (Figura 2.52), a predição do perfil é incoerente com os dados experimentais ao longo da hidrólise, apresentando desvios sistemáticos. Por outro lado, o modelo baseado em coeficientes de rendimento apresenta boa predição para a concentração molar da fenilalanina liberada no meio reacional (Figura 2.50) – inferência mais importante para o controle de um produto com baixo teor do aminoácido.



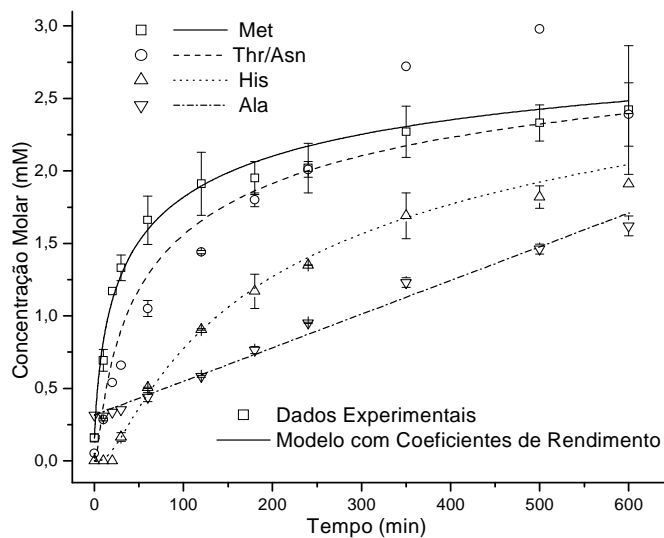
**Figura 2.50:** Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Phe, Trp e Tyr liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Coeficientes de Rendimento (Equação 2.44).

Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.



**Figura 2.51:** Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Leu, ILeu e Val liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Coeficientes de Rendimento (Equação 2.44).

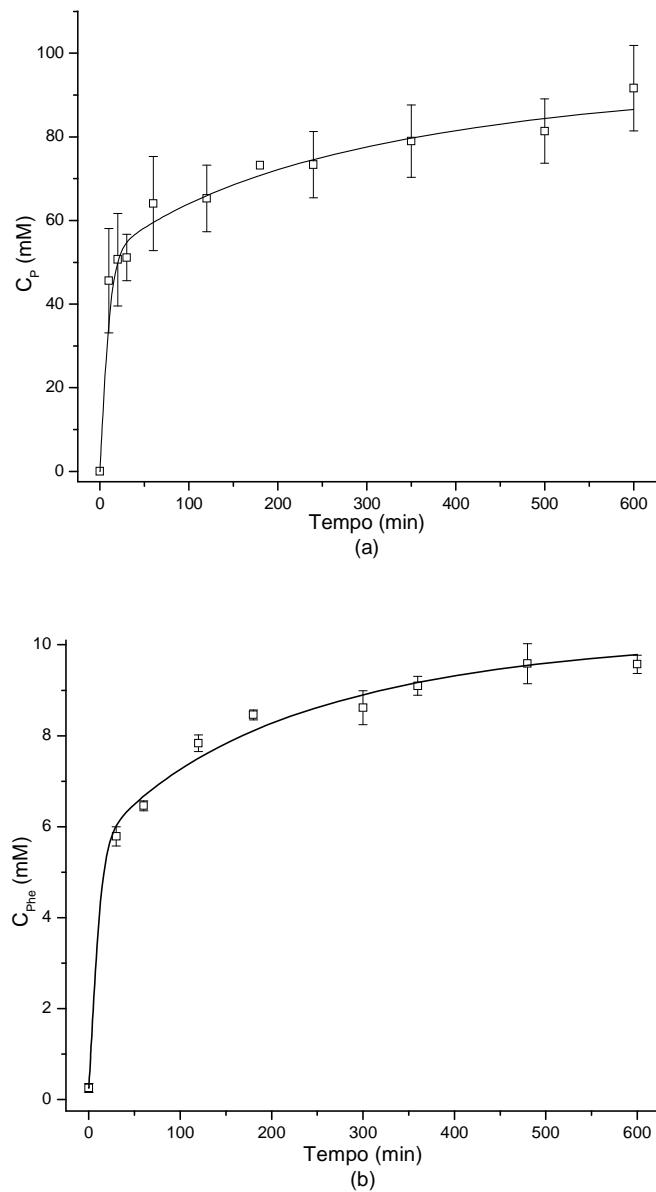
Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.



**Figura 2.52:** Perfis das concentrações molares dos aminoácidos Met, Thr, Asn, His e Ala liberados durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $84 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Condições da reação: 60 mL de pré-hidrolisados de quimotripsina 12,4% ( $50,2 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $1016,4 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo (—): Coeficientes de Rendimento (Equação 2.44). Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

As técnicas de modelagem e ajuste apresentadas nesta seção foram utilizadas para a predição da concentração de Phe em um sistema de reator com membrana estudado por Padilla, 2007. Nesse sistema, buscava-se o incremento da produtividade do processo através da redução, no meio reacional, de possíveis inibidores da enzima – especialmente os aminoácidos hidrofóbicos Phe, Tyr e Trp. O sistema proposto processava a proteólise com CPA-glioxil-agarose em um reator enzimático acoplado a um módulo de ultrafiltração para separação simultânea dos aminoácidos liberados durante a reação. Com o objetivo de manter o volume reacional constante durante a operação do sistema, o reator era alimentado com pré-hidrolisados de quimotripsina 15,3% ou com solução dialisante para facilitar a passagem dos aminoácidos através da membrana.

A Figura 2.53 mostra a qualidade do ajuste para a concentração molar de ligações hidrolisadas  $C_P$  e para a Phe em um reator batelada quando o substrato utilizado foi pré-hidrolisado com quimotripsina até atingir um grau de hidrólise de 15,3 %. Como discutido por Pinto *et al.*, 2008a, o grau da hidrólise obtido com a quimotripsina influencia nas características do substrato utilizado na reação com CPA e novos parâmetros cinéticos são necessários para a modelagem da velocidade global de clivagem das ligações peptídicas carboxi-terminais e, conseqüentemente, para o coeficiente de rendimento  $Y_{Phe}$ . Os parâmetros cinéticos ajustados para a velocidade global são mostrados na Tabela 2.7 quando pré-hidrolisados 15,3% constituem o substrato da reação. Já para o coeficiente  $Y_{Phe}$  foi utilizada a mesma relação linear descrita na Tabela 2.6 ( $Y_{Phe} = a + bV$ ), porém com os parâmetros  $a = 196,5 \times 10^{-3} \pm 36,7 \times 10^{-3}$  e  $b = -7854,4 \times 10^{-2} \pm 5865 \times 10^{-2} \text{ min.U}_{\text{H-PHE}}.\text{mmol}^{-1}$ .



**Figura 2.53:** (a) Evolução da concentração molar das ligações hidrolisadas,  $C_p$ , durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $101 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^\circ\text{C}$ , pH 7,0; Modelo (—): Integração numérica do sistema de EDOs (equações 2.15a a 2.20a, parâmetros listados na Tabela 2.7). (b) Evolução da concentração molar de Phe; Modelo (—): Coeficientes de Rendimento ( $Y_{Phe} = 196,5 \times 10^{-3} - 7854,4 \times 10^{-2} \cdot V$ ). Condições da reação: reator batelada com 53 mL de pré-hidrolisados com quimotripsina 15,3% ( $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ), concentração enzimática de  $3000 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

Ainda com relação aos parâmetros para predição da velocidade global, alguns deles apresentam ordens de grandeza distintas quando o substrato é alterado de pré-hidrolisados

com quimotripsina 12,4% (Tabela 2.5) para 15,3% (Tabela 2.7). Além da mudança na característica do substrato, as diferentes ordens de grandeza podem ser explicadas pela alta correlação entre os parâmetros e por vários deles apresentar o zero no interior da região de confiança. Vale também destacar que os parâmetros cinéticos ajustados compõem um modelo empírico cujo substrato, número de ligações hidrolisadas, é uma abstração que agrupa um número considerável de moléculas de peptídeos de distintas massas molares em um único pseudocomponente.

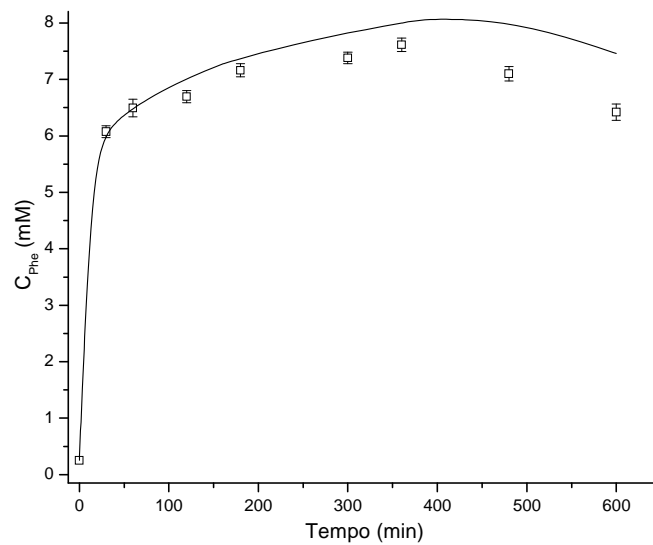
Novamente, o efeito de inibição pelo substrato não se revelou importante ( $k_N$  e  $k_{-N}$  nulos).

**Tabela 2.7:** Parâmetros cinéticos ajustados para sistema de EDOs na hidrólise com CPA-glioxil-agarose de pré-hidrolisados com quimotripsina 15,3% (equações 2.15a a 2.20a).

Parâmetro	Valor
$k_1$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$9,89 \pm 101$
$k_{-1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$340,2 \pm 5685$
$k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$167,4 \pm 239$
$k_P$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$49,9 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-2}$
$k_{-P}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$83,5 \times 10^{-4} \pm 17 \times 10^{-4}$
$k_N$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0
$k_{-N}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0

Detalhes da modelagem matemática do sistema reator com membrana assim como do aparato experimental empregado são descritos em Padilla, 2007. Resumidamente, o sistema era composto de um reator encamisado (40 mL) e duas membranas do tipo *hollow fiber* em paralelo (1000 Da de corte cada). Pré-hidrolisado com quimotripsina 15,3 % foi alimentado no reator continuamente nas primeiras seis horas de reação. A partir da sexta hora, solução dialisante foi a alimentação utilizada (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7). O modelo cinético baseado em coeficientes de rendimento aqui descrito foi então utilizado para prever a velocidade de remoção de Phe ao longo da reação (Figura 2.54).





**Figura 2.54:** Evolução da concentração molar de Phe no sistema reator com membrana durante hidrólise com CPA-glioxil-agarose ( $101 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $45^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0. Modelo (—): Coeficientes de Rendimento ( $Y_{Phe} = 196,5 \times 10^{-3} - 7854,4 \times 10^{-2} \cdot V$ ). Barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas.

A Figura 2.54 ilustra um teste rigoroso para a abordagem cinética com coeficientes de rendimento. Vale ressaltar que além das aproximações utilizadas durante a elaboração do modelo cinético, erros associados às considerações adotadas na modelagem do sistema reator com membrana também contribuem para a diferença sistemática entre modelo e dado experimental ao longo da reação. Mesmo com essas limitações, fica claro na figura que o modelo baseado em coeficientes de rendimento foi capaz de prever a tendência da concentração de Phe remanescente no reator enzimático.

## 2.4 – CONCLUSÕES

### 2.4.1 – MODELAGEM DAS LIGAÇÕES HIDROLISADAS EM REAÇÕES PROTEOLÍTICAS

A metodologia tradicional para derivação de modelos de cinética enzimática, embasada na hipótese de estado pseudo-estacionário, não apresentou resultados satisfatórios para a modelagem cinética dos dados de concentração molar de ligações hidrolisadas ao longo da reação com quimotripsina imobilizada em gel glioxil-agarose. Procedeu-se então à integração numérica das equações diferenciais ordinárias derivadas a partir do mecanismo reacional postulado – ou seja, relaxou-se a hipótese do estado pseudo-estacionário. Tal mecanismo, com inibição simultânea por substrato e produto, foi capaz de prever com precisão a concentração molar das ligações hidrolisadas, para um derivado com baixa carga ( $3 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) e, portanto, sem efeitos difusivos na cinética da reação.

Quando um catalisador contendo  $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$  foi utilizado, além do relaxamento da hipótese pseudo-estacionária, foi necessária a inclusão dos efeitos de transporte de massa intra-partícula no modelo da reação. O modelo obtido, com resultados razoáveis quando contrastados com dados experimentais de dois ensaios de longa duração, apresentou pouca confiabilidade estatística devido à dificuldade em se estimar simultaneamente os parâmetros cinéticos e de transporte de massa presentes no modelo matemático. Por outro lado, a adoção de um pseudocomponente – ligação hidrolisada – dificulta a determinação dos parâmetros com ensaios independentes. Ainda, a desconsideração de algum parâmetro, no intuito de reduzir a complexidade do modelo, conduz à perda da consistência mecanística do mesmo.

Relaxada a hipótese do estado pseudo-estacionário, também foi possível representar adequadamente a cinética aparente da concentração molar das ligações hidrolisadas por CPA-glioxil-agarose. Modelos do tipo Michaelis-Menten, como nas reações com quimotripsina imobilizada em matriz de glioxil-agarose, também apresentaram desvios sistemáticos dos dados experimentais nesse caso.

Portanto, do ponto de vista prático, o conjunto de EDOs sem a adoção do estado pseudo-estacionário para os complexos enzimáticos conseguiu efetivamente representar a dinâmica de diversos casos de despolimerização enzimática das proteínas do soro de queijo: cinética intrínseca para derivado de quimotripsina com baixa carga; modelo reativo-difusivo

para o catalisador constituído da mesma endoprotease, porém com alta carga; e modelagem aparente na reação com CPA-glioxil-agarose. Por se tratar de uma abstração que agrupa inúmeras moléculas em um pseudocomponente – ligações hidrolisadas – a duração dos perfis dinâmicos das fases pré-estacionárias simuladas com o conjunto completo de EDOs destoa em ordem de grandeza daquelas observadas quando componentes reais são estudados em reações químicas ou bioquímicas, abordagem experimental fora do escopo deste estudo. Por outro lado, a proposta apresenta-se bastante razoável para os casos onde modelos do tipo Michaelis-Menten são imprecisos.

#### 2.4.2 – ALGORITMOS DE ESTIMAÇÃO PARAMÉTRICA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DURANTE MODELAGEM NÃO-LINEAR

Três algoritmos estocásticos foram comparados durante o procedimento de ajuste paramétrico para a proteólise do soro de queijo com derivados quimotripsina-glioxil-agarose de baixa e alta carga. A classificação da eficácia dos algoritmos estocásticos não é simples, por sua própria natureza. Ainda assim, pôde-se constatar que, neste caso específico, o algoritmo Evolução Diferencial convergiu para os melhores resultados, seguido pelo algoritmo *Simulated Annealing* e pelo Enxame de Partículas.

Simulações de Monte Carlo foram utilizadas para o cálculo dos intervalos de confiança dos parâmetros visto que, quando a correlação paramétrica é importante, o método convencional baseado no cálculo da matriz covariância com o modelo linearizado na região do ajuste pode apresentar resultados pouco satisfatórios. De maneira geral, o enfoque embasado na matriz covariância apontou valores conservativos para os intervalos de confiança quando comparados com os resultados obtidos via simulações de Monte Carlo. Como limitação do método probabilístico, ressalta-se o elevado tempo computacional requerido pelo mesmo (cada iteração do referido método inclui uma etapa de estimativa paramétrica).

Qualquer dos métodos estocásticos aqui utilizados, com parâmetros de sintonia bem definidos para um problema em particular, apresenta-se como uma ferramenta importante também para a análise estatística pós-ajuste. Sem o uso de derivadas, as múltiplas análises da função-objetivo durante o procedimento de estimativa paramétrica permitem também a construção de complexas regiões de confiança (critério de Beale, Equação 2.38). Nesse cenário, duas limitações da estimativa de parâmetros em casos não-lineares podem ser

superadas: a imprecisão da aproximação linear do modelo para o cálculo da matriz covariância e o elevado tempo computacional demandado pelo método de Monte Carlo.

### 2.4.3 – ACOMPANHAMENTO DETALHADO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES

Modelos híbridos fenomenológico-neuronais foram propostos para descrever o perfil de cinco pseudocomponentes definidos com base em faixas de massas molares para as hidrólises com Alcalase® e quimotripsina imobilizadas em matriz de glioxil-agarose. O mesmo enfoque se deu para o acompanhamento dos perfis de aminoácidos liberados durante a reação de pré-hidrolisados de quimotripsina com CPA-glioxil-agarose.

Na modelagem fenomenológico-neuronal, os pesos das redes neuronais artificiais do tipo *multilayer perceptrons* foram estimados para mapear, em cada estado do reator, o vetor de concentrações dos pseudocomponentes ou dos aminoácidos em seu respectivo vetor de velocidades de reação. As velocidades inferidas pelas redes MLPs eram então utilizadas no balanço material do reator, daí a abordagem híbrida. A técnica foi validada em reatores operados de modo intermitente e contínuo e se mostrou capaz de descrever com precisão os perfis dos componentes reacionais presentes nas três proteólises.

As redes MLPs foram treinadas com dados provenientes de ensaios onde a temperatura e o pH da reação foram mantidos constantes. Dessa forma, reduziu-se a complexidade do modelo: ao invés de considerar o pH e a temperatura da reação como dados de entrada para uma rede MLP maior, para estados intermediários dessa variáveis em ensaios de validação, procedeu-se a interpolação linear dos valores inferidos por cada rede de menor complexidade. Interpolações exponenciais forneceram resultados semelhantes. Como o soro de queijo está sujeito a variações em sua composição devido a efeitos climáticos e sazonais, a modelagem híbrida se mostra pertinente quando o reajuste dos pesos constituintes das redes MLPs for necessário devido a alterações nas características do substrato (procedimento que pode ser realizado em tempo real para redes MLP de complexidade reduzida).

Alternativamente, a descrição detalhada dos produtos reacionais pode ser alcançada empregando coeficientes de rendimento. Utilizando a hidrólise com CPA-glioxil-agarose como estudo de caso, tal proposta foi também capaz de representar com precisão a dinâmica de liberação dos aminoácidos no reator enzimático.

### **3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo**

O contínuo avanço no desenvolvimento de tecnologias voltadas para a Internet vem tornando factível ao longo dos últimos anos o projeto de complexos sistemas distribuídos de controle e monitoramento remoto. Tais sistemas tornam a Internet uma ferramenta financeiramente atrativa e necessária no auxílio aos sistemas de controle e gerenciamento da produção. Merece também citação o potencial emprego da Internet na automação doméstica e no desenvolvimento de laboratórios virtuais para o ensino à distância (Al-Ali e Al-Rousan, 2004; Aktan *et al.*, 1996).

Kim e Heller, 2006, revisaram tecnologias e dados atualmente relacionados com o controle de processos: computadores, redes, equipamentos para armazenamento de histórico de dados, diferentes plataformas, Internet e transmissão por rádio frequência. Segundo os autores, toda essa infra-estrutura pode gerar uma quantidade massiva e bidirecional de dados, de e para os equipamentos, o que irá resultar em uma dinâmica mais complexa e, conseqüentemente, em grandes oportunidades de pesquisa para a comunidade de controle e monitoramento de processos químicos. Nesse contexto, surge uma crescente demanda por ferramentas computacionais estáveis, seguras e aptas a lidar com diferentes plataformas e grandes volumes de dados via Internet.

Um sistema remoto de monitoramento é almejado atualmente com grande interesse pela ampla maioria das indústrias de processo (Yang *et al.*, 2007; Singh e Seto, 2002). A arquitetura remota pode permitir às companhias com unidades de produção geograficamente distribuídas, acessar, analisar e atuar com base nas informações oriundas de suas aplicações de controle monitoradas. O conceito aqui é compartilhar uma equipe de especialistas com várias unidades de produção em tempo real, reduzindo sobremaneira as despesas com deslocamento de pessoal qualificado, e facilitando o gerenciamento, manutenção e a identificação de falhas nas unidades industriais.

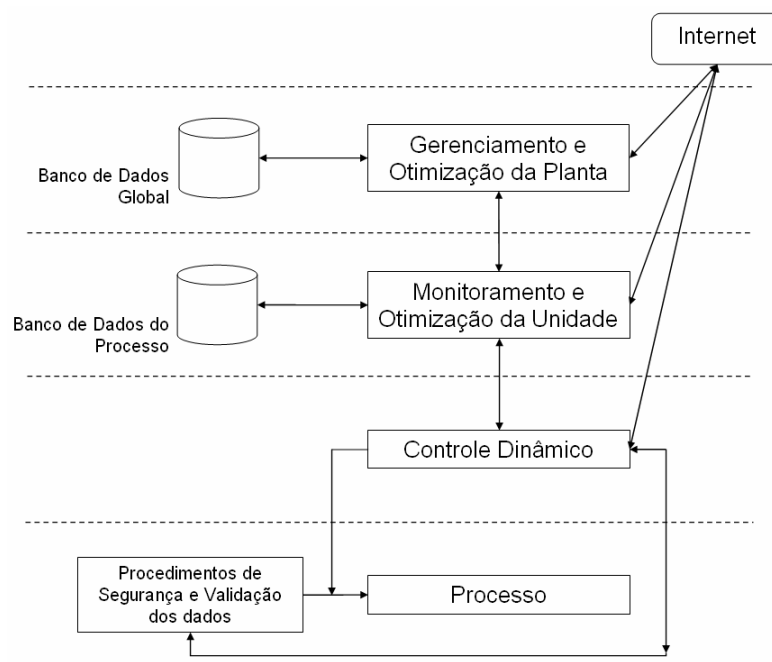
Dentre as vantagens do uso da Internet nos sistemas de controle, portanto, destacam-se a possibilidade de compartilhar diversos aparatos de custos expressivos necessários à tecnologia de monitoramento e a redução de despesas com transportes, equipamentos e

peçoal. A pesquisa e o desenvolvimento contínuo de soluções para a Internet são também um forte atrativo para as indústrias, permitindo às corporações o acesso ao estado da arte do setor.

Segundo Churms *et al.*, 1999, três fatores são cruciais no desenvolvimento de sistemas/aplicações de monitoramento e controle via Internet:

- O *hardware* necessário ao usuário para o acesso remoto ao sistema de monitoramento e controle da planta de produção deve ser compensatório do ponto de vista financeiro;
- O *software* deve, preferencialmente, ser gratuito e de fácil acesso;
- A transferência de dados deve ser segura, consistente e em alta velocidade.

A capacidade em sincronizar dados e interagir com diversas plataformas já existentes são também características fundamentais para as aplicações *web*. Na maioria dos casos, essas aplicações são inseridas em uma complexa **engenharia de sistemas** previamente estabelecida que pode variar de computadores dedicados a Sistemas Digitais de Controle Distribuídos, SDCDs (Shi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2003). A Figura 3.1 ilustra a hierarquia de um sistema de controle de processo e suas possíveis interações com a Internet:



**Figura 3.1:** Sistema hierárquico de controle de processos e possibilidades de interação via Internet.

O termo aplicativo *web* (do inglês, *Internet application* ou *Web application*; aqui também denominado como ambiente integrado), foi cunhado quando se introduziu o conceito de conteúdo dinâmico, isto é, conteúdo que pode ser extraído de uma base de dados e ser

rotineiramente alterado e atualizado antes de exibido. Assim, um aplicativo *web* é um sítio cujos conteúdos são gerados dinamicamente antes de serem enviados ao cliente que o solicita (Kurniawan, 2002). A utilização de um navegador *web* como interface para operação dos sistemas de controle garante a disponibilidade das informações com todos os recursos de visualização e análise a partir de qualquer ponto da planta ou via um computador conectado à Internet.

As tecnologias disponíveis para desenvolvimento de um aplicativo *web* devem ser analisadas sob dois paradigmas distintos: cliente e servidor. No “lado” cliente, utiliza-se um navegador (do inglês *browser*), onde a aplicação desenvolvida é visualizada e, eventualmente, executada. No “lado” servidor, o qual disponibiliza a aplicação e organiza forma e conteúdo das informações, essencialmente duas tecnologias disputam o mercado: **Java** (Sun Microsystems, Inc.) e **.NET** (Microsoft Corporation); ficando a opção entre uma ou outra tecnologia a critério das necessidades da aplicação *web* em pauta e da familiaridade da equipe de desenvolvimento com determinada linguagem de programação (<http://www.setfocus.com/WhitePapers/WhereWeGoing.pdf>).

Neste trabalho, optou-se por Java como tecnologia padrão para desenvolvimento e implementação do aplicativo *web*. Vários autores apontam Java como a linguagem de fato mais adequada para o desenvolvimento de soluções para a Internet, por exemplo: Deitel e Deitel, 2007; Chang e Harkey, 1998. Dentre as características dessa linguagem destacam-se: orientada a objetos, distribuída, segura, portátil, interpretada, *multithreading* (execução simultânea de múltiplas linhas de código), além de gratuita, indo ao encontro das diretrizes brasileiras para o desenvolvimento de *software* livre, que priorizam a plataforma *web* no desenvolvimento de sistemas e interfaces com o usuário (<http://www.softwarelivre.gov.br/documentos-oficiais/DiretrizesPlanejamento>).

Na seção 3.1 deste capítulo é feita uma revisão bibliográfica de temas envolvidos no desenvolvimento do ambiente integrado. A arquitetura proposta para a aplicação é detalhada na seção 3.2. Nas seções 3.3 e 3.4, respectivamente, são apresentados os resultados e as conclusões deles decorrentes.

### **3.1 – REVISÃO DA LITERATURA**

Os dois primeiros itens da presente seção, intitulados “Síntese e Simulação de Bioprocessos” (3.1.1) e “Análise Econômica de Processos” (3.1.2), versam sobre conceitos utilizados durante a simulação e análise de viabilidade econômica da biorefinaria do soro de queijo. Alguns aspectos da linguagem Java, base de desenvolvimento para o ambiente integrado, são apresentados no item 3.1.3.

#### **3.1.1 – SÍNTESE E SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS**

Expõem-se neste item tópicos relevantes concernentes aos conceitos envolvidos no tratamento dos problemas de síntese e simulação de processos. Tal revisão não se propõe exaustiva e cobre apenas aspectos que se mostraram pertinentes durante o desenvolvimento do aplicativo para simular o processo global de hidrólise enzimática do soro de queijo.

##### **3.1.1.1 – Síntese de Bioprocessos**

Os avanços na compreensão dos princípios envolvidos nos processos químicos combinados com a hoje vasta disponibilidade de ferramentas computacionais e sofisticadas técnicas de otimização, têm influenciado drasticamente o projeto de novas unidades industriais e as alterações de operação em plantas já existentes (Westerberg, 2004; Soares e Secchi, 2003).

O projeto de um processo, aqui entendido como o trabalho conceitual realizado *a priori* para a construção de uma planta química, pode ser dividido em três estágios (Peters e Timmerhaus, 1991):

- Projeto Preliminar, onde modelos matemáticos simplificados e métodos aproximados são usados para dimensionar e estimar custos de operações unitárias, com erros que podem chegar a 30%;
- Projeto Detalhado, realizado quando a avaliação do projeto preliminar indica um processo economicamente atrativo. As especificações dos equipamentos ainda não são exatas e erros na estimativa do custo variam entre 10 e 15%;
- Projeto Definitivo, baseado em especificações detalhadas dos equipamentos e estimativas de custos precisas, já incluindo informações para o início da construção da planta.



Silva, 2000, realizou um estudo preliminar do processo de refino do soro de queijo aqui em pauta. Os resultados obtidos indicaram a viabilidade econômica do processo assim como a necessidade de aprofundar a compreensão de cada operação unitária presente na planta, com especial atenção às etapas reacionais. Neste doutorado realizou-se o projeto preliminar da planta de refino incorporando parâmetros e condições operacionais obtidas em pesquisas anteriores do grupo (por exemplo, as condições de operação das reações enzimáticas envolvidas). Balanços materiais e de energia e ferramentas para dimensionamento de equipamentos são incorporados em ambiente amigável ao usuário, permitindo a estimação de investimentos de capital e de custos de produção.

### 3.1.1.2 – Simulação de Bioprocessos

Matematicamente uma planta química pode ser definida como um conjunto de equações não-lineares que descreve (Biegler *et al.*, 1997):

- A conexão entre as operações unitárias do processo através de suas correntes de fluxo de matéria;
- As equações específicas ou fundamentais para cada operação unitária, geralmente balanços de massa e energia, como também relações termodinâmicas;
- As equações constitutivas e seus respectivos parâmetros, tais como constantes cinéticas.

Quando agrupadas, essas equações podem gerar um problema de alta complexidade, com um grande número de equações não-lineares. Para a simulação de problemas assim caracterizados, reconhecem-se na literatura duas abordagens distintas, a saber: seqüencial-modular e orientada por equações (Soares e Secchi, 2007; Biegler *et al.*, 1997).

Na abordagem seqüencial-modular o modelo matemático do processo é subdividido em módulos computacionais, que correspondem, em geral, a unidades físicas da planta: reatores, trocadores de calor, evaporadores, etc. Os módulos são calculados seqüencialmente, seguindo o sentido do fluxo de matéria. O maior inconveniente da abordagem modular surge quando um número elevado de ciclos faz parte do processo, inviabilizando o cálculo seqüencial direto e tornando a convergência lenta. A maioria dos simuladores utilizados industrialmente se baseia nessa abordagem. Em grande medida isto se deve à sua estruturação fidedigna à configuração física do processo, facilitando sobremaneira a identificação de falhas e de erros nos cálculos.

No modo orientado por equações, todo o sistema equacionado é resolvido simultaneamente. Assim, desaparece a maior dificuldade inerente à abordagem seqüencial-

modular: a lentidão na convergência em processos com ciclos, que exigem “interrupções” na corrente retroalimentada. Em contrapartida, o elevado número de equações não-lineares e possíveis equações diferenciais, tratadas trivialmente na abordagem modular – sendo resolvidas dentro de cada módulo – surgem como limitações no modo orientado por equações (Giordano, 1991).

A escolha de uma das abordagens depende da complexidade e característica do processo. No caso do refino do soro, aqui focado como um problema de projeto, optou-se pela abordagem sequencial-modular devido ao número reduzido de ciclos ao longo do processo, facilitando a convergência e a inserção de novos módulos (ou operações unitárias) no diagrama da planta.

### **3.1.2 – ANÁLISE ECONÔMICA DE PROCESSOS**

Historicamente, motivadas por retornos em curto prazo, corporações têm preferido como destino de seus rendimentos o mercado financeiro a investimentos no desenvolvimento de novos processos e em melhorias nos já existentes. Entretanto, e em especial no setor bioquímico, com o aumento da competitividade promovida por países emergentes e a disponibilidade de novas tecnologias mais eficientes do ponto de vista energético e produtivo, metodologias e ferramentas computacionais para o projeto de processos, nos seus níveis conceituais e básico, e para melhorias operacionais no dia-a-dia da produção estão novamente em foco (Farid *et al.*, 2007; Gani e Grossmann, 2007).

Para a avaliação econômica de projetos de plantas químicas, são necessárias estimativas de gastos com investimentos de capital fixo e com a operação da unidade. Somente a partir de tais estimativas é possível uma análise econômica preliminar do processo em análise. Toda esta seção foi majoritariamente baseada em dois livros-texto: Turton *et al.*, 1998 e Peters e Timmerhaus, 1991.

#### **3.1.2.1 – Estimativa do Investimento de Capital**

O capital para instalações e facilidades da planta é chamado de Investimento em Capital Fixo (ICF) ou custo fixo, em geral ainda dividido em custo fixo direto e indireto. O montante necessário para a operação da planta é chamado de Custo Operacional Total (COT) ou capital variável.

Apesar do grande número de técnicas elaboradas para a estimativa do custo fixo, uma das formas mais utilizadas e empregada neste trabalho para estimativa do *ICF* é aquela baseada nos fatores “Lang”,  $F_{Lang}$ , como descrito na Equação 3.1:

$$ICF = F_{Lang} \cdot \sum_{i=1}^{n_{eq}} C_{eq}^i \quad (3.1)$$

Sendo:  $n_{eq}$  – o número total de equipamentos considerados para avaliação econômica da planta;  $C_{eq}^i$  – o custo do equipamento *i* (entregue no sítio de produção). Valores típicos para  $F_{Lang}$  são listados na Tabela 2.7 de Turton *et al.*, 1998; e na Tabela 17 de Peters e Timmerhaus, 1991.

Para estimar o custo de um equipamento A,  $C_{eq}^A$ , emprega-se a relação conhecida como lei de potência: se o custo de um equipamento B,  $C_{eq}^B$ , a uma dada capacidade, é conhecido,  $C_{eq}^A$  pode ser calculado. Para se corrigir variações de custo do equipamento B ao longo do tempo utilizaram-se neste trabalho os índices *Chemical Engineering Plant Cost Index* (CEPCI) listados periodicamente na revista *Chemical Engineering*. Com a Equação 3.2 é possível estimar o custo de um equipamento A utilizando a lei de potência com correções para efeito de variações do custo ao longo do tempo:

$$C_{eq}^A = 1,25 \cdot \frac{i_{tp}}{i_{to}} \cdot C_{eq}^B \cdot \left( \frac{dc_{eq}^A}{dc_{eq}^B} \right)^k \quad (3.2)$$

Sendo:  $i_{tp}$  e  $i_{to}$  – os índices, respectivamente, no tempo presente e no tempo original de cálculo do custo do equipamento B;  $k$  – é o expoente de custo, inerente a cada tipo de equipamento. O fator 1,25 refere-se ao fato de que o custo do equipamento entregue no local de produção é cerca de 25% maior que o preço de compra do mesmo (Perry e Green, 1997).

O Custo Operacional Total *COT* pode também ser calculado com base em fatores multiplicadores como, por exemplo, os descritos na Equação 3.3:

$$COT = 1,23 \cdot \sum_{i=1}^{n_{eq}} CO_i + 0,189 \cdot ICF + 2,73 \cdot CMO \quad (3.3)$$

Sendo:  $CO_i$  – o custo operacional de cada equipamento (manutenção, eletricidade, vapor, etc.);  $CMO$  – o valor despendido com mão-de-obra. Equações para a estimativa de  $CMO$  são descritas em Turton *et al.*, 1998, seção 3.2 do livro-texto.

### 3.1.2.2 – Análise de Investimentos

A efetiva construção de uma planta química só é justificada, em termos financeiros, quando o projeto se mostrar mais atrativo que outras formas de investimento como, por exemplo, aplicações no mercado financeiro. Para estimar a economia de um processo, vários métodos são disponíveis: método do Valor Presente Líquido, VPL; da Taxa Interna de Retorno, TIR; do Período de Retorno de Investimento, PBP (*Payback Period*); entre outros. Os três métodos supraditos são descritos na seqüência.

#### ***Método do Período de Retorno de Investimento (PBP)***

Não considera o efeito do tempo sobre o dinheiro, sendo calculado conforme a Equação 3.4:

$$PBP = \frac{ICF}{FC} \quad (3.4)$$

Sendo:  $ICF$  – o investimento em capital fixo inicial (\$);  $FC$  – o fluxo de caixa, isto é, a diferença entre receitas e despesas ( $\$.tempo^{-1}$ ).

#### ***Método do Valor Presente Líquido (VPL) e da Taxa Interna de Retorno (TIR)***

São as medidas de rentabilidade mais utilizadas, levando em conta o valor do dinheiro no tempo e fluxo de caixa variável em  $n$  anos de projeto.

O VPL é a fórmula matemático-financeira de se determinar o valor presente de pagamentos futuros descontados a uma taxa de juros apropriada, menos o custo do investimento inicial. Basicamente, é o calculo de quanto os futuros pagamentos somados a um custo inicial estariam valendo atualmente. O VPL é definido como:

$$VPL = \frac{1 - (1+i)^{-n}}{i} \cdot FC - ICF \quad (3.5)$$

O VPL difere do método da TIR porque nesse último a taxa de atratividade  $i$  não é especificada a priori, mas calculada para o caso em que o VPL se iguale a zero; neste caso,  $i$  é denominada taxa interna de retorno ( $i = TIR$ ).

Investimentos atrativos apresentam VPL maior que zero e TIR maior que qualquer outra taxa de atratividade disponível no mercado – geralmente, as taxas de juros oferecidas para aplicação no mercado financeiro. No caso de projetos mutuamente exclusivos, deve-se escolher aquele com o VPL positivo mais elevado.

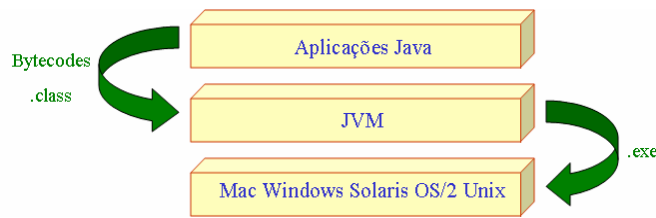
### 3.1.3 – TECNOLOGIA JAVA: APRESENTAÇÃO

Atualmente, a tecnologia Java é disponibilizada pela Sun Microsystems, Inc. na Plataforma Java 2, a qual reúne entre outras edições: a *Java 2 Enterprise Edition* (J2EE), a *Java 2 Standard Edition* (J2SE), e a *Java 2 Micro Edition* (J2ME). Cada uma das edições supracitadas é projetada para um tipo específico de dispositivo; J2EE é voltada para o desenvolvimento de aplicações que serão executadas em servidores; J2SE é uma ferramenta para a criação de sistemas a serem implementados em *desktops*; a J2ME foi criada para o desenvolvimento de aplicações para execução em dispositivos como *Palmtops* e telefones celulares. A possibilidade de escalonamento das edições é um fator importante, por exemplo, uma aplicação desenvolvida em J2SE pode ser facilmente modificada para ser executada em J2EE (<http://www.sun.com/java>).

Os programas em Java consistem em estruturas chamadas classes. Estas são constituídas por partes chamadas métodos, que são os responsáveis pela realização das tarefas atribuídas à classe. As inúmeras classes pré-definidas da linguagem são agrupadas em categorias de classes ou interface de programação de aplicativos (*Java Application Programming Interface* – Java API). Os pacotes Java API estão divididos em pacotes do núcleo e pacotes de extensões e seus nomes iniciados, respectivamente, por *java.* ou *javax.*

Todas as edições têm suas aplicações interpretadas por uma máquina virtual (*Java Virtual Machine*, JVM). O conceito de máquina virtual é o principal responsável pela portabilidade dos aplicativos. Para que uma aplicação Java possa ser executada em uma máquina real qualquer, esta máquina real deve possuir uma JVM. É a máquina virtual que permite que o programa seja executado independentemente da arquitetura ou das características reais da máquina, como ilustrado na Figura 3.2. As aplicações Java fornecem arquivos com extensão “.class” (*bytecodes*) para a JVM. Essa, por sua vez, interpreta-os e

gera os arquivos executáveis que podem ser executados por diversos sistemas operacionais e pelo *hardware*.



**Figura 3.2:** Ilustração da interpretação dos *bytecodes* pela Máquina Virtual Java.

### 3.1.3.1 – J2SE: Applet, JDBC e APIs de Redes

*Applets* são ferramentas poderosas para se obter aplicativos *web* com interfaces gráficas com o usuário (*Graphical User Interfaces*, GUIs) mais amigáveis (Huang *et al.*, 2004). Um *applet* é um programa escrito em Java que requer outro aplicativo para ser executado, geralmente um navegador *web*, e pode ser incluído em uma página HTML (*HyperText Markup Language*). Dentre as vantagens da utilização de *applets* se destacam, além de uma interface amigável, sua portabilidade e segurança (Chang e Harkey, 1998).

Dentre outras APIs aqui utilizadas destacam-se: JDBC (*Java Database Connectivity*, pacote *java.sql*) que se destina ao acesso e à manipulação de banco de dados; e *java.net* que permite transmissão de dados via rede empregando, aqui, o protocolo TCP/IP (*Transmission Control Protocol/Internet Protocol*).

### 3.1.3.2 – Servlets, JavaServer Page (JSP) e JavaBeans

As tecnologias *Java Servlets* e *JavaServer Pages* (JSP) estão inclusas na edição J2EE e se destinam às aplicações de servidores em uma rede focada no relacionamento cliente-servidor. O cliente solicita que alguma ação seja realizada e o servidor a realiza e responde para o cliente.

Esse modelo de comunicação solicitação-resposta é o fundamento para a implantação dos *servlets*, pequenos programas que estendem a funcionalidade de um servidor. Os pacotes de extensão *javax.servlet* e *javax.servlet.http* fornecem as classes e interfaces que definem o *servlet*. Os *servlets* são eficientes no projeto de soluções para Internet que ajudam a fornecer acesso seguro a um sítio da *web*, interagir com banco de dados em favor de um cliente específico, criar dinamicamente documentos personalizados de HTML e manter informações para sessões exclusivas de cada cliente (Deitel e Deitel, 2007). Um *servlet* também é executado pela JVM por meio de um serviço chamado de *Máquina Servlet*, que pode ser

nativo do servidor *web* ou adicionado a esse como um módulo anexo. Esse serviço carrega o *servlet* na memória do computador na primeira vez em que é requisitado ou, opcionalmente, quando a *Máquina Servlet* é inicializada. O *servlet* fica residente para tratar as múltiplas requisições até que o serviço seja finalizado.

A tecnologia JSP foi criada para contornar algumas das limitações no desenvolvimento com *servlets*: se em um *servlet* a formatação da página HTML resultante do processamento de uma requisição se mistura com a lógica da aplicação em si, dificultando alterações em sua formatação; em uma página JSP a formatação se encontra separada da programação, podendo ser modificada sem afetar o restante da aplicação. Assim, uma JSP consiste de uma página HTML com alguns elementos especiais, que conferem o caráter dinâmico da página. Esses elementos podem tanto realizar um processamento por si, como podem recuperar o resultado do processamento realizado em um *servlet*, por exemplo, e apresentar o conteúdo dinâmico junto à página JSP.

Existe também um recurso adicional bastante interessante na utilização de páginas JSP: a compilação automática, que permite que alterações feitas no código da página sejam automaticamente visíveis em sua apresentação. Assim, por exemplo, não é necessário interromper o funcionamento da aplicação para incorporar uma modificação de layout da página (Temple *et al.*, 2004).

A tecnologia JSP é baseada na API JSP, que consiste em dois pacotes: *javax.servlet.jsp* e *javax.servlet.jsp.tagext*. Quanto ao funcionamento, inicialmente o cliente faz uma requisição de uma página JSP através de um navegador, essa página então será processada pelo servidor transformando-a em um *servlet*, que por sua vez disponibiliza uma página HTML que é exibida no navegador do cliente. A partir da segunda requisição da mesma página JSP, não necessariamente do mesmo cliente, é verificado apenas se ocorreram ou não mudanças no código, se não ocorreram os *bytecodes* são chamados para gerar novamente a página HTML.

É importante salientar que a tecnologia JSP não se destina a substituir a *Java Servlets*. Na verdade, JSP é uma extensão dos *servlets* e é prática comum o emprego de ambas no mesmo aplicativo *web* (Kurniawan, 2002).

Um *JavaBean* é, resumidamente, uma classe Java pública comum, ou seja, pode-se criar um *Bean* da mesma maneira que se escreve qualquer outra classe Java, respeitadas suas condições e limitações de uso. Empregando *JavaBeans* como componentes JSP é possível separar a funcionalidade ou programação lógica de um aplicativo (parte dinâmica) de sua

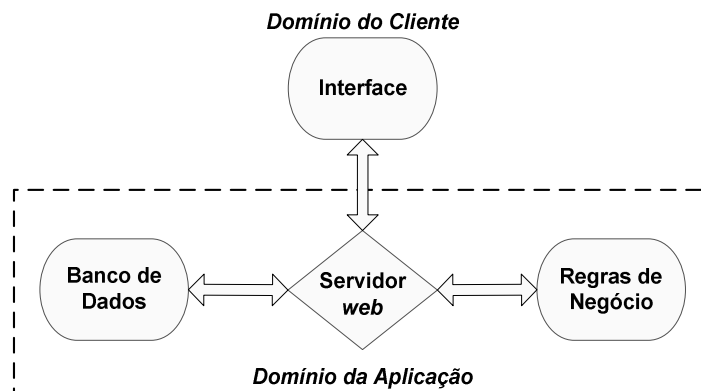
programação visual (parte estática), programações distintas e comumente atribuídas a diferentes profissionais: o programador da linguagem e o designer gráfico respectivamente.



### 3.2 – PADRÃO DE ARQUITETURA DO AMBIENTE INTEGRADO E SOFTWARES UTILIZADOS

Os padrões de arquitetura de *software* incentivam o baixo acoplamento entre subsistemas, especificando-os e determinando a forma de interação entre os mesmos (Deitel e Deitel, 2007). Para o ambiente integrado aqui desenvolvido, adotou-se o padrão de arquitetura MVC (*Model-View-Controller*), que separa os dados da aplicação (contidos no *modelo*), dos componentes gráficos de apresentação (a *exibição*) e da lógica de processamento de entrada (o *controlador*) possibilitando maior desempenho e abrangência.

A arquitetura MVC (ou arquitetura em três camadas) surgiu após o advento do modelo cliente-servidor e também dos servidores *web*. Com a arquitetura dividida, cada camada pode ser desenvolvida de forma independente, ou seja, cada camada (Banco de Dados ou Camada de Informações; Regras de Negócio e Interface com o Usuário ou Camada Cliente) pode ser substituída ou ampliada sem que as outras sofram alterações e permitindo o máximo desempenho de cada especialista. A Figura 3.3 apresenta a estrutura básica de uma aplicação de três camadas.



**Figura 3.3:** Modelo de arquitetura em três camadas (padrão MVC).

Ainda com relação à Figura 3.3, o Servidor *web* possui a tarefa de interconexão entre as três camadas da arquitetura. É também tarefa do Servidor atender requisições provenientes do protocolo HTTP e enviá-las para a Camada de Informações e para as Regras de Negócio. O servidor gratuito *Apache Tomcat 5.5.17* foi utilizado como padrão para o desenvolvimento do ambiente integrado. Como referência oficial para implantação das tecnologias *Java Servlets* e *JavaServer Pages*, o servidor *Tomcat* é distribuído sobre a licença Apache no projeto Jakarta (<http://tomcat.apache.org>).

A camada de Banco de Dados é responsável pela manutenção e integridade dos dados e informações da aplicação. O banco de dados aqui utilizado foi o *MySQL*®, um popular sistema *open source* de gerenciamento de banco de dados relacional desenvolvido e distribuído pela MySQL AB.

A Camada Cliente interliga usuário e aplicação. Nela o usuário interage com o banco de dados e com as regras de negócio e pode ser construída com qualquer linguagem para a *web* que possua mecanismos de conexão com o Servidor e também de conexão com banco de dados. As tecnologias *Java Servlets* e *JavaServer Pages* (Sun Microsystems, Inc.), foram utilizadas na concepção do ambiente integrado.

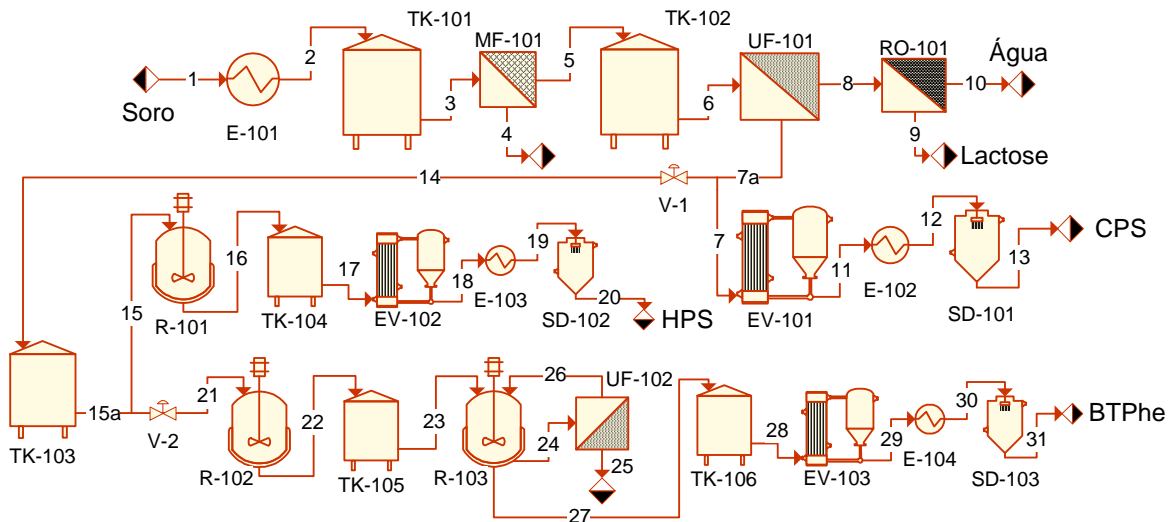
As Regras de Negócio (modelos) são classes que validam as entradas do usuário por meio da interface e devem também se conectar ao banco de dados em busca de informações relevantes para validação das informações/requisições vindas do usuário. Como referência oficial para o servidor *Tomcat*, a linguagem Java foi utilizada para construção das classes que estabelecem as regras de negócio.

Complementam a solução computacional do ambiente integrado o *software Matlab*® 6.5 (MathWorks, Inc.), responsável pela execução dos algoritmos com cálculos matemáticos e o *software Labview*®, juntamente com a placa de aquisição de sinais PCI-6052E (National Instruments, Inc.), para controle e monitoramento dos reatores enzimáticos.

### 3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 – MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA BIOREFINARIA DO SORO DE QUEIJO

O fluxograma básico proposto para o processo de refino do soro de queijo é apresentado na Figura 3.4. No fluxograma, apenas as correntes principais são apresentadas, ou seja, as correntes materiais dos produtos de interesse. As correntes secundárias, isto é, subprodutos, vapor, etc., assim como as condições de operação de cada etapa são explicitadas na modelagem de cada operação unitária detalhada no Anexo A. Equipamentos auxiliares como bombas, compressores, etc., não foram considerados nos cálculos do projeto.



**Figura 3.4:** Fluxograma básico de processo para o refino do soro de queijo.

No diagrama, o soro de queijo é esterilizado no trocador de calor *E-101* e armazenado em um tanque isolado (*TK-101*). Após a micro e a ultrafiltração, respectivamente, unidades *MF-101* e *UF-101*, tem-se um concentrado protéico do soro de queijo (contendo aproximadamente  $60 \text{ g}_{\text{Proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Os tanques *TK-101* e *TK-102*, além de utilizados para armazenamento, atuam também como tanques “pulmão” que garantem a continuidade do processo durante a interrupção dos sistemas de micro e ultrafiltração para a limpeza das membranas. O permeado da ultrafiltração segue para uma unidade de osmose reversa (*RO-101*), originando uma corrente de **lactose** concentrada e uma de “água de processo”. Já o concentrado pode seguir três rotas distintas de acordo com o produto de interesse.

Para a produção do concentrado protéico **CPS**, o retentado da unidade de ultrafiltração é pré-concentrado por intermédio de evaporador operando a vácuo (*EV-101*) e finalmente tem 95% de sua umidade retirada em um secador por atomização (*SD-101*).

Se o soro concentrado for submetido à hidrólise enzimática com Alcalase® no reator enzimático *R-101*, obtém-se, após as etapas de pré-concentração e secagem *EV-102* e *SD-102*, o hidrolisado protéico do soro **HPS**.

Na produção do suplemento protéico com baixo teor do aminoácido Phe (**BTPhe**), o concentrado é submetido a duas hidrólises seqüenciais: com a protease quimotripsina no reator *R-102* e com a exopeptidase CPA no reator *R-103*. Após separação dos aminoácidos liberados durante a reação com CPA por diafiltração (*UF-102*), o produto de interesse passa também pelas etapas de secagem no evaporador *EV-103* e no secador por atomização *SD-103*.

Como as etapas reacionais (*R-101*, *R-102* e *R-103*) são operadas de forma intermitente, os tanques *TK-103*, *TK-104*, *TK-105* e *TK-106* são utilizados como tanques pulmão que garantem a operação contínua das demais unidades da planta. Assim como os tanques *TK-101* e *TK-102*, o tanque *TK-106* auxilia em possíveis interrupções da linha para limpeza da membrana da unidade *UF-102*.

O projeto de planta apresentado na Figura 3.4 e discutido nos parágrafos anteriores é claramente um projeto preliminar. Como unidades de operação contínuas e intermitentes estão presentes ao longo da planta, técnicas de otimização misto-inteira assim como técnicas de *debottlenecking* são perfeitamente cabíveis e necessárias antes da elaboração de um projeto final (Turton *et al.*, 1998). Ainda, tratando-se de uma planta multipropósito com possibilidade da utilização de equipamentos em comum e operações no modo intermitente, políticas de transferência e possíveis campanhas de produção mistas também precisam ser investigadas nas unidades de operação intermitentes (Biegler *et al.*, 1997).

Entretanto, para previsões preliminares de custo e de retorno de capital, metas deste trabalho, a proposta ilustrada na Figura 3.4 é suficiente. De fato, o aprofundamento dos estudos mencionados só seria justificável em uma aplicação específica e não em aplicações de âmbito genérico como as que se propuseram neste doutorado.

No Anexo A são disponibilizados os balanços materiais e de energia das operações unitárias utilizadas ao longo da planta (estado estacionário). Tratando-se de um problema de projeto, deve-se ter em mente que a variável de interesse é sempre a dimensão característica do equipamento (área, volume, diâmetro, etc.), que determinará o custo do mesmo e permitirá, conseqüentemente, a análise econômica da planta. Todas as propriedades físicas, condições

operacionais e preços mencionados no decorrer dos equacionamentos são também listados no supracitado anexo.

Os custos fixos e operacionais dos equipamentos foram estimados consultando catálogos, empresas, livros-texto da área, o simulador de bioprocessos SuperPro Designer® v3.07 (Intelligen, Inc.), e seus valores foram atualizados com auxílio do índice *Chemical Engineering Plant Cost Index* (CEPCI, publicados mensalmente no periódico *Chemical Engineering*). É importante destacar que as estimativas de custo feitas nessa base podem ser facilmente recalculadas com valores correntes para o mercado. O foco foi construir um ambiente computacional no qual o usuário possa fazer essa atualização de forma amigável e, mesmo com valores defasados no tempo, avaliar o impacto de diferentes condições operacionais na economia do processo. Os equacionamentos aqui considerados devem ser encarados, portanto, como uma prova de conceito desse aplicativo e das rotinas de otimização empregadas em operações da planta multipropósito.

Ao invés de uma análise econômica em valores absolutos, que perderia significado prático no decorrer dos anos, em alguns casos optou-se nesta seção pela apresentação dos resultados em unidades arbitrárias (UA). Dessa forma, enfoca-se uma análise de sensibilidade econômica do processo com relação aos seus principais parâmetros.

Na simulação da biorefinaria do soro de queijo, várias situações operacionais devem ser estudadas para cada equipamento presente ao longo da planta no intuito de elevar o rendimento econômico global do processo. Nesta tese, como fica claro no decorrer do texto, deu-se destaque para as condições de operação dos três reatores enzimáticos.

Na equação de projeto de um reator enzimático operado em regime intermitente (Equação 3.6), observa-se que o volume do reator para uma determinada quantidade de substrato  $V_{soro}$  é função apenas da concentração enzimática  $C_{enzima}$ , já que a densidade do gel de agarose e as cargas enzimáticas são consideradas constantes.

$$V_R = V_{soro} + V_{gel} = \frac{V_{soro}}{1 - \frac{C_{enzima}}{\rho_{gel} \cdot c \cdot \arg a_{enzima}}} \quad (3.6)$$

Sendo:  $C_{enzima}$  – a concentração inicial de enzima no reator;  $carga_{enzima}$  – a carga enzimática no gel de agarose;  $\rho_{gel}$  – a densidade do gel de agarose.

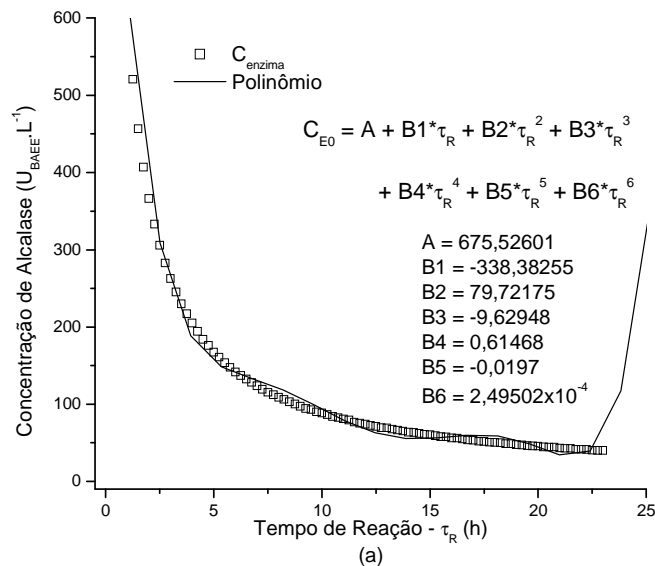
Por sua vez, a variável  $C_{enzima}$  depende do tempo reacional necessário para se obter o grau de hidrólise específico de cada proteólise. A Tabela 3.1 lista as cargas enzimáticas

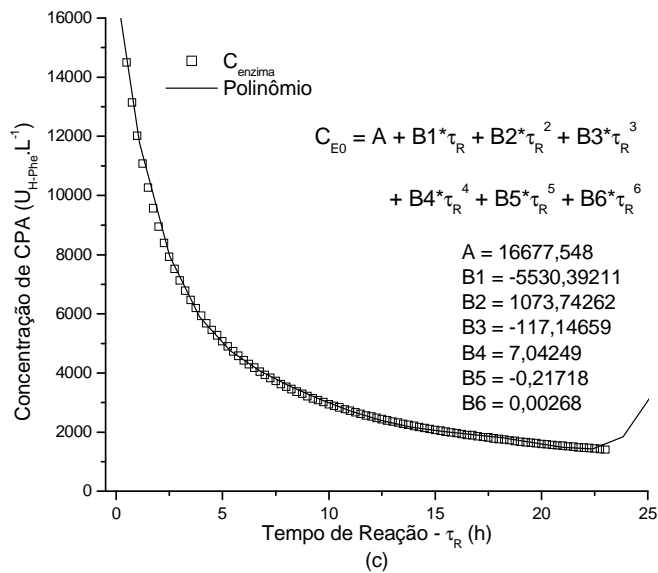
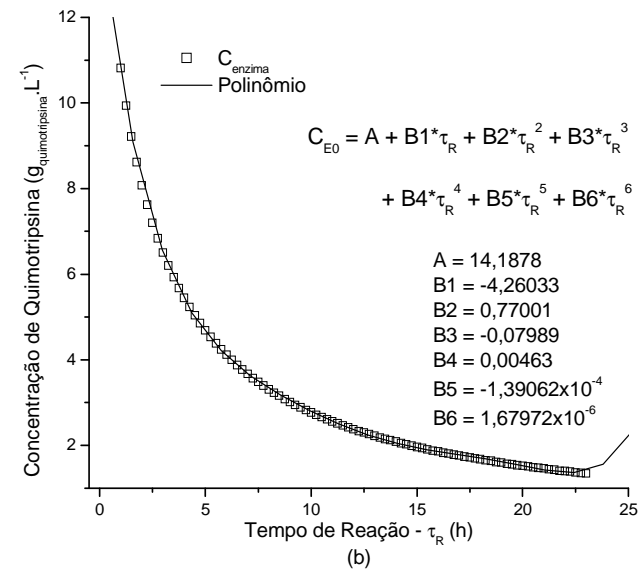
consideradas para cada catalisador e os graus de hidrólise de projeto em cada reator enzimático.

**Tabela 3.1:** Cargas fixadas para cada catalisador enzima-glioxil-agarose e grau de hidrólise de projeto (GH).

Reator	Enzima	Carga	GH (%)
R-101	Alcalase®	30 U <sub>BAEE</sub> ·g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> (Tardioli, 2003).	23
R-102	Quimotripsina	40 mg <sub>quimotripsina</sub> ·g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> (Galvão, 2004)	15,3
R-103	CPA	150 U <sub>H-PHE</sub> ·g <sub>gel</sub> <sup>-1</sup> (Tardioli, 2003)	28

Portanto, nas condições descritas na tabela acima, uma variável a ser investigada é o tempo reacional necessário para se atingir o grau de hidrólise operacional. Polinômios que relacionam o tempo de reação com a concentração enzimática são apresentados na figura abaixo para a faixa de 3 a 22 horas de proteólise. Os polinômios foram estimados com os modelos cinéticos desenvolvidos no capítulo anterior para as reações com CPA e quimotripsina e com o apresentado por Sousa, 2003, para a Alcalase®.



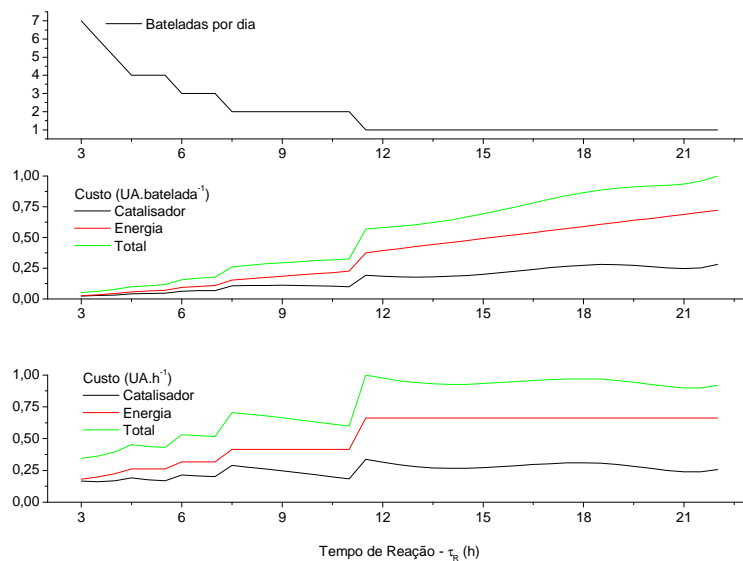


**Figura 3.5:** Polinômios para inferência da concentração enzimática em função do tempo de reação (3 a 22 horas). Reatores: (a) R-101 (Alcalase®-glicoxil-agarose); (b) R-102 (quimotripsina-glicoxil-agarose); (c) R-103 (CPA-glicoxil-agarose). A carga enzimática e o grau de hidrólise para cada reator são descritos na Tabela 3.1.

O custo operacional de cada reator é composto pelo gasto com catalisador por batelada e pelos gastos energéticos com agitação e aquecimento. Para se atingir determinado grau de hidrólise em um tempo relativamente curto, pode-se operar o reator com uma alta concentração de enzima (a concentração inicial de substrato é fixada em  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  para os três reatores). Nesse caso, emprega-se uma quantidade alta de gel e, em contrapartida, a vida

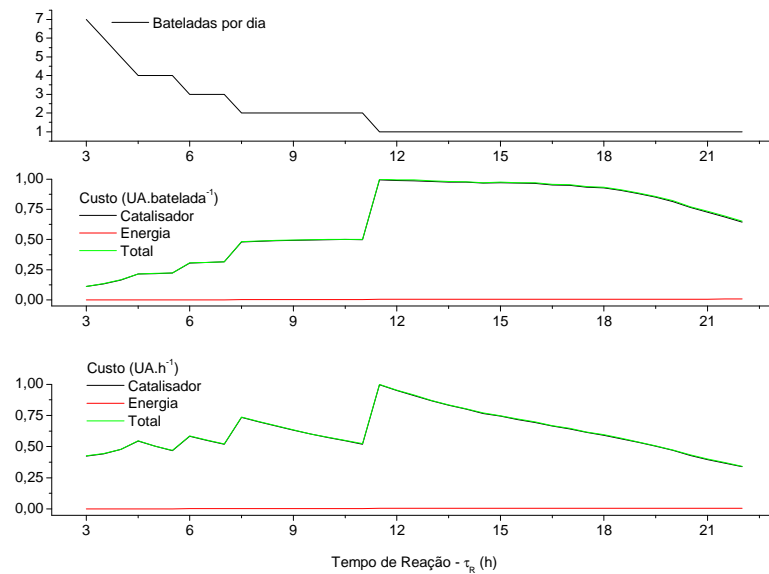
útil do catalisador é elevada e os gastos com energia são reduzidos. Na situação oposta, quando o tempo de reação é elevado para uma dada conversão, a quantidade de gel requerida é baixa e, por outro lado, reduz-se a vida útil do catalisador e são majorados os gastos para manter o reator acesso.

As três figuras seguintes ilustram o problema. Como os reatores são processados em modo intermitente, para melhor compreensão os sistemas são detalhados na figura por batelada e por hora de produção. Entretanto, apenas os custos por hora de produção devem ser tomados como parâmetros de decisão, uma vez que a biorefinaria é processada em modo contínuo. Os resultados mostrados nas figuras permitem inferir que enquanto o tempo mínimo de reação deve ser utilizado para os reatores R-101 e R-103 (3 horas; Figura 3.6 e Figura 3.8), para a reação com catalisador quimotripsina-glioxil-agarose, R-102, o tempo máximo de reação é mais indicado (22 horas; Figura 3.7). Em outras palavras: como o custo associado ao catalisador empregado no reator R-102 é elevado, é preferível manter o reator acesso por um longo tempo a praticar bateladas menores, porém, com uma quantidade de gel maior por batelada. Por fim, com o quadro descrito nas figuras abaixo também é possível concluir que qualquer projeto econômico do processo fica bastante sensível aos custos dos catalisadores, uma vez que variações em seus preços e/ou em suas estabilidades podem alterar as configurações dos reatores de uma extremidade para a outra das figuras com relação aos tempos reacionais.

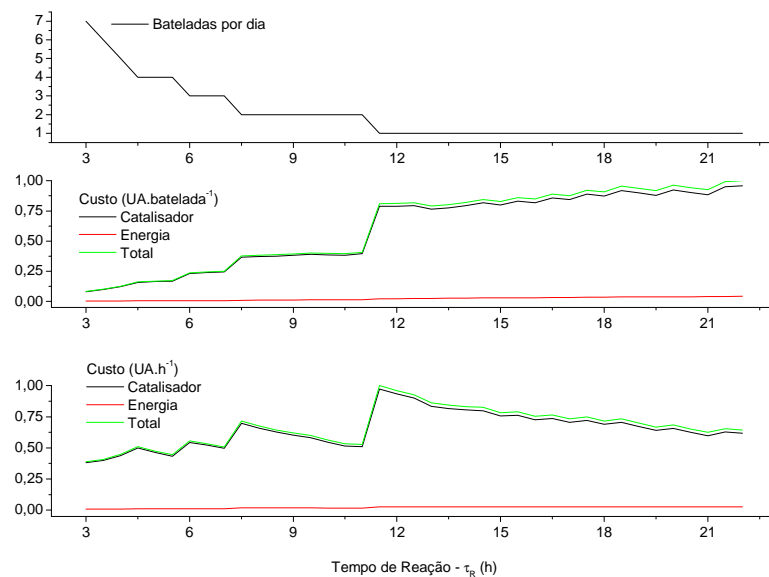


**Figura 3.6:** Custo operacional do reator R-101 (Alcalase®-glioxil-agarose) em função do tempo de reação (UA = unidade arbitrária). Simulações para uma vazão de soro de queijo de  $5000 \text{ kg.h}^{-1}$ .



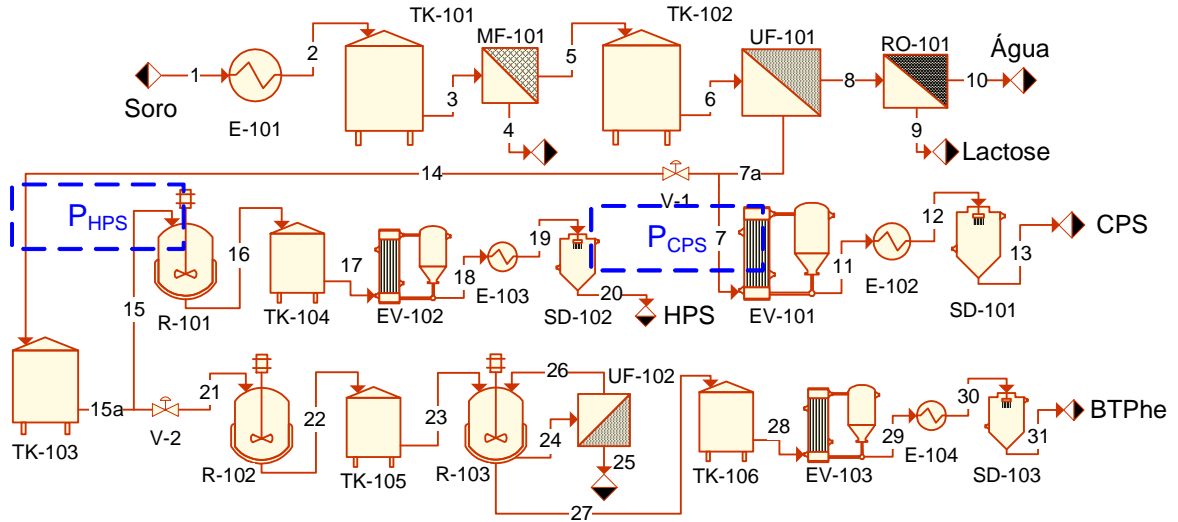


**Figura 3.7:** Custo operacional do reator R-102 (quimotripsina®-glicoxil-agarose) em função do tempo de reação (UA = unidade arbitrária). Simulações para uma vazão de soro de queijo de  $5000 \text{ kg.h}^{-1}$ .



**Figura 3.8:** Custo operacional do reator R-103 (CPA-glicoxil-agarose) em função do tempo de reação (na figura UA = unidade arbitrária). Simulações para uma vazão de soro de queijo de  $5000 \text{ kg.h}^{-1}$ .

Para a definição do esquema de produção multipropósito, além do tempo de operação de cada reator  $\tau_{Ri}$ , têm-se as variáveis  $p_{CPS}$  (percentagem da vazão mássica  $F_{7a}$  destinada à produção de CPS) e  $p_{HPS}$  (percentagem de vazão mássica  $F_{15a}$  destinada à produção de HPS) como ilustra a Figura 3.9:



**Figura 3.9:** Esquema da planta multipropósito com variáveis  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  em destaque.

As variáveis  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  influenciam no cálculo das vazões mássicas  $F_i$  das correntes 7, 14, 15 e 21 mostradas na Figura 3.9, como definem as equações 3.7 a 3.10:

$$F_7 = F_{7a} \cdot p_{CPS} \quad (3.7)$$

$$F_{14} = F_{7a} \cdot (1 - p_{CPS}) \quad (3.8)$$

$$F_{15} = F_{7a} \cdot (1 - p_{CPS}) \cdot p_{HPS} \quad (3.9)$$

$$F_{21} = F_{7a} \cdot (1 - p_{CPS}) \cdot (1 - p_{HPS}) \quad (3.10)$$

As duas variáveis supracitadas auxiliam na formulação de um problema de otimização do tipo não-linear com restrições. De acordo com a Equação 3.5, além da taxa mínima de atratividade  $i$  e do tempo de vida do projeto  $n$ , o VPL é também função do investimento em capital fixo inicial  $ICF$  e do fluxo de caixa  $FC$ . Ambas variáveis  $ICF$  e  $FC$  são função, dentre

outras, de  $p_{CPS}$ ,  $p_{HPS}$  e do tempo de operação de cada reator  $\tau_{Ri}$ . Procede-se então à busca do mínimo no problema não-linear exposto a seguir:

$$\begin{aligned} & \underset{p_{CPS}, p_{HPS}, \tau_{R-101}, \tau_{R-102}, \tau_{R-103}}{\text{Min}} \quad \{\phi\}, \\ & \phi = -VPL[i, n, ICF(\dots, p_{CPS}, p_{HPS}, \tau_{R-101}, \tau_{R-102}, \tau_{R-103}), FC(\dots, p_{CPS}, p_{HPS}, \tau_{R-101}, \tau_{R-102}, \tau_{R-103})] \end{aligned} \quad (3.11)$$

Com as restrições:

$$0 \leq p_{CPS} \leq 1 \quad (3.12)$$

$$0 \leq p_{HPS} \leq 1 \quad (3.13)$$

$$3 \text{ h} \leq \tau_{Ri} \leq 22 \text{ h}; i = 1, \dots, 3 \quad (3.14)$$

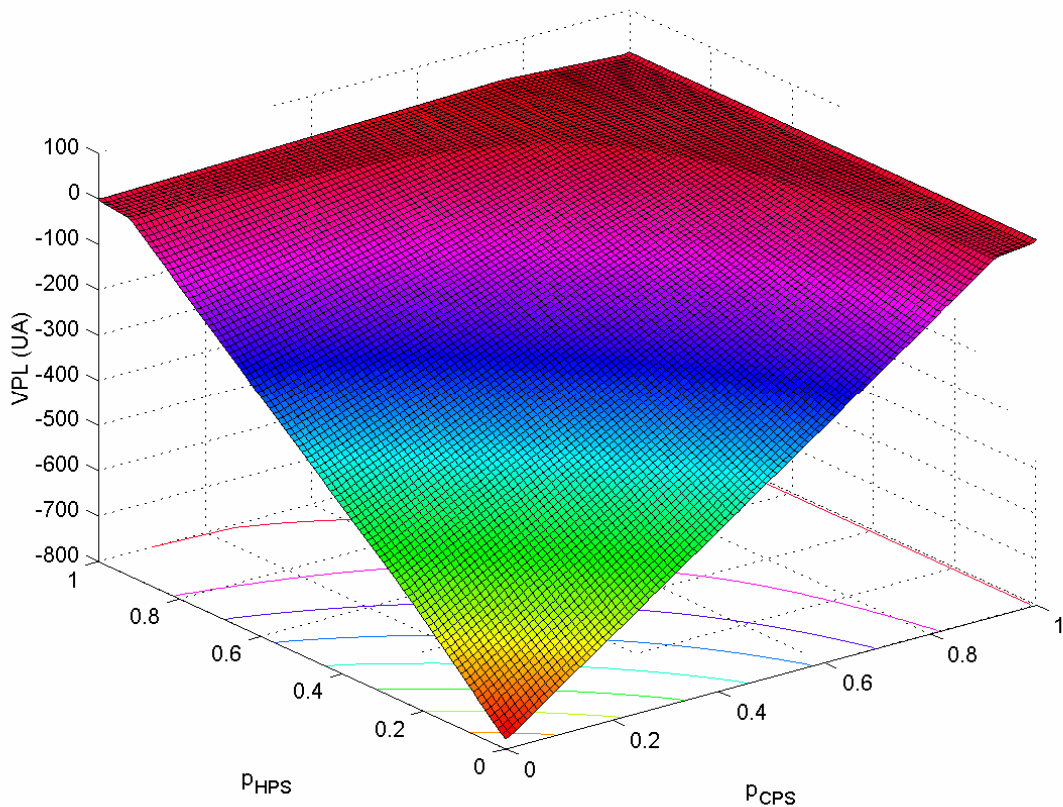
$$\frac{F_{13}}{LM_{CPS}} \leq 1 \quad (3.15)$$

$$\frac{F_{20}}{LM_{HPS}} \leq 1 \quad (3.16)$$

$$\frac{F_{31}}{LM_{BTPhe}} \leq 1 \quad (3.17)$$

Nas restrições 3.15 a 3.17 a vazão mássica de cada corrente  $F_i$ , em  $\text{Kg.ano}^{-1}$ , não pode ultrapassar o limite de mercado de cada produto  $LM_i$  sob pena de acúmulo do mesmo. Antecipadamente, é importante destacar que as restrições 3.15 a 3.17 necessitam de um estudo mais aprofundado em casos específicos visto que, às vezes, pode ser preferível acumular determinado produto em estoque a produzir outro de custo de produção mais elevado como o BTPhe, por exemplo. Além disso, em um estudo detalhado de mercado, a possibilidade de exportação dos produtos também deve ser considerada.

A influência das variáveis  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  no problema de otimização é mostrada na Figura 3.10 para uma vazão de soro  $F_I = 8000 \text{ kg.h}^{-1}$  e tempos de operação dos reatores fixos em  $\tau_{R-101} = 3 \text{ h}$ ,  $\tau_{R-102} = 22 \text{ h}$  e  $\tau_{R-103} = 3 \text{ h}$ .



**Figura 3.10:** Influência das variáveis  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  no projeto da biorefinaria do soro de queijo (UA = unidade arbitrária). Os tempos reacionais utilizados foram:  $\tau_{R-101} = 3$  h,  $\tau_{R-102} = 22$  h e  $\tau_{R-103} = 3$  h. A vazão de soro de queijo é de  $8000 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ . Na figura, os valores ótimos para  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  são, respectivamente, 0,69 e 0,75.

Para resolução do problema definido nas equações 3.11 a 3.17, utilizou-se o método da programação quadrática sucessiva com restrições, SQP, que permite a inclusão de restrições lineares e não-lineares do problema (algoritmo *fmincon* do Matlab® 6.5, MathWorks, Inc.; Edgar *et al.*, 2001). Os pontos de operação calculados com a programação quadrática sucessiva foram comparados com aqueles determinados pelos métodos de busca direta SA, PSO e ED. Nesse caso, mantidas as restrições de operação 3.12 a 3.14, as restrições de mercado 3.15 a 3.17 foram incorporadas ao problema via penalização da função-objetivo, isto é,  $-VPL$ :

3 – Engenharia de Bioprocessos e Sistemas aplicada à Biorefinaria de Soro de Queijo

$$\begin{aligned} & \underset{P_{CPS}, P_{HPS}, \tau_{R-101}, \tau_{R-102}, \tau_{R-103}}{\text{Min}} \quad \{\phi\}, \\ \phi = & [-VPL + (F_{13} - LM_{CPS}) \text{Preço}_{CPS} + (F_{20} - LM_{HPS}) \text{Preço}_{HPS} + (F_{31} - LM_{BTPhe}) \text{Preço}_{BTPhe}] \end{aligned} \quad (3.18)$$

Com as condições:

$$\text{Preço}_{CPS} = 0, \text{ Se } F_{13} < LM_{CPS} \quad (3.18a)$$

$$\text{Preço}_{HPS} = 0, \text{ Se } F_{20} < LM_{HPS} \quad (3.18b)$$

$$\text{Preço}_{BTPhe} = 0, \text{ Se } F_{31} < LM_{BTPhe} \quad (3.18c)$$

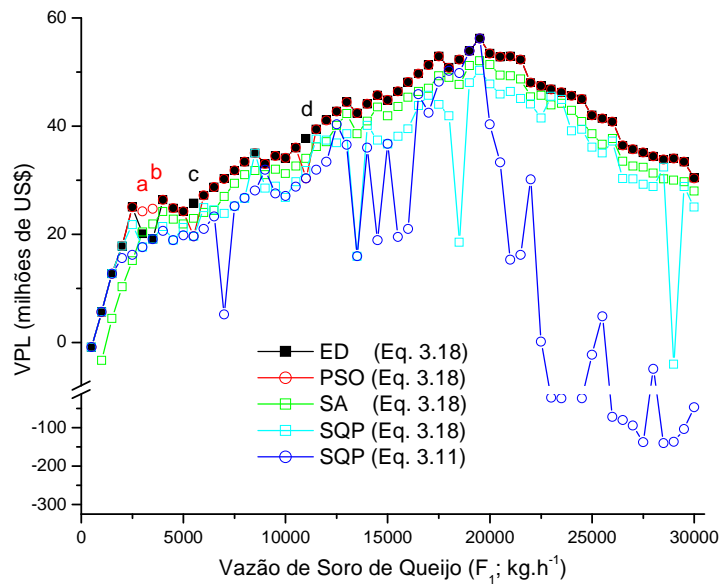
Com as restrições:

$$0 \leq p_{WPC} \leq 1 \quad (3.12)$$

$$0 \leq p_{WPH} \leq 1 \quad (3.13)$$

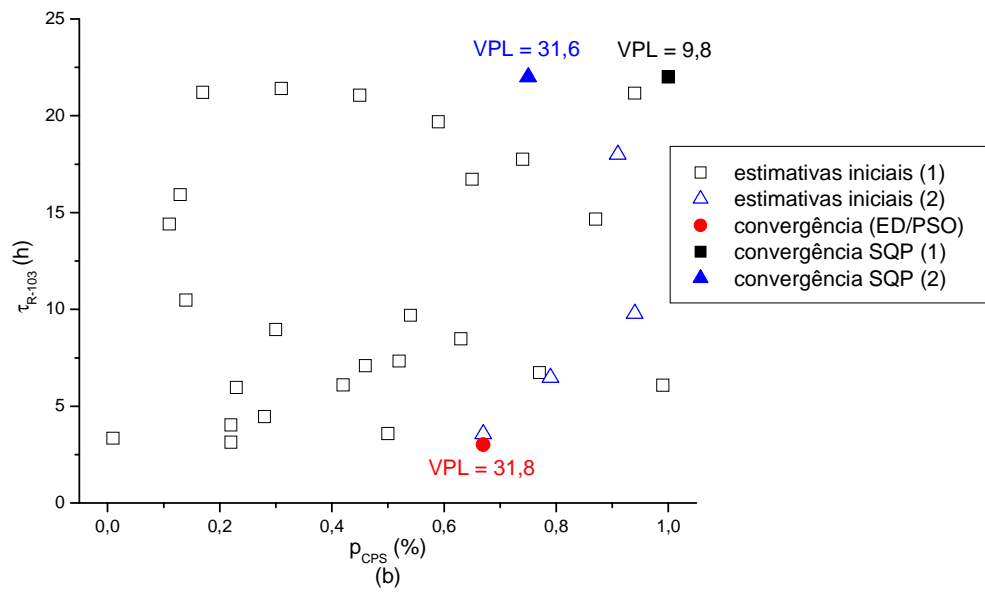
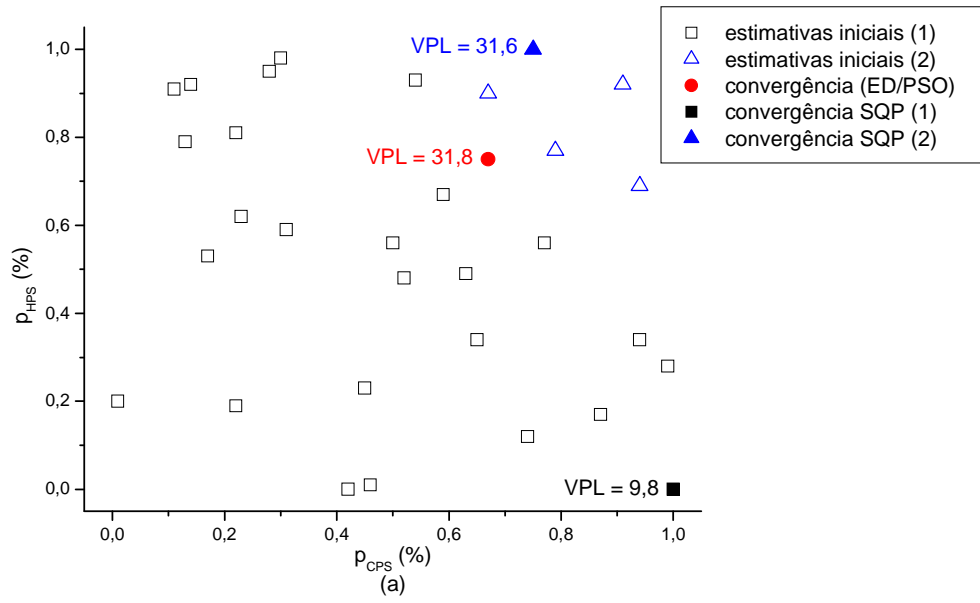
$$3 h \leq \tau_{Ri} \leq 22 h; i = 1, \dots, 3 \quad (3.14)$$

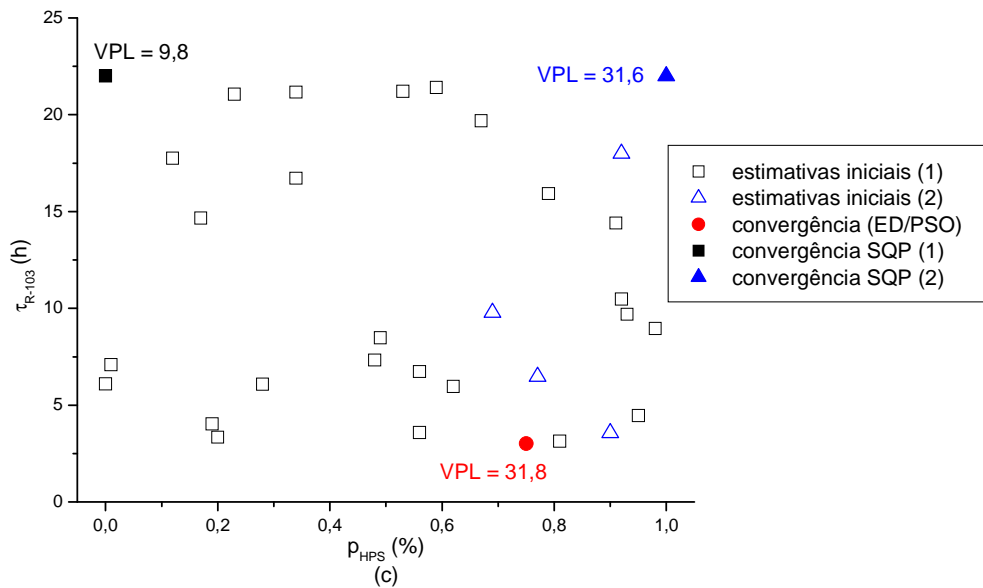
A Figura 3.11 compara o desempenho de cada algoritmo de otimização. Para o cálculo do VPL de cada projeto (cada vazão de soro define um projeto da biorefinaria), a taxa de atratividade utilizada foi de 10,08 % a.a. – rendimento médio pago pelos fundos de renda fixa em 2007 (Jornal *O Estado de São Paulo*, dia 9 de janeiro de 2008).



**Figura 3.11:** Valor presente líquido do projeto em função da vazão de soro de queijo à montante da biorefinaria. Comparação de desempenho entre os métodos de otimização Evolução Diferencial (ED), Enxame de Partículas (PSO), *Simulated Annealing* (SA) e Programação Quadrática Sucessiva (SQP).

A Programação Quadrática Sucessiva (algoritmo *fmincon*), independente da função-objetivo (Equação 3.11 ou 3.18), mostrou desempenho pouco robusto, com oscilações na convergência e alta sensibilidade às estimativas iniciais das variáveis definidas nas equações 3.12 a 3.14. A Figura 3.12 ilustra o caso para uma vazão de soro de queijo de  $7500 \text{ kg.h}^{-1}$ , onde o ponto de operação determinado pelos algoritmos ED e PSO foi:  $p_{CPS} = 0,67$ ;  $p_{HPS} = 0,75$ ;  $\tau_{R-101} = 3 \text{ h}$ ;  $\tau_{R-102} = 22 \text{ h}$  e  $\tau_{R-103} = 3 \text{ h}$ . A mesma população inicial gerada de forma aleatória para os algoritmos ED e PSO foi utilizada como estimativas iniciais para a SQP (com a função-objetivo definida pela Equação 3.18, isto é, com as restrições de mercado 3.15 a 3.17 sendo incorporadas ao problema via penalização da função-objetivo). A Figura 3.12 compara as três variáveis onde os métodos divergiram, a saber,  $p_{CPS}$ ,  $p_{HPS}$  e  $\tau_{R-103}$ . Observe na figura que dois conjuntos distintos de estimativas iniciais levam o algoritmo SQP para dois estados sub-ótimos, porém diferentes do ponto de operação “ótimo” determinado pela Evolução Diferencial e pelo Enxame de Partículas. Pode-se notar na figura que o algoritmo SQP convergiu sobre as restrições do problema, não conseguindo identificar um ponto ótimo no interior da região factível.





**Figura 3.12:** Comparação de desempenho entre os métodos estocásticos ED/PSO e o algoritmo SQP. A figura destaca a sensibilidade do método local às estimativas iniciais. (Resultados obtidos para uma vazão mássica de soro de  $7500 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Nas figuras o valor presente líquido (VPL) é mostrado em milhões de dólares.

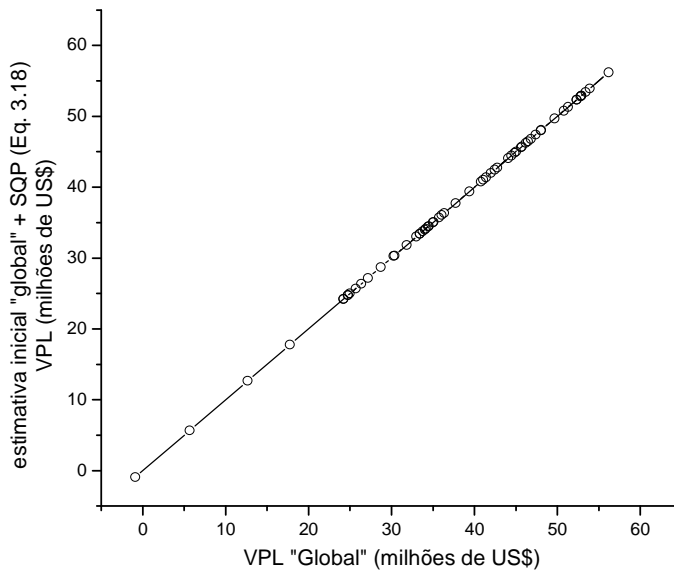
Para o problema de otimização definido de acordo com as equações 3.11 a 3.17, o desempenho limitado da abordagem SQP mostrado na Figura 3.11 para vazões de soro de queijo acima de  $\sim 18000 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  também pode ser justificado: para vazões acima desse valor, as restrições 3.15 a 3.17 sempre serão violadas, ou seja, não importa o quanto a SQP manipule as variáveis do problema, elas nunca atenderão às restrições de mercado simultaneamente (vide, por exemplo, o comportamento das restrições de mercado para vazões acima de  $\sim 18000 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  na Figura 3.15). Por outro lado, para vazões abaixo de  $\sim 18000 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}$  a SQP também apresentou resultados limitados para o problema de otimização formulado com a função-objetivo 3.11.

Utilizando a mesma função-objetivo para todos os métodos (Equação 3.18), a Evolução Diferencial e o Enxame de Partículas foram as abordagens que conduziram a biorefinaria para os melhores resultados econômicos em estado estacionário. Os pontos *a* e *b* em destaque na Figura 3.11 evidenciam situações onde o Enxame de Partículas convergiu para melhores resultados. Em contrapartida, nos pontos *c* e *d* da mesma figura, a Evolução Diferencial foi superior. A técnica *Simulated Annealing* e a SQP convergiram para resultados sub-ótimos na grande maioria dos casos. Não obstante, vale ressaltar que um estudo detalhado



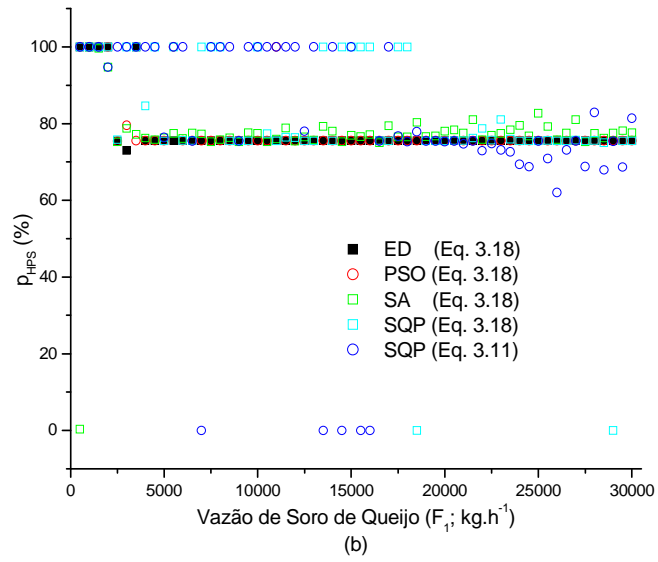
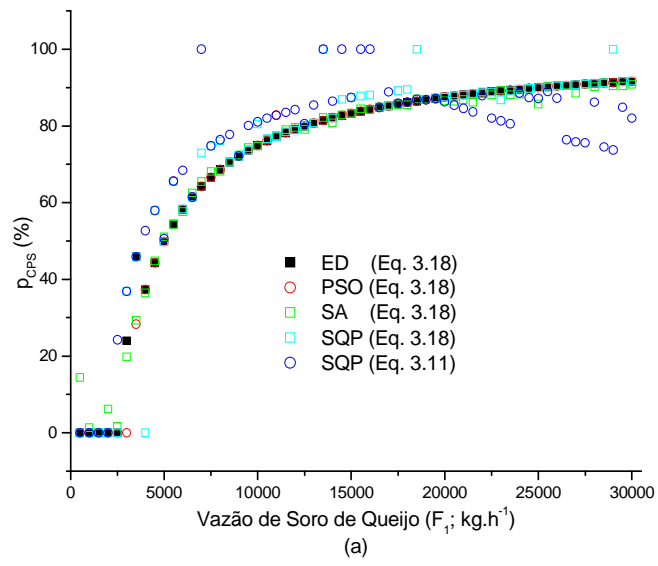
dos parâmetros de sintonia de qualquer dos métodos estocásticos analisados provavelmente melhoraria seu desempenho.

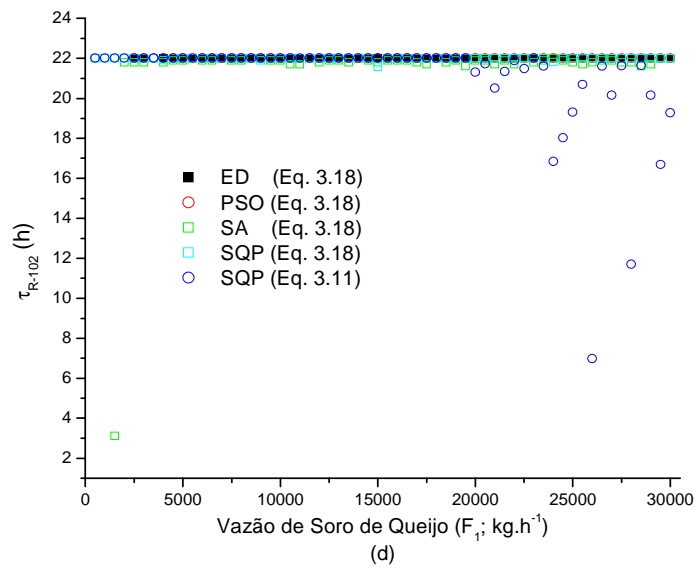
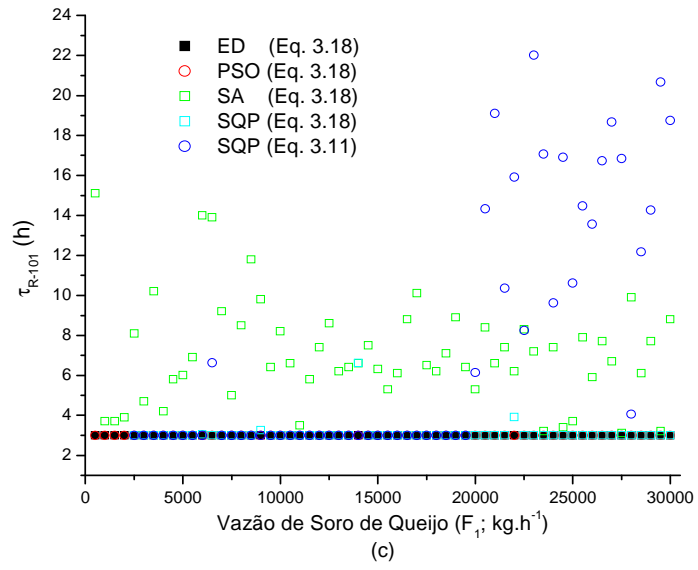
A robustez dos métodos estocásticos ED e PSO fica comprovada quando, para cada vazão mássica de soro, utiliza-se o ponto “ótimo” de operação por um deles determinado como estimativa inicial para a SQP. A Figura 3.13 mostra que nenhum ganho adicional é obtido no VPL do projeto com a utilização do algoritmo de busca baseado no gradiente após a otimização estocástica.

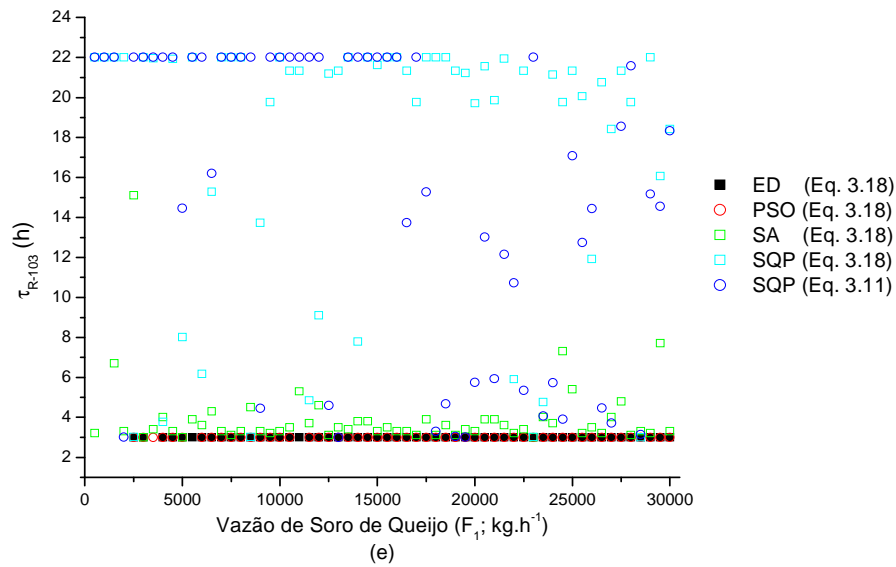


**Figura 3.13:** Comparação do VPL “ótimo” de projeto antes e após a utilização da programação quadrática sucessiva. Utiliza-se como estimativa inicial para a SQP o ponto “ótimo” de operação determinado pelos algoritmos ED/PSO.

A Figura 3.14 detalha os valores determinados por cada método para as variáveis  $p_{CPS}$ ,  $p_{HPS}$  e para os tempos operacionais dos reatores  $\tau_{Ri}$ . Quanto aos tempos de operação, os maiores VPLs na Figura 3.11 são obtidos quando o tempo mínimo de reação é aplicado para R-101 e R-103 (3 horas) e o tempo máximo – 22 horas – para a reação com o catalisador quimotripsina-glioxil-agarose, R-102 (como anteriormente discutido na Figura 3.7).

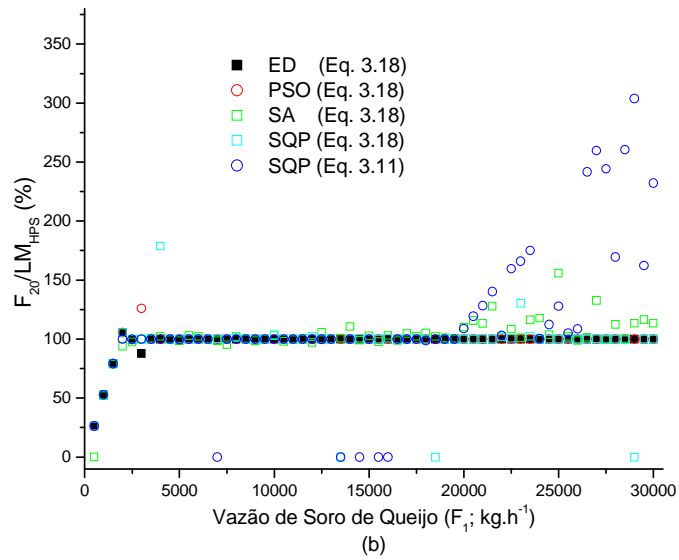
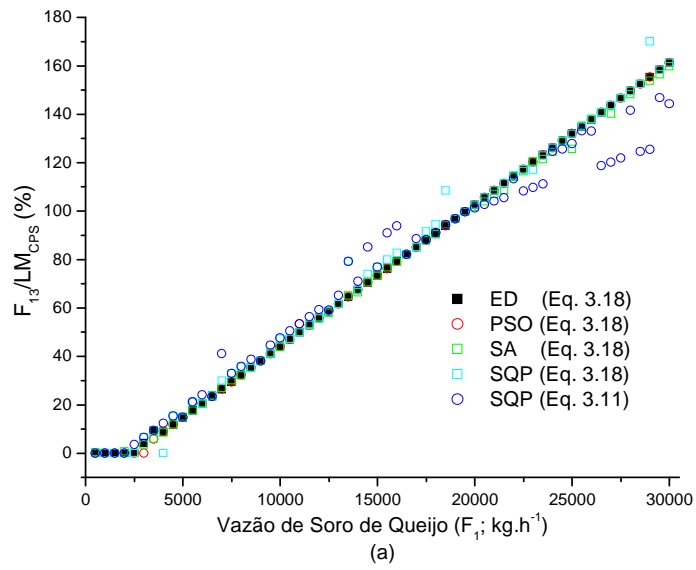


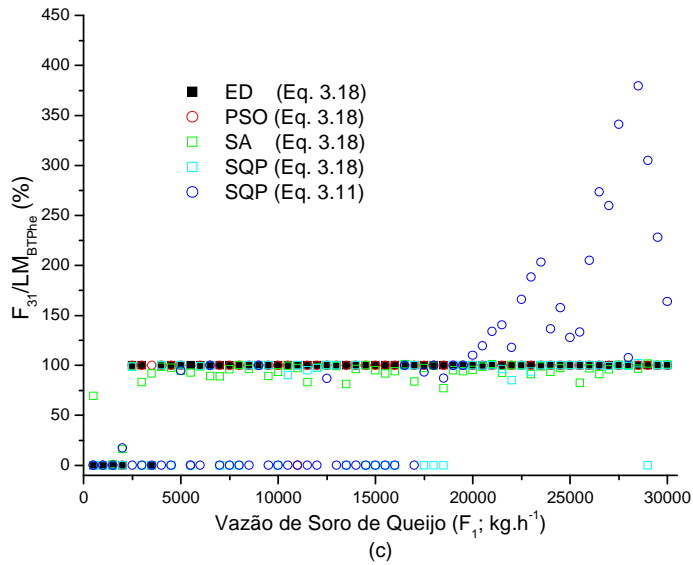




**Figura 3.14:** Valores determinados por cada método de otimização para as variáveis  $p_{CPS}$  (a),  $p_{HPS}$  (b) e para os tempos operacionais dos reatores R-101 (c), R-102 (d) e R-103 (e). Cada vazão de soro queijo determina um valor presente líquido de projeto detalhado na Figura 3.11.

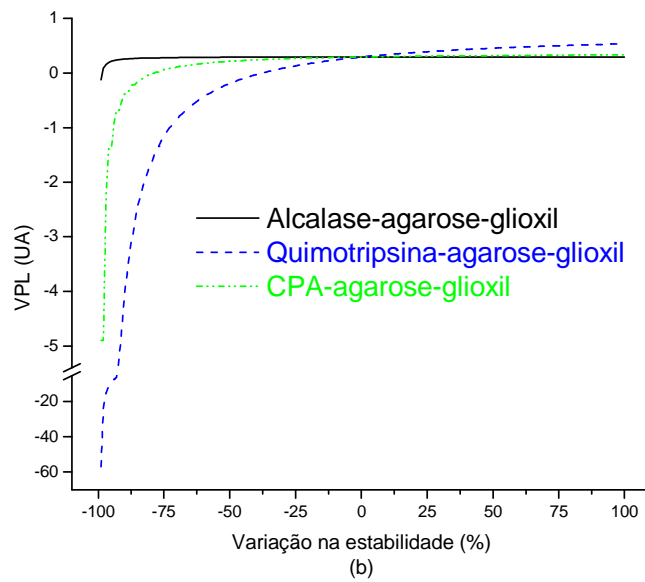
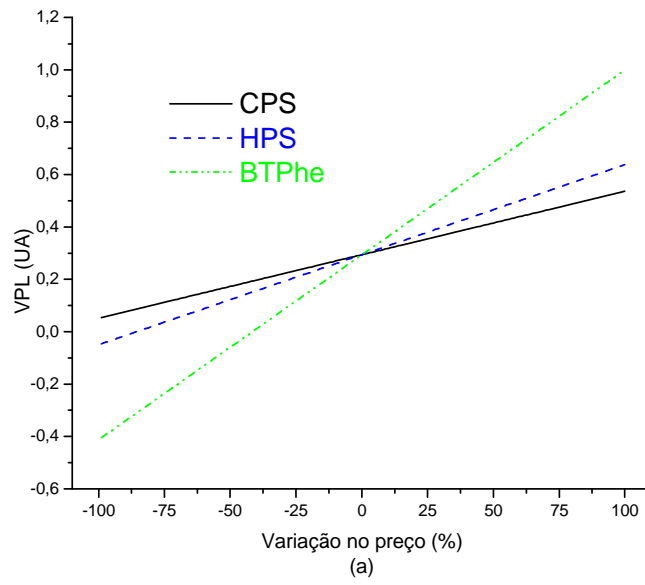
Já a análise das variáveis  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  (respectivamente Figura 3.14a e Figura 3.14b) é feita em conjunto com as restrições de mercado na Figura 3.15: devido à lucratividade na produção de BTPhe, os melhores resultados mostram que é preferível acumular o produto CPS – Figura 3.15a – e manter  $p_{HPS}$  invariante à medida que se aumenta a vazão de soro de queijo (Figura 3.14b). Dessa forma, as produções de HPS e BTPhe estão sempre no limite superior tolerado para o mercado (Figura 3.15b-c).

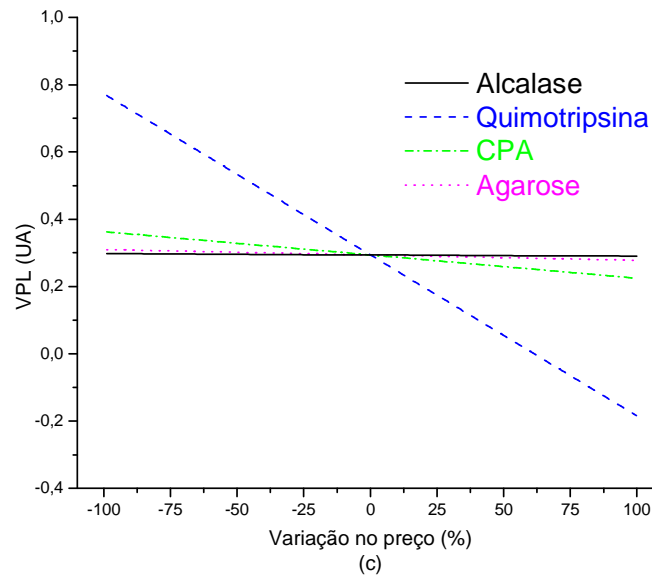




**Figura 3.15:** Restrições de mercado para o produtos CPS (a), HPS (b) e BTPhe(c) definidas de acordo com equações 3.15 a 3.17. Cada condição operacional está determinada na Figura 3.14.

Utilizando os valores ótimos das variáveis operacionais calculadas com o método Evolução Diferencial, a Figura 3.16 detalha o impacto de alguns parâmetros no projeto da biorefinaria multipropósito para um caso típico do cenário brasileiro, isto é, vazão de soro de 8000 kg.h<sup>-1</sup>. A Figura 3.16a,c mostra a influência de variações nos preços dos produtos e catalisadores. Alterações no preço da enzima quimotripsina têm um significativo impacto na economia do processo, pois o catalisador é empregado em uma das etapas para a produção de BTPhe, o principal produto da planta (Figura 3.16a). A sensibilidade do projeto com relação aos preços dos catalisadores pode ser minimizada se derivados de glioxil-agarose altamente estáveis forem disponíveis, como atesta a Figura 3.16b. Nesse caso, o emprego de catalisadores estáveis permite o reuso dos mesmos em várias bateladas, reduzindo, por conseguinte, o custo operacional dos reatores enzimáticos.





**Figura 3.16:** Impacto econômico da variação de alguns parâmetros no projeto da biorefinaria do soro de queijo ( $F_I = 8000 \text{ kg.h}^{-1}$ ;  $p_{CPS} = 0,69$ ;  $p_{HPS} = 0,75$ ;  $\tau_{R-101} = 3 \text{ h}$ ;  $\tau_{R-102} = 22 \text{ h}$  e  $\tau_{R-103} = 3 \text{ h}$ ). Nas figuras, UA representa Unidade Arbitrária.

As simulações apresentadas nesta seção indicam claramente que os produtos da biorefinaria são mais atrativos economicamente que a opção corriqueira no país de utilizar o soro de queijo em formulações para ração animal ou em preparados alimentícios. Por outro lado, prováveis investidores devem estar dispostos a utilizar tecnologia de ponta, como enzimas imobilizadas e sistemas avançados de controle e inferência. O ambiente integrado descrito no próximo item deste capítulo se insere nessas circunstâncias, como uma ferramenta de análise importante para diferentes cenários de mercado.

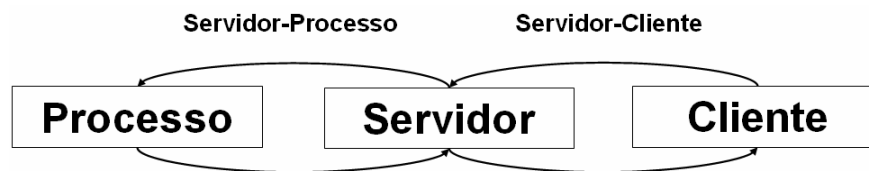
### 3.3.2 – AMBIENTE INTEGRADO

Nesta seção apresentam-se os testes com a solução computacional utilizada na implementação do ambiente integrado para monitoramento, controle, simulação e otimização da biorefinaria do soro de queijo. De maneira geral, o ambiente integrado é resultado dos modelos discutidos e validados nas seções anteriores deste e do capítulo anterior. O aplicativo reúne os algoritmos desenvolvidos tanto nos módulos para monitoramento e controle em tempo real (modelos cinéticos fenomenológico-neuronais ou empregando coeficientes de rendimento), quanto nas partes de simulação e otimização estacionária da planta. Os modelos



para predição da concentração molar de ligações hidrolisáveis, por exemplos, são utilizados para dimensionar os reatores com base na conversão desejada (grau de hidrólise).

Basicamente, a aplicação foi estruturada em dois paradigmas circulares: Servidor-Processo e Servidor-Cliente, como ilustrados na Figura 3.17. O paradigma Servidor-Processo, com processamento síncrono, realiza a troca de informações necessárias entre processo e servidor e não fica exposto diretamente ao ambiente da Internet. Por intermédio do servidor, o círculo Servidor-Cliente, assíncrono, lê o estado do processo ou nele atua de acordo com as solicitações enviadas pelos clientes conectados. A divisão em dois paradigmas torna o ambiente integrado, além de operacional, seguro, pois não permite que os clientes interajam diretamente com os computadores dedicados do processo. Somente as solicitações dos clientes validadas pelos protocolos de segurança previamente configurados no servidor são efetivamente enviadas aos computadores de processo.



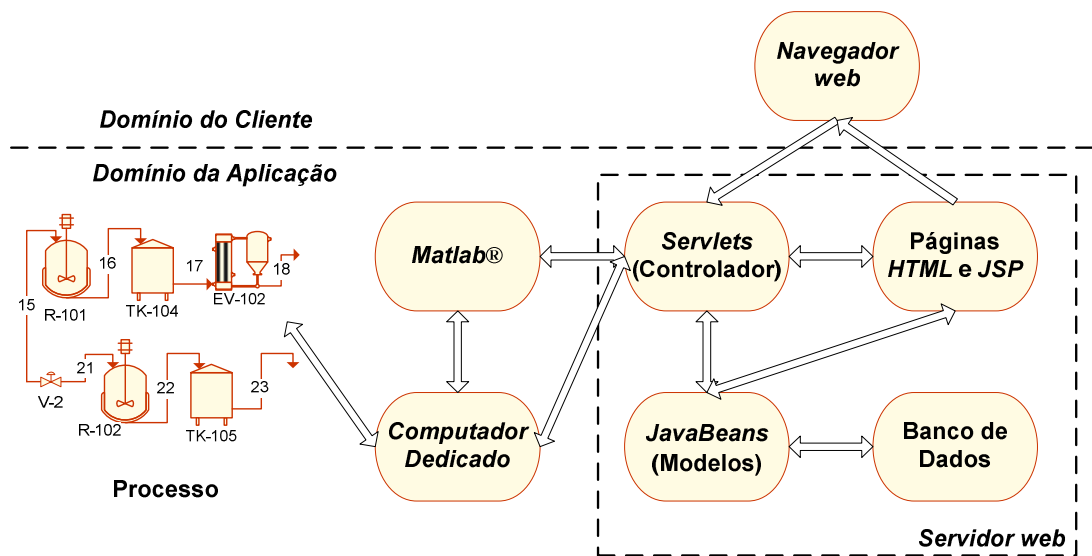
**Figura 3.17:** Paradigmas circulares de processamento Servidor-Processo e Servidor-Cliente empregados na solução do ambiente integrado.

A Figura 3.18 detalha a arquitetura empregada na elaboração do ambiente integrado. Trata-se basicamente do padrão MVC (*Model-View-Controller*), onde *servlets* atuam como gerenciadores entre as páginas JSP e cliente, induzindo a separação entre a geração (a cargo dos *servlets*) e apresentação de conteúdo (páginas JSPs). Os *servlets* são os controladores das páginas JSP, as quais exibem o conteúdo dinâmico como, principalmente, interfaces gráficas com o usuário. JSP são portáteis, trabalhando com uma grande variedade de servidores *web*, aplicações, navegadores e sistemas operacionais.

Para a comunicação Servlet/Matlab, utilizou-se a classe *open source* JMatLink (Müller e Waller, 1999). Com essa classe é possível acessar e manipular dados e funções definidas no ambiente Matlab, facilitando e ampliando consideravelmente as possibilidades de desenvolvimento dos algoritmos matemáticos. A interface Matlab/Computador Dedicado é disponibilizada no próprio *software* utilizado para aquisição de sinais do processo – Labview (Labview User Manual, 2000). Com auxílio da API *java.net* a interface Servlet/Computador Dedicado foi feita via protocolo TCP/IP, utilizando em ambos os lados da interface o modelo de comunicação solicitação-resposta.

No domínio do cliente, os dados pertinentes foram disponibilizados via interfaces gráficas com o usuário, *applets* propriamente ditos, em um navegador *web*. O protocolo de comunicação Applet/Servlet adotado foi o apresentado por Brogden, 2000.

Outras possibilidades de interface entre os *softwares* mencionados são possíveis e foram avaliadas (vide Bai, 2003), entretanto apresentaram ora desempenho inferior ora complicações em sua implementação. É válido também ressaltar que os *softwares* proprietários presentes na solução computacional da Figura 3.18, Labview e Matlab, estão no paradigma servidor, sendo que no paradigma cliente apenas um navegador que interprete Java faz-se necessário.



**Figura 3.18:** Solução computacional para o ambiente integrado.

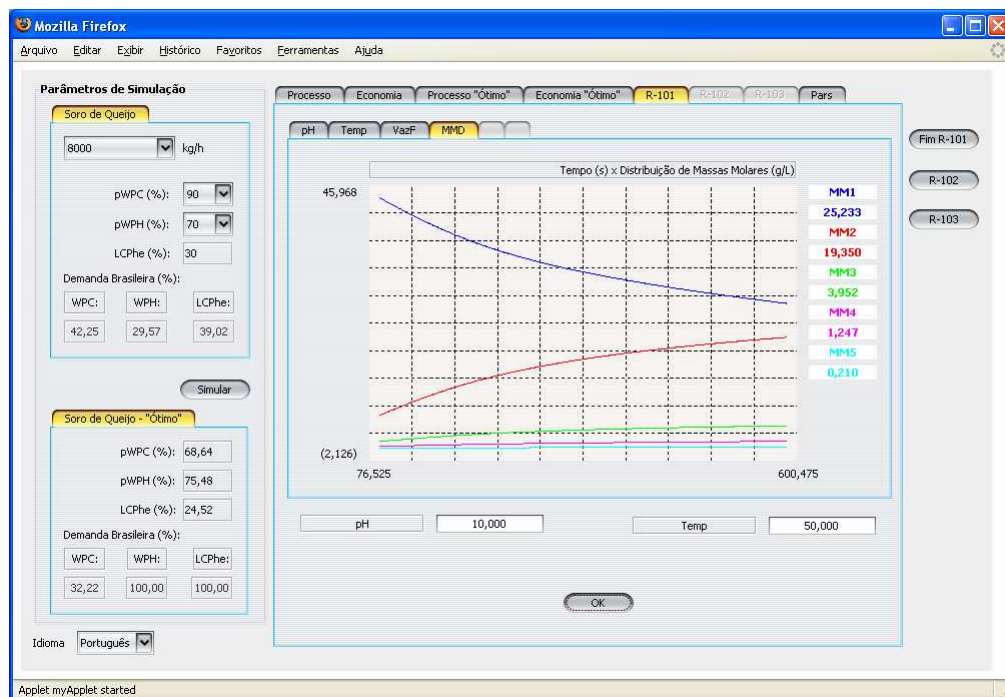
Os próximos dois itens desta seção mostram os resultados obtidos com o ambiente integrado proposto na figura acima. No primeiro item, os módulos para monitoramento e controle em tempo real são discutidos, utilizando como estudo de caso o acompanhamento cinético dos três reatores enzimáticos que compõem a biorefinaria do soro de queijo. Os módulos de simulação e otimização estacionária da planta são descritos no segundo item.

### 3.3.2.1 – Monitoramento e Controle em Tempo Real

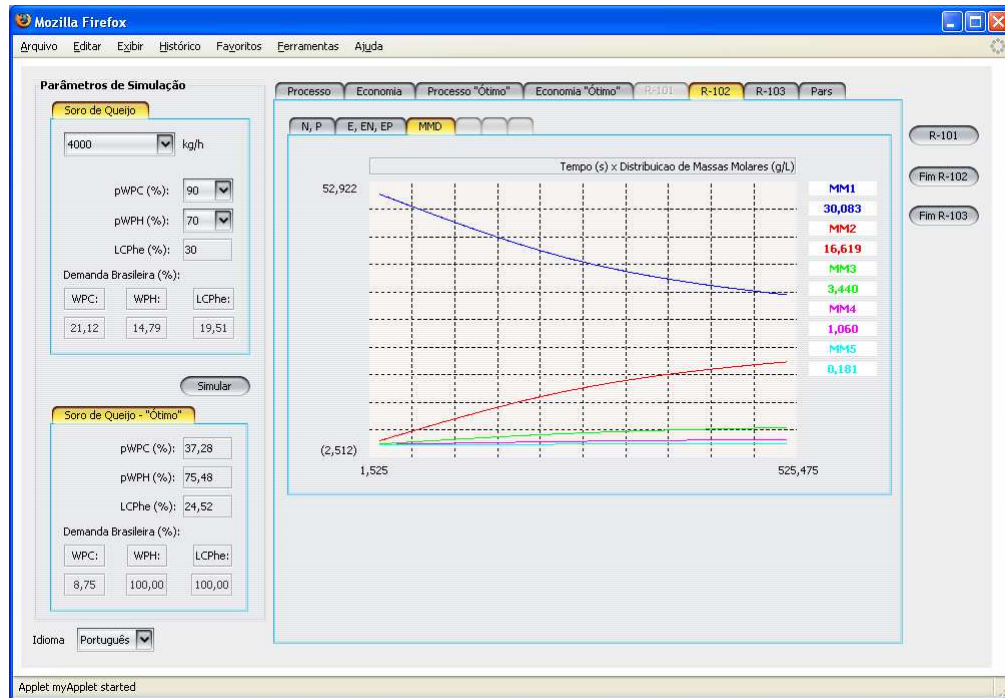
No projeto da biorefinaria do soro de queijo, o acompanhamento dinâmico dos três reatores envolvidos no processo é etapa fundamental para a garantia de qualidade dos produtos almejados. A utilização de um navegador *web* como interface para operação do sistema visa a garantir disponibilidade das informações dos reatores monitorados em tempo

real a qualquer computador remoto conectado à Internet com privilégios de acesso aos dados do processo.

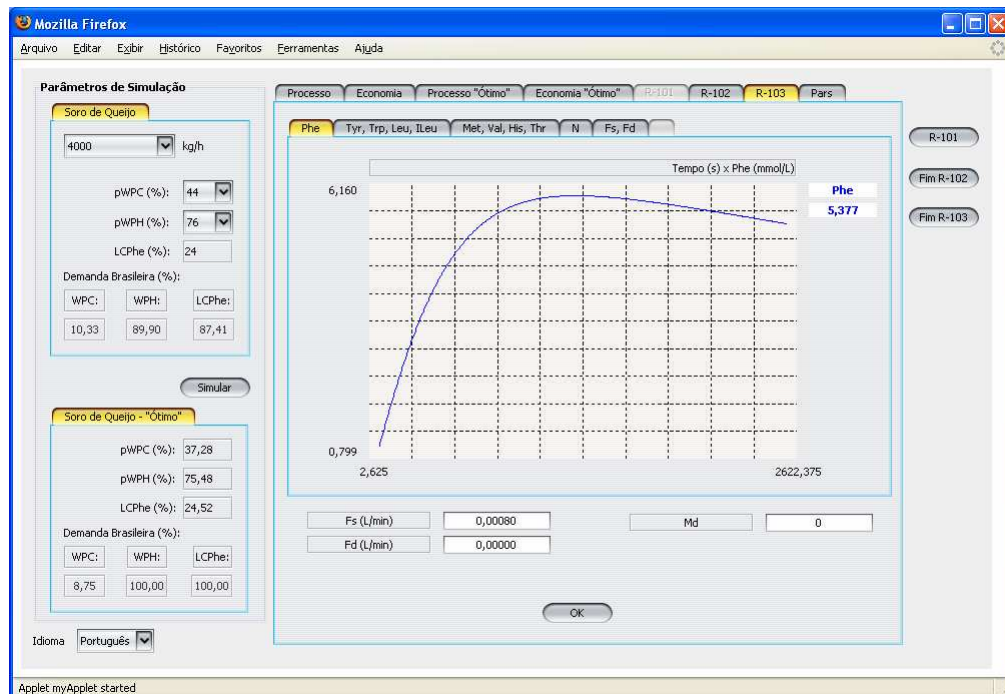
As próximas três figuras apresentam interfaces gráficas do ambiente integrado durante o monitoramento dos reatores. As inferências dos estados desses reatores foram realizadas com os modelos cinéticos desenvolvidos ao longo desta tese: modelos fenomenológico-neuronais para a reação com Alcalase® e com a quimotripsina, respectivamente, Figura 3.19 e Figura 3.20, e coeficientes de rendimento para predição dos perfis de aminoácidos liberados durante a hidrólise com CPA-glioxil-agarose (Figura 3.21).



**Figura 3.19:** Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o monitoramento da distribuição de massas molares dos pseudocomponentes ao longo da hidrólise com Alcalase®-glioxil-agarose.

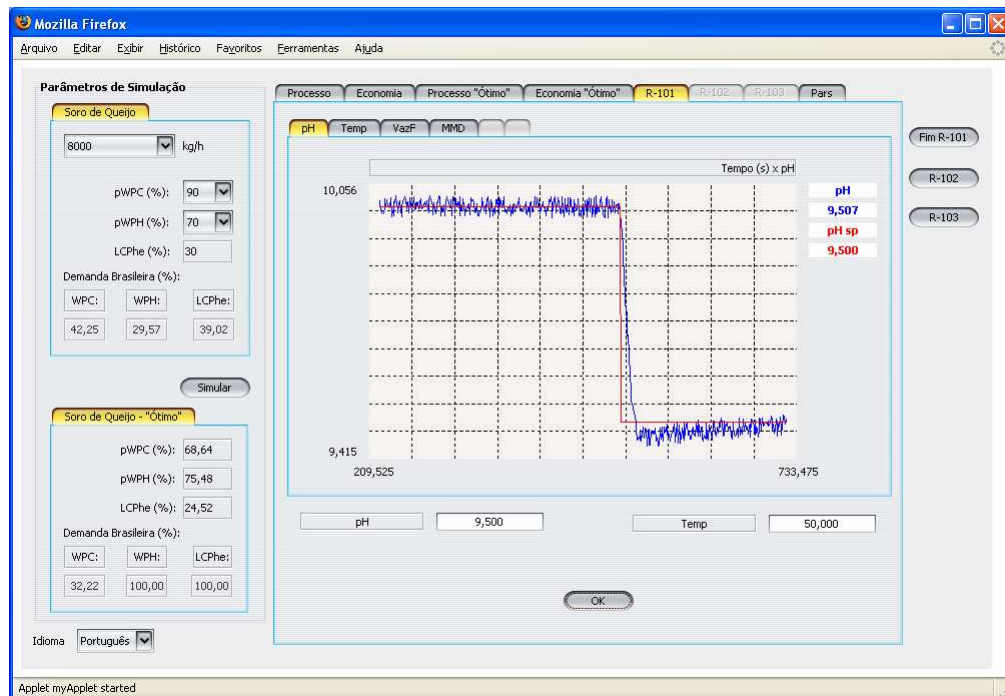


**Figura 3.20:** Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o monitoramento da distribuição de massas molares dos pseudocomponentes ao longo da hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose.



**Figura 3.21:** Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o monitoramento da concentração molar de Phe liberada ao longo da hidrólise com CPA-glioxil-agarose em reator de membrana (com retirada do aminoácido).

O ambiente integrado disponibilizou os dados cinéticos em tempo real ao longo das reações de forma consistente e em uma interface amigável. Além do monitoramento remoto, a solução computacional adotada também permite que o usuário atue nas configurações de controle dos reatores. A Figura 3.22, por exemplo, ilustra um problema servo onde o pH – *set-point* – da hidrólise enzimática com Alcalase® foi alterado remotamente via Internet de 10 para 9,5. Ao invés de atuar diretamente no computador dedicado do processo, qualquer solicitação do cliente passa antes pela validação de segurança configurada no servidor do ambiente integrado. Como exemplo, no caso aqui analisado, o servidor verifica se o novo *set-point* solicitado para o pH da reação está dentro de sua faixa operacional e se, por conseguinte, pode de fato ser alterado.

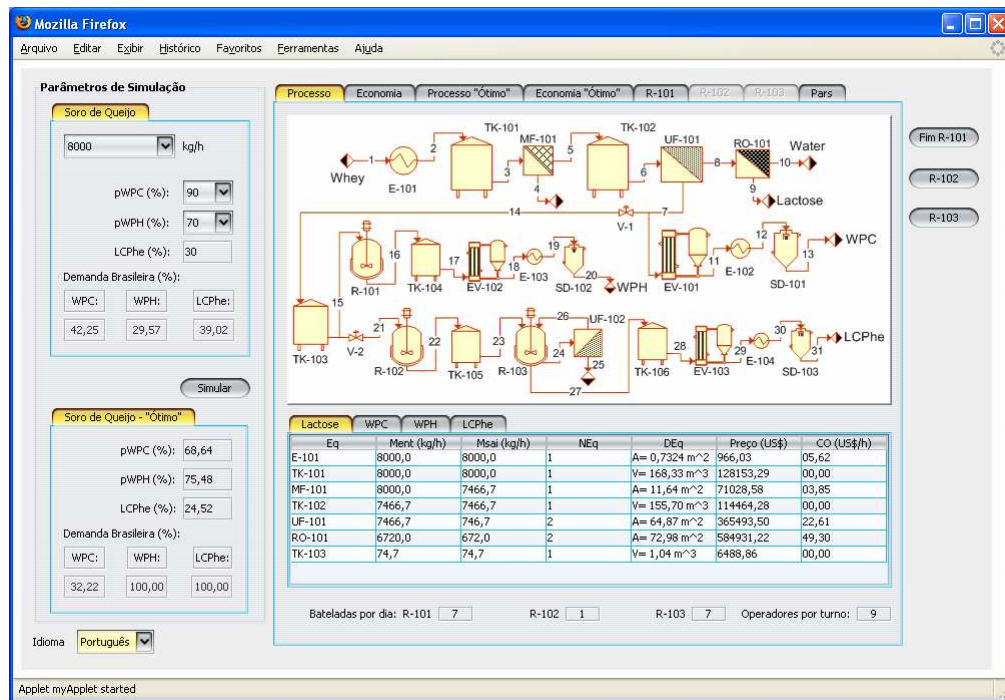


**Figura 3.22:** Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado durante o controle remoto via Internet do reator para produção de CPS: alteração no *set-point* do pH reacional.

### 3.3.2.2 – Simulação e Otimização da Biorefinaria

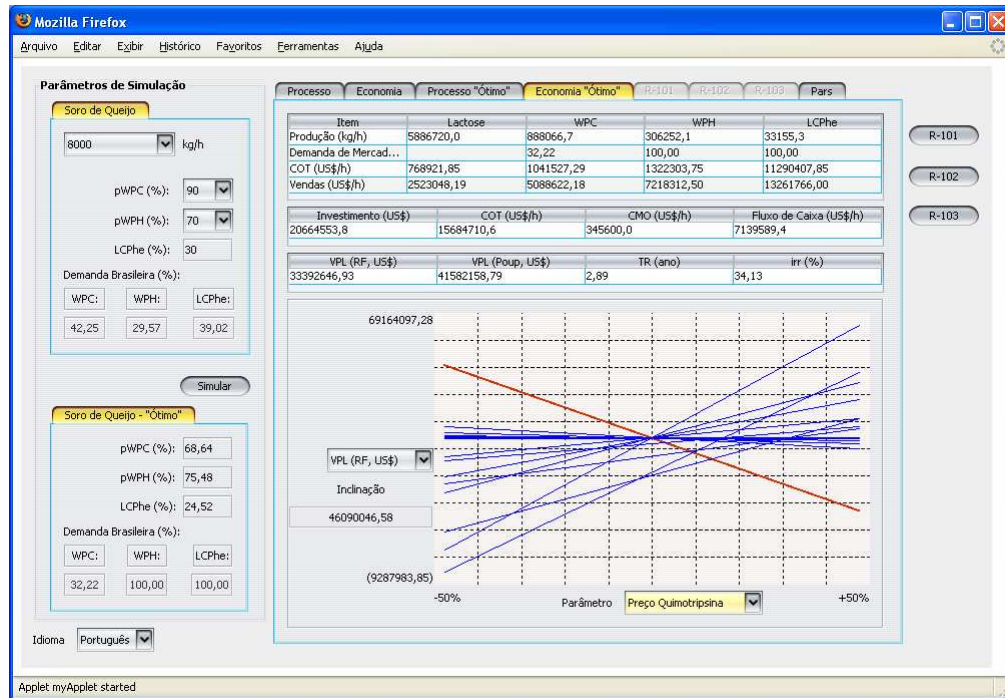
Além dos módulos para atuação remota no processo, o ambiente integrado também permite, via Internet, o projeto, simulação e otimização estacionária de diferentes configurações operacionais para a biorefinaria do soro de queijo. Os algoritmos para simulação da planta, cujos resultados foram apresentados na seção 3.3.1, foram integrados à solução computacional do aplicativo em pauta.

Especificada uma vazão de soro de queijo e a porcentagem de produção de cada produto – as variáveis já discutidas  $p_{CPS}$  e  $p_{HPS}$  ou na Figura 3.23, respectivamente,  $p_{WPC}$  e  $p_{WPH}$  – o ambiente integrado disponibiliza em uma interface amigável com o usuário o balanço de massa da biorefinaria, o dimensionamento, o custo fixo e operacional dos principais equipamentos previstos no projeto da planta (Figura 3.23).



**Figura 3.23:** Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado. Simulação do projeto da biorefinaria do soro de queijo: balanços de massa, dimensionamento, custo fixo e operacional dos principais equipamentos.

A análise econômica do processo também é disponibilizada via interface gráfica. Nesse módulo do aplicativo *web*, índices econômicos globais da planta como os custos e rendimentos por produto, além do impacto de variações em diferentes parâmetros operacionais na economia do projeto são calculados e exibidos em um contexto amigável (Figura 3.24). Além do projeto da biorefinaria calculado para as variáveis  $p_{WPC}$  e  $p_{WPH}$  definidas pelo usuário, o mesmo também tem disponível na simulação a configuração “ótima”, obtida por Evolução Diferencial, para a vazão de soro pré-especificada.



**Figura 3.24:** Interface gráfica com o usuário do ambiente integrado. Índices econômicos do processo e impacto de variações em parâmetros operacionais do mesmo. Configuração ótima calculada pela Evolução Diferencial.

A interface com um *software* matemático (no caso, o Matlab), expande consideravelmente as possibilidades de cálculo do ambiente integrado. Note-se, entretanto, que apenas o servidor necessita de uma licença desse *software*. Todos os algoritmos de projeto, simulação e otimização descritos nesta tese foram implementados com esse pacote. No processamento em tempo real, as ferramentas disponíveis para identificação do processo também são cruciais para a operação da biorefinaria. Como o soro de queijo pode provir de diferentes laticínios e está sujeito a efeitos sazonais e climáticos, variações em sua composição são inevitáveis. Nesse caso, o pacote matemático presente no ambiente integrado pode auxiliar na re-identificação dos diferentes modelos que integram a solução computacional em voga para distintas composições no substrato. Alternativamente, com a interface Java apropriada outro *software* também poderia ser utilizado para os cálculos numéricos, como, por exemplo, o *software* livre Scilab (<http://www.scilab.org>).

O domínio de técnicas de imobilização para produção industrial em escala de enzimas estabilizadas a baixo custo, aliado ao ambiente integrado aqui discutido, podem efetivamente tornar o projeto de uma biorefinaria do soro de queijo viável economicamente. Os módulos de simulação e otimização estacionária do aplicativo *web* podem atuar como uma ferramenta de

suporte para a análise de diferentes cenários de produção e de mercado durante o projeto conceitual da biorefinaria.

Acredita-se que o conceito Remoto pode ser aplicado para grandes corporações e também para pequenas empresas. Para grandes empresas com unidades de produção geograficamente distribuídas, o acesso remoto em tempo real do processo representa economia de tempo e de pessoal qualificado. No caso de companhias menores, as simulações e análises econômicas calculadas pelo ambiente integrado, desenvolvido em um contexto amigável, podem ser ferramentas motivadoras para a transformação do soro de queijo em produtos consumíveis, com sabor agradável e ricos em proteínas. A ferramenta se insere em uma conjuntura onde a troca e disponibilidade das informações ocorrem em tempo real, gerando um ambiente favorável para a análise e rápida tomada de decisão (Pinto *et al.*, 2008b).



### 3.4 – CONCLUSÕES

Neste capítulo foi apresentado um aplicativo, tendo a Internet como plataforma, para avaliação econômica, monitoramento e controle em tempo real da biorefinaria de soro de queijo. Em um ambiente comum é possível realizar operações em tempo real, como inferência de estado e controle remoto dos reatores enzimáticos contemplados no processo, e simulações da planta em estado estacionário para diferentes vazões da matéria-prima.

Quanto à estrutura da aplicação, a mesma foi baseada em *software* de caráter livre ou aberto, principalmente no paradigma do cliente, o que facilita sobremaneira o acesso às ferramentas de simulação e otimização da biorefinaria de soro em estado estacionário.

A simulação estacionária provê o pré-dimensionamento dos principais equipamentos, seus respectivos custos fixos e operacionais, além da avaliação econômica do processo. Testes de sensibilidade paramétrica, analisando o impacto de variações em parâmetros de mercado e de operação (preço e vida útil do catalisador, por exemplo) também podem ser realizados com facilidade. Para cada vazão de soro de queijo, o ambiente integrado disponibiliza um módulo de otimização que determina o ponto ótimo de operação da biorefinaria multipropósito, em estado estacionário, com o método estocástico Evolução Diferencial.

Os modelos híbridos cinético-neuronais implementados no ambiente integrado permitiram descrições detalhadas e acuradas das composições dos reatores ao longo das proteólises monitoradas remotamente via Internet. Com o auxílio de interfaces amigáveis, o ambiente integrado também possibilita ao usuário remoto a alteração de condições operacionais do processo (por exemplo, alteração do pH reacional – *set-point* do controlador).

A combinação de catalisadores estáveis e do ambiente integrado aqui desenvolvido é importante para que o projeto da biorefinaria do soro de queijo se torne factível do ponto de vista econômico. Catalisadores estáveis e com baixo custo associado permitem – além de seus empregos em múltiplas bateladas – a operação dos reatores por longos períodos e em altas temperaturas, reduzindo o risco de contaminação dos produtos.

Utilizando a Internet como plataforma, a proposta do ambiente integrado pode atuar com uma ferramenta auxiliar para grandes corporações na tomada de decisões frente a diferentes cenários de produção. Para médias e pequenas empresas do setor queijeiro, a ferramenta se torna motivacional, disponibilizando técnicas avançadas de monitoramento e controle, e análise de possíveis ganhos econômicos quando, ao invés de sua disposição com resíduo, o soro de queijo é reaproveitado de maneira racional na forma de concentrados e hidrolisados protéicos.

## 4 – Conclusões Gerais

O desenvolvimento de soluções computacionais envolvendo o projeto da biorefinaria do soro de queijo, uma planta multipropósito, foi o tema central dos estudos desenvolvidos ao longo desta tese de doutorado.

Na concepção da biorefinaria apresentada, os reatores enzimáticos constituem as etapas primordiais para agregação de valor ao principal resíduo da indústria queijeira: são nos reatores que, com auxílio de enzimas imobilizadas em suporte inerte, são processadas as proteólises que, de forma controlada, conduzem a uma distribuição de hidrolisados com faixas molares, produtos de maior valor agregado.

Foram propostos modelos cinéticos para o acompanhamento dinâmico da concentração molar de ligações hidrolisadas ao longo das reações com quimotripsina e CPA, ambas imobilizadas em suporte glioxil-agarose. Apesar de se tratar de uma aproximação, a predição precisa desse pseudoproduto é importante para o projeto dos reatores e desenvolvimento de seus algoritmos de controle e otimização. Embora comum nesse tipo de modelagem, o emprego de equações do tipo Michaelis-Menten se mostrou incapaz de descrever com eficácia as velocidades de reação durante ensaios de batelada para ambas as hidrólises. Somente com o relaxamento da hipótese pseudo-estacionária – originária das equações de Michaelis-Menten – e utilização do sistema completo de equações diferenciais ordinárias oriundas dos balanços materiais para os pseudocomponentes foi possível representar com precisão o perfil do pseudoproduto no curso das reações.

Com característica não-linear, a modelagem do sistema completo de equações diferenciais motivou o emprego de diferentes técnicas de otimização à guisa de se evitar estimativas locais dos parâmetros cinéticos constituintes do modelo. Como técnicas de busca clássicas baseadas no cálculo do gradiente da função-objetivo apresentaram problemas de convergência, foram utilizados os algoritmos estocásticos Recozimento Simulado, Enxame de Partículas e Evolução Diferencial. O emprego das abordagens estocásticas, que se caracterizam por múltiplas avaliações da função-objetivo, também permitiu a construção das regiões de confiança paramétricas e, conseqüentemente, uma análise estatística dos parâmetros cinéticos pós-ajuste.

Para um acompanhamento detalhado da composição dos produtos reacionais, cinco pseudocomponentes foram pré-definidos de acordo com faixas de massas molares das

proteínas e peptídeos presentes ao longo das reações com Alcalase® e quimotripsina. No caso da reação com CPA, foi possível mensurar as concentrações molares dos aminoácidos liberados durante a hidrólise com a exoprotease. Em ambos os casos, as concentrações eram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho e, portanto, inviáveis para o monitoramento em tempo real dos reatores.

O detalhamento dos reatores em tempo real foi obtido com o auxílio de modelos híbridos fenomenológico-neuronais. Os pesos de redes neuronais do tipo *multilayer perceptrons* (MLP) foram ajustados para mapear as velocidades da reação com base no estado atual do reator (concentrações dos pseudocomponentes ou aminoácidos). Os valores preditos pelas redes MLP eram então utilizados nos balanços materiais dos componentes presentes em cada reator enzimático. Os pesos de cada rede MLP foram ajustados para uma combinação fixa de pH e temperatura da reação, e suas predições eram linearmente interpoladas para situações intermediárias dessas variáveis em ensaios de validação. Como o substrato das reações – soro de queijo – está sujeito a variações em sua composição, tal abordagem se mostrou pertinente: com um modelo simplificado, uma nova estimativa do conjunto de pesos de cada rede MLP para um substrato de composição diferente se torna menos intensiva do ponto de vista do processamento computacional requerido.

Alternativamente, fica como opção também a modelagem híbrida baseada em coeficientes de rendimento. Tal proposta foi utilizada para o acompanhamento dos principais aminoácidos liberados durante a hidrólise com CPA e forneceu resultados coerentes com aqueles determinados via análise em cromatografia líquida de alto desempenho.

Com os modelos dos reatores elaborados, procedeu-se à simulação da biorefinaria do soro de queijo em estado estacionário. A abordagem seqüencial-modular foi utilizada para a simulação do processo, o que facilita a futura inserção de novos módulos no diagrama da planta, por exemplo, para agregar maior valor à corrente de lactose permeada da ultrafiltração. Em uma concepção multipropósito, algoritmos de busca não-linear foram disponibilizados para determinar o estado estacionário ótimo para uma dada vazão de soro de queijo.

Finalmente, os modelos cinéticos e de simulação estacionária foram implementados em um ambiente integrado de operação em tempo real. Tendo a Internet como plataforma, foi possível em um único aplicativo a realização remota de operações em tempo real (monitoramento e controle dos reatores enzimáticos) e de simulações da biorefinaria do soro de queijo (balanços materiais e dimensionamento dos principais equipamentos, seus custos fixos e operacionais, análise econômica do processo e módulo de otimização estacionária).

Acredita-se que o ambiente integrado desenvolvido pode se tornar uma ferramenta importante de análise em diferentes cenários de produção e de mercado. O conceito remoto é viável para grandes corporações com unidades de produção geograficamente dispersas. Como o aplicativo emprega a Internet como plataforma, os algoritmos também se tornam acessíveis para médias e pequenas empresas do setor queijeiro. Em resumo, a proposta do ambiente integrado, aliada à disponibilidade de enzimas imobilizadas e estabilizadas com custo acessível, é importante para que a biorefinaria do soro de queijo se torne factível em escala industrial.

Além de estudos que objetivem agregar valor à corrente de lactose refinada da biorefinaria, outro tema decorrente desta tese seria a padronização do ambiente integrado e sua aplicação na análise econômica de outros processos de interesse (incluindo sintonia e análise de desempenho dos algoritmos estocásticos de busca na otimização estacionária da planta).

## Referências Bibliográficas

- Adler-Nissen, J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London & New York, 1986.
- Adriano, WS. Preparação e caracterização de enzimas industriais em quitosana. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2008.
- Aktan, B; Bohus, CA; Crawl, LA; Shor, MH. Distance learning applied to control engineering laboratories. *IEEE T Educ*, 39(3): 320–326, 1996.
- Al-Ali, AR; Al-Rousan, M. Java-Based Home Automation System. *IEEE T Consum Electr*, 50(2), 498–504, 2004.
- Alper, JS; Gelb, RI. Standard errors and confidence intervals in nonlinear regression: comparison of Monte Carlo and parametric statistics. *J Phys Chem-US*, 94(11): 4747–4751, 1990.
- Asprey, SP; Naka, Y. Mathematical problems in fitting kinetic models – some new perspectives. *J Chem Eng Jpn*, 32(3): 328–337, 1999.
- Atra, R; Vatai, G.; Bekassy-Molnar, E; Balint, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *J Food Eng*, 67(3): 325–332, 2005.
- Babu, BV; Munawar, SA. Differential evolution strategies for optimal design of shell-and-tube heat exchangers. *Chem Eng Sci*, 62(14): 3720–3739, 2007.
- Babu, BV; Jehan, M. Differential evolution for multi-objective optimization. In: *Proceedings of the IEEE Congress on Evolutionary Computation*, Canberra, Australia, 4: 2696–2703, 2003.
- Bai, Y. *Applications interface programming using multiple languages: a windows® programmer's guide*. Pearson Education, New Jersey, 2003.
- Bailey, JE; Ollis, DF. *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill, New York, 1977.
- Barber, AK; Fisher, JR. A mechanism of action for carboxypeptidase A. *Proc Nat Acad Sci*, 69(10): 2970–2974, 1972.
- Baughman, DR; Liu, YA. *Neural networks in bioprocessing and chemical engineering*. Academic Press, New York, 1995.

- Baş, D; Dudak, FC, Boyaci, IH. Modeling and optimization IV: investigation of reaction kinetics and kinetic constants using a program in which artificial neural network (ANN) was integrated. *J Food Eng*, 79(4): 1152–1158, 2007a.
- Baş, D; Dudak, FC, Boyaci, IH. Modeling and optimization III: reaction rate estimation using artificial neural network (ANN) without a kinetic model. *J Food Eng*, 79(2): 622–628, 2007b.
- Beale, EML. Confidence-regions in non-linear estimation. *J Roy Stat Soc B Met*, 22(1): 41–88, 1960.
- Ben-Ameur, W. Computing the initial temperature of simulated annealing. *Comput Optim Appl*, 29(3): 369–385, 2004.
- Berendsen, WR; Lapin, A; Reuss, M. Investigations of reaction kinetics for immobilized enzymes – identification of parameters in the presence of diffusion limitation. *Biotechnol Prog*, 22(5), 1305–1312, 2006.
- Bereta, M; Burczynski, T. Comparing binary and real-valued coding in hybrid immune algorithm for feature selection and classification of ECG signals. *Eng Appl Artif Intel*, 20(5): 571–585, 2007.
- Bhat, N; McAvoy, TJ. Use of neural nets for dynamic modeling and control of chemical process systems. *Comput Chem Eng*, 14(4–5): 573–583, 1990.
- Biegler, LT; Grossmann, IE. Retrospective on optimization. *Comput Chem Eng*, 28(8): 1169–1192, 2004.
- Biegler, LT; Grossmann, IE; Westerberg, AW. *Systematic methods of chemical process design*. Prentice-Hall, New Jersey, 1997.
- Blanch, HW; Clark, DS. *Biochemical engineering*. Marcel Dekker, New York, 1997.
- Bradstreet, RB. *The Kjeldahl method for organic nitrogen*. Academic Press, New York, 1965.
- Brogden, WB. *Java developer's guide to servlets and JSP*. Sybex, New York, 2000.
- Büchi. Büchi Labortechnik AG. *Training papers, spray drying*, pp. 1–19, 2002.
- Buzzy-Ferraris, G. Planning of experiments and kinetic analysis. *Catal Today*, 52(2–3): 125–132, 1999.
- Cardoso, MF; Salcedo, RL; Azedvedo, SF. The simplex-simulated annealing approach to continuous non-linear optimization. *Comput Chem Eng*, 20(9): 1065–1080, 1996.
- Chang, D; Harkey, D. *Client/Server data access with Java and XML*. John Wiley & Sons, New York, 1998.

- Chen, C; Yang, B.; Yuan, J; Wang, Z; Wang, L. Establishment and solution of eight-lump kinetic model for FCC gasoline secondary reaction using particle swarm optimization. *Fuels*, 86(15): 2325–2332, 2007.
- Churms, CL; Prozesky, VM; Springhorn, KA. The remote control of nuclear microprobes over the Internet. *Nucl Instrum Meth B*, 158(1–4): 124–128, 1999.
- Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Tech*, 11(7): 254–262, 2000.
- Cornish-Bowden, A. J. Analysis of progress curves in enzyme kinetics. *Biochem J*, 130(2): 637–639, 1972.
- Coulson, JM; Richardson, JF. *Chemical engineering*, Vol. 1. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1996.
- Deitel, HM; Deitel, PJ. *Java How to Program*. 7 ed., Prentice-Hall, New Jersey, 2007.
- Duggleby, RG. Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. *Method Enzymol*, 249: 61–90, 1995.
- Earle, RL. *Unit operations in food processing*. 2 ed., Pergamon Press, New York, 1983.
- Edgar, TF; Himmelblau, DM; Lasdon, LS. *Optimization of chemical processes*. McGraw-Hill, Boston, 2001.
- Eerikainen, T; Linko, P; Linko, S; Siimes, T; Zhu, YH. Fuzzy-logic and neural-network applications in food-science and technology. *Trends Food Sci Tech*, 4(8): 237–242, 1993.
- Eftaxias, A; Font, J; Fortuny, A; Fabregat, A; Stuber, F. Nonlinear kinetic parameter estimation using simulated annealing. *Comput Chem Eng*, 26(12): 1725–1733, 2002.
- Enzyme Business. Novo Nordisk A/S. Alcalase, *Product Sheet*, pp.1–3, 1994.
- Faber, R; Arellano-Garcia, H; Wozny, G. A hybrid optimization approach to parameter estimation. In: *17<sup>th</sup> European Symposium on Computer Aided Process Engineering (ESCAPE17)*, Bucharest, Romênia, 2007.
- Farid, SS; Washbrook, J; Titchener-Hooker, NJ. Modeling biopharmaceutical manufacture: design and implementation of SimBiopharma. *Comput Chem Eng*, 31(9): 1141–1158, 2007.
- Fernandez-Sanchez, VMA. Difusão de aminoácidos e proteínas em partículas de gel de agarose. *Dissertação de Mestrado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2000.
- Ferreira, ALO. Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2004.
- Forni, L. Mass and heat transfer in catalytic reactions. *Catal Today*, 52(2–3): 147–152, 1999.

- Gallifuoco, A; Cantarella, M; Viparelli, P; Marucci, M. Polygalacturonic acid/endo-polygalacturonase system: a kinetic study in batch reactors. *Biotechnol Prog*, 20(5): 1430–1436, 2004.
- Galvão, CMA. Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2004.
- Galvão, CMA; Pinto, GA; Jesus, CDF; Giordano, RC; Giordano, RLC. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic hydrolyses of cheese whey. *J Food Eng*, doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.08.009, 2008.
- Galvão, CMA; Silva, AFS; Custódio, MF; Monti, R; Giordano, RLC. Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. *Appl Biochem Biotech*, 91(3): 761–776, 2001.
- Gani, R; Grossmann, IE. Process system engineering and CAPE – what next?. In: *17<sup>th</sup> European Symposium on Computer Aided Process Engineering (ESCAPE17)*, Bucharest, Romênia, 2007.
- Gekas, V; Lopez-Leiva, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem*, 20: 2–12, 1985.
- Georgakis, C; Aris, R. Diffusion, reaction and pseudo-steady-state hypothesis. *Math Biosci*, 25(3–4): 237–258, 1975.
- Giordano, RC. Modelagem e otimização da reforma a vapor de gás natural. *Tese de Doutorado – USP*, São Paulo, SP, Brasil, 1991.
- Glover, F. Tabu search – a tutorial. *Interfaces*, 20(4): 74–94, 1990.
- Goldberg, DE. *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Boston, 1989.
- Gonçalves, LRB; Giordano, RLC; Giordano, RC. Effects of diffusion on the kinetics of maltose hydrolysis using glucoamylase immobilized on macroporous silica. *Braz J Chem Eng*, 14(4): 341–346, 1997.
- GonzalezTello, P; Camacho, F; Jurado, E; Paez, MP; Guadix, EM. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: kinetic models. *Biotech Bioeng*, 44(4): 523–528, 1994.
- Grossmann, IE; Biegler, LT. Future perspective on optimization. *Comput Chem Eng*, 28(8): 1193–1218, 2004.
- Guimarães, FMQ; Vasconcelos, CJ; Fagundez, FD; Pinto, GA; Santos, MM. As várias dimensões da otimização de processo. *InTech Brasil*, 91: 12–21, 2007.



- Guisán, JM. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 10(6): 375–382, 1988.
- Guisán, JM; Fernández-Lafuente, R; Rodrigues, V; Bastida, A, Blanco, RM; Alvaro, G. Enzyme stabilization by multipoint attachment to activated pre-existing supports. In: van der Tweel, WJJ; Harder, A; Buitelaar, RM (Eds). *Stability and Stabilization of Enzymes*, In: *Proceedings of International Symposium*, Maastricht, Holanda, 55–62, 1993.
- Hagan, MT; Menhaj, MB. Training feedforward networks with the Marquardt algorithm. *IEEE T Neural Networ*, 5(6): 989–993, 1994.
- Haykin, S. *Neural networks: a comprehensive foundation*. 2 ed., Prentice-Hall, New Jersey, 1999.
- Himmelblau, DM. *Process analysis by statistical methods*. John Wiley & Sons, New York, 1970.
- Hinton, GE. How neural networks learn from experience. *Sci Am*, 267(3): 145–151, 1992.
- Hock, W; Schittkowski, K. A comparative performance evaluation of 27 nonlinear programming codes. *Computing*, 30(4): 335–358, 1983.
- Holland, JH. *Adaptations in natural and artificial systems*. Ann Arbor, Michigan, 1975.
- Huang, MY; Lin, YJ; Xu, H. A framework for web-based product data management using J2EE. *Int J Adv Manuf Technol*, 24(11–12): 847–852, 2004.
- Huang, Y; Huang, C. Real-valued genetic algorithms for fuzzy grey prediction system. *Fuzzy Set Syst*, 87(3): 265–276, 1997.
- Huffman, LM; Harper, WJ. Maximizing the value of milk through separation technologies. *J Dairy Sci*, 82(10): 2238–2244, 1999.
- Johnson, ML. Evaluation and propagation of confidence intervals in nonlinear, asymmetrical variance spaces. *Biophys J*, 44: 101–106, 1983.
- Kennedy, J; Eberhart, RC. Particle swarm optimization. In: *Proceedings of IEEE International Conference on Neural Networks*. Perth, Australia, (4):1942-1948, 1995.
- Kennedy, J; Eberhart, RC; Shi, Y. *Swarm intelligence*. Morgan Kaufmann Publishers, San Francisco, 2001.
- Kim, S; Heller, M. Emerging cyberinfrastructure: challenges for the chemical process control community. *Comput Chem Eng*, 30(10–12): 1497–1501, 2006
- Kim, YA; Chism, GW; Mangino, ME. Determination of the beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and bovine serum albumin of whey protein concentrates and their relationship to protein functionality. *J Food Sci*, 52: 124–127, 1987.

- Kirkpatrick, S; Gelatt, CD; Vecchi, MP. Optimization by simulated annealing. *Science*, 220(4598): 671–680, 1983.
- Ko, CL; Wang, FS; Chao, YP; Chen, TW. S-system approach to modeling *Escherichia coli* growth by hybrid differential evolution with data collocation. *Biochem Eng J*, 28, 10–16, 2006.
- Koerber, SC; Fink, AL. The analysis of enzyme progress curves by numerical differentiation, including competitive product inhibition and enzyme reactivation. *Anal Biochem*, 165: 75–87, 1986.
- Korhonen, H. Technology options for new nutritional concepts. *Int J Dairy Technol*, 55(2): 79–88, 2002.
- Koshland, DE. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 44(2): 98–104, 1958.
- Kurniawan, B. *Java for the web with Servlets, JSP, and EJB: a developer's guide to J2EE solutions*. Pearson Education, New Jersey, 2002.
- Labview User Manual. National Instruments Corporation, *Capítulos 17 e 20*, 2000.
- Lau, CGY. Neural network, I: theory and modeling. *P IEEE*, 78(9): 1411–1413, 1990.
- Lee, Z. A novel hybrid algorithm for function approximation. *Experts Systems with Applications*, 34: 384–390, 2008.
- Li, G; Tomlin, AS; Rabitz, H; Tóth, J. Determination of approximate lumping schemes by a singular perturbation method. *J Chem Phys*, 99(5): 3562–3574, 1993.
- Locatelli, M. Simulated annealing algorithms for continuous global optimization: convergence conditions. *J Optimiz Theory App*, 104, 121–133, 2000.
- Mahmoud, MI. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol*, 48(10): 89–95, 1994.
- Maly, T; Petzold, LR. Numerical methods and software for sensitivity analysis of differential-algebraic systems. *Appl Numer Math*, 20: 57–79, 1996.
- Mannheim, A; Cheryan, M. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J Food Sci*, 55(2): 381–390, 1990.
- Mansoornejad, B. Mostoufi, N. Jalali-Farahani, F. A hybrid GA-SQP optimization technique for determination of kinetic parameters of hydrogenation reaction. *Comput Chem Eng*, 32(7): 1447–1455, 2008.
- Margot, A; Flaschel, E; Renken, A. Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Proc Biochem*, 32(3): 217–223, 1997.

- Maria, G. A review of algorithms and trends in kinetic model identification for chemical and biochemical systems. *Chem Biochem Eng Q*, 18(3): 195–222, 2004.
- Márquez, MC; Vázquez, MA. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Proc Biochem*, 35(1–2): 111–117, 1999.
- Masters, K. *Spray drying handbook*. 3 ed., John Wiley & Sons, New York, 1979.
- Mateo, C; Palomo, JM; Fuentes, M; Betancor, L; Grazu, V; López-Gallego, F; Pessela, BCC; Hidalgo, A; Fernández-Lorente, G; Fernández-Lafuente, R; Guisán, JM. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of protein. *Enzyme Microb Technol*, 39(2), 274–280, 2006.
- Medeiros, JACC. Exame de partículas como ferramenta de otimização em problemas complexos de engenharia nuclear. *Tese de Doutorado – UFRJ*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2005.
- Metrópolis, N; Ulam, S. The monte carlo method. *J Am Stat Assoc*, 44(247): 335–341, 1949.
- Mira, NVM; Marquez, UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Publ*, 34: 86–96, 2000.
- Mota, MVT; Ferreira, IMPLVO; Oliveira, MBP; Rocha, C; Teixeira, JA; Torres, D; Gonçalves, MP. Trypsin hydrolysis of whey proteins concentrates: characterization using multivariate data analysis. *Food Chem*, 94(2): 278–286, 2006.
- Müller, S; Waller, H. *Efficient integration of real-time hardware and web based services into Matlab*. Disponível em <http://jmatlink.sourceforge.net/docs/ESS99.pdf>, 1999
- Nelles, O. *Nonlinear system identification: from classical approaches to neural networks and fuzzy models*. Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- Noethen, L; Walcher, S. Quasi-steady state in the Michaelis-Menten system. *Nonlinear Anal-Real*, 8(5): 1512–1535, 2007.
- Ohara, H. Biorefinery. *Appl Microbiol Biot*, 62(5–6): 474–477, 2003.
- Ourique, CO; Biscaia, EC; Pinto, JC. The use of particle swarm optimization for dynamical analysis in chemical processes. *Comput Chem Eng*, 26(12): 1783–1793, 2002.
- Padilla, RYC. Reator enzimático de membrana para proteólise de soro de queijo, visando à produção de concentrado protéico com baixo teor de fenilalanina. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2007.
- Painter, TJ. *The polysaccharides*, Vol. 2. Academic Press, Florida, 1985.
- Parsopoulos, KE; Vrahatis, MN. Particle swarm optimization method in multiobjective problems. In: *Proceedings ACM Symposium on Applied Computing (SAC2002)*, 603–607, Madrid, Espanha, 2002.

- Perry, RH; Green, DW. *Perry's chemical engineers' handbook*. 7 ed., McGraw-Hill, New York, 1997.
- Peters, MS; Timmerhaus, KD. *Plant design and economics for chemical engineers*. 4 ed., McGraw-Hill, New York, 1991.
- Peters, RH. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *Int Dairy J*, 15(6–9): 537–545, 2005.
- Písecký, J. Spray drying in the cheese industry. *Int Dairy J*, 15(6–9): 531–536, 2005.
- Pinto, GA; Giordano, RLC; Giordano, RC. Neural network inference of molar mass distributions of peptides during Tailor-made enzymatic hydrolysis of cheese whey: effects of pH and temperature. *Appl Biochem Biotech*, 143(2): 142–152, 2007.
- Pinto, GA; Giordano, RLC; Giordano, RC. Remote engineering for a cheese whey biorefinery: an Internet-based application for process design, economic analysis, monitoring, and control of multiple plant sites. *Bioprocess Biosyst Eng*, doi:10.1007/s00449-008-0222-8, 2008b.
- Pinto, GA; Sousa, R; Giordano, RC. Comparison of performance of different algorithms in noisy signal filtering of process in enzymatic hydrolysis of cheese whey. *Braz Arch Biol Technol*, 48: 151–159, 2005.
- Pinto, GA; Tardioli, PW; Padilla, RYC; Giordano, RC; Giordano, RLC. Amino acids yields during proteolysis catalyzed by carboxypeptidase A are strongly dependent on substrate pre-hydrolysis. *Biochem Eng J*, 39(2): 328–337, 2008a.
- Rautenbach, R.; Albrecht, R. *Membrane processes*. John Wiley & Sons, New York, 1989.
- Resende, MM. Proteólise enzimática de soro de queijo em reatores de Taylor-Couette-Poiseuille. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2002.
- Rice, RG; Do, DD. *Applied mathematics and modeling for chemical engineers*. John Wiley & Sons, New York, 1994.
- Ritchie, RJ; Prvan, T. A simulation study on designing experiments to measure the  $K_M$  of Michaelis-Menten kinetics curves. *J Theor Biol*, 178(3): 239–254, 1996.
- Rivera, EC; Costa, AC; Andrade, RR; Atala, D; Maugeri, F; Filho, RM. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes. *Biochem Eng J*, 36(2): 157–166, 2007.
- Rodriguez-Fernandez, M; Egea, JA; Banga, JR. Novel metaheuristic for parameter estimation in nonlinear dynamic biological systems. *BMC Bioinformatics*, 7: 483, 2006.
- Saha, BC; Hayashi, K. Debittering of protein hydrolysates: a review. *Biotechnol Adv*, 19(5): 355–370, 2001.

- Salman, A; Engelbrecht, AP; Omran, MGH. Empirical analysis of self-adaptive differential evolution. *Eur J Oper Res*, 183(2): 785–804, 2007.
- Sanchez, GS. Diseño de derivados de quimotripsina como catalizadores en reacciones de química fina. *Tese de Doutorado – Instituto de Catálisis y Petroleoquímica*, Madrid, Espanha, 1995.
- Schwaab, M; Biscaia, EC; Monteiro, JL; Pinto, JC. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. *Chem Eng Sci*, 63(6): 1542–1552, 2008.
- Schmidt, DG; Poll, JK. Enzymatic hydrolysis of whey proteins – hydrolysis of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth Milk Dairy J*, 45(4): 225–240, 1991.
- Schnell, S; Maini, PK. Enzyme kinetics at high enzyme concentration. *Bull Math Biol*, 62(3): 483–499, 2000.
- Schnell, S; Maini, PK. Enzyme kinetics far from the standard quasi-steady-state and equilibrium approximations. *Math Comput Model*, 35: 137–144, 2002.
- Schnell, S; Maini, PK. A century of enzyme kinetics: reliability of the  $K_M$  and  $v_{max}$  estimates. *Comments Theor Biol*, 8(2-3): 169-187, 2003.
- Schulz, AR. *Enzyme kinetics from diastase to multi-enzyme system*. Cambridge University Press, New York, 1994.
- Segel, IH. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley, New York, 1975.
- Shi, DQ; He, ZM; Qi, W. Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochem*, 40(5): 1943–1949, 2003.
- Shi, JZ; Gu, F; Goulding, P; Ball, A. Integration of multiple platforms for real-time remote model-based condition monitoring. *Comput Ind*, 58(6): 531–538, 2007.
- Shi, Y; Eberhart, RC. A modified particle swarm optimizer. In: *Proceedings of the IEEE International Conference on Evolutionary Computation*, Anchorage, Alaska, 69–73, 1998.
- Silva, CRN. Processos de recuperação de proteínas de soro de queijo na forma de hidrolisados e concentrados. *Dissertação de Mestrado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2000.
- Silvestre, MPC. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem*, 60(2): 263–271, 1997.
- Singh, P; Seto, K. Analyzing APC performance. *Chem Eng Prog*, 98(8): 60–66, 2002.
- Singh, RP; Heldman, DR. *Introduction to food engineering*. 2 ed., Academic Press, New York, 1993.

- Siso, MIG. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technol*, 57: 1–11, 1996.
- Smith, JM; Van Ness, HC; Abbott, MM. *Introdução à termodinâmica da engenharia química*. 5 ed., Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 2000.
- Soares, RP; Secchi, AR. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimization. In: *13<sup>th</sup> European Symposium on Computer Aided Process Engineering (ESCAPE13)*, Lappeenranta, Finlândia, 2003.
- Soares, RP; Secchi, AR. Debugging for equation-oriented CAPE tools. In: *17<sup>th</sup> European Symposium on Computer Aided Process Engineering (ESCAPE17)*, Bucharest, Romênia, 2007.
- Sousa, R. Inteligência computacional aplicada à automação da hidrólise enzimática de soro de queijo em reator contínuo. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2003.
- Sousa, R; Lopes, GP; Pinto, GA; Almeida, PIF; Giordano, RC. GMC-fuzzy control of pH during enzymatic hydrolysis of cheese whey proteins. *Comput Chem Eng*, 28(9): 1661–1672, 2004.
- Storn, R; Price, K. Differential evolution – a simple and efficient heuristic for global optimization over continuous spaces. *J Global Optim*, 11(4): 341–359, 1997.
- Straume, M; Johnson, ML. Monte Carlo method for determining complete confidence probability distribution of estimated model parameters. *Methods Enzymol*, 210: 117–129, 1992.
- Stryer, L. *Bioquímica*. Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, 1992.
- Sung, DD; Kim, JY; Lee, I; Chung, SS; Park, KH. Temperature dependence of the rate and activation parameters for *tert*-butyl chloride solvolysis: Monte Carlo simulation of confidence intervals. *Chem Phys Lett*, 392(4–6): 378–382, 2004.
- Tardioli, PW. Hidrólise controlada das proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e Alcalase® imobilizadas multipontualmente em agarose. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2003.
- Temple, A; de Mello, RF; Calegari, DT; Schiezero, M. *JSP, Servlets e J2EE*. Creative Commons, California, 2004.
- Thomas, GM; Gerth, R; Velasco, T; Rabelo, LC. Using real-coded genetic algorithms for weibull parameter estimation. *Computers Ind Engng*, 29(1–4): 377–381, 1995.
- Torres, DPM. Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino. *Dissertação de Mestrado – Universidade do Minho*, Braga, Portugal, 2005.

- Trelea, IC. The particle swarm optimization algorithm: convergence analysis and parameter selection. *Inform Process Lett*, 85(6): 317–325, 2003.
- Turton, R; Boilie, RC; Whiting, WB; Shaeiwitz, JA. *Analysis, synthesis and design of chemical processes*. Prentice-Hall, New Jersey, 1998.
- Tzafiriri, AR; Edelman, ER. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. *J Theor Biol*, 245(4): 737–748, 2007.
- Van Boekel, MAJS. Statistical aspects of kinetic modeling for food science problems. *J Food Sci*, 61(3): 477–485, 1996.
- Vasic-Racki, D; Kragl, U; Liese, A. Benefits of enzyme kinetic modeling. *Chem Biochem Eng Q*, 17: 7–18, 2003.
- Vieira, AMS. Separação de aminoácidos aromáticos de oligopeptídeos. *Tese de Doutorado – UFSCar*, São Carlos, SP, Brasil, 2004.
- Villadsen, J; Michelsen, ML. *Solution of differential equation models by polynomial approximation*. Prentice-Hall, New Jersey, 1978.
- Vorob'ev, MM; Levicheva, IYU; Belikov, VM. Kinetics of initial stage of milk protein hydrolysis by chymotrypsin. *Appl Biochem Microbiol*, 32(2): 219–222, 1996.
- Walas, SM. *Chemical process equipment, selection and design*. Butterworth-Heinemann, Boston, 1990.
- Wang, FS; Jing, CH; Tsao, GT. Fuzzy-decision-making problems of fuel ethanol production using a genetically engineered yeast. *Ind Eng Chem Res*, 37(8), 3434–3443, 1998.
- Westerberg, AW. A retrospective on design and process synthesis. *Comput Chem Eng* 28(4): 447–458, 2004.
- Whitaker, JR. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2 ed., Marcel Dekker, New York, 1994.
- Yang, SH; Chen, X; Alty, JL. Design issued and implementation of internet-based control systems. *Control Eng Pract*, 11(6): 709–720, 2003.
- Yang, SH; Dai, C; Knott, RP. Remote maintenance of control system performance over the Internet. *Control Eng Pract*, 15(5): 533–544, 2007.
- Yang, ST. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*. Elsevier, Amsterdam, 2007.
- Zander, HJ; Dittmeyer, R; Wagenhuber, J. Dynamic modeling of chemical reaction systems with neural networks and hybrid models. *Chem Eng Technol*, 22(7): 571–574, 1999.

Zimmerle, CT; Frieden, C. Analysis of progress curves by simulation generated by numerical integration. *Biochem J*, 258(2): 381–387, 1989.



## Apêndice

Tanto na simulação da planta em estado estacionário como nos ajustes dos parâmetros cinéticos, algoritmos eficientes de otimização foram necessários para lidar com a característica tipicamente não-linear dos processos bioquímicos. Na seção **Otimização Não-Linear** do presente apêndice é realizada uma revisão dos conceitos e das técnicas de otimização aqui empregadas.

Como a abordagem híbrida fenomenológico-neuronal é apresentada como a solução adotada para o acompanhamento dinâmico detalhado dos produtos formados no curso das reações enzimáticas do processo, uma revisão sucinta sobre o tema é apresentada na seção **Redes Neurais Artificiais** deste apêndice.

### OTIMIZAÇÃO NÃO-LINEAR

A otimização tornou-se no curso dos últimos anos uma das principais áreas de interesse na engenharia de processos. O forte apelo no sentido da melhoria continuada de processos, em ambiente econômico crescentemente competitivo, aliado aos desafios colocados por problemas inerentemente complexos, vem promovendo uma ampla troca de experiências entre academia e indústria nessa área (Biegler e Grossmann, 2004).

Na indústria, o termo otimização de processos é utilizado para se referir a uma maximização de ganhos. Esses ganhos se traduzem em uma maior produção, dentro das especificações de qualidade, segurança e impacto ambiental, com um menor custo associado ao consumo de matéria-prima e utilidades necessárias (vapor, água de resfriamento e eletricidade – para citar os mais comuns), o que leva, em última instância, a um melhor resultado econômico do processo industrial. De maneira geral, trata-se de um conjunto de tecnologias utilizadas para realizar mudanças ou ajustes em modelos, equipamentos e nas condições operacionais de um determinado processo, visando a sua maior eficiência. Elas são aplicadas desde o projeto do processo, nos seus níveis conceitual e básico, até sua operação no dia-a-dia da produção (Guimarães *et al.*, 2007).

Do ponto de vista matemático, o processo de otimização pode ser entendido como a busca por um extremo em um problema restringido. Esse extremo, aqui definido como o

mínimo da função-objetivo, é atingido ou almejado por um método de busca. A formulação geral, para um problema misto-inteiro, é apresentada pela Equação 1:

$$\begin{aligned} & \min f(x, y) \\ & \text{tal que: } \begin{cases} h(x, y) = 0 \\ g(x, y) \leq 0 \\ x \in \mathbf{X}, y \in \{0,1\}^m \end{cases} \end{aligned} \quad (1)$$

Sendo:  $x$  e  $y$  – respectivamente as variáveis contínuas e discretas;  $f(x,y)$  – a função-objetivo;  $h(x,y)$  – as equações do processo, encaradas como restrições de igualdade (balanço material, energético, etc.);  $g(x,y)$  – as restrições ou especificações de interesse.

No caso de um problema contínuo  $m$ -dimensional e sem restrições ( $\mathfrak{R}^m$ ; sendo que  $m$  corresponde ao número de incógnitas do problema de otimização), são apresentadas a seguir as *condições necessárias* e a *condição suficiente* para que o ponto  $\underline{x}^* = [x_1^*, x_2^*, \dots, x_m^*]$  seja um mínimo da função-objetivo  $f(\underline{x})$  (Edgar *et al.*, 2001). Primeiramente, supõe-se uma aproximação quadrática de  $f(\underline{x})$  no ponto  $\underline{x}^*$  como mostra a Equação 2:

$$f(\underline{x}) \approx f(\underline{x}^*) + \nabla_x^T f(\underline{x}^*) \Delta \underline{x} + \frac{1}{2} (\Delta \underline{x}^*)^T \nabla_{xx} f(\underline{x}^*) \Delta \underline{x} \quad (2)$$

1. Para que  $\underline{x}^*$  seja um mínimo de  $f(\underline{x})$ , a primeira condição necessária é que o gradiente seja nulo nesse ponto, ou seja,  $\nabla_x f(\underline{x}^*) = \mathbf{0}$ ;
2. Outra condição necessária é que a matriz Hessiana,  $\nabla_{xx} f(\underline{x}^*)$  seja positiva semidefinida (a Tabela 1 apresenta a classificação da matriz Hessiana com base nos seus autovalores).

Com a condição (1) atendida e a Hessiana positiva definida, tem-se então a *condição suficiente* para que  $\underline{x}^*$  seja um mínimo de  $f(\underline{x})$ .

No domínio da otimização contínua, os métodos de busca foram aqui classificados como baseados no gradiente ou diretos. Nas próximas duas subseções são discutidos aspectos relevantes para esta tese de ambas as abordagens.

Especificamente nos processos bioquímicos, tipicamente de natureza não-linear, os estudos de otimização recaem usualmente em problemas não-convexos ou mal condicionados, o que leva os métodos clássicos de busca baseados no gradiente a apresentarem dificuldades

de convergência. Nesse caso, é conveniente, e já usual, acoplar um método de busca direta a um baseado no gradiente (Mansoornejad *et al.*, 2008; Faber *et al.*, 2007; Eftaxias *et al.*, 2002, Nelles, 2001). O segundo refinaria o resultado do primeiro, permitindo ainda estimar as estatísticas dos parâmetros a partir da matriz de sensibilidade paramétrica e das variâncias experimentais. Nesse quadro, as revisões de ambas as abordagens se tornam complementares.

**Tabela 1:** Relação entre a matriz Hessiana,  $\nabla_{xx} f(\underline{x}^*)$ , e seus autovalores no ponto estacionário  $\underline{x}^*$  (Edgar *et al.*, 2001).

Matriz Hessiana $\nabla_{xx} f(\underline{x}^*)$	Todos os seus autovalores
<b>Positiva Definida</b>	$> 0$
<b>Positiva Semidefinida</b>	$\geq 0$
<b>Negativa Definida</b>	$< 0$
<b>Negativa Semidefinida</b>	$\leq 0$

## MÉTODOS BASEADOS NO GRADIENTE

Os métodos baseados no gradiente, valendo-se das condições necessárias e suficiente na otimização, buscam o extremo em pontos onde os gradientes são nulos e norteiam sua direção de busca  $s$  de acordo com o valor do gradiente local da função-objetivo.

O método do *gradiente descendente*, por exemplo, é uma abordagem indireta de primeira ordem – requer o cálculo da derivada primeira de  $f(\underline{x})$  – para cálculo do mínimo da função não-linear  $f(\underline{x})$ . Nesse método, a cada iteração  $k$ , a direção de busca  $\underline{s}^k$  que definirá o próximo ponto  $\underline{x}^{k+1}$  é calculada com base no valor do gradiente da função  $\nabla_x f(\underline{x})$  no ponto  $\underline{x}^k$  (Edgar *et al.*, 2001):

$$\underline{x}^{k+1} = \underline{x}^k + \lambda^k \underline{s}^k = \underline{x}^k - \lambda^k \nabla_x f(\underline{x}^k) \quad (3)$$

Sendo:  $\lambda$  – um escalar que pode ser alterado a cada iteração  $k$ .

O *método de Newton* é um exemplo de uma estratégia determinística de segunda ordem para a busca do mínimo de equações não-lineares. Aproximando localmente a função não linear  $f(\underline{x})$  por uma função quadrática como descrita na Equação 2, o mínimo de  $f(\underline{x})$  na direção de  $\underline{x}^k$  é calculado conforme a Equação 4 (Edgar *et al.*, 2001):

$$\nabla_{xx} f(\underline{x}^k)(\underline{x}^{k+1} - \underline{x}^k) = -\nabla_x f(\underline{x}^k) \quad (4)$$

Trata-se então, como mostra a Equação 4, da resolução de um problema linear a cada iteração  $k$ . O método pode apresentar problemas de convergência se a Hessiana  $\nabla_{xx} f(\underline{x}^k)$  não for positiva definida (vide Tabela 1). Para contornar essa limitação, alguns autores sugerem a modificação da Hessiana a cada iteração do método de modo a garantir que a mesma seja positiva definida e bem condicionada. Esse é o caso do *método de Levenberg-Marquardt*:

$$\tilde{\nabla}_{xx} f(\underline{x}^k) = \nabla_{xx} f(\underline{x}^k) + \lambda^k \underline{I} \quad (5)$$

Sendo:  $\lambda$  – um escalar modificável a cada iteração  $k$ ;  $\tilde{\nabla}_{xx} f(\underline{x}^k)$  – a Hessiana modificada positiva definida;  $\underline{I}$  – a matriz identidade.

Conicionados à continuidade da função-objetivo na região de busca e ao cálculo das primeiras, e em alguns casos segundas derivadas (ou aproximações numéricas dessas), os métodos de otimização baseados no gradiente são aplicáveis com robustez em problemas bem comportados. Em domínios com descontinuidades e característica multimodal ou ruidosa, esses métodos apresentam problemas de convergência, oscilação e mínimos locais. A distinção entre extremo “local” e “global” só se justifica em problemas de otimização não-linear visto que há um único extremo, o global, nos casos lineares. Considerada uma referência padrão para o tópico, uma revisão ampla sobre os métodos de busca baseados no gradiente para problemas lineares e não-lineares de engenharia química pode ser encontrada em Edgar *et al.*, 2001.

Como exemplos de técnicas de otimização baseadas no cálculo do gradiente para a resolução de problemas não-lineares com restrições, Edgar *et al.*, 2001, destacam a Programação Quadrática Sucessiva (SQP, *Seqüencial – ou Sucessive – Quadratic Programming*) e o método do Gradiente Reduzido Generalizado. Algoritmos que implementam a SQP foram considerados superiores, por Biegler e Grossmann, 2004, aos que empregam o método do Gradiente Reduzido Generalizado, pois aqueles requerem um menor número de avaliações da função-objetivo durante o processo de busca.

A SQP é eficiente na resolução de problemas de otimização bem condicionados e quando a função-objetivo e os gradientes podem ser avaliados com relativa precisão. Baseado nas *condições KKT* (Karush, 1939; Kuhn e Tucker, 1951 *apud* Biegler *et al.*, 1997) para a

solução ótima de funções com restrições, o procedimento de cálculo consiste na resolução de um subproblema de programação quadrática a cada iteração (Hock e Schittkowski, 1983).

Técnicas que empregam a SQP na resolução de problemas de programação não-linear são robustas e apresentam rápida convergência em problemas com restrições. Essa é a escolha corriqueira nas aplicações industriais (Biegler *et al.*, 1997). À medida que a complexidade do problema de otimização aumenta, entretanto, um algoritmo que utiliza a SQP pode demandar muitas manipulações matemáticas para que sua implementação seja factível. Nesses casos, um método de busca direto ou um enfoque híbrido que combine métodos diretos e baseados no gradiente pode ser mais eficaz (Mansoornejad *et al.*, 2008).

## MÉTODOS DIRETOS

Na abordagem direta, busca-se o extremo do problema avaliando a função-objetivo em pontos de um espaço finito ou discreto. Nenhuma informação adicional, como o valor do gradiente, por exemplo, faz-se necessária. Para problemas com grande espaço de busca, os métodos diretos são pouco eficientes. A maioria dos métodos diretos faz uso de escolhas aleatórias e funções de probabilidade. São, assim, estocásticos. Analogias entre a busca do ótimo e fenômenos observáveis da natureza são frequentes nesses casos. Com o contínuo avanço tecnológico no processamento computacional, alguns métodos dessa classe vêm apresentando resultados satisfatórios para casos de otimização não-linear (Biegler e Grossmann, 2004; Nelles, 2001).

Em problemas de otimização onde o cálculo da função-objetivo requer expressivo esforço computacional, os métodos diretos podem se tornar lentos e pouco robustos. Outra limitação está relacionada à dificuldade de implementação nos problemas com restrições não-lineares (Grossmann e Biegler, 2004).

Com sua origem no cálculo diferencial, muitas vezes a análise de um problema de otimização está focada em critérios de convergência. Entretanto, vale destacar que a busca por um extremo global pode em muitos casos se tornar inviável. Na prática, melhorias sensíveis em um processo, com mínimos locais razoáveis, podem ser mais atrativas economicamente do que a busca pelo mínimo absoluto (Guimarães *et al.*, 2007).

Como já mencionado, a abordagem estocástica muitas vezes utiliza estratégias de busca que procuram representar fenômenos físicos, evolutivos ou de interação social-cognitiva. O algoritmo de otimização recozimento simulado, ou no inglês, *simulated annealing* (Kirkpatrick *et al.*, 1983), e as estratégias evolucionárias (Rechenberg, 1965 *apud*

Neles, 2001) são exemplos importantes. Mais recentemente, o algoritmo enxame de partículas (Kennedy e Eberhart, 1995) e a evolução diferencial (Storn e Price, 1997) surgem como técnicas promissoras, por apresentarem rápida convergência e requererem uma quantidade reduzida de parâmetros de sintonia.

Ainda na abordagem direta, pode-se citar o algoritmo de busca Tabu, o qual consiste de buscas locais seguidas de explorações aleatórias em novas regiões do domínio de otimização (Glover, 1990). Os poucos parâmetros de sintonia requeridos são também um ponto favorável nesse método.

A seguir são discutidos os algoritmos de busca estocásticos estudados neste trabalho, a saber, *Simulated Annealing*, Enxame de Partículas e Evolução Diferencial.

### ***Simulated Annealing (SA)***

Proposto inicialmente como um método estocástico para otimização combinatória derivado da mecânica probabilística, o algoritmo *Simulated Annealing* (SA) simula o processo de *annealing* ou recozimento físico, no qual um metal é submetido a uma temperatura elevada, sendo, então, esfriado suavemente, permitindo que seja atingida alguma configuração de mínima energia (Kirkpatrick *et al.*, 1983). À medida que um metal em estado líquido é esfriado lentamente, as moléculas vão se ordenando até formar um cristal único e atingir o estado de mínima energia – alusão ao mínimo global no processo de otimização. Entretanto, se esfriado rapidamente, as moléculas não se alinham de forma ordenada e o metal se solidifica em uma forma policristalina ou amorfa, os mínimos locais.

O algoritmo SA, como listado na Figura 1, segue o procedimento de Metrópolis e Ulam, 1949. A cada passo, a próxima configuração  $\underline{x}^{k+1}$  é escolhida aleatoriamente a partir de  $N(\underline{x}^k)$ , a vizinhança de  $\underline{x}^k$ , aplicando uma perturbação em  $\underline{x}^k$ . Calcula-se então o novo valor da função-objetivo  $E(\underline{x}^{k+1})$ . Se  $\Delta E \leq 0$ , a nova configuração  $\underline{x}^{k+1}$  é aceita; se  $\Delta E > 0$ ,  $\underline{x}^{k+1}$  é aceita com probabilidade  $P_r = e^{-\Delta E/T}$ . Um número aleatório provido de uma distribuição uniforme no intervalo  $[0,1]$  é obtido. Se ele é menor que  $P_r$ , a mudança de configuração é aplicada, daí o critério de Metrópolis. A condição de convergência “alcançar o equilíbrio” pode ser considerada como sendo um número prescrito de iterações que foi realizado.

Ao contrário de aplicar algum método baseado no gradiente, um método de pesquisa aleatória, como o de Metrópolis, é usado para localizar a próxima configuração. A pesquisa aleatória é controlada por uma seqüência decrescente da temperatura  $T$ . Quando  $T$  é alta, grandes incrementos de energia  $E$  podem ser aceitos. À medida que  $T$  diminui, somente

pequenos incrementos são permitidos. No limite, quanto  $T$  é quase zero, incrementos em  $E$  praticamente não são mais aceitos. A estratégia de Metrópolis pode permitir, portanto, ao algoritmo SA “escapar” de mínimos locais em direção ao mínimo global.

```

Inicie  $T$  e  $\underline{x}$ 
Repita
  Gere  $\underline{x}^{k+1}$  em  $N(\underline{x}^k)$ ;
   $\Delta E \leftarrow E(\underline{x}^{k+1}) - E(\underline{x}^k)$ ;
  Se  $\Delta E < 0$ 
     $P_r = 1$ ;
  Se não
     $P_r = e^{-\Delta E/T}$ ;
  Se aleatório  $[0,1) < P_r$ 
     $\underline{x}^k \leftarrow \underline{x}^{k+1}$ ;
  Reduza  $T$ ;
Até (alcançar equilíbrio);
Retorne  $\underline{x}$ ;

```

**Figura 1:** Listagem do algoritmo *Simulated Annealing*.

O critério para redução da temperatura  $T$  é ponto chave no desempenho do algoritmo, e há garantia de convergência assintótica para o mínimo global apenas se:  $T^k = T^0 / \ln(k)$ . Tal esquema de redução de  $T$ , entretanto, é muito lento e, na prática, esquemas heurísticos de convergência mais rápidos precisam ser empregados (Locatelli, 2000).

### Enxame de Partículas (PSO)

O algoritmo enxame de partículas (PSO, *Particle Swarm Optimization*) proposto por Kennedy e Eberhart, 1995, faz uma metáfora do comportamento social de interação entre indivíduos (partículas) de um grupo (enxame). Definindo pelos autores como um método de otimização contínua não-linear, o PSO tem sido aplicado dentro do escopo da engenharia química na análise dinâmica não-linear de processos químicos, estimativa de parâmetros e em problemas multiobjetivo (Lee, 2008; Schwaab *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Ourique *et al.*, 2002; Parsopoulos e Vrahatis, 2002).

O algoritmo se baseia na seguinte teoria sócio-cognitiva: cada indivíduo de uma população possui sua própria experiência e é capaz de avaliar a qualidade dessa experiência; como os indivíduos são sociais, eles também possuem conhecimentos sobre o comportamento e a experiência dos outros indivíduos presentes no grupo. A analogia foi desenvolvida a partir da observação por Kennedy e Eberhart do comportamento de bandos de pássaros e de

cardumes de peixes na busca por alimento. Os autores observaram que, durante a busca pelo alimento, o comportamento do grupo é influenciado pela experiência individual acumulada por cada indivíduo, bem como pelo resultado da experiência acumulada do grupo.

No algoritmo PSO, cada partícula  $i$  do enxame, dotada de uma posição  $\underline{x}_i = (x_{i,1}, x_{i,2}, \dots, x_{i,m})$  e de uma velocidade  $\underline{v}_i = (v_{i,1}, v_{i,2}, \dots, v_{i,m})$ , representa um ponto no espaço de busca  $m$ -dimensional ( $\mathfrak{R}^m$ ; sendo que  $m$  corresponde ao número de incógnitas no problema de otimização). Depois de inicializado o algoritmo com uma população aleatória e com distribuição uniforme, cada partícula movimenta-se no espaço  $m$ -dimensional de busca procurando melhorar seu desempenho individual, isto é, reduzir o valor da função-objetivo. Como critério para o deslocamento, utiliza sua melhor posição obtida até a iteração  $k$ ,  $\underline{p}_i = (p_{i,1}, p_{i,2}, \dots, p_{i,m})$ , e a melhor posição do grupo,  $\underline{p}_g = (p_{g,1}, p_{g,2}, \dots, p_{g,m})$ . A velocidade e a posição de cada partícula são então atualizadas de acordo com as equações 6 e 7:

$$\underline{v}_i^{k+1} = w\underline{v}_i^k + c_1\underline{r}_1 \otimes (\underline{p}_i - \underline{x}_i^k) + c_2\underline{r}_2 \otimes (\underline{p}_g - \underline{x}_i^k) \quad (6)$$

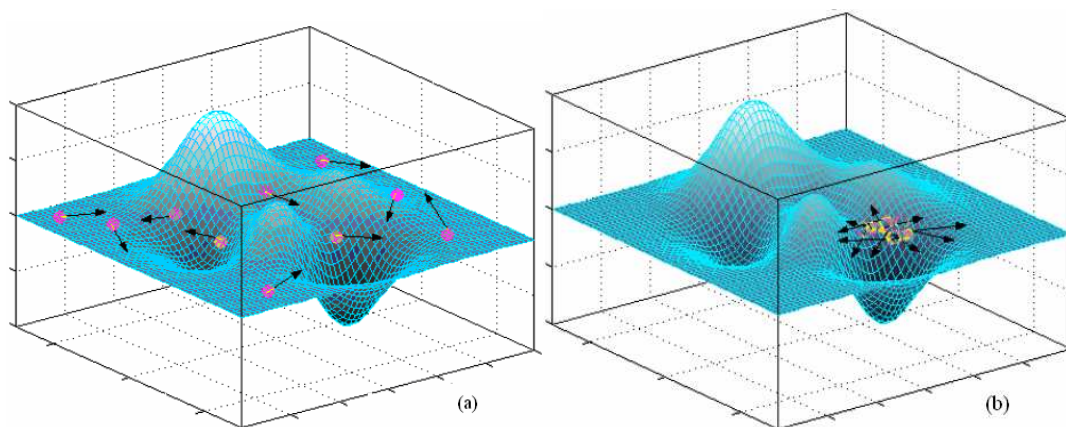
$$\underline{x}_i^{k+1} = \underline{v}_i^k + \underline{x}_i^k \quad (7)$$

Sendo:  $\underline{v}_i$  – a velocidade da partícula  $i$ ;  $\underline{x}_i$  – a posição da partícula  $i$ ;  $\underline{p}_i$  e  $\underline{p}_g$  – respectivamente, a melhor posição da partícula  $i$  e do grupo até a iteração  $k$ ;  $w$  – o fator de inércia;  $c_1$  e  $c_2$  – são constantes que representam, respectivamente, fatores de aprendizado cognitivo e social;  $\underline{r}_1$  e  $\underline{r}_2$  – são valores aleatórios ente 0 e 1; e  $\otimes$  representa o produto vetorial elemento por elemento.

Como todo método de busca direto, o desempenho do algoritmo é bastante dependente dos valores de seus parâmetros de sintonia  $w$ ,  $c_1$  e  $c_2$  (Trelea, 2003).

Como destacam Schwaab *et al.*, 2008, uma característica muito interessante do PSO é a realização de uma busca global nas iterações iniciais do procedimento de otimização, ocorrendo nesse estágio a prospecção de várias regiões do espaço de busca (Figura 2a), o que pode facilitar a localização do ótimo global. Com o decorrer das iterações, a busca passa a ser local em torno do ponto mais promissor (Figura 2b).





**Figura 2:** Evolução do enxame no algoritmo PSO (Medeiros, 2005). (a) Iterações iniciais: investigação de várias regiões do espaço de busca; (b) convergência do método: busca local em torno do ponto mais promissor.

O pseudocódigo do algoritmo é listado na Figura 3.

*Gere uma população aleatória e uniforme de  $N_p$  partículas*

*Repita*

*Repita*

*Se  $f(\underline{x}_i) < f(\underline{p}_i)$*

*$\underline{p}_i \leftarrow \underline{x}_i$ ;*

*Se  $f(\underline{p}_i) < f(\underline{p}_g)$*

*$\underline{p}_g \leftarrow \underline{p}_i$ ;*

*Atualize  $\underline{v}_i$  e  $\underline{x}_i$ ;*

*Até ( $i = N_p$ );*

*Até (convergência);*

*Retorne  $\underline{p}_g$ ;*

**Figura 3:** Listagem do algoritmo PSO.

### **Evolução Diferencial (ED)**

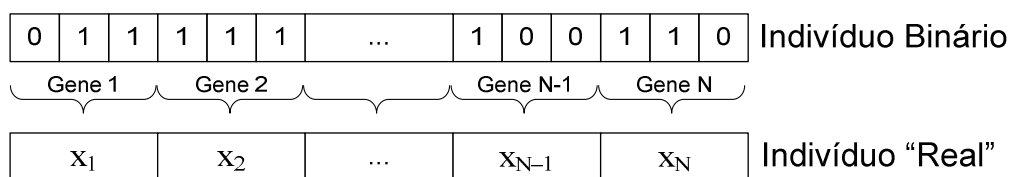
Motivados pelo grande sucesso da evolução natural em resolver complexos problemas temporais de “otimização”, como o surgimento de novas espécies e suas adaptações a mudanças drásticas no meio-ambiente, os algoritmos evolucionários são técnicas estocásticas que traçam paralelismos com os conceitos derivados da teoria da evolução natural e da genética (Goldberg, 1989). Todos os algoritmos evolucionários trabalham com uma *população de indivíduos*, os quais, para os problemas aqui estudados, são equivalentes a pontos no domínio de busca das variáveis. Como na natureza, esses indivíduos pertencem a uma *geração*, ou seja, cada iteração do método. Valendo-se da teoria da seleção natural, onde os indivíduos mais aptos sobrevivem, isto é, o conjunto de variáveis que resulta nas melhores

avaliações da função-objetivo, e aplicando operadores genéticos como mutação e recombinação a cada iteração, os algoritmos evolucionários permitem a exploração de novos pontos do espaço de busca do problema, e podem atingir seu mínimo global.

Os quatro principais temas de desenvolvimento na computação evolucionária são: Programação Genética, Estratégias Evolucionárias, Programação Evolucionária e Algoritmos Genéticos (Nelles, 2001).

Desenvolvidas por Rechenberg e Schwefel nos anos 60, as estratégias evolucionárias propõem a utilização dos parâmetros do problema de otimização sem uma pré-codificação, ou seja, variáveis contínuas são representadas com valores do tipo real, parâmetros inteiros com variáveis do tipo inteiro, etc. (Goldberg, 1989). Na formulação original de Rechenberg e Schwefel a mutação é o principal operador genético da estratégia e as variáveis – indivíduos – sofrem mutação de acordo com uma distribuição normal de probabilidade.

Originalmente, o termo Algoritmo Genético (AG) se destinava apenas a problemas com codificação binária (Holland, 1975). Entretanto, considerando AGs como algoritmos de pesquisa baseados na seleção natural e na genética (Goldberg, 1989), já é corrente o uso do termo na literatura também para designar algoritmos com codificação do tipo real, e muitos autores destacam o desempenho dessa abordagem frente à binária para problemas definidos no espaço contínuo (Babu e Munawar, 2007; Bereta e Burczynski, 2007; Salman *et al.*, 2007; Huang e Huang, 1997; Thomas *et al.*, 1995). A Figura 4 mostra a representação de um indivíduo em um problema de otimização contínua sem pré-codificação e na codificação binária (cromossomo), onde é preciso codificar os parâmetros do tipo real  $x_i$  e, conseqüentemente, introduz-se um erro numérico.



**Figura 4:** O indivíduo no algoritmo genético. Os genes do indivíduo podem ser as próprias variáveis do problema de otimização  $x_i$  (codificação “real”) ou sua codificação na forma binária.

Em forma algorítmica, basicamente, os passos de um AG são os listados na Figura 5:

Gere uma população aleatória de  $N_P$  indivíduos  
 Repita  
     Avalie o desempenho de cada indivíduo;  
     Seleção;  
     Recombinação;  
     Mutação;  
 Até (número máximo de gerações);  
 Retorne Melhor Indivíduo;

**Figura 5:** Listagem do Algoritmo Genético.

Cada algoritmo genético vai diferir então na maneira como os critérios de seleção, de recombinação e de mutação serão aplicados. Goldberg, 1989, traz uma ampla revisão de tais critérios. Já Babu e Munawar, 2007, apresentam vários casos de aplicações com AG na engenharia de processos, como, por exemplo, síntese de processos, otimização em tempo real de reator bioquímico, estimativa de parâmetros cinéticos em reações heterogêneas, etc.

Considerada uma estratégia evolucionária recente, a evolução diferencial (ED) requer uma quantidade de parâmetros de sintonia reduzida, é de fácil implementação, robusta e apresenta rápida convergência (Storn e Price, 1997). Enquanto nos algoritmos genéticos a mutação é o resultado de pequenas perturbações nos genes do indivíduo, na ED a mutação é o resultado da combinação linear desses (Salman *et al.*, 2007). Vários autores apontam a ED e suas variações híbridas como uma das melhores estratégias evolucionárias, com resultados promissores na programação não-linear (Ko *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1998).

Separada em três operações evolucionárias, a saber, mutação, recombinação e seleção, a ED pode ser descrita como segue:

- Mutação: para cada indivíduo  $\underline{x}_i^k$  da geração  $k$ , um novo vetor – indivíduo –  $\underline{v}_i^k$  é criado pela mutação de um *vetor alvo* selecionado aleatoriamente  $\underline{x}_{i_3}^k$ , com  $i \neq i_3$ . Com a escolha aleatória de mais dois vetores  $\underline{x}_{i_1}^k$  e  $\underline{x}_{i_2}^k$ , com  $i \neq i_1 \neq i_2 \neq i_3$ , o novo vetor  $\underline{v}_i^k$  é produzido conforme a Equação 8:

$$\underline{v}_i^k = \underline{x}_{i_3}^k + F(\underline{x}_{i_1}^k - \underline{x}_{i_2}^k) \quad (8)$$

Sendo:  $F$  – um fator escalar utilizado para controlar a amplitude da evolução diferencial, com  $F \in (0, \infty)$ .

- Recombinação: Os elementos do vetor  $\underline{x}_i^k$  são combinados com os do novo indivíduo  $\underline{v}_i^k$  para gerar o descendente  $\underline{\mu}_i^k$  de acordo com a seguinte estratégia de recombinação binomial:

$$\mu_i^k(j) = \begin{cases} v_i^k(j), & \text{se } r < P_r \\ x_i^k(j), & \text{senão} \end{cases} \quad (9)$$

Sendo:  $r$  – um número aleatório entre 0 e 1 provido de uma distribuição uniforme;  $P_r$  – a probabilidade de reprodução (com  $P_r \in [0, 1]$ );  $j = 1, \dots, m$  – refere-se à dimensão do problema de otimização;  $m$  – representa o número de genes, ou seja, os parâmetros.

- Seleção: o novo indivíduo  $\underline{\mu}_i^k$  só é escolhido se apresentar aptidão maior do que a do indivíduo  $\underline{x}_i^k$ , em contrapartida esse último é mantido para a geração futura  $k + 1$ .

## REDES NEURONAIS ARTIFICIAIS

Esse item foi baseado na excelente explanação de Haykin, 1999, para os temas pertinentes às redes neuronais artificiais.

Redes neuronais artificiais originaram-se como uma tentativa de modelar e compreender a capacidade de processamento de informação do sistema nervoso. Entre as características do sistema nervoso que são interessantes para reprodução em modelos neuronais, destacam-se: robustez e tolerância a falhas, flexibilidade, alto grau de paralelismo, tamanho compacto, alto aproveitamento energético e habilidade para lidar com informação difusa, ruidosa ou inconsistente. Portanto, a exemplo do cérebro, RNAs são projetadas para reconhecer padrões, reorganizar dados e aprender.

Na década de quarenta surgiram os primeiros estudos nesse campo. McCulloch e Pitts foram os pesquisadores pioneiros, mostrando que um neurônio artificial podia ser modelado por uma função degrau para realizar uma operação lógica (Lau, 1990). Outros modelos surgiram no decorrer dos anos, mas foi no início da década de setenta que Paul J. Werbos desenvolveu o algoritmo *backpropagation*. Praticamente ignorado até metade da década de oitenta, foi desde então que o supracitado algoritmo se tornou uma importante ferramenta no treinamento supervisionado de redes com múltiplas camadas para desempenho de uma ampla variedade de tarefas, impulsionando as pesquisas nesse campo (Hinton, 1992).

RNAs podem ser classificadas de acordo com sua estrutura e/ou algoritmos de aprendizagem. A estrutura de uma rede neuronal é determinada pelas conexões entre os seus neurônios e a natureza dessas conexões. O ajuste ou treinamento da força das conexões é feito pelo algoritmo de aprendizagem.

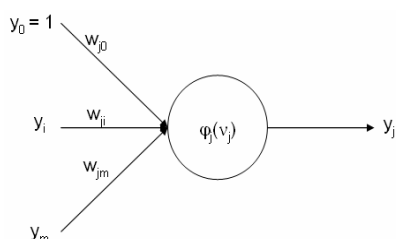
Nas redes MLP (do inglês, *MultiLayer Perceptrons*), por exemplo, os neurônios geralmente são agrupados em camadas e o fluxo de informações de uma camada a outra é unidirecional, da entrada para saída. Os neurônios são conectados entre as camadas sucessivas e não dentro de uma mesma camada. Nas redes recorrentes as conexões permitem o fluxo de informação em ambos os sentidos entre um par de unidades, e mesmo de uma unidade para ela mesma.

Já os algoritmos de treinamento de RNAs podem ser classificados como supervisionados ou não supervisionados. Nos algoritmos de aprendizagem supervisionada, os pesos das conexões são ajustados de acordo com a diferença entre a saída desejada (dados experimentais ou de processo, por exemplo) e a saída obtida pela rede durante o treinamento. Os algoritmos supervisionados são normalmente mais usados em aplicações de engenharia. O

paradigma não supervisionado não requer que a saída desejada seja conhecida. Durante o treinamento, somente padrões de entrada são apresentados à rede que, mediante programação computacional, se encarrega de mapear o espaço de entrada em um espaço de saída, adaptando os pesos das suas conexões e agrupando os padrões de entrada em grupos com características similares (Baughman e Liu, 1995). Esse tipo de abordagem é mais comumente utilizada no pré-processamento de dados (Nelles, 2001).

## COMPONENTES DE UM NEURÔNIO

A base de uma RNA é seu neurônio, cuja anatomia é mostrada na Figura 6:



**Figura 6:** Anatomia de um neurônio que transfere a entrada  $y_i$  para a saída  $y_j$  através de um fator de peso  $w_{ji}$  e uma função de transferência  $\varphi_j(v_j)$ .

As entradas do neurônio são representadas por  $y_i$  ( $i = 1, \dots, m$ ). O neurônio utiliza essas entradas, ou atividades, para calcular a saída  $y_j$ , a qual pode compor parte de um vetor de entrada para outros neurônios.

Cada peso, ou fator de peso,  $w_{ji}$ , é multiplicado por uma entrada correspondente, e o neurônio utiliza a entrada ponderada para compor futuros cálculos. Os pesos de uma rede podem produzir um efeito de excitação ou inibição no valor de entrada, dependendo da magnitude do peso e do seu sinal.

Outro fator importante que pode estar presente na computação de um neurônio é aquele conhecido como *bias* (ou *threshold*), representado na Figura 6 pela letra  $w_{j0}$ . O parâmetro interno  $w_{j0}$  regula a ativação total do neurônio  $j$ , a qual é calculada conforme a Equação 10:

$$v_j = \sum_{i=0}^m w_{ji} y_i \quad (10)$$

O fator final no cálculo da saída do neurônio é a função de transferência  $\varphi_j(\ )$  (ou função de ativação); assim:

$$y_j = \varphi_j(v_j) \tag{11}$$

Algumas funções de transferência típicas são a linear, a sigmóide e a tangente hiperbólica, apresentadas, respectivamente, nas equações 12, 13 e 14.

$$\varphi_j(v_j) = v_j \tag{12}$$

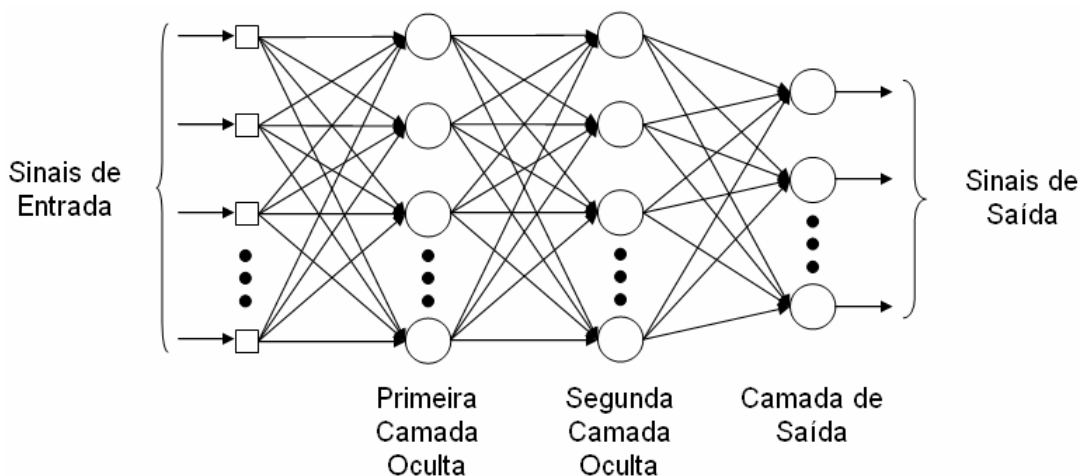
$$\varphi_j(v_j) = \frac{1}{1 + a.e^{-v_j}} \tag{13}$$

$$\varphi_j(v_j) = a.\tanh(b v_j) \tag{14}$$

Sendo:  $a$  e  $b$  – constantes utilizadas para controlar a saturação da função de transferência.

### REDE PERCEPTRONS MULTICAMADAS (MLP)

A arquitetura detalhada na Figura 7 exibe uma rede do tipo MLP:



**Figura 7:** Arquitetura de uma rede MLP com duas camadas ocultas.

Redes MLP têm sido aplicadas com sucesso na resolução de diferentes classes de problemas com o auxílio do popular algoritmo conhecido como *error backpropagation* e suas variações.

As características principais das redes MLP são:

- Cada neurônio na rede inclui uma função de ativação suave (isto é, contínua e diferenciável);
- A rede permite a inclusão em sua estrutura de uma ou mais camadas ocultas que não incluem nem a camada de entrada nem de saída da rede;
- A rede exibe um alto grau de conectividade, determinada por suas sinapses.

O conjunto de padrões ou exemplos a serem ajustados pela rede MLP, após um pré-tratamento (por exemplo, normalização dos dados), assim como para qualquer modelo empírico, é geralmente dividido em dois grupos: treinamento e teste. O conjunto de teste é utilizado para testar o desempenho do modelo pós-treinamento; o conjunto de treinamento é ainda subdividido em dois subconjuntos: subconjunto de estimação, para selecionar o modelo (função de transferência a empregar, número de neurônios na camada oculta, números de camadas ocultas, etc.), além do número de iterações de treinamento, de forma a evitar sobreajuste (*overfitting*); e subconjunto de validação do modelo. A técnica de divisão do conjunto de treinamento em dois subconjuntos é conhecida como validação cruzada.

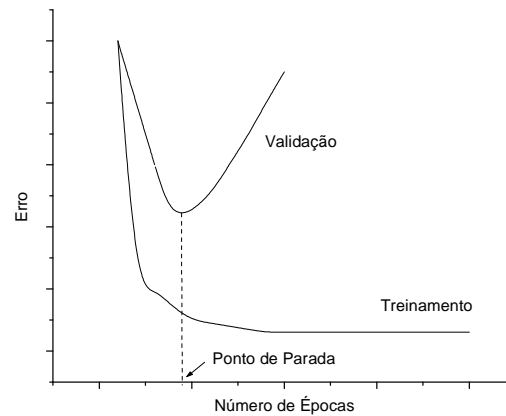
Quanto ao treinamento (leia-se ajuste dos pesos sinápticos), pode ser realizado de uma forma seqüencial ou intermitente. Na forma seqüencial (mais utilizada em aplicações que exigem treinamento em tempo real), as atualizações nos pesos da rede são feitas após a apresentação de cada exemplo, enquanto no modo intermitente a correção é realizada após a apresentação de todo o conjunto de exemplos, constituindo uma *época*.

Com o intuito de se evitar *overfitting* durante o treinamento da rede MLP, pode-se empregar a técnica de parada antecipada (*early stopping*), a qual adota o seguinte procedimento:

- Após um período de estimação (treinamento), com os pesos ajustados é calculado o erro associado aos dados do subconjunto de validação;
- Reinicia-se a seção de treinamento enquanto o erro avaliado acima permanecer em queda.

A Figura 8 ilustra a técnica:





**Figura 8:** Ilustração da técnica de parada antecipada associada à validação cruzada.

Hagan e Menhaj, 1994, propuseram o acoplamento do algoritmo de Levenberg-Marquardt ao *backpropagation* (resultando em um algoritmo híbrido, MBP) para o treinamento de redes MLP no modo intermitente. O algoritmo MBP se mostrou superior a outras abordagens de treinamento no modo intermitente quando o número de pesos na rede MLP não ultrapassa algumas centenas (o que foi o caso das redes aqui utilizadas).

No algoritmo MBP a atualização na época  $k$  dos pesos durante o treinamento se dá conforme a Equação 15 (vide semelhança com a Equação 5):

$$\underline{w}(k+1) = \underline{w}(k) + \left[ \underline{J}^T(k)\underline{J}(k) + \lambda \underline{I} \right]^{-1} \underline{J}^T(k)\underline{e}(k) \quad (15)$$

Sendo:  $\underline{w}$  – o vetor de pesos sinápticos de dimensão  $m$ ;  $\lambda$  – um escalar recalculado a cada época  $k$  (que garante que a matriz  $\underline{J}^T(k)\underline{J}(k) + \lambda \underline{I}$  seja definida positiva);  $\underline{I}$  – a matriz identidade;  $\underline{e}$  – o vetor erro, isto é, a diferença entre os valores inferidos pela rede e os esperados;  $\underline{J}$  – a matriz jacobiana descrita pela Equação 16:

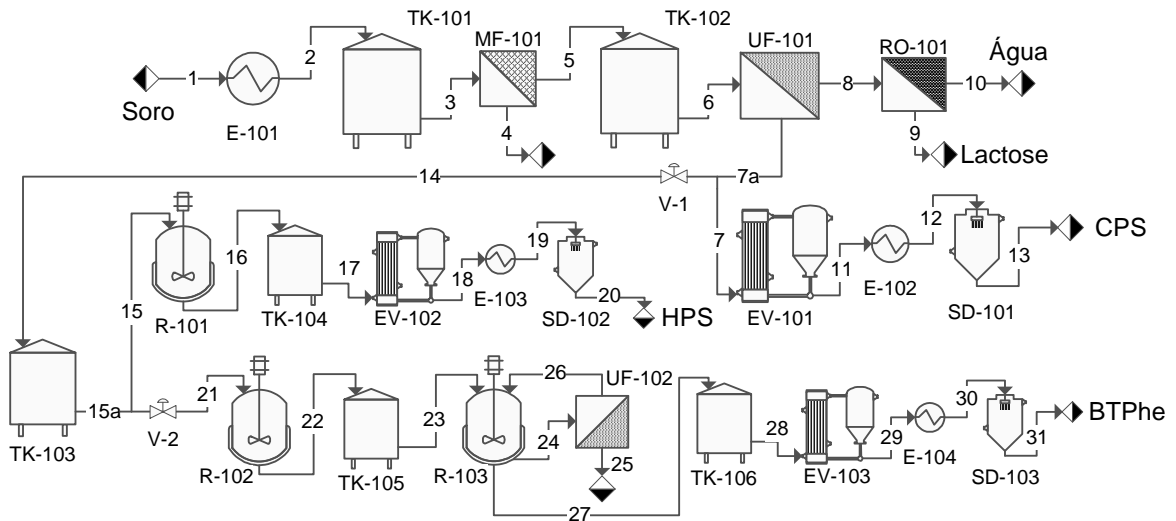
$$\underline{J} = \begin{bmatrix} \frac{\partial e(1)}{\partial w_1} & \frac{\partial e(1)}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e(1)}{\partial w_m} \\ \frac{\partial e(2)}{\partial w_1} & \frac{\partial e(2)}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e(2)}{\partial w_m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial e(n)}{\partial w_1} & \frac{\partial e(n)}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e(n)}{\partial w_m} \end{bmatrix} \quad (16)$$

Na Equação 16 fica explicitada a necessidade da apresentação de todo o conjunto  $n$  de exemplos para o cálculo da matriz jacobiana, caracterizando o modo intermitente de treinamento.

## Anexo A

### Modelagem do Processo de Refino do Soro

Na figura abaixo se apresenta o fluxograma básico do processo de refino do soro que foi utilizado como referência para denominar equipamentos e correntes nas seções do presente anexo. Todos os preços apresentados são para a base de 2005 (*Chemical Engineering Plant Cost Index*, CEPCI = 468,2) e podem ser atualizados para o ano de interesse de acordo com o índice apropriado.

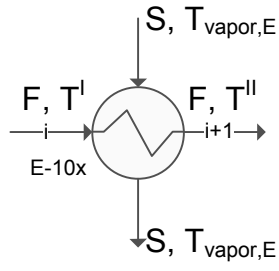


**Figura A.1:** Fluxograma básico de processo para o refino do soro de queijo.

## A.1 – TROCADOR DE CALOR

### A.1.1 – Modelo Matemático

O esquema da Figura A.2 representa o trocador de calor considerado para o desenvolvimento do modelo matemático.



Onde:

$F$  – vazão mássica da corrente a ser aquecida;

$T^I, T^{II}$  – temperatura de entrada e saída da corrente a ser aquecida;

$S$  – vazão mássica do vapor saturado (fluido de aquecimento);

$T_{vapor,E}$  – temperatura do vapor saturado.

**Figura A.2:** Modelo do trocador de calor considerado.

Assumindo que toda energia  $q_E$  disponibilizada na mudança de estado do fluido de aquecimento de vapor para líquido saturado é utilizada como fonte de calor, é possível estabelecer a seguinte relação pelo balanço de energia do sistema (Coulson e Richardson, 1996):

$$q_E = U_E \cdot A_E \cdot \frac{(T_{vapor,E} - T^{II}) - (T_{vapor,E} - T^I)}{\ln\left(\frac{T_{vapor,E} - T^{II}}{T_{vapor,E} - T^I}\right)} = F \cdot CP_{soro}(\bar{T}, x) \cdot (T^{II} - T^I) \quad (A.1)$$

Sendo:  $U_E$  – o coeficiente global de transferência de calor;  $CP_{soro}$  – a capacidade calorífica específica do soro, que é função da temperatura média de operação  $\bar{T}$  e do teor de sólidos totais  $x$ .

Isolando a área do trocador  $A_E$  na Equação A.1, tem-se então a relação A.2 para projeto do trocador de calor:

$$A_E = \frac{F \cdot CP_{soro}(\bar{T}, x) \cdot (T^{II} - T^I)}{U_E \cdot \frac{(T_{vapor,E} - T^{II}) - (T_{vapor,E} - T^I)}{\ln\left(\frac{T_{vapor,E} - T^{II}}{T_{vapor,E} - T^I}\right)}} \quad (A.2)$$

### A.1.2 – Custo Fixo

O preço de compra de um trocador  $CF_E$  é função da sua área de troca e pode ser estimado pelas equações A.3 e A.4 (software SuperPro Designer® v3.07):

$$CF_E = 716,51 \cdot A_E \quad [US\$], \text{ para } A_E \leq 1 \text{ m}^2 \quad (A.3)$$

$$CF_E = 716,38 \cdot A_E^{0,75} \quad [US\$], \text{ para } 1 < A_E \leq 100 \text{ m}^2 \quad (\text{A.4})$$

### A.1.3 – Custo Operacional

Seu custo operacional  $CO_E$  foi calculado pela Equação A.5, com base no gasto com vapor de aquecimento:

$$CO_E = \frac{F \cdot CP_{soro}(\bar{T}, x) \cdot (T^H - T^L)}{\lambda_{vapor,E}} \text{Preço}_{vapor} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (\text{A.5})$$

Sendo:  $\lambda_{vapor,E}$  – o calor latente específico do vapor de aquecimento utilizado no trocador.

## A.2 – TANQUE DE ARMAZENAMENTO

### A.2.1 – Modelo Matemático

O volume de um tanque de armazenamento é função do tempo de residência do produto a ser estocado  $\tau_{TK}$  e de sua temperatura de armazenamento  $T_{TK}$ , a qual influencia a densidade do produto a ser estocado  $\rho_{soro} = f(T_{TK})$ . Seu volume  $V_{TK}$  pode ser calculado de acordo com a Equação A.6 (Peters e Timmerhaus, 1991):

$$V_{TK} = 1,2 \frac{F \cdot \tau_{TK}}{\rho_{soro}(T_{TK})} \quad (\text{A.6})$$

Sendo:  $F$  – a vazão mássica da corrente a ser armazenada.

### A.2.2 – Custo Fixo

O preço de compra de um tanque é função do volume. As equações A.7 a A.9 foram ajustadas com auxílio do software SuperPro Designer® v3.07:

$$CF_{TK} = 4812,81 \cdot V_{TK} \quad [US\$], \text{ para } V_{TK} \leq 3,8 \text{ m}^3 \quad (\text{A.7})$$

$$CF_{TK} = 3192,03 + 371,53 \cdot V_{TK} + 5,77 \cdot V_{TK}^2 \quad [US\$], \text{ para } 3,8 < V_{TK} \leq 35 \text{ m}^3 \quad (\text{A.8})$$

$$CF_{TK} = 41777,48 - 210,44 \cdot V_{TK} + 3,13 \cdot V_{TK}^2 \quad [US\$], \text{ para } 35 < V_{TK} \leq 200 \text{ m} \quad (\text{A.9})$$

Para os tanques de armazenamento não foi considerado custo operacional.

### **A.3 – SISTEMAS DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR MEMBRANAS**

Os métodos de concentração/purificação por membranas de microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa são atualmente de uso corrente nas indústrias de laticínios. Uma breve descrição de cada sistema é agora apresentada. Toda esta seção, a menos que explicitado, foi baseada em Rautenbach e Albrecht, 1989.

Na microfiltração, considerada uma extensão da ultrafiltração, as membranas possuem poros variando de 0,1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ . Na planta ilustrada na Figura A.1, a unidade de microfiltração (*MF-101*) propicia a separação da gordura presente no soro *in natura* e a esterilização a frio (Padilla, 2007; Vieira, 2004).

Para a concentração do soro é utilizada uma unidade de ultrafiltração (*UF-101*, membrana de corte de 10 kDa). Nesse processo, as membranas são microporosas e os tamanhos nominais dos poros podem variar de 0,001  $\mu\text{m}$  a 0,1  $\mu\text{m}$ . Uma outra unidade de ultrafiltração é utilizada para a separação dos aminoácidos liberados durante a hidrólise com CPA (*UF-102*, membrana de corte de 1 kDa). Neste caso, entretanto, o que se opera na prática é uma diafiltração: solução dialisante (tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7) é adicionada para promover a lavagem da membrana e permitir que os aminoácidos permeiem através da membrana mais facilmente (Vieira, 2004).

Na osmose reversa as membranas são permeáveis à água, mas não a sais ou moléculas maiores. Os tamanhos nominais dos poros da membrana, considerada “não porosa” (poros muito estreitos), variam de 0,1 nm a 1 nm. No processo em estudo a osmose reversa é utilizada para concentração da lactose (unidade *RO-101*).

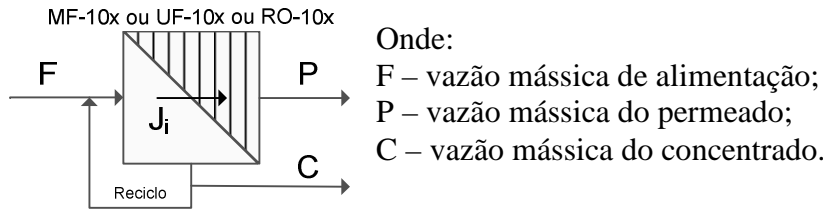
#### **A.3.1 – Modelo Matemático**

Nos três casos de filtração estudados as forças motrizes que regem o processo são as mesmas: gradientes de pressão e de concentração. Aplicando o balanço material para o sistema de filtração contínuo e definindo o fator de concentração de cada unidade  $F_{C,i}$  como

sendo a razão entre as vazões mássicas da alimentação  $F$  e do concentrado  $C$  e  $J_i$  com o fluxo do permeado  $P$  através da membrana  $i$  (vide esquema na Figura A.3) tem-se a Equação A.10:

$$F = P + C = J_i \cdot A_i + \frac{F}{F_{C,i}} \quad (\text{A.10})$$

Sendo: o índice  $i = MF, UF$  ou  $RO$ .



**Figura A.3:** Esquema simplificado para operação de sistema de filtração em modo contínuo.

Chega-se então à expressão A.11 que pode ser utilizada para estimativa da área de filtração requerida  $A_i$  para processos de micro- e ultrafiltração e de osmose reversa operados de forma contínua.

$$A_i = \frac{F \left( 1 - \frac{1}{F_{C,i}} \right)}{J_i} \quad (\text{A.11})$$

### A.3.2 – Custo Fixo

O preço do sistema de concentração/purificação por membranas é função da área de membrana requerida. De acordo com dados fornecidos pelo simulador SuperPro Designer® v3.07 e por Silva, 2000, as seguintes correlações foram utilizadas:

$$CF_{MF} = 3310385 \cdot A_{MF} \quad [US\$], \text{ para } A_{MF} \leq 5 \text{ m}^2 \quad (\text{A.12})$$

$$CF_{MF} = 13659,69 \cdot A_{MF}^{0,55} \quad [US\$], \text{ para } 5 < A_{MF} \leq 80 \text{ m}^2 \quad (\text{A.13})$$

$$CF_{UF} = 66207,07 \cdot A_{UF} \quad [US\$], \text{ para } A_{UF} \leq 5 \text{ m}^2 \quad (\text{A.14})$$

$$CF_{UF} = 27319,38 \cdot A_{UF}^{0,55} \quad [US \$], \text{ para } 5 < A_{UF} \leq 80 \text{ m}^2 \quad (\text{A.15})$$

$$CF_{RO} = 28445,89 \cdot A_{RO} \quad [US\$], \text{ para } A_{RO} \leq 5 \text{ m}^2 \quad (\text{A.16})$$

$$CF_{RO} = 40979,07 \cdot A_{RO}^{0,55} \quad [US \$], \text{ para } 5 < A_{RO} \leq 80 \text{ m}^2 \quad (\text{A.17})$$

### A.3.3 – Custo Operacional

Viotto, 1993, relata que o custo com reposição pode variar entre 14-38% do custo de compra de uma planta de filtração. Assim, admitiu-se uma reposição anual de membrana ao custo de:

$$CO_{MF}^1 = 0,14 \cdot CF_{MF} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (\text{A.18})$$

$$CO_{UF}^1 = 0,26 \cdot CF_{UF} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (\text{A.19})$$

$$CO_{RO}^1 = 0,38 \cdot CF_{RO} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (\text{A.20})$$

Além disso, considerou-se o consumo de eletricidade ao custo de 5 kWh por m<sup>3</sup> de permeado (Perry e Green, 1997):

$$CO_i^2 = 5 \cdot \frac{F \cdot \left(1 - \frac{1}{F_{C,i}}\right)}{\rho_{soro}(T^i)} \cdot Preço_{eletricidade} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (\text{A.21})$$

No caso da Equação A.21, respeitada as demais unidades dos seus parâmetros, a densidade do soro  $\rho_{soro}$  na temperatura de operação da unidade  $T^i$  deve ser expressa em unidades de massa por m<sup>3</sup>; sendo o índice  $i = MF, UF$  ou  $RO$ .



## A.4 – REATORES ENZIMÁTICOS

### A.4.1 – Modelo Matemático

As hidrólises enzimáticas do processo de refino do soro de queijo são processadas em bateladas. Portanto, para cálculo do volume do reator apenas os valores do volume de soro processado,  $V_{soro}$ , e de gel adicionado,  $V_{gel}$ , por batelada são necessários (Biegler *et al.*, 1997):

$$V_R = V_{soro} + V_{gel} = \frac{V_{soro}}{1 - \frac{C_{enzima}}{\rho_{gel} \cdot c \cdot \arg a_{enzima}}} \quad (A.22)$$

Sendo:  $C_{enzima}$  – a concentração inicial de enzima no reator;  $carga_{enzima}$  – a carga enzimática no gel de agarose;  $\rho_{gel}$  – a densidade do gel de agarose.

Na Equação A.22 supõe-se a porosidade do gel de agarose nula, o que superestima o volume do reator a favor da segurança na estimação da capacidade total necessária. Por outro lado, tal hipótese permite futuras alterações operacionais nos reatores como, por exemplo, aumentos na razão enzima/substrato.

### A.4.2 – Custo Fixo

Conforme Peters e Timmerhaus, 1991, para um reator com agitação, encamisado, de aço inoxidável e pressão máxima de trabalho de 3,4 atm., a correlação é:

$$CF_R = 25365,23 \cdot V_R^{0,55} \quad [US \$], \text{ para } 1 < V_R \leq 30 \text{ m}^3 \quad (A.23)$$

### A.4.3 – Custo Operacional

Para o cálculo do custo operacional referente ao reator, foi considerado o custo com a reposição do catalisador imobilizado em gel de agarose por batelada:

$$CO_R^1 = \frac{massa_{gel} \cdot (Preço_{gel} + carga_{enzima} \cdot Preço_{enzima})}{N_{batelada}} \quad [US\$ \cdot batelada^{-1}] \quad (A.24)$$

Sendo:  $massa_{gel}$  – a massa de gel utilizada por batelada;  $carga_{enzima}$  – a quantidade de enzima imobilizada por massa de gel;  $N_{batelada}$  – o número de bateladas em que a quantidade de catalisador adicionada se iguala à quantidade inicial (equação A.24a).

$$N_{batelada} = \frac{1}{1 - e^{-\tau_R / \tau_{catalisador}}} \quad (\text{A.24a})$$

Sendo:  $\tau_R$  – o tempo de reação por batelada;  $\tau_{catalisador}$  – o tempo característico do catalisador (listado na Tabela A.1).

**Tabela A.1:** Tempo característico do catalisador.  $\tau_{catalisador}$  está relacionado com o tempo de meia-vida do catalisador por:  $\tau_{catalisador} = \tau_{1/2} / -\ln(1/2)$ .

Reator	Catalisador	$\tau_{catalisador}$ (h)
R-101	Alcalase®-glioxil-agarose	2151 (Tardioli, 2003).
R-102	Quimotripsina-glioxil-agarose	1909 (Galvão, 2004)
R-103	CPA-glioxil-agarose	359,1 (Tardioli, 2003)

Também foi possível estimar os gastos com energia para agitação e com vapor para aquecimento de cada reator, equações A.25 e A.26 respectivamente:

$$CO_R^2 = 1,5 \cdot V_R \cdot \tau_R \cdot Pr \cdot e_{\text{co}_{\text{eletrica de}}} \quad [US\$.batelada^{-1}] \quad (\text{A.25})$$

Sendo:  $V_R$  – o volume do reator em  $m^3$ ;  $\tau_R$  – o tempo de reação por batelada; o fator multiplicativo 1,5 refere-se ao consumo médio de 1,5 kW por  $m^3$  de volume útil do reator (Walas, 1990).

$$CO_R^3 = \frac{\tau_R \cdot U_R \cdot A_R \cdot (T_{\text{vapor},R} - T_R)}{\lambda_{\text{vapor},R}} \cdot Pr \cdot e_{\text{co}_{\text{vapor}}} \quad [US\$.batelada^{-1}] \quad (\text{A.26})$$

Sendo:  $\tau_R$  – o tempo de reação por batelada;  $U_R$  – o coeficiente global de transferência de calor;  $A_R$  – a área de troca;  $T_R$  – a temperatura no reator;  $T_{\text{vapor},R}$  – a temperatura do vapor saturado;  $\lambda_{\text{vapor},R}$  – o calor latente específico do vapor utilizado no aquecimento do reator (assumindo que o vapor deixa a camisa do reator como líquido saturado).

## A.5 – EVAPORADOR

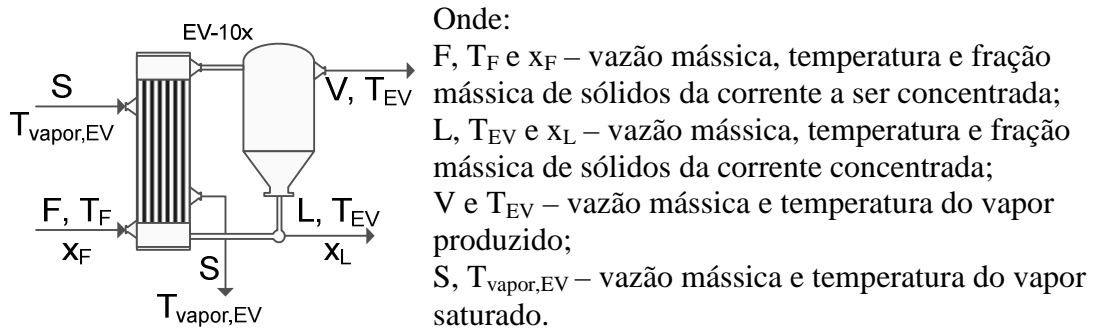
A pré-concentração da solução em um evaporador operando a vácuo se fez necessária para que a solução alimentada ao secador por atomização tivesse seu teor de sólidos totais concentrado de aproximadamente 18 para 40% (Písecký, 2005; Masters, 1979). A operação de

evaporadores a vácuo é comum na indústria de alimentos, pois a pressões reduzidas a temperatura de ebulição da solução é relativamente baixa, reduzindo os riscos de degradação térmica do produto (Earle, 1983).

### A.5.1 – Modelo Matemático

O esquema de evaporador representado na Figura A.4 foi utilizado no desenvolvimento do modelo matemático do mesmo. Tais considerações foram adotadas:

- estado estacionário;
- o vapor de aquecimento  $S$  encontra-se saturado e deixa o evaporador como líquido saturado;
- não há perdas de calor para o ambiente.
- a elevação no ponto de ebulição é desprezível.



**Figura A.4:** Esquema simplificado de evaporador.

Para um evaporador contínuo, os balanços de massa global e de soluto ficam:

$$F = L + V \quad (\text{A.27a})$$

$$F \cdot x_F = L \cdot x_L \quad (\text{A.27b})$$

Aplicando o balanço de energia ao sistema e supondo que todo o calor fornecido pelo vapor saturado  $q_{EV}$  é utilizado para evaporação da solução:

$$q_{EV} = \lambda_{vapor,EV} \cdot S = U_{EV} \cdot A_{EV} \cdot (T_{vapor,EV} - T_{EV}) \quad (\text{A.28})$$

Sendo:  $\lambda_{vapor,EV}$  – o calor latente específico do vapor de aquecimento saturado utilizado no evaporador;  $U_{EV}$  – o coeficiente global de transferência de calor.

Definindo a economia do evaporador  $E_{EV}$  como a relação entre a quantidade de vapor produzida no evaporador  $V$  e a quantidade de vapor de aquecimento alimentada ao evaporador  $S$  ( $E_{EV} = V/S$ , valor típico de 0,95; Coulson e Richardson, 1990) e substituindo as equações A.27a e A.27b na Equação A.28, foi possível calcular a área de troca térmica do evaporador de um único efeito  $A_{EV}$  de acordo com a Equação A.29 (Earle, 1983):

$$A_{EV} = \frac{\lambda_{vapor, EV} \cdot F}{E_{EV} \cdot U_{EV} \cdot (T_{vapor, EV} - T_{EV})} \left( 1 - \frac{x_F}{x_L} \right) \quad (A.29)$$

### A.5.2 – Custo Fixo

A área de troca térmica de um evaporador determina seu preço de compra (Silva, 2000):

$$CF_{EV} = 78656,05 \quad [US\$], \text{ para } A_{EV} \leq 3 \text{ m}^2 \quad (A.30)$$

A função constante da Equação A.30 é válida para evaporadores com áreas de troca inferiores a 3 m<sup>2</sup>, o caso neste trabalho.

### A.5.3 – Custo Operacional

O custo operacional do evaporador foi calculado com base em seu gasto com vapor de aquecimento  $S$ :

$$CO_{EV} = \frac{F}{E_{EV}} \cdot \left( 1 - \frac{x_F}{x_L} \right) \cdot Pr_{e\zeta o_{vapor}} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (A.31)$$

## A.6 – SECADOR POR ATOMIZAÇÃO

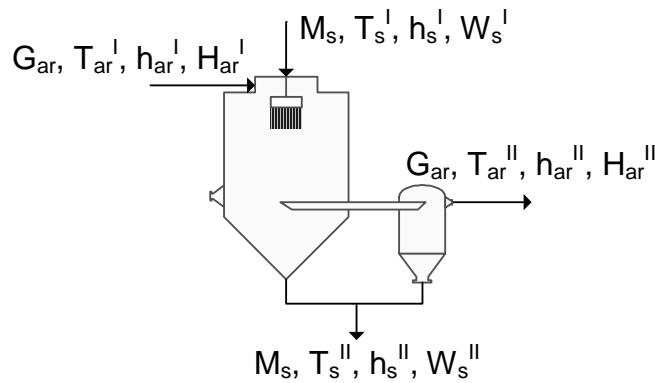
A utilização do secador por atomização na planta tem por finalidade a secagem, remoção da umidade em excesso, do concentrado. Esta última etapa é de uso corrente na indústria de laticínios para obtenção do produto final em pó, facilitando a estocagem e prolongando a conservação do mesmo (Písecký, 2005; Rautenbach e Albrecht, 1989). Em Masters, 1979, uma ampla fundamentação teórica sobre o processo de secagem por atomização é apresentada, assim como a derivação do modelo matemático exposto a seguir.

### A.6.1 – Modelo Matemático

Para determinação do diâmetro do secador  $D_{SD}$ , sua dimensão característica, três etapas de cálculos são necessárias, a saber: a vazão volumétrica de ar secante, o volume de sua carcaça e finalmente o diâmetro da mesma. As três etapas são apresentadas a seguir.

#### Vazão de volumétrica de ar

Considerando o esquema de secador da Figura A.5, suponha  $M_s$  unidades de massa de sólido seco por unidade de tempo a uma temperatura  $T_s^I$  entrando no secador em uma suspensão contendo  $W_s^I$  unidades de água por unidades de sólido seco em massa (umidade em base seca). A suspensão deixa o secador com  $W_s^{II}$  unidades em base seca a uma temperatura  $T_s^{II}$ . Ar seco é fornecido ao sistema a uma vazão mássica  $F_{ar}$ , uma temperatura  $T_{ar}^I$  e umidade absoluta  $H_{ar}^I$ . O mesmo ar permanece no secador por um determinado tempo de residência  $\tau_{SD}$ , deixando-o a uma temperatura  $T_{ar}^{II}$  e umidade absoluta  $H_{ar}^{II}$ .



**Figura A.5:** Modelo de secador por atomização utilizado.

Aplicando o balanço material de umidade para o sistema:

$$M_s \cdot (W_s^I - W_s^{II}) = F_{ar} \cdot (H_{ar}^{II} - H_{ar}^I) \quad (A.32)$$

Analogamente, aplicando o balanço de energia e ignorando perdas para o ambiente:

$$F_{ar} \cdot h_{ar}^I + M_s \cdot h_s^I = F_{ar} \cdot h_{ar}^{II} + M_s \cdot h_s^{II} \quad (A.33)$$

Sendo:  $h_i$  – as entalpias específicas de cada corrente:

$$h_{ar}^I = Cp_{ar}(T_{ar}^I) \cdot (T_{ar}^I - T_{ref}) + H_{ar}^I \cdot Cp_{vapor}(T_{ar}^I) \cdot (T_{ar}^I - T_{ref}) + \lambda_{vapor,0^\circ C} \cdot H_{ar}^I \quad (A.33a)$$

$$h_{ar}^{II} = Cp_{ar}(T_{ar}^{II}) \cdot (T_{ar}^{II} - T_{ref}) + H_{ar}^{II} \cdot Cp_{vapor}(T_{ar}^{II}) \cdot (T_{ar}^{II} - T_{ref}) + \lambda_{vapor,0^\circ C} \cdot H_{ar}^{II} \quad (A.33b)$$

$$h_s^I = Cp_{soro}(T_s^I, x^I) \cdot (T_s^I - T_{ref}) + W_s^I \cdot Cp_{\acute{a}gua}(T_s^I) \cdot (T_s^I - T_{ref}) \quad (A.33c)$$

$$h_s^{II} = Cp_{soro}(T_s^{II}, x^{II}) \cdot (T_s^{II} - T_{ref}) + W_s^{II} \cdot Cp_{\acute{a}gua}(T_s^{II}) \cdot (T_s^{II} - T_{ref}) \quad (A.33d)$$

Sendo:  $Cp_{ar}$ ,  $Cp_{vapor}$ ,  $Cp_{soro}$  e  $Cp_{\acute{a}gua}$ , respectivamente, as capacidades caloríficas específicas do ar, do vapor de água, do soro e da água;  $T_{ref}$  – a temperatura de referência para os valores dos calores específicos;  $x^i$  – teor de sólidos totais, que se relaciona com a umidade em base seca  $W_s^i$  por:  $W_s^i = (1 - x^i)/x^i$ ;  $\lambda_{vapor,0^\circ C}$  é o calor latente específico de vaporização da água a 0 °C.

Em um problema típico de projeto, no sistema de equações descrito pelas equações A.32 e A.33 desconhecem-se  $F_{ar}$  e  $H_{ar}^{II}$ . Isolando  $H_{ar}^{II}$  nas equações A.32 e A.33b e substituindo em A.33 as demais equações com termos de projeto conhecidos, tem-se para  $F_{ar}$ :

$$F_{ar} = -M_S \frac{-h_s^I + h_s^{II} + Cp_{vapor}(T_{ar}^{II}) \cdot (T_{ar}^{II} - T_{ref}) \cdot (W_s^I - W_s^{II}) + \lambda_{vapor,0^\circ C} \cdot (W_s^I - W_s^{II})}{-h_{ar}^I + Cp_{ar}(T_{ar}^{II}) \cdot (T_{ar}^{II} - T_{ref}) + Cp_{vapor}(T_{ar}^{II}) \cdot (T_{ar}^{II} - T_{ref}) \cdot H_{ar}^I + \lambda_{vapor,0^\circ C} \cdot H_{ar}^I} \quad (A.34)$$

Finalmente, pela equação A.35 foi calculada a vazão volumétrica de ar secante necessária  $G_{ar}$ :

$$G_{ar} = \frac{F_{ar}}{\rho_{ar} \left( \frac{T_{ar}^I + T_{ar}^{II}}{2} \right)} \quad (A.35)$$

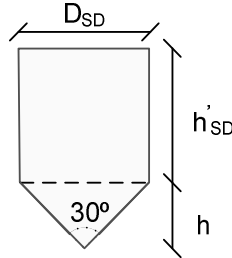
Sendo:  $\rho_{ar}$  – a densidade do ar na sua temperatura média.

### ***Cálculo do volume útil da carcaça e de seu diâmetro***

Considerado que o tempo de residência médio do ar secante  $\tau_{SD}$  é de 24 s para produtos da indústria de laticínios (consulta à empresa Niro A/S, Dinamarca), estimou-se o volume útil da carcaça  $V_{SD}$  pela seguinte relação:

$$V_{SD} = G_{ar} \cdot \tau_{SD} \quad (A.36)$$

Um esquema geométrico típico para projetos de secadores por atomização é representado na Figura A.6:



**Figura A.6:** Esquema geométrico para projeto de secadores por atomização.

Por semelhança de triângulos foi possível estabelecer a seguinte relação entre  $V_{SD}$  e seu diâmetro  $D_{SD}$  (assumindo para fim de projeto  $h'_{SD} = 3D_{SD}$ ):

$$D_{SD} = \left[ \frac{4 \cdot V_{SD}}{\pi \cdot \left( 3 + \frac{\text{tg}(60^\circ)}{6} \right)} \right]^{1/3} \quad (\text{A.37})$$

### A.6.2 – Custo Fixo

O custo fixo do secador por atomização é calculado pelas equações A.38 e A.39 (SuperPro Designer® v3.07):

$$CF_{SD} = 72440,28 \cdot D_{SD} \quad [\text{US\$}], \text{ para } D_{SD} \leq 0.6 \text{ m} \quad (\text{A.38})$$

$$CF_{SD} = 101704,50 \cdot D_{SD}^{0,54} \quad [\text{US\$}], \text{ para } 0.6 < D_{SD} \leq 10 \text{ m} \quad (\text{A.39})$$

### A.6.3 – Custo Operacional

O custo operacional do secador foi estimado com base em seu consumo de eletricidade, de ar, e de vapor para aquecimento do ar, respectivamente, equações A.40, A.41 e A.42.

$$CO_{SD}^1 = 0,258 \cdot M_S \cdot (1 + W_S^H) \cdot \text{Pr } e\zeta o_{\text{eletriciada de}} \quad [\text{US\$} \cdot \text{tempo}^{-1}] \quad (\text{A.40})$$

Sendo:  $M_S$  – expresso em kg de sólido por unidade de tempo; o fator multiplicativo 0,258 (expresso em kWh por kg de sólido) foi proposto por Peters, 2005.

$$CO_{SD}^2 = G_{ar} \cdot Pr e\zeta o_{ar} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (A.41)$$

$$CO_{SD}^3 = \frac{F_{ar} \cdot CP_{ar} \left( \frac{T_{ar}^I + T_{amb}}{2} \right) \cdot (T_{ar}^I - T_{amb})}{\lambda_{vapor,SD}} \cdot Pr e\zeta o_{vapor} \quad [US\$.tempo^{-1}] \quad (A.42)$$

Sendo:  $T_{amb}$  – a temperatura do ar ambiente;  $\lambda_{vapor,SD}$  – o calor latente específico de vaporização do vapor utilizado.

## A.7 – DADOS DE PROCESSO

### A.7.1 – Condições Operacionais dos Equipamentos e da Planta

#### Trocador de Calor

$T_{vapor,E} = 169,95 \text{ °C}$  (Coulson e Richardson, 1996).

E-101:  $T_1 = 20 \text{ °C}$ ;  $T_2 = 50 \text{ °C}$ ;  $x_1 = 0,06$ .

E-102:  $T_{11} = 25 \text{ °C}$ ;  $T_{12} = 50 \text{ °C}$ ;  $x_{11} = 0,4$ .

E-103:  $T_{18} = 25 \text{ °C}$ ;  $T_{19} = 50 \text{ °C}$ ;  $x_{18} = 0,4$ .

E-104:  $T_{29} = 25 \text{ °C}$ ;  $T_{30} = 50 \text{ °C}$ ;  $x_{29} = 0,4$ .

#### Tanque de Armazenamento

TK-101:  $T_{TK} = 50 \text{ °C}$ ;  $\tau_{TK} = 18$  horas.

TK-102:  $T_{TK} = 25 \text{ °C}$ ;  $\tau_{TK} = 18$  horas.

TK-103:  $T_{TK} = 20 \text{ °C}$ ;  $\tau_{TK} = 12$  horas.

TK-104:  $T_{TK} = 25 \text{ °C}$ ;  $\tau_{TK} = 4$  horas.

TK-105:  $T_{TK} = 25 \text{ °C}$ ;  $\tau_{TK} = 24$  horas.

TK-106:  $T_{TK} = 25 \text{ °C}$ ;  $\tau_{TK} = 9$  horas.



Sistemas de Concentração e Purificação por Membranas

MF-101:  $J = 625 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ;  $F_C = 15$  (Rautenbach e Albrecht, 1989).

UF-101:  $J = 50 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ;  $F_C = 10$  (Vieira, 2004).

UF-102:  $J = 5 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ;  $F_C = 4$  (Padilla, 2007).

RO-101:  $J = 40 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ;  $F_C = 10$  (Rautenbach e Albrecht, 1989).

Reator Enzimático

$T_{\text{vapor,R}} = 169,95 \text{ }^\circ\text{C}$  (Perry e Green, 1997).

R-101:  $T_R = 50 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tardioli, 2003).

R-102:  $T_R = 55 \text{ }^\circ\text{C}$  (Galvão, 2004).

R-103:  $T_R = 45 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tardioli, 2003).

Evaporador

$T_{\text{vapor,EV}} = 132,84 \text{ }^\circ\text{C}$  (Earle, 1983).

EV-101:  $T_{\text{EV}} = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_7 = 0,18$ ;  $x_{11} = 0,4$  (Písecký, 2005).

EV-102:  $T_{\text{EV}} = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_{17} = 0,18$ ;  $x_{18} = 0,4$  (Písecký, 2005).

EV-103:  $T_{\text{EV}} = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_{28} = 0,06$ ;  $x_{29} = 0,4$  (Písecký, 2005).

Secador por Atomização

$T_{\text{amb}} = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

$T_{\text{ar}}^{\text{I}} = 180 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_{\text{ar}}^{\text{II}} = 70 \text{ }^\circ\text{C}$  (Büchi, 2002).

SD-101:  $T_{12} = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_{13} = 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_{12} = 0,4$ ;  $x_{13} = 0,91$  (Písecký, 2005).

SD-102:  $T_{19} = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_{20} = 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_{19} = 0,4$ ;  $x_{20} = 0,91$  (Písecký, 2005).

SD-103:  $T_{30} = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $T_{31} = 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_{30} = 0,4$ ;  $x_{31} = 0,91$  (Písecký, 2005).

**A.7.2 – Critérios e Equações para Avaliação Econômica**

- operação da planta:  $24 \text{ h.dia}^{-1}$ ,  $365 \text{ dia.ano}^{-1}$ ;

- tempo de vida do projeto: 15 anos;

- impostos: 15% sobre as vendas e 30% sobre o rendimento líquido (valores próximos aos pagos no país pelas indústrias alimentícias); No caso da produção de BTPhe, produto

farmacêutico com demanda porém não produzido no país, adotou-se impostos de 5% sobre as vendas e 25% sobre o rendimento líquido.

Estimativa do Investimento em Capital Fixo – ICF

$$ICF = 4,13 \sum_{i=1}^{n_{eq}} C_{eq}^i \text{ (Peters e Timmerhaus, 1991)}$$

Sendo:  $n_{eq}$  – o número total de equipamentos considerados para avaliação econômica da planta;  $C_{eq}^i$  – o custo do equipamento  $i$  (entregue no sítio de produção).

Estimativa do Custo Operacional Total - COT

$$COT = 1,23 \cdot \sum_{i=1}^{n_{eq}} CO_i + 0,189 \cdot ICF + 2,73 \cdot CMO \text{ (Turton et al., 1998)}$$

Sendo:  $CO_i$  – o custo operacional de cada equipamento (manutenção, eletricidade, vapor, etc.);  $CMO$  – o valor despendido com mão-de-obra.

Valor despendido com mão-de-obra - CMO

O número de operários por turno  $NOpT$  foi estimado com base na Tabela A.2:

**Tabela A.2:** Valores para estimativa do número de operários por equipamento por turno (Turton et al., 1998; Peters e Timmerhaus, 1991).

Equipamento	Operário por Equipamento por Turno
Tanque de Armazenamento	0
Evaporador	0,1
Sistema de Filtração	0,25
Trocador de Calor	0,3
Secador por Atomização	1
Reator (batelada)	1

$$CMO = 4,5 \cdot NOpT \cdot Salário_{Ano} \text{ (Turton et al., 1998)}$$

Sendo:  $NOpT$  – o número de operário por equipamento por turno;  $Salário_{Ano}$  – o montante despendido por operário em um ano de trabalho, assumindo o pagamento de US\$ 3 por hora de trabalho:

$$Salário_{Ano} = 3 \frac{US\$}{hora} \cdot 8 \frac{hora}{dia} \cdot 24 \frac{dia}{mês} \cdot 12 \frac{mês}{ano} = 6912,00 \frac{US\$}{ano}$$

Limites de Mercado

-  $LM_{CPS} = 2,76 \times 10^6 \text{ kg} \cdot \text{ano}^{-1}$  (<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>).

-  $LM_{HPS} = 3,05 \times 10^5 \text{ kg} \cdot \text{ano}^{-1}$  (<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>).

-  $LM_{BTPhe} = 3,32 \times 10^4 \text{ kg.ano}^{-1}$ ; com taxa de incidência média para a PKU de 1 em cada 10000 recém nascidos (Mira e Marquez, 2000), estimou-se o consumo no país de 0,5 kg por mês para crianças portadoras de PKU entre 0 e 14 anos (aproximadamente 29% do total da população brasileira; <http://www.ibge.gov.br>).

### A.7.3 – Preços de Utilidades, Enzimas e Produtos

Os preços de utilidades listados foram atualizados para o ano de análise de acordo com índices apropriados.

$$\text{Preço}_{ar} = 0,006 \text{ US}\$.kg_{ar}^{-1} \text{ (Peters e Timmerhaus, 1991).}$$

$$\text{Preço}_{eletricidade} = 0,08 \text{ US}\$.kWh^{-1} \text{ (Peters e Timmerhaus, 1991).}$$

$$\text{Preço}_{vapor} = 0,01 \text{ US}\$.kg_{vapor}^{-1} \text{ (Peters e Timmerhaus, 1991).}$$

$\text{Preço}_{gel} = 584,00 \text{ US}\$.kg_{gel}^{-1}$  (80 % do preço referente à maior quantia disponibilizada comercialmente pela empresa, consulta à empresa Main Technology, São Paulo , SP, código do produto CL6B200).

$\text{Preço}_{Alcalase} = 0,13 \text{ US}\$.U_{BAEE}^{-1}$  (80 % do preço referente à maior quantia disponibilizada comercialmente pela empresa, consulta à empresa Main Technology, São Paulo , SP, código do produto P4860).

$\text{Preço}_{Quimotripsina} = 1,14 \text{ US}\$.mg_{Quimotripsina}^{-1}$  (80 % do preço referente à maior quantia disponibilizada comercialmente pela empresa, consulta à empresa Main Technology, São Paulo , SP, código do produto C3142).

$\text{Preço}_{CPA} = 0,03 \text{ US}\$.U_{H-PHE}^{-1}$  (80 % do preço referente à maior quantia disponibilizada comercialmente pela empresa, consulta à empresa Main Technology, São Paulo , SP, código do produto C9268).

$$\text{Preço}_{Lactose} = 0,43 \text{ US}\$.kg_{Lactose}^{-1}.$$

$$\text{Preço}_{CPS} = 5,73 \text{ US}\$.kg_{CPS}^{-1}.$$

$$\text{Preço}_{HPS} = 23,57 \text{ US}\$.kg_{HPS}^{-1}.$$

$$\text{Preço}_{OBTPhe} = 400,00 \text{ US}\$.kg_{BTPhe}^{-1}.$$

### A.7.4 – Propriedades Físicas das Substâncias

#### Capacidade Calorífica

$$C_{p_{ar}} = 961,8 \cdot 10^{-3} + 1,648 \cdot 10^{-4} \cdot T - 458,7 \cdot T^{-2}; \text{ kJ.kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}; T \text{ em kelvins (Smith et al., 2000).}$$

$$Cp_{\text{água}} = 4,023 + 5,774 \cdot 10^{-4} \cdot T - 8,314 \cdot 10^{-8} \cdot T^{-2}; \text{ kJ.kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}; T \text{ em kelvins (Smith et al., 2000).}$$

$$Cp_{\text{vapor}} = 1,602 + 6,697 \cdot 10^{-4} \cdot T - 5588,9 \cdot T^{-2}; \text{ kJ.kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}; T \text{ em kelvins (Smith et al., 2000).}$$

$$CP_{\text{soro}}(T, x) = 1,505 \cdot x + 1,958 \cdot 10^{-3} \cdot x \cdot T - 1,526 \cdot 10^{-6} \cdot x \cdot T^2 + CP_{\text{água}}(T) \cdot (1 - x); \text{ kJ.kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}; T \text{ em Kelvins; } x \text{ é o teor de sólidos totais – massa de sólido por massa total da suspensão (Singh e Heldman, 2001)}$$

#### Coefficiente Global de Transferência de Calor

$$U_E = 9900 \text{ kJ.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1} \text{ (Biegler et al., 1997).}$$

$$U_R = 4590 \text{ kJ.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1} \text{ (Perry e Green, 1997).}$$

$$U_{EV} = 21600 \text{ kJ.h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-1} \text{ (Earle, 1983).}$$

#### Calor Latente Específico de Vaporização

$$\lambda_{\text{vapor,E}} = 2048,08 \text{ kJ.kg}^{-1} \text{ (Smith et al., 2000).}$$

$$\lambda_{\text{vapor,R}} = 2048,08 \text{ kJ.kg}^{-1} \text{ (Smith et al., 2000).}$$

$$\lambda_{\text{vapor,EV}} = 2165,32 \text{ kJ.kg}^{-1} \text{ (Smith et al., 2000).}$$

$$\lambda_{\text{vapor,0}^\circ\text{C}} = 2502 \text{ kJ.kg}^{-1} \text{ (Masters, 1979).}$$

#### Densidade do soro

$$\rho_{\text{soro}}(T) = 1045,14 - 0,37 \cdot T; \text{ kg.m}^{-3}; T \text{ em } ^\circ\text{C} \text{ (Padilla, 2007).}$$

## Anexo B

### Listagem dos Métodos de Otimização Estocásticos

Abaixo são listados, em linguagem FORTRAN, os três métodos de otimização utilizados: evolução diferencial, enxame de partículas e *simulated annealing*.

#### B.1 – Evolução Diferencial

```

subroutine DE(nE,Xglobal,iD,Cglobal,it,zTempo,Cprog,fParcial)
  IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
  PARAMETER(NVec1=20,NVec2=620,NVec3=6e3)
  Parameter(mP = 150)
  dimension alb(NVec1),aub(NVec1),X(mP,NVec1),Par(NVec1),C(mP)
  dimension ind(mP),Xglobal(NVec1),Xn(NVec1),Xt(mP,NVec1),ob(NVec1)
  dimension aUBT(mP,NVec1),aLBT(mP,NVec1),Cprog(NVec3),fParcial(10)
  dimension Cparcial(mP,10),Caux(10)
c   Variables for subroutine date_and_time

  integer time_array_0(8), time_array_1(8)
  real start_time, finish_time

  OPEN(unit=1,File='fiddleDE.txt',STATUS='OLD')
    read(1,*) iD, iPop
    read(1,*) (alb(i),i=1,iD)
    read(1,*) (aub(i),i=1,iD)
    read(1,*) itMax,fMin,maxiCR
    read(1,*) iCR
    read(1,*) ibest
    read(1,*) CR
    read(1,*) F
    read(1,*) (ob(i),i=1,iD)
    read(1,*) porc1,porc2
  close(1)

  maxItDec = nint(1.5d0*dble(maxiCR))

c   gera limites
  do i = 1,iPop
    cond = geraRandom()
    do j = 1,iD
      if (cond.le.porc2) then
        aLBT(i,j) = alb(j)
        aUBT(i,j) = aub(j)
      else
        aLBT(i,j) = (1.d0 - porc1)*ob(j)
        aUBT(i,j) = (1.d0 + porc1)*ob(j)
      end if
    end do
  end do

c   gera populacao X
  do i = 1,iPop
    cond = geraRandom()
    do j = 1,iD
      X(i,j) = aLBT(i,j) + (aUBT(i,j) - aLBT(i,j))*geraRandom()
      Par(j) = X(i,j)
    end do
  end do

c   avalia individuo
  call funcaoI(iD,alb,aub,Par,soma,Caux)
  C(i) = soma
  do k = 1,NE

```

```

                Cparcial(i,k) = Caux(k)
            end do
        end do

c   encontra melhor
    call sort(C,iPop,ind)
    if (ibest.gt.0) then
        ibest = ind(1)
    end if
    Cglobal = C(ind(1));
    do j = 1,iD
        Xglobal(j) = X(ind(1),j)
    end do
    do k = 1,nE
        fParcial(k) = Cparcial(ind(1),k)
    end do

    OPEN(unit=10,File='Xglobal.dat',STATUS='unknown')
    write(10,1) (Xglobal(j),j=1,iD)
    close(10)
1   FORMAT(15(E11.6, 2X))

    istop = 0
    it = 1
    itDec = 1
    iM = 30

    zTempo = 0.d0

    do while (istop.eq.0)

        call date_and_time(values=time_array_0)
        start_time = time_array_0 (5) * 3600 + time_array_0 (6) * 60
        #      + time_array_0 (7) + 0.001 * time_array_0 (8)

        if (it.ge.iM) then
            iM = iM + 30
            write(*,*) it,Cglobal
        end if

        if (it.le.NVec3) then
            Cprog(it) = Cglobal
        else
            do i = 1,NVec3-1
                Cprog(i) = Cprog(i+1)
            end do
            Cprog(NVec3) = Cglobal
        end if

c       do i = 1,iPop
            Seleciona 3 individuos distintos
            ia = i
            do while((ia == i).or.(ib == i).or.(ic == i).or.
#          (ia == ib).or.(ib == ic).or.(ic == ia))
                ia = nint(1.d0 + (dble(iPop) - 1.d0)*geraRandom())
                ib = nint(1.d0 + (dble(iPop) - 1.d0)*geraRandom())
                ic = nint(1.d0 + (dble(iPop) - 1.d0)*geraRandom())
            end do
c       Realiza Mutacao e Crossover
            p = geraRandom()
            if (iCR.eq.0) then
                if (p.lt.CR) then
                    if (ibest.gt.0) then
                        do j = 1,iD
                            Xn(j) = X(ibest,j) + F*(X(ib,j) - X(ic,j))
                        end do
                    else
                        do j = 1,iD
                            Xn(j) = X(ia,j) + F*(X(ib,j) - X(ic,j))
                        end do
                    end if
                else
                    do j = 1,iD
                        Xt(i,j) = X(i,j)
                    end do
                    ir = nint(1.d0 + (dble(iD) - 1.d0)*geraRandom())

```

## Anexo B: Listagem dos Métodos de Otimização Estocásticos

```

        if (ibest.gt.0) then
            Xt(i,ir) = X(ibest,ir) + F*(X(ib,ir) - X(ic,ir))
        else
            Xt(i,ir) = X(ia,ir) + F*(X(ib,ir) - X(ic,ir))
        end if
    end if
else
    if (ibest.gt.0) then
        do j = 1,iD
            Xn(j) = X(ibest,j) + F*(X(ib,j) - X(ic,j))
        end do
    else
        do j = 1,iD
            Xn(j) = X(ia,j) + F*(X(ib,j) - X(ic,j))
        end do
    end if
    ir = nint(1.d0 + (dble(iD) - 1.d0)*geraRandom())
    do j = 1,iD
        Xt(i,j) = Xn(j)
        if ((p.ge.CR).or.(j.ne.ir)) then
            Xt(i,j) = X(i,j)
        end if
    end do
end if
c      checa limites
      do j = 1,iD
        if (Xt(i,j).lt.alb(j)) then
            Xt(i,j) = aLBT(i,j)
        elseif (Xt(i,j).gt.aub(j)) then
            Xt(i,j) = aUBT(i,j)
        end if
      end do
end do

c      Realiza Selecao para a proxima geracao

      do i = 1,iPop
        do j = 1,iD
            Par(j) = Xt(i,j)
        end do
c      avalia individuo
        call funcaoI(iD,alb,aub,Par,soma,Caux)
        Ctemp = soma

c      se estiver na restricao - penaliza fobj
        iPen = 0
        do j = 1,iD
            if (Xt(i,j).le.alb(j)) then
                iPen = 1
            elseif (Xt(i,j).ge.aub(j)) then
                iPen = 1
            end if
        end do
        if (iPen.eq.1) then
            Ctemp = 2*Ctemp
        end if

        if (Ctemp.lt.C(i)) then
            C(i) = Ctemp
            do k = 1,nE
                Cparcial(i,k) = Caux(k)
            end do
            do j = 1,iD
                X(i,j) = Xt(i,j)
            end do
        end if
    end do
c      encontra melhor
    call sort(C,iPop,ind)
    if (ibest.gt.0) then
        ibest = ind(1)
    end if
    Cmin = C(ind(1));
    if (Cmin.lt.Cglobal) then
        itDec = 0
        Cglobal = Cmin
        do j = 1,iD

```

```

        Xglobal(j) = X(ind(1),j)
    end do
    do k = 1,nE
        fParcial(k) = Cparcial(ind(1),k)
    end do
    OPEN(unit=10,File='Xglobal.dat',STATUS='unknown')
    write(10,1) (Xglobal(j),j=1,iD)
    close(10)
    write(*,*) it,Cglobal
end if

it = it + 1
itDec = itDec + 1

if (itDec.ge.maxiCR) then
    if (ibest.gt.0) then
        ibest = 0
    else
        ibest = ind(1)
    end if
end if

if (it.ge.itMax) then
    istop = 1
end if
if (Cglobal.le.fMin) then
    istop = 1
end if
if (itDec.ge.maxItDec) then
    istop = 1
end if

    call date_and_time(values=time_array_1)
finish_time = time_array_1 (5) * 3600 + time_array_1 (6) * 60
#      + time_array_1 (7) + 0.001 * time_array_1 (8)

    zTempo = zTempo + (finish_time - start_time)
end do
it = it - 1

zTempo = zTempo/dbble(it)

return
end subroutine DE

```

## B.2 – Exame de Partículas

```

subroutine PSO(nE,Pglobal,iD,Cglobal,it,zTempo,Cprog,fParcial)
    IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
    PARAMETER(NVec1=20,NVec2=620,NVec3=6e3)
    Parameter(mP = 150)
    dimension alb(NVec1),aub(NVec1),Pi(mP,NVec1),Par(NVec1),C(mP)
    dimension ind(mP),Pglobal(NVec1),X(mP,NVec1),ob(NVec1)
    dimension aUBT(mP,NVec1),aLBT(mP,NVec1),Cprog(NVec3),fParcial(10)
    dimension Cparcial(mP,10),Caux(10),vel(mP,NVec1)
c    Variables for subroutine date_and_time

    integer time_array_0(8), time_array_1(8)
    real start_time, finish_time

    OPEN(unit=1,File='fiddlePSO.txt',STATUS='OLD')
        read(1,*) iD, iPop
        read(1,*) (alb(i),i=1,iD)
        read(1,*) (aub(i),i=1,iD)
        read(1,*) itMax,fMin,maxiCR
        read(1,*) wi_min,wi_max
        read(1,*) c1,c2
        read(1,*) (ob(i),i=1,iD)
        read(1,*) porc1,porc2
    close(1)

    maxItDec = nint(1.5d0*dble(maxiCR))
c    gera limites

```



```

do i = 1,iPop
  cond = geraRandom()
  do j = 1,iD
    if (cond.le.porc2) then
      aLBT(i,j) = alb(j)
      aUBT(i,j) = aub(j)
    else
      aLBT(i,j) = (1.d0 - porc1)*ob(j)
      aUBT(i,j) = (1.d0 + porc1)*ob(j)
    end if
  end do
end do

c  gera populacao Pi e velocidades
do i = 1,iPop
  cond = geraRandom()
  do j = 1,iD
    Pi(i,j) = aLBT(i,j) + (aUBT(i,j) - aLBT(i,j))*geraRandom()
    X(i,j) = Pi(i,j)
    Par(j) = X(i,j)
    vel(i,j) = 0.d0
  end do
c  avalia individuo
  call funcaoI(iD,alb,aub,Par,soma,Caux)
  C(i) = soma
  do k = 1,NE
    Cparcial(i,k) = Caux(k)
  end do
end do

c  encontra melhor
  call sort(C,iPop,ind)

  ibest = ind(1)
  Cglobal = C(ind(1))
  Cmin = Cglobal
  do j = 1,iD
    Pglobal(j) = Pi(ind(1),j)
  end do
  do k = 1,nE
    fParcial(k) = Cparcial(ind(1),k)
  end do

  OPEN(unit=10,File='Pglobal.dat',STATUS='unknown')
  write(10,1) (Pglobal(j),j=1,iD)
  close(10)
1  FORMAT(15(E11.6, 2X))

  istop = 0
  it = 1
  itDec = 1
  iM = 30

  zTempo = 0.d0

  do while (istop.eq.0)

    call date_and_time(values=time_array_0)
    start_time = time_array_0 (5) * 3600 + time_array_0 (6) * 60
    # + time_array_0 (7) + 0.001 * time_array_0 (8)

    if (it.ge.iM) then
      iM = iM + 30
      write(*,*) it,Cglobal
    end if

    if (it.le.NVec3) then
      Cprog(it) = Cglobal
    else
      do i = 1,NVec3-1
        Cprog(i) = Cprog(i+1)
      end do
      Cprog(NVec3) = Cglobal
    end if

    wi = wi_max - (wi_max - wi_min)*dble(it)/dble(itMax)

```

## Anexo B: Listagem dos Métodos de Otimização Estocásticos

```

do i = 1,iPop
c      atualiza posicao e velocidade do individuo
      do j = 1,iD
c
          r1 = geraRandom()
          r2 = geraRandom()
          vel(i,j) = w1*vel(i,j) +
#      c1*r1*(pi(i,j) - X(i,j)) + c2*r2*(Pglobal(j) - X(i,j))
c      #
      checa limites da velocidades - evitar movimentos "bruscos"
          if ((X(i,j) + vel(i,j)).lt.alb(j)) then
              vel(i,j) = alb(j) - X(i,j)
          elseif ((X(i,j) + vel(i,j)).gt.aub(j)) then
              vel(i,j) = aub(j) - X(i,j)
          end if
c
          X(i,j) = X(i,j) + vel(i,j)
          if (X(i,j).lt.alb(j)) then
              X(i,j) = aLBT(i,j)
          elseif (X(i,j).gt.aub(j)) then
              X(i,j) = aUBT(i,j)
          end if
          Par(j) = X(i,j)
      end do
c      checando desempenho do individuo
      call funcaoI(iD,alb,aub,Par,soma,Caux)
c      se estiver na restricao - penaliza fobj
      iPen = 0
      do j = 1,iD
          if (X(i,j).le.alb(j)) then
              iPen = 1
          elseif (X(i,j).ge.aub(j)) then
              iPen = 1
          end if
      end do
      if (iPen.eq.1) then
          soma = 2.d0*soma
      end if
      if (soma.lt.C(i)) then
          C(i) = soma
          do j = 1,iD
              Pi(i,j) = X(i,j)
          end do
          do k = 1,nE
              Cparcial(i,k) = Caux(k)
          end do
      end if
c      checando desempenho do grupo
      if (C(i).lt.Cglobal) then
          ibest = i
          Cglobal = C(i)
          do j = 1,iD
              Pglobal(j) = Pi(i,j)
          end do
      end if

end do

if (Cmin.gt.Cglobal) then
    itDec = 0
    Cmin = Cglobal
    do k = 1,nE
        fParcial(k) = Cparcial(ibest,k)
    end do
    OPEN(unit=10,File='Pglobal.dat',STATUS='unknown')
    write(10,1) (Pglobal(j),j=1,iD)
    close(10)
    write(*,*) it,Cglobal
end if

if (itDec.ge.maxiCR) then
c      perturba novamente populacao
      do i = 1,iPop
          if (i.ne.ibest) then
              cond = geraRandom()
              do j = 1,iD
                  Pi(i,j) = aLBT(i,j) + (aUBT(i,j) - aLBT(i,j))*geraRandom()
                  X(i,j) = Pi(i,j)
              end do
          end if
      end do

```

```

                Par(j) = X(i,j)
                vel(i,j) = 0.d0
            end do
            avalia individuo
            call funcaoI(iD,alb,aub,Par,soma,Caux)
            C(i) = soma
            do k = 1,NE
                Cparcial(i,k) = Caux(k)
            end do
        end if
    end do
end if

it = it + 1
itDec = itDec + 1

if (it.ge.itMax) then
    istop = 1
end if
if (Cglobal.le.fMin) then
    istop = 1
end if
if (itDec.ge.maxItDec) then
    istop = 1
end if

    call date_and_time(values=time_array_1)
finish_time = time_array_1 (5) * 3600 + time_array_1 (6) * 60
#      + time_array_1 (7) + 0.001 * time_array_1 (8)

    zTempo = zTempo + (finish_time - start_time)
end do
it = it - 1

zTempo = zTempo/dbble(it)

return
end subroutine PSO

```

### B.3 – Simulated Annealing

```

subroutine SA(nE,Xopt,iD,Cglobal,it,zTempo,Cprog,fParcial)
    IMPLICIT REAL*8 (A-H,O-Z)
    PARAMETER (NVec1=20,NVec2=620,NVec3=6e3)
    Parameter(mP = 150)
    dimension alb(NVec1),aub(NVec1)
    dimension ind(mP),X(NVec1),Xopt(NVec1),Xn(NVec1),ob(NVec1)
    dimension aUBT(NVec1),aLBT(NVec1),Cprog(100000),fParcial(10)
    dimension Caux(10)
c    Variables for subroutine date_and_time

    integer time_array_0(8), time_array_1(8)
    real start_time, finish_time

    OPEN(unit=1,File='fiddleSA.txt',STATUS='OLD')
        read(1,*) iD
        read(1,*) (alb(i),i=1,iD)
        read(1,*) (aub(i),i=1,iD)
        read(1,*) itMax,fMin,maxiCR
        read(1,*) T0,Tmin
        read(1,*) alpha,aviz,imetDecT
        read(1,*) (ob(i),i=1,iD)
        read(1,*) porc1,porc2
    close(1)

    maxItDec = nint(1.5d0*dble(maxiCR))

c    gera limites
    do j = 1,iD
        aLBT(j) = (1.d0 - porc1)*ob(j)
        aUBT(j) = (1.d0 + porc1)*ob(j)
    end do

    T = T0

```

```

c      avalia fobj
      do j = 1,iD
          X(j) = aLBT(j) + (aUBT(j) - aLBT(j))*geraRandom()
          Xopt(j) = X(j)
      end do
      call funcaoI(iD,alb,aub,Xopt,soma,Caux)
      C = soma
      Cglobal = soma
      do k = 1,NE
          fParcial(k) = Caux(k)
      end do

      OPEN(unit=10,File='Xopt.dat',STATUS='unknown')
      write(10,1) (Xopt(j),j=1,iD)
      close(10)
1     FORMAT(15(E11.6, 2X))

      istop = 0
      it = 1
      itDec = 1
      iM = 300
      aKe = 1.d0
      icontaEven = 2
      zTempo = 0.d0

      viz = aviz

      do while (istop.eq.0)

          call date_and_time(values=time_array_0)
          start_time = time_array_0 (5) * 3600 + time_array_0 (6) * 60
          #      + time_array_0 (7) + 0.001 * time_array_0 (8)

          if (it.ge.iM) then
              iM = iM + 300
              write(*,*) it,Cglobal
          end if

          if (it.le.NVec3) then
              Cprog(it) = Cglobal
          else
              do i = 1,NVec3-1
                  Cprog(i) = Cprog(i+1)
              end do
              Cprog(NVec3) = Cglobal
          end if

c      gera limites
      do j = 1,iD
          cond = geraRandom()
          if (cond.le.porc2) then
              aLBT(j) = alb(j)
              aUBT(j) = aub(j)
          else
              aLBT(j) = (1.d0 - porc1)*ob(j)
              aUBT(j) = (1.d0 + porc1)*ob(j)
          end if
      end do

c      escolhe proximo estado
      if ((viz.gt.0.99d0).and.(viz.lt.10.d0)) then
          if (it.eq.icontaEven) then
              aKe = aKe*alpha
              aK = aKe
              icontaEven = icontaEven + 2
          else
              aK = 1.d0
          end if
      end if

      do j = 1,iD
          xp = - 987.d0
          iTent = 1
          do while (xp.eq.-987.d0)
              if (viz.lt.0.99d0) then
                  xp = X(j) + (-viz + 2.d0*viz*geraRandom())*X(j)

```

## Anexo B: Listagem dos Métodos de Otimização Estocásticos

```

        iViz = 1
    elseif ((viz.gt.0.99d0).and.(viz.lt.10.d0)) then
#         xp = X(j) + (0.5d0 - geraRandom())*
            aK*(aub(j) - alb(j))
            iViz = 2
    else
        xp = aLBT(j) + (aUBT(j) - aLBT(j))*geraRandom()
            iViz = 3
    end if
c
    if ((xp.le.alb(j)).or.(xp.ge.aub(j))) then
        xp = -987.d0
    end if
    if (iTent.ge.500) then
        xp = aLBT(j) + (aUBT(j) - aLBT(j))*geraRandom()
    end if
    iTent = iTent + 1
    end do
    Xn(j) = xp
end do

c
avalia novo estado
    call funcaoI(iD,alb,aub,Xn,soma,Caux)
c
se estiver na restricao - penaliza fobj
    iPen = 0
    do j = 1,iD
        if (X(j).le.alb(j)) then
            iPen = 1
        elseif (X(j).ge.aub(j)) then
            iPen = 1
        end if
    end do
    if (iPen.eq.1) then
        soma = 2.d0*soma
    end if
c
    Cn = soma

if (Cn.gt.C) then
    p = dexp(-(Cn-C)/T)
    else
        p = 1.d0
    end if

    if (geraRandom().lt.p) then
        C = Cn
        do j = 1,iD
            X(j) = Xn(j)
        end do
    end if

    if (imetDecT.eq.0) then
        if (it.gt.1) T = T0/dlog(dble(it))
    else
        T = alpha*T
    end if

    if (C.lt.Cglobal) then
        itDec = 0
        Cglobal = C
        do k = 1,nE
            fParcial(k) = Caux(k)
        end do
        OPEN(unit=10,File='Xopt.dat',STATUS='unknown')
        write(10,1) (Xopt(j),j=1,iD)
        close(10)
        write(*,*) it,Cglobal
    end if

c
    if (itDec.ge.maxiCR) then
        muda criteri de perturbaco
        T = T0
        iViz = iViz + 1
        if (iViz.gt.3) then
            viz = aviz
        else
            if (iViz.eq.2) then

```

## Anexo B: Listagem dos Métodos de Otimização Estocásticos

```

                                viz = 1.d0
                                else
                                viz = 99.d0
                                end if
                            end if
                        end if

                    it = it + 1
                    itDec = itDec + 1

                    if (T.lt.Tmin) then
                        istop = 1
                    end if
                    if (it.ge.itMax) then
                        istop = 1
                    end if
                    if (Cglobal.le.fMin) then
                        istop = 1
                    end if
                    if (itDec.ge.maxItDec) then
                        istop = 1
                    end if

                    call date_and_time(values=time_array_1)
                    finish_time = time_array_1 (5) * 3600 + time_array_1 (6) * 60
                    #      + time_array_1 (7) + 0.001 * time_array_1 (8)

                    zTempo = zTempo + (finish_time - start_time)
                end do
                it = it - 1

                zTempo = zTempo/dbble(it)

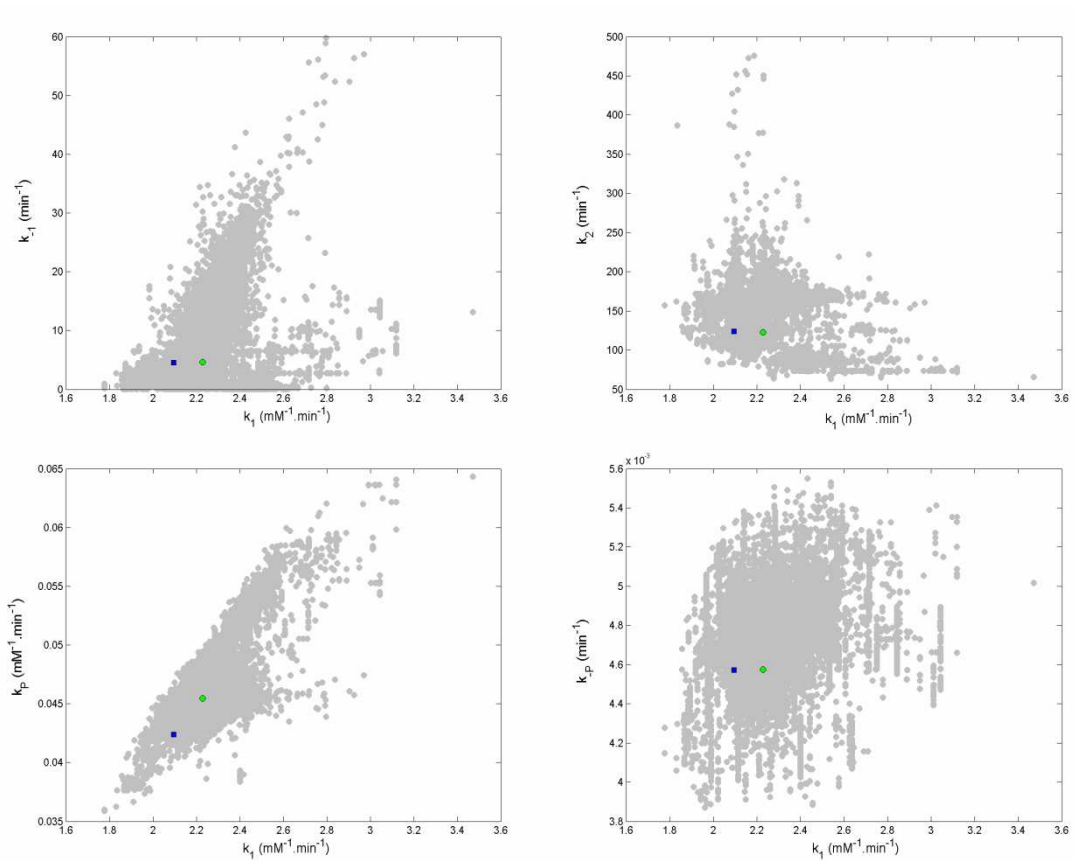
                return
            end subroutine SA
```

## Anexo C

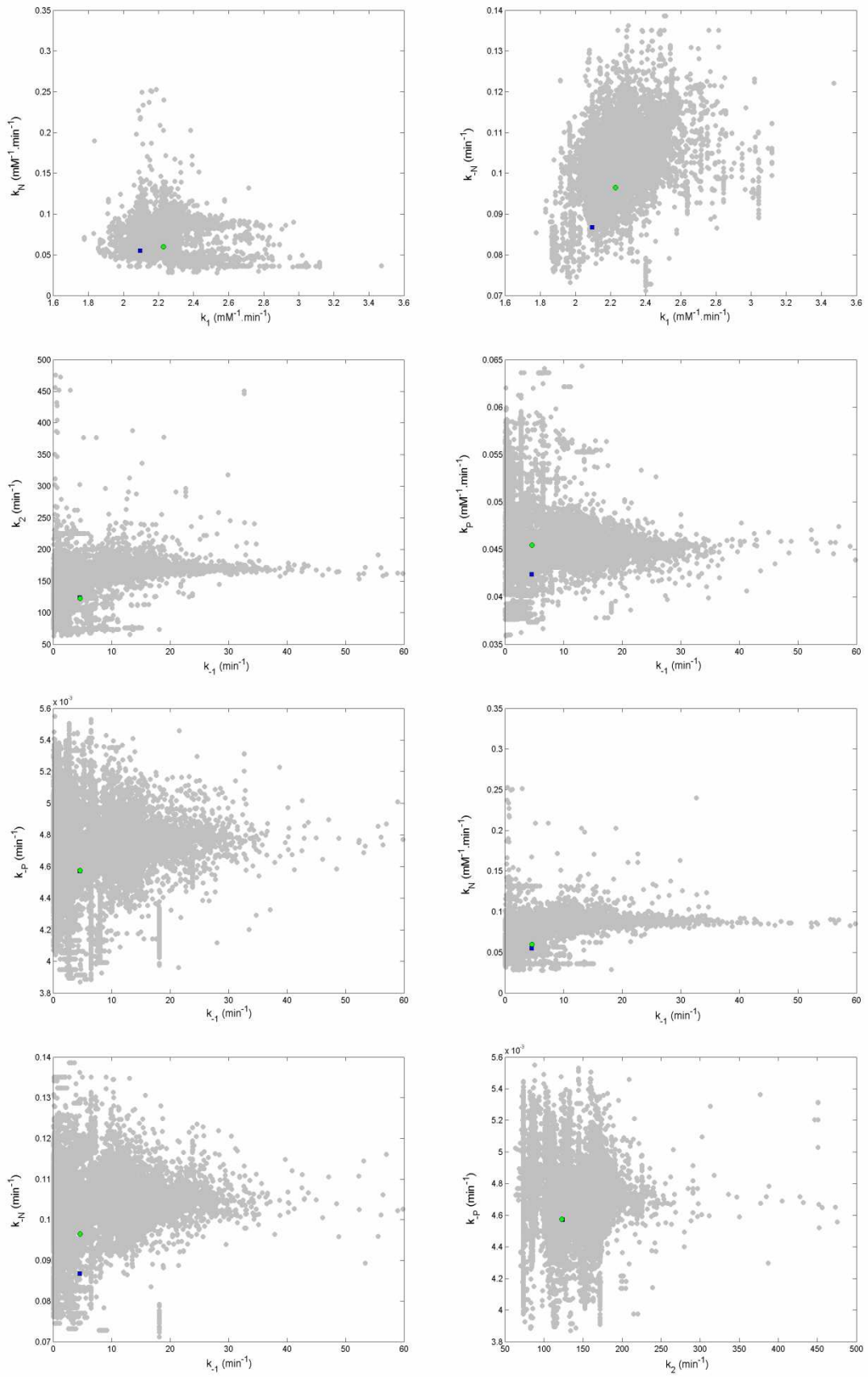
### Regiões de Confiança Paramétrica

#### C.1 – Modelagem Cinética com Derivado de Baixa Carga

Regiões de confiança (95 %) para os parâmetros cinéticos do sistema completo de EDOs (Equações 2.15a a 2.20a) na modelagem com quimotripsina baixa carga. [●] valores ótimos; [■] valores médios calculados via simulações de Monte Carlo. Regiões construídas de acordo com o critério de Beale (Equação 2.38)

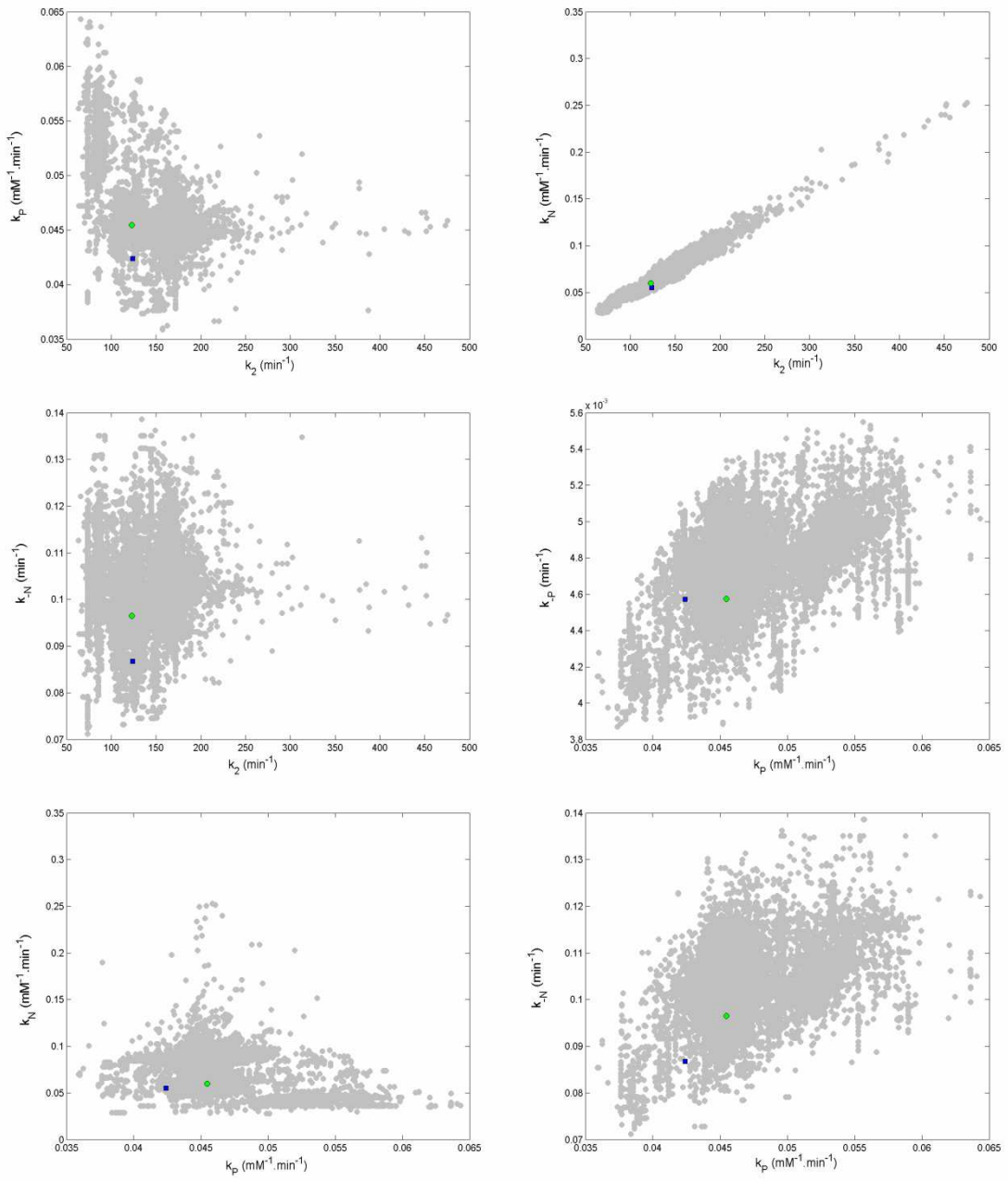


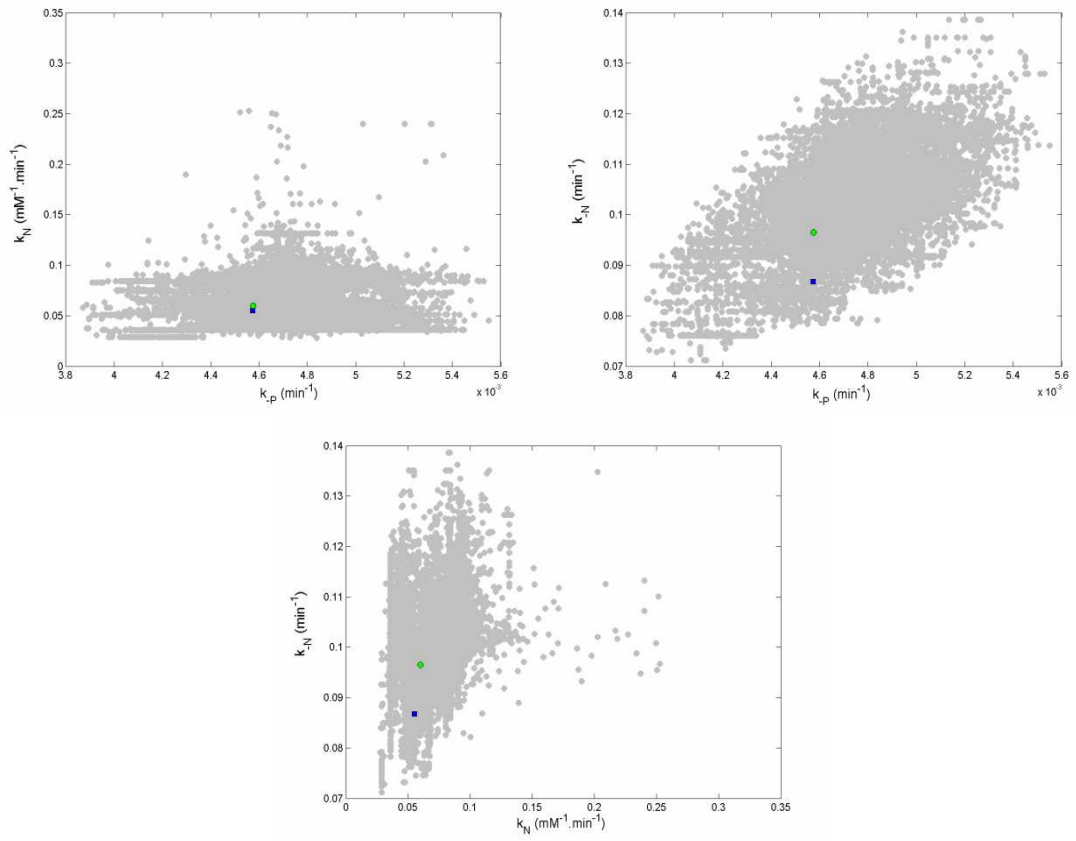
Anexo C: Regiões de Confiança Paramétrica





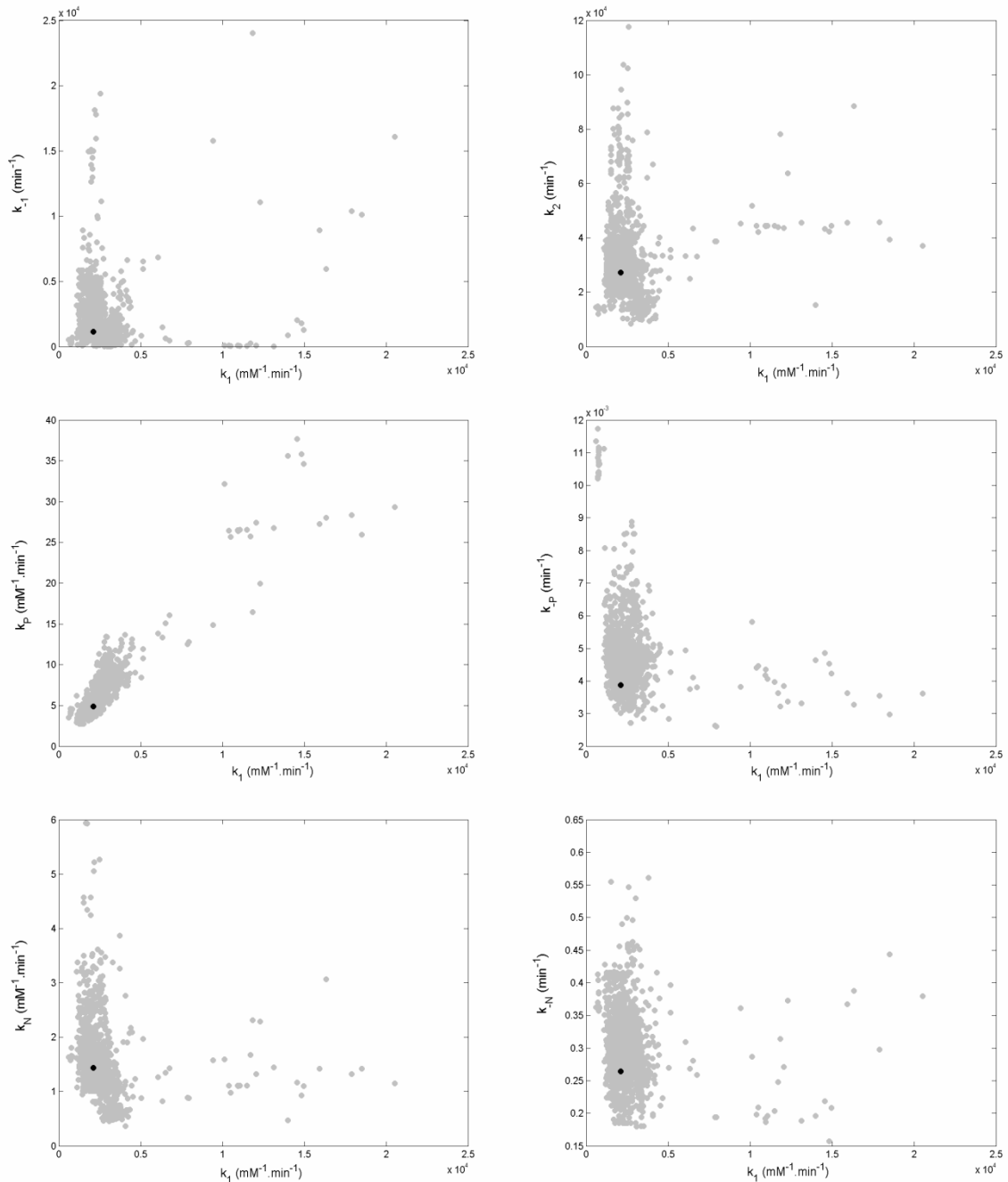
Anexo C: Regiões de Confiança Paramétrica

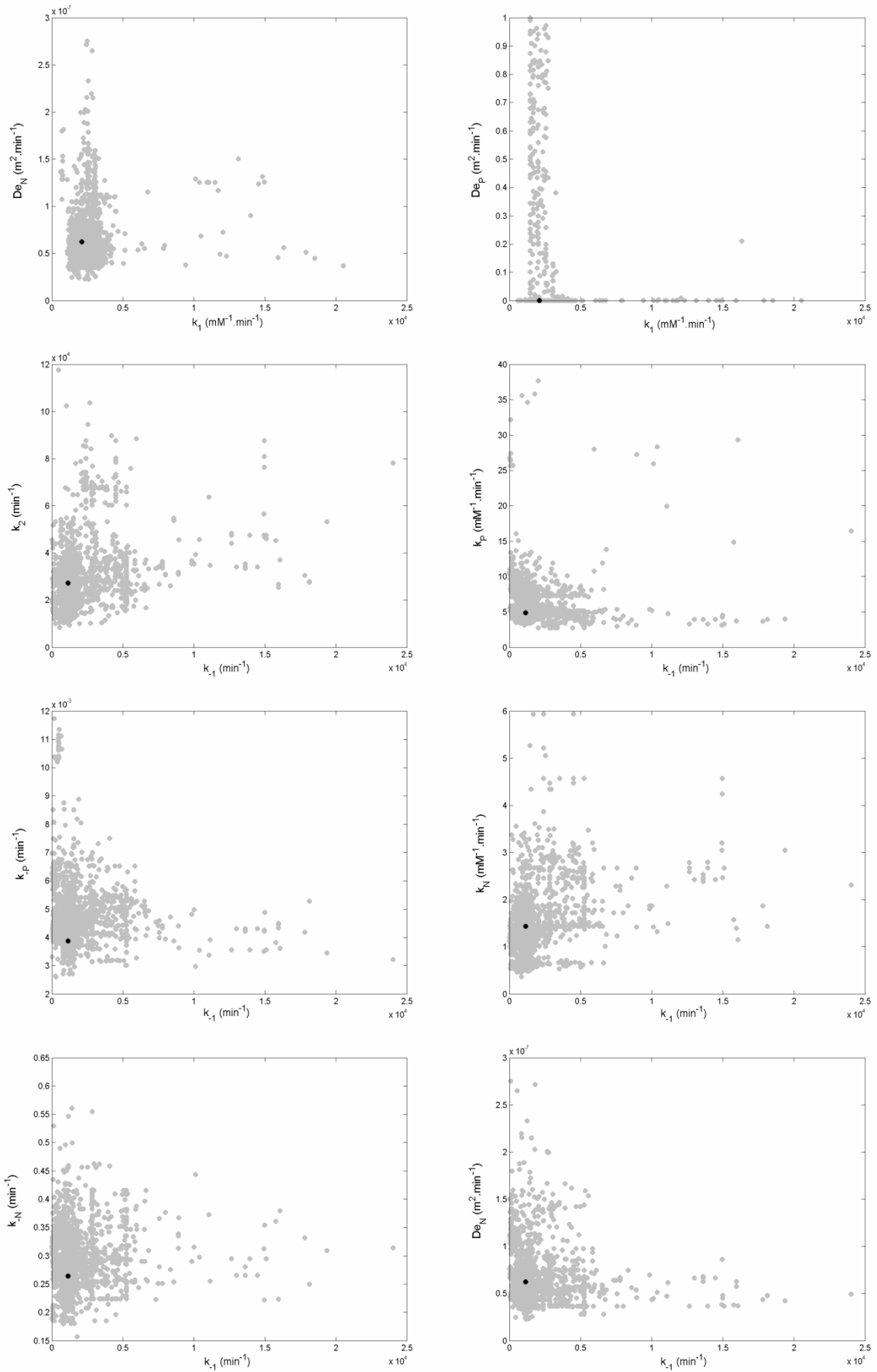


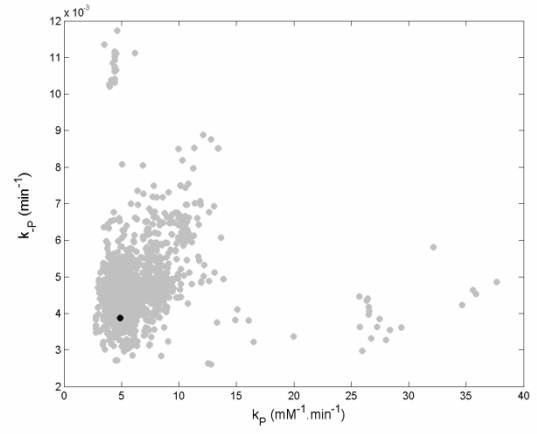
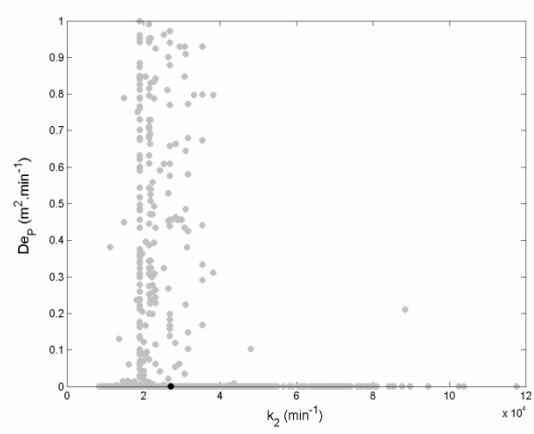
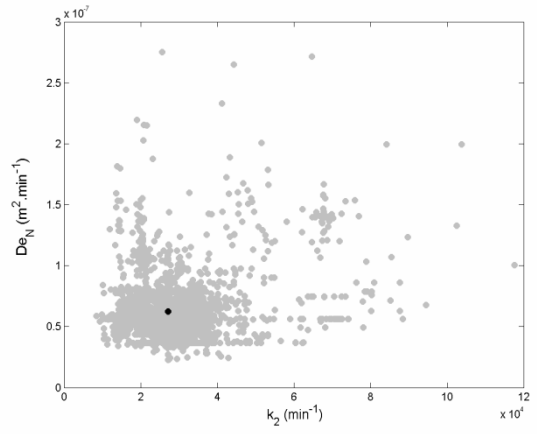
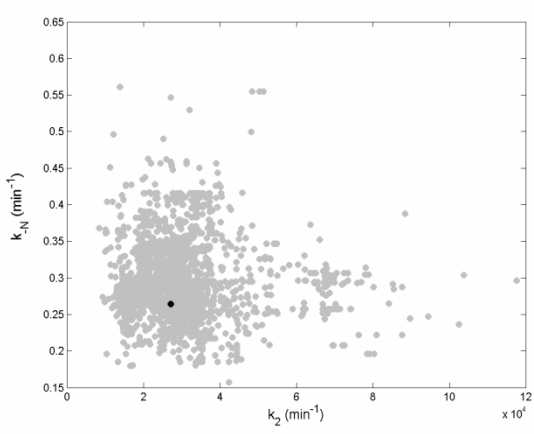
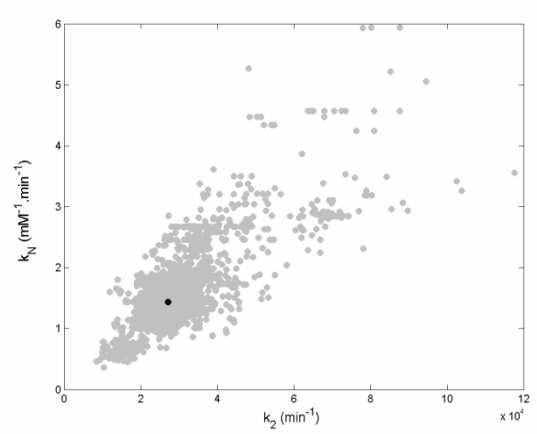
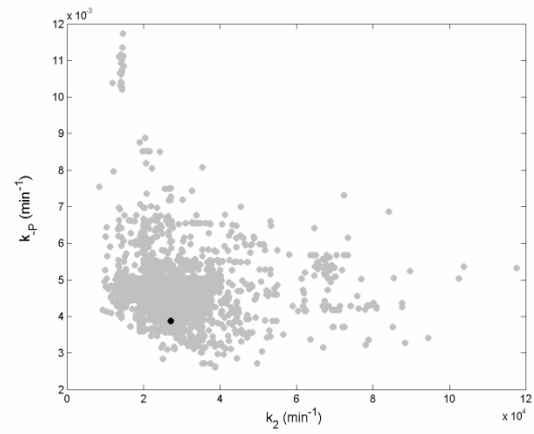
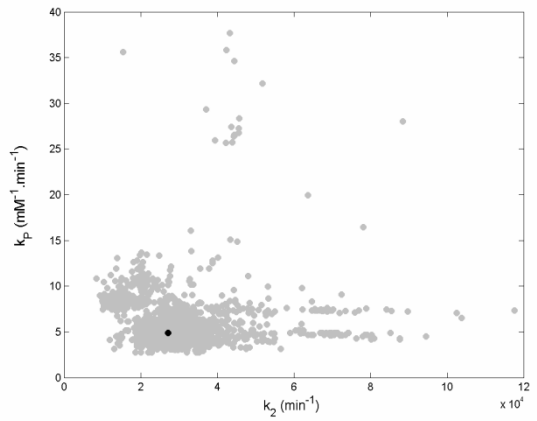
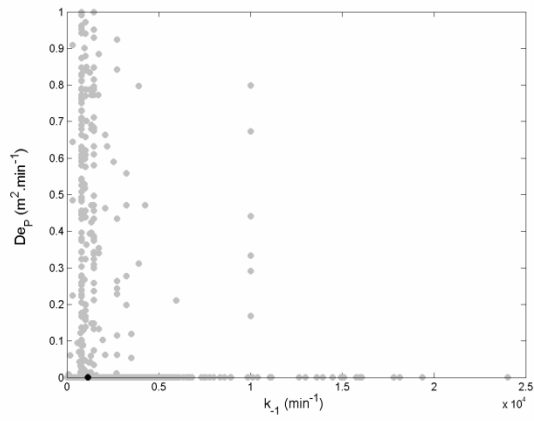


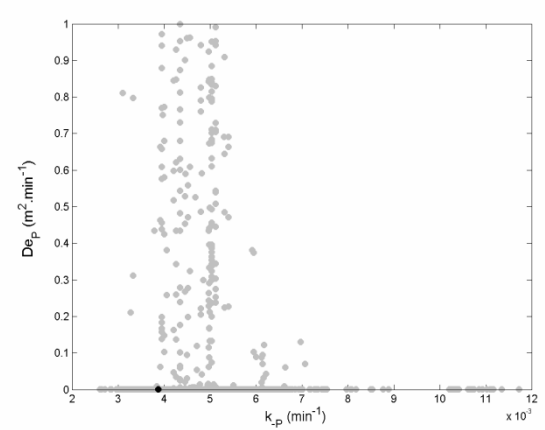
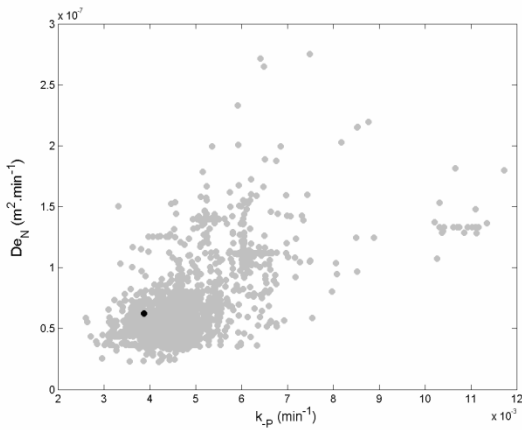
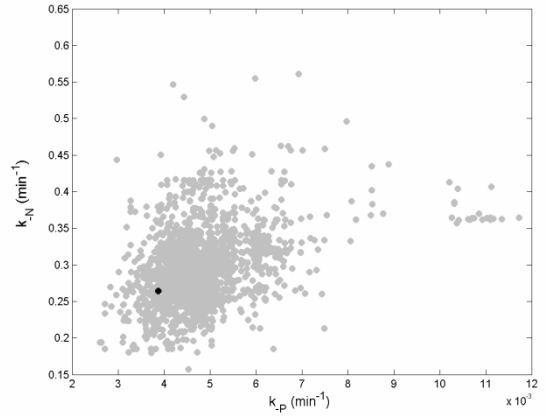
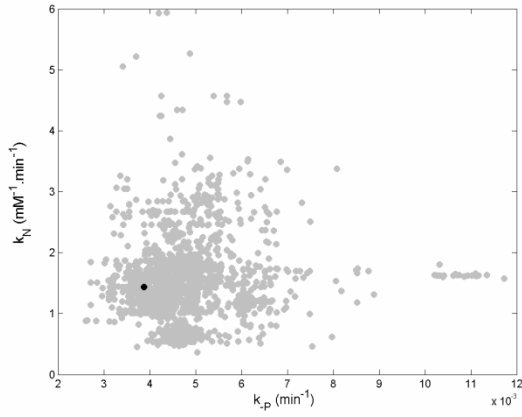
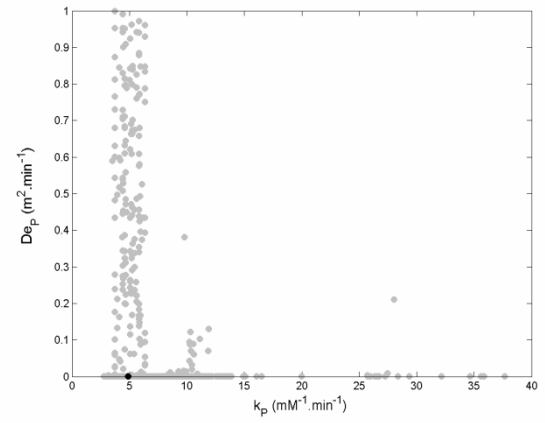
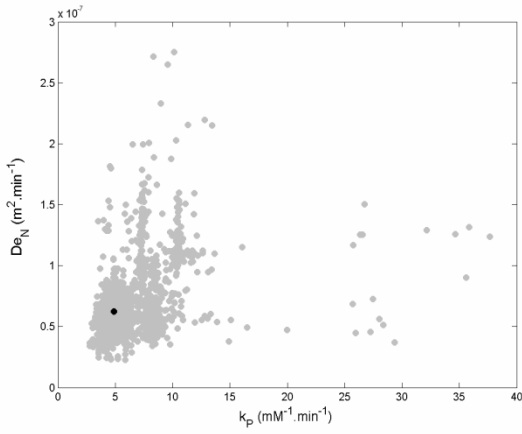
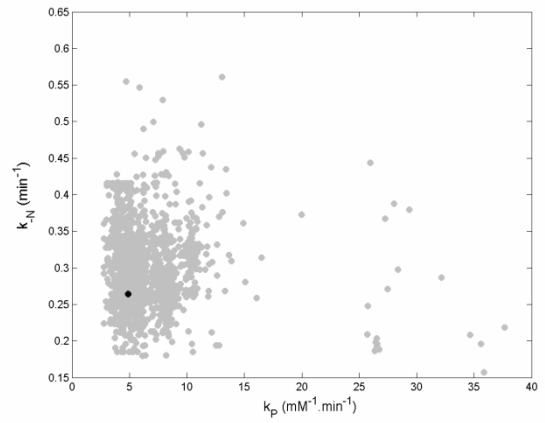
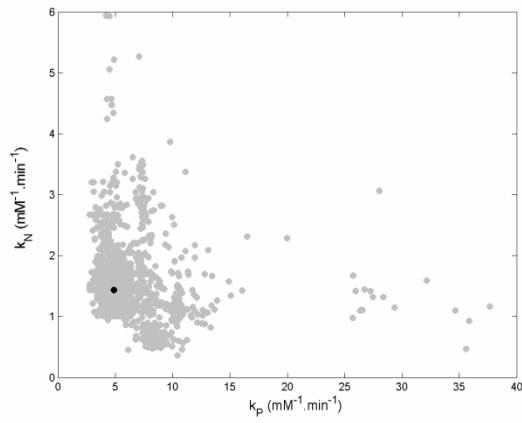
## C.2 – Modelagem com Derivado de Alta Carga – Inclusão dos Efeitos Difusivos Intra-Partícula na Cinética da Reação

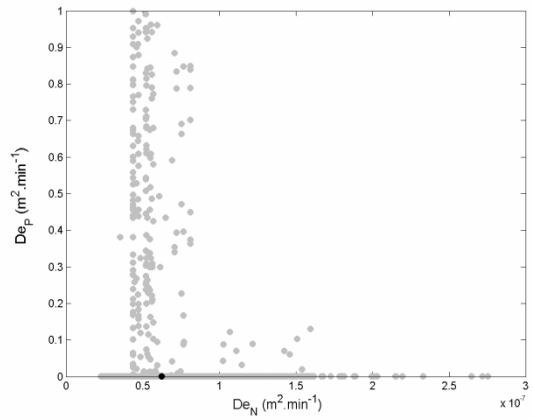
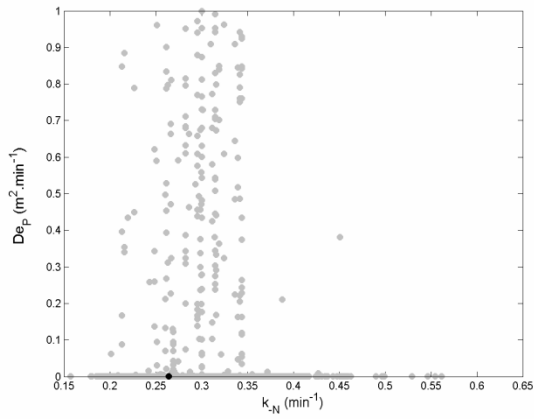
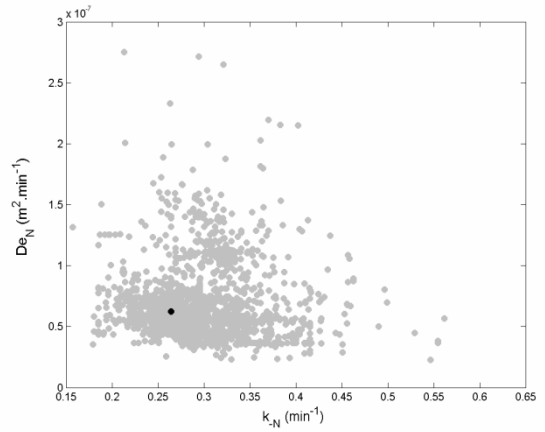
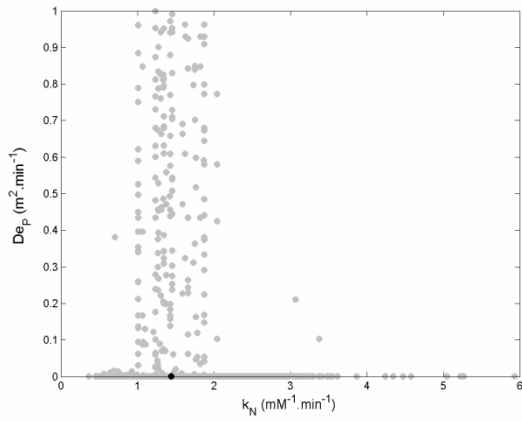
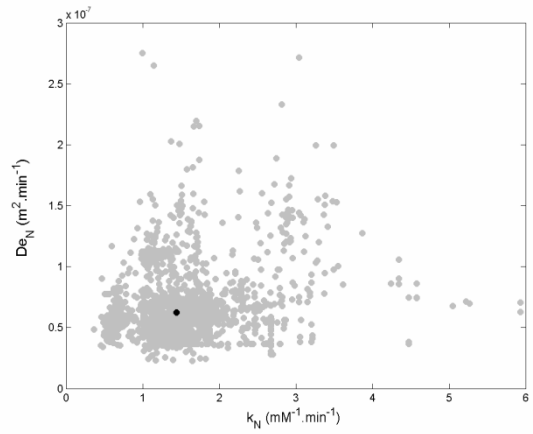
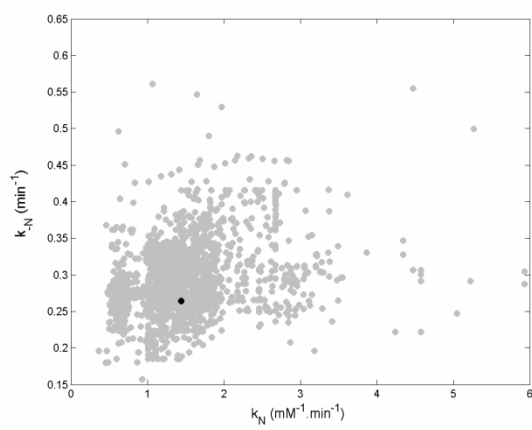
Regiões de confiança (95 %) para os parâmetros cinéticos do sistema completo de EDOs (modelo reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 – velocidades de reação calculadas com equações 2.15 a 2.20) na modelagem com quimotripsina alta carga. [●] valores ótimos. Regiões construídas de acordo com o critério de Beale (Equação 2.38)











## Anexo D

### Perfis Intra-Partícula e Efetividade da Reação

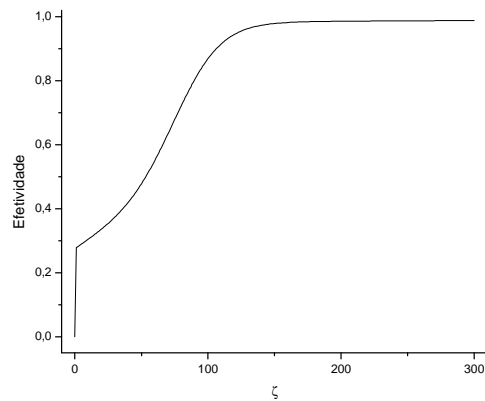
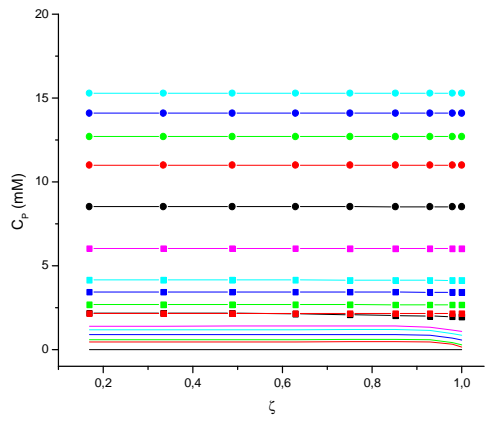
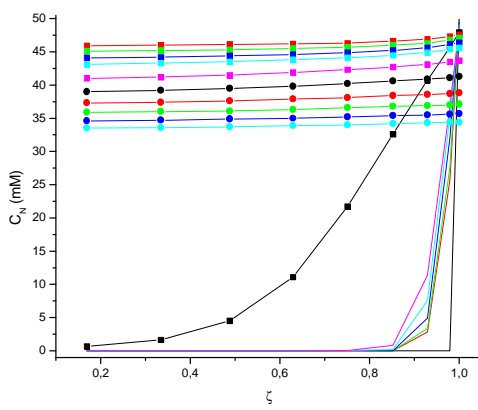
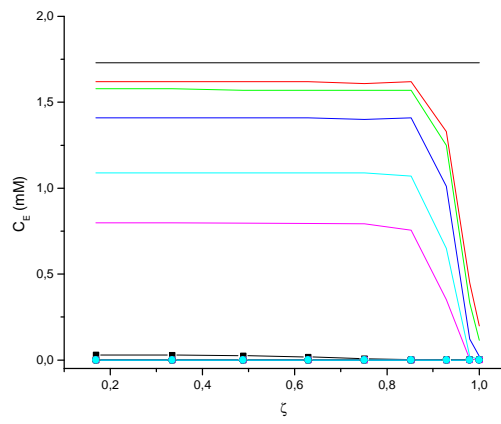
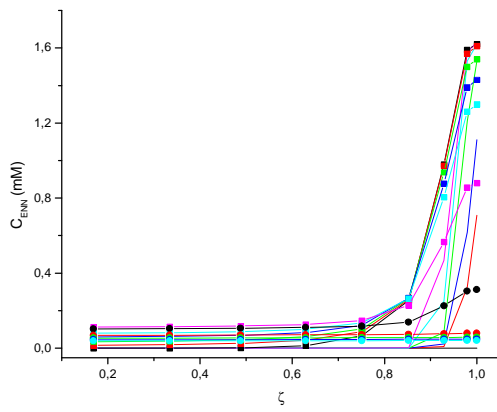
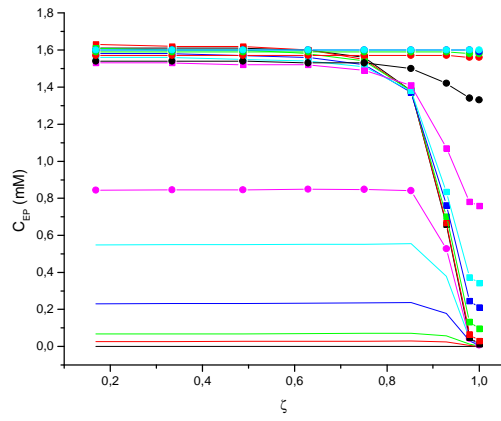
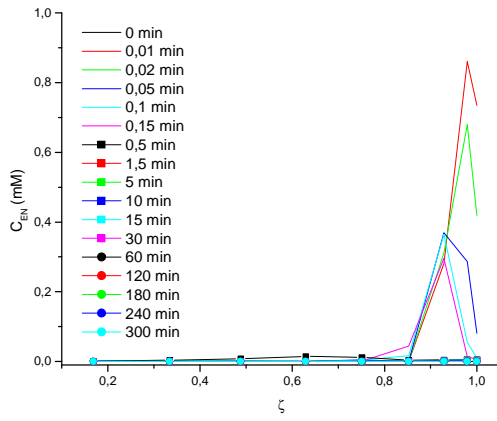
#### Modelagem com Derivado de Alta Carga – Inclusão dos Efeitos Difusivos Intra-Partícula na Cinética da Reação

##### Anexo D.1

Evolução da concentração dos componentes no interior da partícula e efetividade da reação durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato contendo  $29,10 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $0,15 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo: Reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com equações 2.15 a 2.20;  $k_1 = 2,105 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-1} = 1,134 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 2,722 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_p = 4,878 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-p} = 3,875 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,440 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 0,264 \text{ min}^{-1}$ ;  $D_{e,N} = 6,234 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,p} = 9,251 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ).



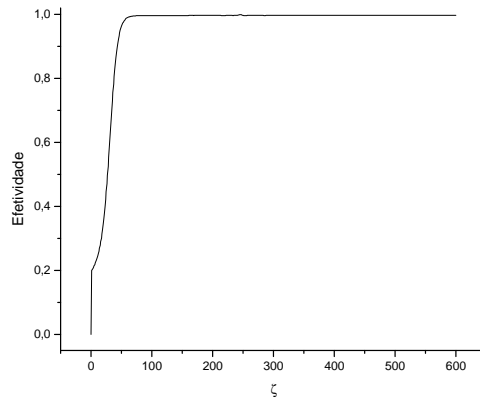
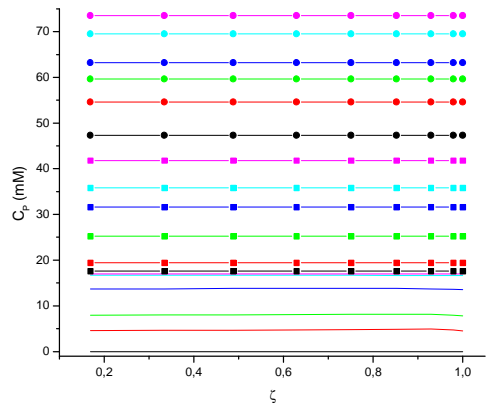
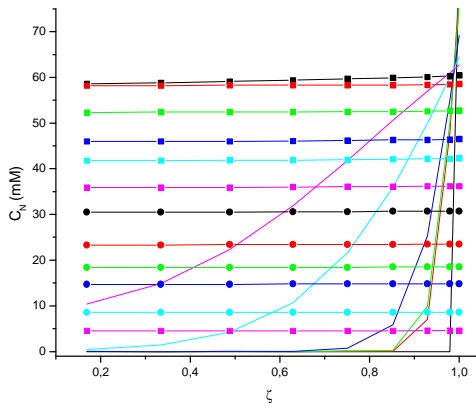
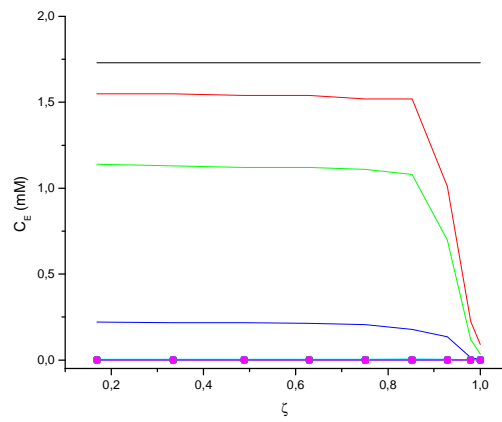
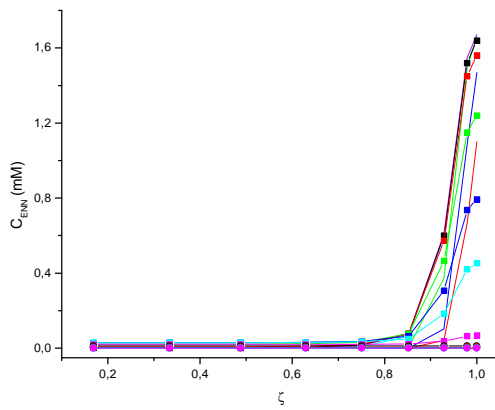
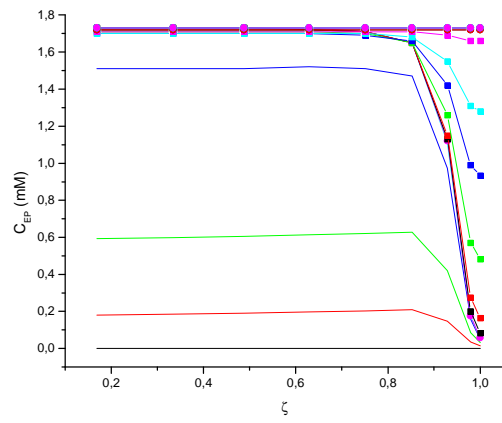
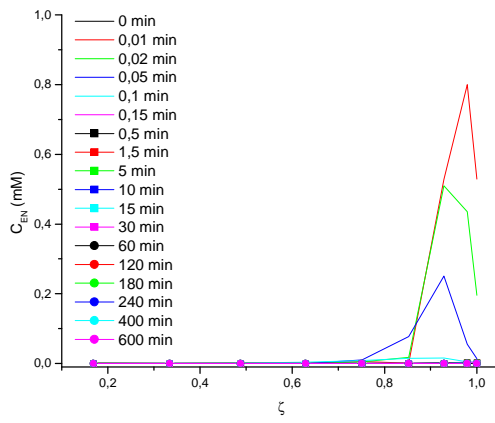
Anexo D: Perfis Intra-Partícula e Efetividade da Reação



## Anexo D.2

Evolução da concentração dos componentes no interior da partícula e efetividade da reação durante hidrólise com quimotripsina-glioxil-agarose ( $40 \text{ mg}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{g}_{\text{gel}}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$ , pH 8,0. Condições da reação: 25 mL de substrato contendo  $50 \text{ g}_{\text{proteína}} \cdot \text{L}^{-1}$  e concentração enzimática de  $4,2 \text{ g}_{\text{quimotripsina}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Modelo: Reativo-difusivo de acordo com equações 2.24 e 2.25 (Velocidades de reação calculadas com equações 2.15 a 2.20;  $k_1 = 2,105 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-1} = 1,134 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_2 = 2,722 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ ;  $k_p = 4,878 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-p} = 3,875 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ;  $k_N = 1,440 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $k_{-N} = 0,264 \text{ min}^{-1}$ ;  $D_{e,N} = 6,234 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  e  $D_{e,p} = 9,251 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ ).

Anexo D: Perfis Intra-Partícula e Efetividade da Reação



## Anexo E

### Pesos das Redes Neurais

A sub-rotina RedeNeural apresentada abaixo, escrita em linguagem Fortran, faz os cálculos referentes ao algoritmo de uma rede neuronal com, no máximo, duas camadas ocultas. Os pesos das redes desenvolvidas ao longo desta tese são lidos de acordo com a estrutura especificada no algoritmo abaixo e são apresentados em seguida nos itens **E.1**, **E.2** e

#### E.3.

```

c      A subrotina RedeNeural calcula o vetor de velocidades
c      rNN com base no vetor de concentracoes cNN e no arquivo
c      de pesos nomeado arqNN (rede com no máximo duas camadas
c      ocultas)
c      Gilson Alexandre Pinto

subroutine RedeNeural(cNN,arqNN,rNN)
  IMPLICIT REAL*4 (A-H,O-Z)
  dimension PE(20,20),PS(20,20),PSi(20,20),
  #b1(20),b2(20),b3(20),cn(2,5),vn(2,5)
  DIMENSION calcul(50),calcu2(50),calcu3(50),calcu4(50),
  #calcu5(50),rNN(10),cNN(20)
c
c      Lendo arquivo de pesos
  open(UNIT=1,FILE=arqNN,STATUS='old')

  read(1,*) iTanf,INco,iLin
  read(1,*) Rnd,Rnu
  read(1,*) Ient,Isneuro,Isai
  do i=1,Isneuro
    read(1,*) (PE(i,j),j=1,Ient)
  end do
  do i=1,Isai
    read(1,*) (PS(i,j),j=1,Isneuro)
  end do
  do i=1,Isneuro
    read(1,*) b1(i)
  end do
  do i=1,Isai
    read(1,*) b2(i)
  end do
  if (INco.NE.1) then
    do i=1,Ient
      read(1,*) (PSi(i,j),j=1,Ient)
    end do
    do i=1,Ient
      read(1,*) b3(i)
    end do
  end if
  do i=1,2
    read(1,*) (cn(i,j),j=1,Ient)
  end do
  do i=1,2
    read(1,*) (vn(i,j),j=1,Ient)
  end do
  close(1)
c
c      Inicializando os calculos
  if (INco.EQ.1) then
    do i=1,Isneuro

```

```

        calcul(i) = 0.0
        do j=1,Ient
            a = Rnd + (Rnu-Rnd)*((cNN(j)-cn(1,j))/(cn(2,j)-cn(1,j)))
            calcul(i) = calcul(i) + PE(i,j)*a
        end do
    end do
else
    do i=1,Ient
        calcul(i) = 0.0
        do j=1,Ient
            a = Rnd + (Rnu-Rnd)*((cNN(j)-cn(1,j))/(cn(2,j)-cn(1,j)))
            calcul(i) = calcul(i) + PSi(i,j)*a
        end do
    end do
c
    do i=1,Ient
        calcul2(i) = calcul(i) + b3(i)
        a = calcul2(i)
        if (iTanf.EQ.1) then
c
            logsig
            if (a.GT.10.0) then
                calcul4(i) = 1.0
            end if
            if (a.LT.-12.0) then
                calcul4(i) = 0.0
            end if
            if (a.GE.-12.0.AND.a.LE.10.0) then
                calcul3(i) = exp(-calcul2(i))
                calcul4(i) = 1.0/(1.0+calcul3(i))
            end if
        else
c
            tansig
            if (a.GT.9.0) then
                calcul4(i) = 1.0
            end if
            if (a.LT.-9.0) then
                calcul4(i) = -1.0
            end if
            if (a.GE.-9.0.AND.a.LE.9.0) then
                calcul3(i) = exp(-2.0*calcul2(i))
                calcul4(i) = (2.0/(1.0+calcul3(i))) - 1.0
            end if
        end if
    end do
c
    do i=1,Isneuro
        calcul(i) = 0.0
        do j=1,Ient
            calcul(i) = calcul(i) + PE(i,j)*calcul4(j)
        end do
    end do
end if
c
c parte comun
    do i=1,Isneuro
        calcul2(i) = calcul(i) + b1(i)
        a = calcul2(i)
        if (iTanf.EQ.1) then
c
            logsig
            if (a.GT.10.0) then
                calcul4(i) = 1.0
            end if
            if (a.LT.-12.0) then
                calcul4(i) = 0.0
            end if
            if (a.GE.-12.0.AND.a.LE.10.0) then
                calcul3(i) = exp(-calcul2(i))
                calcul4(i) = 1.0/(1.0+calcul3(i))
            end if
        else
c
            tansig
            if (a.GT.9.0) then
                calcul4(i) = 1.0
            end if
            if (a.LT.-9.0) then
                calcul4(i) = -1.0
            end if
        end if
    end do
end if

```

```

        end if
        if (a.GE.-9.0.AND.a.LE.9.0) then
            calcul3(i) = exp(-2.0*calcul2(i))
            calcul4(i) = (2.0/(1.0+calcul3(i))) - 1.0
        end if
    end if
end do
c
c
do i=1,Isai
    calcul5(i) = 0.0
    do j=1,Isneuro
        calcul5(i) = calcul5(i) + PS(i,j)*calcul4(j)
    end do
end do
c
do i=1,Isai
    calcul5(i) = calcul5(i) + b2(i)
    if (iLin.EQ.0) then
        a = calcul5(i)
        if (a.GT.10.0) then
            calcul5(i) = 1.0
        end if
        if (a.LT.-12.0) then
            calcul5(i) = 0.0
        end if
        if (a.GE.-12.0.AND.a.LE.10.0) then
            calcul1(i) = exp(-calcul5(i))
            calcul5(i) = 1.0/(1.0+calcul1(i))
        end if
    end if
    rNN(i) = (calcul5(i) - Rnd)*
c      ((vn(2,i)-vn(1,i))/(Rnu-Rnd)) + vn(1,i);
    end do
return
end

```

**E.1 – CPA-Glioxil-Agarose (pH = 7; Temperatura = 45 ° C)**

1	1	0	
5.000000E-02	9.500000E-01		
10	10	10	
4.213206	1.271720	-2.715835	2.709656
-3.703369	1.932930	-6.441335E-01	-3.859890
2.079069E-02	10.386330		
-6.049210E-01	1.579832	-3.186659	2.414440
-10.418000	1.060160	-10.823900	-5.118097
-15.978770	-8.649776E-01		
-3.550748	-2.099662	-3.216420E-01	-2.774394
1.081419	-6.328981	1.262396	-5.241866E-01
4.824316	-2.115103		
7.842891E-01	-3.644273	-10.558880	-10.358910
-7.435627	2.263174E-01	-2.490998	-3.268749E-01
-12.573780	-6.004196		
1.430574	-1.775643	1.580647	-1.337988
-4.976165	-4.379270	-2.110519	-6.380049
-6.062780	-1.073051		
-2.477267	1.436934	-1.816975	4.231415E-01
-1.110189	-8.398830E-01	-9.069557E-02	6.265904
4.495977	9.064788E-01		
-9.181918	-4.598546	-1.179391	-2.413819
2.311785	-2.971571	-3.100085	-2.104200
4.762245	3.787869		
-1.875795	-8.165302E-01	-6.636849E-01	-3.693437
-2.414203	5.534526E-01	2.767008	5.531589E-01
-6.687775	1.440827E-01		
4.358477	4.012197	-3.557867E-01	4.330523
2.667603	-2.286597	1.844895	-1.836901
-4.230150	1.439471		
2.793568	1.267628	-8.969219E-01	2.334861
1.062678	-1.862739	4.307860	1.535574
-2.123102E-01	-3.552613		
1.806097E-01	3.883067E-01	1.312423	-9.626422E-01
8.237411	-9.087519E-02	1.117370	8.421283E-01
1.743643	-4.418038E-01		
6.644259E-01	-1.491744	4.346927	6.785312E-01
3.605050	-4.150719E-01	4.535253	-9.704254E-01
-3.568751	-4.248999		
7.681509E-01	-2.119475E-01	6.382495	-7.785128E-01
1.807454	-1.400063E-02	7.486673	9.890957E-03
-4.672244	-1.895730		
7.945665E-01	4.372757E-01	5.451524	-1.001596
1.938504	-4.987758E-01	-3.152533E-01	3.009299
-4.206204	-1.640617		
1.465241	-6.557646	8.446298	7.213789
-5.210879	-3.279910	-1.473845	1.414797
-9.828373E-01	-6.846255		
9.556462E-01	-3.666259	7.127982	4.786430
-1.744486	-5.276383E-01	-5.613675	-2.213136
-3.787540	1.851074		
9.557332E-01	-5.198433	8.223148	6.620501
-4.138097	-1.266171	-5.054032	2.744570
1.357925	-6.173712		
-5.220941E-01	-2.643364	4.401721	3.929131
2.881932E-01	-1.752485	-1.160765	2.433497
3.617706	-4.139211		
1.414384	7.792297	10.467680	-16.192300
9.552458E-02	-2.188476	-8.952096E-01	3.451782
1.573395	-3.447519E-01		
16.555500	8.821527E-01	-9.873714E-01	-6.584907E-01
8.098193E-01	-8.912293	-4.205778	5.424701E-01
3.503654E-01	3.072248		
-8.309792			
7.701988			
8.944715			
15.314010			
2.266008			
-6.284587			
-12.013330			
-4.629398			
4.368148E-01			

5.856522  
-4.648151  
3.570629  
1.473176  
1.280364  
3.804004  
-3.151711  
-9.009980E-02  
-2.078065  
-5.849867  
-6.074820  
2.518000E-04 3.169000E-04 8.665000E-04 4.649000E-04  
0.000000E+00 1.990000E-10 7.200000E-12 1.310000E-11  
8.460000E-10 2.110000E-10  
6.820000E-03 4.200000E-03 8.280000E-03 2.050000E-02  
2.750000E-03 4.840000E-07 1.870000E-07 2.870000E-07  
6.960000E-07 2.300000E-08  
1.990000E-10 7.200000E-12 1.310000E-11 8.460000E-10  
2.110000E-10 2.180000E-10 0.000000E+00 4.180000E-11  
0.000000E+00 2.300000E-09  
4.840000E-07 1.870000E-07 2.870000E-07 6.960000E-07  
2.300000E-08 5.340000E-08 9.890000E-08 2.430000E-08  
1.380000E-08 2.301000E-09



## E.2 – Quimotripsina-Glioxil-Agarose

### E.2.1 – pH = 7,8; Temperatura = 55 ° C

5.000000E-02	9.500000E-01		
-1.677883	6.014233	8.365363E-01	-4.599048
-1.598183	-3.644733	6.785779E-01	
6.846589E-01	1.628338	-9.798143E-01	-7.001163
-1.719030	-1.194587	-3.559878	
3.419772E-01	-6.650947	2.394373	-1.064590
-4.088585E-01	-3.640205	4.273960	
-5.445166E-01	-4.107765	3.646848	3.395504
3.072716	-1.448817	3.561991	
-4.233484	-4.053345	-3.117074	1.940689
-1.128359	-2.263694	3.391720	
-5.624166	-7.203538	-5.864439	-5.301679
-2.951932	-3.921468	-1.283458	
5.335884	-9.899300E-01	2.079134E-02	3.477078
-8.630743E-01	-2.727818	4.807013	
1.591268	-6.377330	-1.950885	-4.656840
1.056161	-4.912014	-4.851697E-01	
1.168214	-5.107715	2.562969	3.443796
5.230064	1.402282E-01	9.981008E-01	
-4.118772	2.561230	-4.333441	1.714631
5.052908E-01	-5.962746	-5.246872E-01	
-1.728192	-6.897724E-01	-5.340844	1.381816E-01
2.166408	8.430409	-3.804576	
-2.760775	4.240217	-4.505052	-3.194929
-3.712606E-01	1.229819	-4.360832	
-8.957147E-01	3.512269	1.631546	-1.934153E-01
-5.158933E-01	1.965515	3.509439	3.082791
-1.653152	-2.123389	9.109486E-03	-6.001514E-01
2.065277	2.164316	2.890531	1.160781
-2.274445	-1.408156	-1.506454E-01	-7.240742E-02
-1.266815	7.891127E-01	4.526917E-01	2.610529
1.982949	4.163095	-2.242494	-9.566177E-01
2.235357E-01	9.393938E-01	-1.418939	-1.685729
3.672464E-01	-6.298561E-01	-1.738878E-01	3.588359
1.685313	4.489109E-01	1.012037	1.120596
-3.295946	1.665629	1.858713	1.490694
-2.321656	-9.238999E-01	9.708119E-01	-2.831821
2.030553	2.232464	-1.622036	7.156194E-01
-2.035955	-3.463099	2.020712	7.122833E-01
-1.185113	1.685902E-01	9.066982E-01	-1.853261
-7.066685E-02	2.588482	2.101256	5.174722E-01
-1.924051	8.720306E-02	3.533515	-3.627458
3.758115E-01	6.976330E-01	-3.922654	-7.570546E-01
-5.561019E-01	9.501536E-01	-2.015268	-8.184133E-01
-2.624930	-7.917987E-01	-1.379824	9.958876E-03
-4.490722E-01	2.235331	-1.653922	-9.610757E-01
5.962716			
3.098958			
-3.996654			
-2.516151			
7.080585			
7.278984			
-8.341917E-01			
6.518735			
-2.701384			
-5.341710			
-3.368027			
-8.984196E-01			
-4.219466			
-1.040334			
-1.036059			
-1.465476			
-3.438892			
-1.420616			
4.041016			
2.820000	1.660000	9.230000E-01	0.000000E+00
0.000000E+00	1.346000E-04	3.701500E-04	
7.176000	30.900000	13.211000	32.084000
8.945000	1.128300E-01	8.585900E-01	
1.346000E-04	3.701500E-04	2.375300E-04	-4.869360E-04
7.294140E-04	2.503960E-04	2.672210E-05	
1.128300E-01	8.585900E-01	3.083900E-01	1.018840
1.801300E-01	3.959000E-02	9.260000E-03	

**E.2.2 – pH = 8; Temperatura = 55 ° C**

1	1	0	
5.000000E-02	9.500000E-01		
7	12	7	
-1.215336	1.383487	3.887505	1.050828
3.433485	-5.687282	-2.901841	
1.016195	4.061579	-3.758833E-01	3.631804
-5.030750	-5.273041E-01	-3.326333	
-3.688462	-2.366597	-2.506757	-3.427135
2.801521	4.680180	-1.272419	
-2.284348	-4.070833	1.814219	-4.640747
1.421302	1.625721	6.162309	
-4.306392E-02	5.693732	-3.868450E-01	-3.835876
4.024351	2.053919	1.093413E-01	
-2.276128	-3.566390	-5.900193	1.877812
1.958611	6.813741E-01	6.228875	
-2.903534	-2.472918	5.725312	2.388252
2.832939	5.265210E-01	-2.698688	
-3.353659	-1.788298	-4.339347	-2.972535
4.617009	-8.331685E-01	1.683626	
-2.462650	-2.200600	-5.236148	3.334413
1.524943	2.477556	-4.184345	
9.926464E-01	1.369069	1.240289	6.031803
4.320815	-9.693663E-01	1.028415	
4.426609	9.274785E-01	3.108763	-3.401140
-3.781443	2.580342	-4.410612	
-5.460100	-4.884708	2.972940	2.383838
6.960704E-01	4.666465	1.698747	
1.466196	1.862289	-7.640885E-01	1.071304
-1.706854	2.311695E-01	-2.475879	-6.401910E-01
-4.226195	5.136417E-01	-6.745616E-01	-2.334952
2.133573	1.522393	-1.489445E-01	2.514650
1.714951	-1.200102	1.022755	3.072248
-1.524509	-5.075873	8.847204E-01	-1.090495
3.436801	-1.692797	-2.421413	-8.371788E-02
1.950892	-2.008751	-1.915209E-02	-8.760399E-01
-2.348821	-1.282537	-2.431312	-4.852667E-01
9.593842E-01	2.023875	-3.994493E-01	6.558873E-01
5.590711E-01	-1.538198	-2.336035	6.088187E-02
-1.222024	-2.525492	-7.653204E-01	-2.130489E-01
1.367115	-2.191817E-01	-1.741391	4.989508E-01
1.309283	2.160717E-01	1.188482	2.979083E-01
-1.726927	-2.874634	4.983493E-01	-5.139768E-01
1.371727	-6.198944E-01	-2.354259	-2.301559
1.009163	1.967822E-01	-3.024401	-2.437193
-1.584089	1.087067	-2.690310	-1.941770
-1.205694	2.967906	1.542974E-01	-2.131738
1.775307	3.578022	2.041419	-1.083141
-5.273201E-01	-3.825387E-01	6.976761E-01	-2.149361
6.161511			
-3.287114			
7.600046			
-3.405720E-02			
-4.947241			
-2.370928			
2.543773			
4.576272			
5.024492			
-6.898489			
2.434996			
-4.521336			
4.446980			
-2.813476			
3.191331			
3.523374			
2.472561E-01			
8.029398			
-1.567192			
2.707000	1.963000	1.005000	0.000000E+00
0.000000E+00	0.000000E+00	2.573240E-04	
8.252000	30.669000	12.368000	31.842000
8.556000	1.447300E-01	7.832100E-01	
0.000000E+00	2.573240E-04	2.315910E-04	-8.313540E-05
3.721300E-04	9.897070E-05	1.068880E-04	
1.447300E-01	7.832100E-01	2.785400E-01	9.417300E-01
1.975500E-01	5.709000E-02	1.006000E-02	

**E.2.3 – pH = 8,5; Temperatura = 55 ° C**

1	1	0		
5.000000E-02	9.500000E-01			
7	12	7		
-3.212973	3.351962	4.564951	-5.719556	
2.240606	-1.038224	-3.050622		
5.351865E-01	4.925869	-4.193057	2.251774	
2.073573	4.180161	-3.051114		
-2.878675	-1.212721	-4.508536	-2.142233E-01	
-6.053520	-4.730348	-5.614251		
4.041714	2.347837	5.379716E-01	-2.070208	
3.380600	-9.736648E-01	7.627227		
-5.404741	5.074885	-1.536350	3.523705	
-5.420515E-01	1.451094	4.113251		
4.059968	-2.459320	-3.649422	2.915360	
-2.209639	1.600286	7.890189E-01		
3.636109	-4.790565E-01	1.376769	2.192486	
-3.270735	-6.070859	1.387092		
4.664246	5.085733	3.149565	6.407415	
4.586726E-01	3.772716	-4.783250E-02		
-2.229833	1.708382	7.570269	-3.806045	
-1.818797	3.304163E-01	-2.828262		
1.737114	-1.723098	4.075112E-01	-5.100073	
2.340930	5.443461	-1.830086		
3.089803	1.905304	-4.701574	-3.139360	
4.618741	2.515799	-1.311666		
8.140764E-01	-2.848422	1.776450E-01	-5.117127	
-3.873148	3.342298	-6.271718E-02		
-8.033815E-02	1.049533	-2.851091E-01	-2.769112	
-2.483541	1.544165	1.619843	-1.032163	
3.714699	-7.076226E-01	-7.897341E-01	2.159612	
5.779967E-02	-1.766542	1.984539	1.054989	
-1.649230	1.090464E-01	2.353831	-1.485381	
1.973241	3.815674	-1.868549	1.340963	
1.917695	-1.175207	8.539155E-01	-3.923628E-02	
-3.082409	-1.396219	1.693414E-01	-1.330072	
2.982724E-01	-2.281515	3.049977	-5.127621E-01	
9.549074E-02	1.643485E-01	-1.395263	9.238622E-01	
-4.136900	4.909219E-01	2.901083	5.258776E-01	
7.451425E-01	3.588678	1.220467	2.180269E-01	
7.987736E-01	-9.471554E-02	1.157916	8.676322E-01	
-2.157502	-1.172562	5.402955E-01	-2.368152	
2.026633	-9.075288E-01	-3.375517E-01	-8.207828E-01	
-7.120456E-01	-9.922694E-01	2.007961	3.856606E-01	
5.419408E-01	-1.743585	4.827127E-01	2.127587	
5.116526	-1.480304	1.492358E-01	-8.078095E-02	
-1.543274	1.232537	2.033880	3.038727	
-2.023335	-5.568796	1.366327	1.246344	
7.291833E-01	1.107600E-01	-3.415539	-2.503617	
1.719497				
1.542747				
8.009427				
-4.809677				
3.035712E-01				
-2.134140				
1.171419				
-3.912051				
-3.598818				
3.150384				
4.971664				
11.276010				
4.605413E-01				
-2.383171				
3.366765				
-5.723086				
3.704345				
-2.422503				
3.173456				
3.310000	2.441000	1.802000	0.000000E+00	
0.000000E+00	4.552650E-05	5.423590E-04		
9.341000	31.524000	10.422000	31.773000	
7.517000	1.654000E-01	7.774300E-01		
4.552650E-05	5.423590E-04	5.42360E-05	3.642120E-04	
2.117970E-04	6.730010E-05	0.000000E+00		
1.654000E-01	7.774300E-01	1.266800E-01	8.037200E-01	
1.582700E-01	1.017400E-01	5.860000E-03		

### E.3 – Alcalase®-Glioxil-Agarose

#### E.3.1 – pH = 8; Temperatura = 50 ° C

1	1	0		
1.000000E-01	9.000000E-01			
5	9	5		
6.385513E-01	-2.283393	-1.731580	-1.526624	
-2.055434				
10.801950	-9.791729	-6.725467	-6.047884	
-8.546500				
-13.279660	1.222205	12.334760	4.128998	
2.101985				
-3.854560	-3.920434	-8.172451E-01	5.159739	
3.952161				
-4.705935	-1.216802	2.785634	2.604801	
3.891532				
2.631308	-4.279589	-2.899459	-3.228883	
-4.366079				
-3.872866	3.902662	1.223223	-2.064012	
2.293725				
4.790384	-2.876724	-5.655956	-2.118233E-01	
-2.633328				
-2.656864	7.856493E-01	1.501638	2.405533E-01	
-9.504279E-01				
-4.574685E-01	-1.757143	7.294500E-01	1.902119E-01	
1.331055	-4.180579E-01	-7.147949E-01	-7.640586E-01	
-2.792791E-01				
4.574400E-01	3.000686	-9.361959E-02	4.789393E-01	
-1.063866	-3.480639E-01	-1.237488	1.583135E-01	
1.428298				
1.514921E-01	2.322479	2.928976E-01	-2.177103E-01	
-2.810366	-5.205417E-03	4.892973E-01	-2.489405E-01	
-2.212585E-01				
-4.001664E-01	2.699493	-8.459279E-01	-1.649777	
-1.044621	-1.714991	2.351021	1.737267	
1.161486				
-5.007648E-01	-3.774004	-2.806540	-1.320737	
6.612086E-01	-1.387890	1.122355	5.346432	
-7.807614E-01				
-1.440792				
4.788381				
-7.555759				
-2.840669				
-3.159510				
-6.164505E-01				
-3.129603				
1.621517				
-1.981034				
6.333219E-01				
-8.577967E-01				
1.139683E-01				
-1.203456				
3.330521E-01				
14.816480	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
57.784970	13.874910	16.574890	6.891170	
7.559020				
-1.564000E-02	-7.937720E-05	1.863820E-05	2.582080E-05	
3.134880E-05				
-6.166170E-05	8.910000E-03	4.350000E-03	1.480000E-03	
1.510000E-03				

**E.3.2 – pH = 9; Temperatura = 50 ° C**

1	1	0		
1.000000E-01	9.000000E-01			
5	9	5		
1.145417	-2.141669	-2.253353	-1.781758	
-4.274219E-01				
8.555184	-6.197402	-8.691433	-5.722386	
-3.524694				
-4.204931	-5.378277E-02	-1.832778	2.444818	
1.641110				
-3.199549	-10.325950	20.367920	1.929983	
-7.546906				
-22.360970	15.441700	10.463990	8.570043	
4.074683				
3.390458	-6.064963	-4.088509	-3.872643	
-2.460673				
-2.874064	-9.097915E-01	2.594961E-01	-1.176388E-01	
-1.282447E-01				
2.823991	-6.141422	-4.606048	-4.211853	
-2.305172				
-11.477840	-3.461524E-01	6.182339	2.953455	
6.963748				
-1.398939E-01	-1.213864E-01	3.915493E-01	2.373368E-01	
1.151482	-2.546299	-1.633333E-01	-2.673247	
2.186923E-01				
9.222027E-01	-1.697890E-01	1.011145E-01	-5.180829E-01	
-1.564038	2.641196	3.298649E-01	2.545565	
4.197326E-01				
-4.995764E-01	-5.041799E-02	-6.740648E-01	-7.505431E-01	
-8.114612E-01	2.795658	-4.680015E-01	2.983664	
-1.156446E-01				
2.021024	7.091550E-01	-1.274068	-4.993936E-01	
-3.287926E-01	2.401074	-5.287191E-01	2.140964	
1.031564E-01				
2.213742E-01	9.460053E-01	-9.961135E-01	2.126435	
-1.402817	1.302184	4.433134E-01	1.384171	
-2.529678				
-1.296433				
1.746878				
-3.550547				
-1.683501E-01				
-11.567520				
-1.417763				
-3.615541				
-8.335147E-01				
-7.007443				
5.394349E-01				
-4.391239E-01				
-4.309654E-01				
-1.304871				
-2.494974E-01				
9.364600	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
57.008380	12.704310	17.283860	8.639430	
12.618440				
-6.155000E-02	-4.193020E-04	9.536220E-06	4.889300E-05	
4.997160E-05				
-5.363470E-05	2.816000E-02	1.784000E-02	9.370000E-03	
6.200000E-03				

**E.3.3 – pH = 10; Temperatura = 50 ° C**

1	1	0		
1.000000E-01	9.000000E-01			
5	11	5		
-1.351932	5.628580E-01	-6.374769E-01	-7.292402E-01	
-1.860081				
-1.085335	3.163471	-8.348803E-01	-2.435974	
-2.549152				
-1.847292	8.404975E-01	2.627803E-01	-1.082562	
-1.048497				
-1.912964	-9.302874E-01	-3.953704E-01	-4.525903E-01	
6.098533E-01				
-8.780233	-5.961018	7.926696	6.826189	
11.132220				
6.834447	-12.334930	-5.831561	-4.759832	
-2.444255				
2.714792	-3.141254	-2.492990	-1.279271	
-1.666524				
-10.527990	-6.428424E-01	4.550028	7.278664	
1.509493				
-3.440300	-4.721295	3.292956	2.232409	
4.418711				
-5.053608	-9.835877E-01	4.058313	2.242812	
7.212286				
-2.417303	-1.187948	9.146006E-01	6.250793E-01	
7.892814E-01				
2.997525E-01	9.436696E-01	2.899225E-01	2.721725E-01	
-1.543515E-01	-1.572311	-1.207564	1.075473	
-9.550698E-01	1.943846	9.446917E-02		
1.186098E-01	1.198622	-1.425270E-01	3.371105E-01	
9.525823E-01	1.167733	1.835445	-7.390682E-01	
8.364268E-01	-2.760944	2.789040E-01		
-1.105096	-1.488939	-1.239772	-6.931925E-02	
3.572677E-01	1.360260	1.137647	-7.415143E-01	
3.479290E-01	-2.152205	-1.705738E-01		
-1.300373	-1.125917	1.459119	-6.687583E-03	
2.672775E-01	1.903399	1.542677	-3.872169E-01	
2.917616E-01	-1.293597	-1.018820		
2.143755E-01	8.559742E-01	-1.699902E-01	4.630134E-01	
-2.437853	3.005852	-1.422821E-01	-3.602039	
3.710000	1.110895	-9.299656E-01		
-2.297285				
-2.070444				
-1.772487				
-2.079788				
-3.163629				
-3.710777E-01				
-1.820165E-01				
-7.300867				
-2.294034				
-1.262930				
-1.825818				
2.172390E-01				
-4.306902E-01				
1.112737E-01				
-8.138234E-01				
-6.413913E-01				
2.474080	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
54.215250	14.165260	16.676400	8.497110	
16.118340				
-7.586000E-02	-6.973100E-04	-9.519920E-06	2.216330E-05	
6.665690E-05				
-4.202830E-05	3.834000E-02	2.083000E-02	9.820000E-03	
6.920000E-03				

**E.3.4 – pH = 8,5; Temperatura = 40 ° C**

	2	2	1	
-9.000000E-01	9.000000E-01			
	5	5	5	
-6.091444E-01	7.745284E-01	-1.313479E-01	5.053189E-01	
1.167334E-01				
-6.663452E-01	3.367908E-01	5.012256E-01	-5.548823E-02	
1.323096E-01				
-1.762732	7.781638E-01	1.040590	1.032823	
1.051674				
4.359773	1.773495	-5.055265E-01	7.427326E-02	
-4.406293E-01				
2.203473	-5.305034E-02	-6.108031E-01	-1.534666	
1.634800				
-2.300727E-01	4.365720E-01	-5.991405E-01	8.209781E-01	
-2.647856E-02				
6.530796E-02	-1.280242E-01	1.589708E-01	-7.987239E-01	
-1.884569E-01				
1.519126E-01	-8.492805E-01	1.287543	-8.821766E-01	
4.196952E-01				
3.042331E-01	-7.511466E-01	7.327950E-01	-1.065091	
1.135151E-01				
6.435197E-01	-1.252805	1.642535	-9.942545E-01	
5.651613E-01				
2.394078				
2.018289E-01				
-5.439989E-02				
1.819227				
1.670049				
2.545530E-02				
9.542602E-02				
9.477119E-02				
-2.324242E-02				
-3.121698E-01				
-2.313827	3.770108	5.579137E-01	7.431154E-02	
-1.288166				
-1.830632E-01	-8.197580E-01	1.248945	-1.211165E-01	
-2.130471				
3.284888E-01	-9.602969E-01	-1.298972	-1.040507	
-1.769713				
1.164317	1.135950	-8.234359E-01	-3.113925E-01	
-1.183613				
4.970878E-02	8.614764E-01	2.686873E-01	-1.978913E-01	
1.393067				
2.076135				
1.069237				
-2.773541E-01				
1.003701				
-7.322276E-01				
23.602620	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
53.507990	11.325750	9.681490	3.152430	
6.578450				
-3.895000E-02	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
0.000000E+00	2.534000E-02	9.960000E-03	5.160000E-03	
5.700000E-03				

**E.3.5 – pH = 8,5; Temperatura = 55 ° C**

	2	2	1	
-9.000000E-01	9.000000E-01			
5	5	5		
1.366129	-1.607529	9.167782E-01	2.114691	
-2.084639E-01				
4.152090E-02	-6.068273E-01	-5.524807E-01	-1.610676	
-4.395307E-01				
-7.441121E-01	4.050291E-02	-1.382771	-2.266379E-01	
-1.530761				
-1.229266	-2.032434	-2.638006	-1.012981	
-6.449533E-01				
9.315957E-02	-5.844685E-01	1.685926	1.904637E-03	
1.774020				
-3.993802E-01	7.387007E-01	4.989305E-01	3.559704E-01	
1.595152E-01				
6.406465E-01	-4.640172E-01	-1.451702	-8.169587E-02	
-4.396113E-01				
-5.904996E-01	-1.849399	1.476156	-5.272415E-01	
1.409887				
5.298826E-01	-5.974576E-01	-1.740618E-01	-3.641275E-01	
4.494240E-03				
3.724641E-01	-7.691610E-01	1.612323	-1.331702	
-5.822338E-01				
-2.297652				
2.363105				
-5.976739E-01				
-6.327325E-01				
1.460896				
2.704121E-01				
-7.090776E-01				
1.404212E-01				
-1.436063E-01				
1.285537				
-6.060630E-01	-9.417794E-01	1.124754	6.356825E-01	
-8.231187E-01				
5.346033E-01	1.273184	1.314317E-01	4.466109E-02	
-5.218933E-01				
2.228468	-4.490171E-01	-2.773734	-4.686062E-01	
-2.933946				
1.271880	-3.765518	-5.802304E-01	7.727366E-01	
1.135958				
-3.482412E-01	-2.125976	1.162623	9.798589E-01	
3.168838				
1.844610				
1.334224				
-3.006317E-01				
6.491901E-01				
3.496235				
11.460950	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
53.935210	11.267940	9.796670	3.818340	
20.169010				
-8.922000E-02	-2.962630E-04	2.203650E-05	8.781100E-06	
4.958540E-05				
-4.898420E-05	5.245000E-02	1.680000E-02	7.520000E-03	
1.183000E-02				



**E.3.6 – pH = 10,4; Temperatura = 40 ° C**

1	1	1		
1.000000E-01	9.000000E-01			
5	12	5		
-6.888660	-5.566564	1.264481	-4.409932	
1.642393				
-5.272718	-4.719222	-3.771583	5.699059	
-3.704410				
-8.121090	5.849249	4.178935	8.736820	
-6.444061E-02				
3.900777	1.441641	5.063022	6.008914	
-5.482908				
-3.833830	-6.856068	6.094849	4.222807	
4.164475				
7.100492E-01	-13.683460	-12.129720	-6.272958	
2.738814				
4.743201	-10.039790	-1.632214	-2.480540	
1.237931E-01				
8.636492	3.125942	7.327018	7.132643	
2.020201				
-5.397173	-6.631045	1.764586	5.012837	
4.190493				
6.978051	-2.914875	7.362662	3.950004	
-3.026862				
-3.669796	7.184256	-4.906747	-4.727416	
2.940620E-01				
2.347143E-01	-4.099473	-1.277247	-7.387086	
-6.744261				
1.314211	1.007786	-1.318704	2.028575	
-7.523306E-02	-1.749091	5.720953E-01	-2.824690	
-5.683414E-02	2.644000E-01	1.604195	-3.936286E-01	
-7.132644E-01	-1.052229	1.363841	-1.823886	
-6.100751E-03	1.822473	-5.009513E-01	1.458407	
1.609982E-01	-5.078755E-01	-1.434350	2.831535E-01	
-2.346913E-01	-5.250468E-01	1.267308	-1.067677	
1.091523E-01	1.827332	-3.166535E-01	1.377495	
-4.458233E-02	1.296474E-01	-9.084117E-01	2.949850E-01	
-1.468199	9.132085E-01	1.216459	-7.652877E-01	
1.585493E-01	1.851693	-1.432094E-01	2.754789E-01	
-1.134566E-01	1.484708E-01	-4.522591E-01	2.789817E-01	
-2.766550	-2.165121E-01	1.168769	-7.704952E-01	
3.842493E-01	1.867309	-1.215283E-01	3.382621E-01	
-2.310835E-01	2.016453	-9.218086E-02	5.233011E-01	
14.020890				
11.912160				
8.260741E-01				
-10.306800				
-3.288153				
7.221389				
5.111185				
-5.813875				
-3.478958				
-2.249427				
2.347538				
14.967430				
1.475689				
4.744566E-01				
-1.408119				
-8.396280E-01				
-6.914071E-01				
10.735420	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
54.834790	12.623620	17.473180	3.412140	
13.053750				
-4.394000E-02	-2.057240E-05	1.120020E-04	-7.003810E-05	
7.553320E-05				
-1.491490E-04	2.798000E-02	1.930000E-02	9.760000E-03	
9.340000E-03				

**E.3.7 – pH = 10,4; Temperatura = 55 ° C**

	2	1	1	
-9.000000E-01		9.000000E-01		
	5	10	5	
-5.833191E-01		1.425497	9.405167E-01	1.361182E-01
2.092720				
1.063200	-2.739712E-01	1.546855	1.995721	
-4.055132E-01				
-1.105263	1.282425E-01	1.087531	1.196058	
1.406264E-01				
7.643253E-02	2.208117	1.021651	-1.037710	
-1.348396				
-1.626195	-4.570308E-01	-9.088022E-02	-1.253997E-01	
-1.463747				
-1.527788	4.867552E-01	-1.367301	-1.019359	
1.501472				
9.145323E-02	4.882447E-01	-6.304305E-01	-6.851295E-01	
2.764243				
-1.219030E-01	1.150453	7.926607E-01	1.667214	
-2.941846				
7.448834E-01	1.967314E-01	7.963743E-01	-1.910224	
-1.506354				
1.559926	6.350603E-01	-3.031186E-01	-1.187529	
1.013800				
6.997323E-01	-6.327544E-01	-5.208346E-01	6.318850E-01	
1.204365	7.254296E-01	3.251480E-01	-1.724779E-01	
-4.022291E-01		-1.158364		
-3.867057E-01	-1.059819E-01	2.957152E-01	-3.191584E-01	
-1.084169	-8.676822E-01	-2.690682E-01	-4.974155E-02	
3.704377E-01	-4.956157E-01			
-3.980908E-01	-5.224875E-01	3.417011E-01	-3.693938E-01	
-7.284337E-01	-1.117276	2.456114E-02	-1.292524E-02	
1.216932E-01	-4.244469E-01			
-1.516526E-01	1.177063	-3.910350E-01	-4.418347E-01	
-1.816254E-01	1.107258E-01	-3.401039E-01	-1.344733E-01	
9.932195E-01	-4.519859E-02			
-1.357643	4.573465E-01	-2.762942E-01	-1.687948	
2.372423E-01	4.405921E-01	1.723676E-01	1.516786	
-1.446813E-01	1.194135			
2.674277				
-1.815349				
2.094583				
1.142962				
-4.303608E-01				
1.240306E-01				
8.008981E-01				
-4.998492E-01				
2.357735				
2.239785				
5.627710E-01				
1.123275E-01				
-3.005295E-02				
5.770326E-01				
1.183690				
5.583200	0.000000E+00	0.000000E+00	0.000000E+00	
0.000000E+00				
60.000000	14.812700	18.647300	9.182100	
15.213900				
-7.630000E-02	-1.000000E-03	0.000000E+00	0.000000E+00	
1.000000E-04				
-1.000000E-04	3.860000E-02	2.100000E-02	9.900000E-03	
6.900000E-03				