



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MADSON LINHARES MAGALHÃES

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA
DE OLIGOSSACARÍDEOS CATALISADA POR DEXTRANA-SACARASE
USANDO SACAROSE COMO SUBSTRATO E MALTOSE COMO ACCEPTOR

FORTALEZA

2019

MADSON LINHARES MAGALHÃES

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA
DE OLIGOSSACARÍDEOS CATALISADA POR DEXTRANA-SACARASE
USANDO SACAROSE COMO SUBSTRATO E MALTOSE COMO ACCEPTOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.

Coorientador: Prof. Dr. Samuel Jorge Marques Cartaxo.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M167m Magalhães, Madson Linhares.

Modelagem e simulação da síntese enzimática de oligossacarídeos catalisada por dextrana-sacarase usando sacarose como substrato e maltose como acceptor / Madson Linhares Magalhães. – 2019.
132 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.

Coorientação: Prof. Dr. Samuel Jorge Marques Cartaxo.

1. Modelagem matemática. 2. Oligossacarídeos. 3. Polimerização. I. Título.

CDD 660

MADSON LINHARES MAGALHÃES

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA
DE OLIGOSSACARÍDEOS CATALISADA POR DEXTRANA-SACARASE USANDO
SACAROSE COMO SUBSTRATO E MALTOSE COMO ACCEPTOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 20/05/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Samuel Jorge Marques Cartaxo (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Sebastião Mardônio Pereira de Lucena
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Filipe Xavier Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado o dom da vida e toda a força necessária para trilhar meus caminhos, tornando-me capaz de superar os obstáculos existentes.

Aos meus pais, Marcos Antônio e Maria do Carmo, por acreditar e me incentivar a realizar meus sonhos, por todo apoio, carinho e amor que sempre recebi.

Aos meus irmãos, Maycon Juglas, Milena Michele e Meylling Mayara, por sempre acreditar no meu potencial e determinação.

À minha namorada, Rayana Melo, por toda compreensão, carinho e amor. Obrigado pelo incentivo nos momentos difíceis, onde, mesmo com a distância, sempre se fez presente.

Aos professores participantes da banca examinadora, pelo tempo e valiosas contribuições para melhoria deste trabalho. Por todos os professores do Departamento de Engenharia Química, que ajudaram direta ou indiretamente na minha formação.

Ao Prof. Dr Fabiano Fernandes, pela excelente orientação, sempre surgindo com soluções inesperadas para os obstáculos surgidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Por todos os conhecimentos e oportunidades que me propiciou, pela amizade e pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Samuel Cartaxo, pela coorientação deste trabalho, onde, junto ao professor Fabiano, ajudou na resolução das grandes questões envolvidas no trabalho. Por todos os anos de amizade, sempre estando disponível para uma conversa. Por ser uma referência como profissional e pessoa.

A todos os meus amigos, em especial a Andréa Pereira, Leandro Maia e Maria Gabriela, pelo apoio nas questões acadêmicas e pessoais em todos esses anos. Agradeço por terem contribuído ativamente para que este trabalho pudesse ser concluído da melhor forma possível.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente.”

(Roger Von Oech)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

A alimentação tem grande importância na manutenção de saúde, devido a isso, alimentos como os oligossacarídeos, vêm ganhando espaço no mercado mundial. Oligossacarídeos são carboidratos não digeríveis, com grau de polimerização (DP) entre 3 e 10 monômeros, que possuem ação prebiótica, alterando benéficamente a microbiota intestinal. Estudos recentes mostram grandes aplicações de oligossacarídeos nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A dextrana-sacarase é uma enzima que pode produzir diferentes oligossacarídeos dependendo do aceptor utilizado. Como não há muitos estudos sobre a cinética enzimática destes compostos, este trabalho visa o desenvolvimento de um modelo matemático para a síntese de oligossacarídeos catalisada por dextrana-sacarase usando sacarose como substrato e maltose como aceptor. Foram desenvolvidos três modelos: 1) síntese apenas de oligossacarídeos; 2) síntese de oligossacarídeos e dextransas pelo mesmo sítio ativo; 3) síntese de oligossacarídeos e dextransas por sítios diferentes. Todos os modelos foram desenvolvidos abordando técnicas da cinética de polimerização como: etapas de iniciação/formação, propagação e terminação. Os parâmetros dos modelos foram ajustados pelo método de Levenberg-Marquardt. A implementação dos modelos e simulações foram realizadas usando o ambiente de programação computacional Python. O terceiro modelo foi o que representou melhor os dados experimentais, apresentando um desvio residual padrão de 7,06 % para os oligossacarídeos totais nos experimentos usados para o ajuste dos parâmetros. Estes desvios foram de 1,63 % e 8,49 % com os dois conjuntos de dados usados para validação. O modelo 3 predisse a distribuição de pesos moleculares para a dextrana, sendo um diferencial, pois a maioria dos modelos encontrados na literatura não captam essa informação. Após a validação do modelo 3, realizaram-se simulações para avaliar a melhor forma de operação em larga escala. Simularam-se as seguintes formas de operação: batelada, semi-batelada com alimentação fixa, semi-batelada com alimentação em pulsos espaçados igualmente no tempo e semi-batelada com alimentação variando com tempo. A melhor estratégia foi a semi-batelada com alimentação fixa, apresentando uma maior produção de oligossacarídeos com DP5 e DP6. Otimizou-se esta estratégia operacional por meio do método do enxame de partículas (PSO) visando maximizar a produção de oligossacarídeos. As condições otimizadas foram obtidas com um volume reacional inicial de 1 m³ com concentrações de 40 e 45 g/L de sacarose e maltose e as alimentações fixas de 109,1 e 235,1 L/h de sacarose e maltose, respectivamente.

Palavras-chave: Modelagem matemática. Oligossacarídeos. Polimerização.

ABSTRACT

Food has great importance in the maintenance of health, due to this, foods like oligosaccharides, have been gaining space in the world market. Oligosaccharides are non-digestible carbohydrates, with degree of polymerization (DP) between 3 and 10 monomers, which have prebiotic action, beneficially altering the intestinal microbiota. Recent studies show large applications of oligosaccharides in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Dextranase is an enzyme that can produce different oligosaccharides depending on the acceptor used. As there are not many studies on the enzymatic kinetics of these compounds, this work aims at the development of a mathematical model for the synthesis of oligosaccharides catalyzed by dextranase using sucrose as substrate and maltose as acceptor. Three models were developed: 1) synthesis of oligosaccharides only; 2) synthesis of oligosaccharides and dextran by the same active site; 3) synthesis of oligosaccharides and dextrans by different sites. All models were developed approaching techniques of polymerization kinetics such as: initiation / formation, propagation and termination steps. The model parameters were adjusted by the Levenberg-Marquardt method. The implementation of the models and simulations were performed using the Python programming environment. The third model was the one that best represented the experimental data, presenting a standard residual deviation of 7.06% for the total oligosaccharides in the experiments used to adjust the parameters. These deviations were 1.63% and 8.49% with the two data sets used for validation. Model 3 predicted the molecular weight distribution for dextran, being a differential, since most models found in the literature do not capture this information. After validation of model 3, simulations were performed to evaluate the best form of large-scale operation. The following modes of operation were simulated: batch, batch, semi-batch, with fixed feed, half-batch with feed in pulses equally spaced in time and semi-batch with feed varying with time. The best strategy was the semi-batch with fixed feed, presenting a higher production of oligosaccharides with DP5 and DP6. This operational strategy was optimized using the particle swarm (PSO) method to maximize the production of oligosaccharides. Optimized conditions were obtained with an initial reaction volume of 1 m³ with concentrations of 40 and 45 g / L of sucrose and maltose and the fixed feeds of 109.1 and 235.1 L / h of sucrose and maltose, respectively.

Keywords: Mathematical modeling. Oligosaccharides. Polymerization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do cólon humano.....	22
Figura 2. Estrutura tridimensional da dextrana-sacarase.....	31
Figura 3. Localização e estrutura dos sítios ativos da dextrana-sacarase que interagem com glicose (GLC).....	32
Figura 4. Mecanismo da síntese de dextrana a partir da dextrana-sacarase considerando dois sítios ativos equivalentes.....	34
Figura 5. Mecanismo de liberação de dextrana com acceptor considerando a existência de dois sítios ativos equivalentes.....	35
Figura 6. Distribuição de pesos molares de um polímero	36
Figura 7. Influência da taxa de iniciação/formação na quantidade e peso molecular de polímeros formados	38
Figura 8. Fluxograma do PSO	41
Figura 9. Imagem da Cromatografia de Camada Fina (TLC) da síntese I. (S) Sacarose, (M) Maltose, (G) Glicose, (F), Frutose, (GPi) Isomaltooligossacarídeos com grau de polimerização <i>i</i>	45
Figura 10. Imagem da Cromatografia de Camada Fina (TLC) da síntese II. (P) Sacarose + Maltose + Glicose + Frutose, (GPi) Isomaltooligossacarídeos com grau de polimerização <i>i</i>	47
Figura 11. Visão geral das reações dos oligossacarídeos no Modelo 1. (E) Enzima, (S) Sacarose, (F) Frutose, (A) Aceptor, (G) Glicose, (EGi) Complexo Enzima-Substrato com grau de polimerização <i>i</i> , (AGi) Oligossacarídeo com grau de polimerização <i>i</i>	52
Figura 12. Visão geral das reações das dextranas no Modelo 2. (E) Enzima, (S) Sacarose, (F) Frutose, (A) Aceptor, (G) Glicose, (H ₂ O) Água, (EGi) Complexo Enzima-Substrato com grau de polimerização <i>i</i> , (Gi) Dextranas com grau de polimerização <i>i</i>	53
Figura 13. Visão geral das reações de síntese de a) oligossacarídeos e b) dextranas no Modelo 3. (E) Enzima, (S) Sacarose, (F) Frutose, (A) Aceptor, (H ₂ O) Água, (EGi) Complexo Enzima-Substrato com grau de polimerização <i>i</i> , (AGi) Oligossacarídeo com grau de polimerização <i>i</i> , (EDXi) Complexo Enzima-Dextrana com grau de polimerização <i>i</i> , (DXi) Dextrana com grau de polimerização <i>i</i>	55
Figura 14. Perfil da função erro.....	57
Figura 15. Perfis dos complexos enzima-substrato EGis em reator batelada obtidos com $S_0 = 40 \text{ g/L}$, $A_0 = 45 \text{ g/L}$ e $Et = 10 \text{ UI/L}$	62
Figura 16. Perfil da enzima em reator batelada obtido com $S_0 = 40 \text{ g/L}$, $A_0 = 45 \text{ g/L}$ e	

$E_t = 10 \text{ UI/L}$	63
Figura 17. Fluxograma lógico de simulação dos modelos	64
Figura 18. Fluxograma lógico para estimativa dos parâmetros cinéticos.....	67
Figura 19. Esquema de bateladas consideradas na modelagem da Síntese I.....	68
Figura 20. Valores interpolados para concentração de AG2 na Síntese I	69
Figura 21. Simulações do modelo 1 com as condições e os dados experimentais da Síntese I. (●) pontos experimentais (g/L), (–) valores preditos pelo modelo 1 (g/L)	71
Figura 22. Simulações do Modelo 1 na Síntese I com o espalhamento dos dados experimentais. (–) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (–) reta bissetriz.....	73
Figura 23. Simulações do modelo 2 com as condições e os dados experimentais da Síntese I. (●) pontos experimentais (g/L), (–) valores preditos pelo modelo 2 (g/L)	76
Figura 24. Simulações do Modelo 2 na Síntese I com o espalhamento dos dados experimentais. (–) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (–) reta bissetriz.....	78
Figura 25. Perfil da constante cinética kr_3 com os parâmetros ajustados com os dados da Síntese I.....	81
Figura 26. Simulações do modelo 3 com as condições e os dados experimentais da Síntese I. (●) pontos experimentais (g/L), (–) valores preditos pelo modelo 3 (g/L)	83
Figura 27. Simulações do Modelo 3 na Síntese I com o espalhamento dos dados experimentais. (–) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (–) reta bissetriz.....	85
Figura 28. Simulações dos modelos 1,2 e 3 para Síntese I. (●) pontos experimentais (g/L), (–) valores preditos pelo modelo 1 (g/L), (–) valores preditos pelo modelo 2 (g/L), (–) valores preditos pelo modelo 3 (g/L)	88
Figura 29. Distribuição dos pesos molares das dextranas do Modelo 3 na Síntese I	90
Figura 30. Volume Reacional na Síntese II	91
Figura 31. Simulações do Modelo 3 na Síntese II com o espalhamento dos dados experimentais. (–) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (–) reta bissetriz.....	92
Figura 32. Simulações do modelo 3 para Síntese II. (●) pontos experimentais (g/L), (–) concentrações preditas pelo modelo (g/L)	93
Figura 33. Simulações do Modelo 3 na Síntese III com o espalhamento dos dados	

experimentais. (--) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (-) reta bissetriz.....	95
Figura 34. Simulações das dextranas na Síntese III. (●) pontos experimentais (g/L), (-) concentrações previstas pelo modelo (g/L)	96
Figura 35. Simulações dos oligossacarídeos na Síntese III. (●) pontos experimentais (g/L), (-) concentrações previstas pelo modelo (g/L)	98
Figura 36. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em batelada	99
Figura 37. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em semi-batelada com alimentação fixa	102
Figura 38. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em semi-batelada com alimentação fixa de maltose e em pulsos de sacarose	105
Figura 39. Perfil da vazão de alimentação variável de sacarose	108
Figura 40. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em semi-batelada com alimentação variável.....	109
Figura 41. Sistema proposto para síntese de oligossacarídeos em larga escala	111
Figura 42. Superfície resposta da concentração de AG5 em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose	112
Figura 43. Superfície resposta da concentração de AG6 em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose	113
Figura 44. Superfície resposta da concentração de Oligossacarídeos totais em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose.....	113
Figura 45. Superfície resposta da concentração de Carboidratos totais em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose	114
Figura 46. Superfície resposta da fração AG5/ <i>Carboidratos totais</i> em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose	115
Figura 47. Superfície resposta da fração AG6/ <i>Carboidratos totais</i> em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose.....	115
Figura 48. Superfície resposta da fração <i>Oligossacarídeos totais/Carboidratos totais</i> em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais produtos comerciais contendo IMOS.....	25
Tabela 2. Aminoácidos terminais que compõem os sítios ativos GLC 2903, GLC 2904 e GLC 2905 da dextrana-sacarase	33
Tabela 3. Analogia entre os termos do PSO, o bando de pássaros e o significado físico de cada termo do método	40
Tabela 4. Concentrações dos carboidratos obtidas pela Síntese I.....	46
Tabela 5. Concentrações dos carboidratos obtidas pela Síntese II	47
Tabela 6. Concentrações dos carboidratos obtidas pela Síntese III.....	48
Tabela 7. Número de equações nos modelos desenvolvidos considerando o grau de polimerização máximo de 30 monômeros	63
Tabela 8. Valores do fator α para aplicação dos pesos nas funções objetivo.....	66
Tabela 9. Parâmetros cinéticos ajustados do Modelo 1 com os dados da Síntese I.....	70
Tabela 10. Valores estatísticos do Modelo 1 com os dados da Síntese I	74
Tabela 11. Parâmetros cinéticos ajustados do Modelo 2 com os dados da Síntese I.....	75
Tabela 12. Valores estatísticos do Modelo 2 com os dados da Síntese I	79
Tabela 13. Parâmetros cinéticos ajustados do Modelo 3 com os dados da Síntese I.....	80
Tabela 14. Valores estatísticos do Modelo 3 na Síntese I com os dados da Síntese I.....	86
Tabela 15. Propriedades das dextranas obtidas na simulação do Modelo 3 na Síntese I	91
Tabela 16. Valores estatísticos do Modelo 3 com os dados da Síntese II.....	93
Tabela 17. Valores estatísticos do Modelo 3 com os dados da Síntese III.....	95
Tabela 18. Propriedades das dextranas obtidas na simulação do Modelo 3 na Síntese III.....	97
Tabela 19. Concentrações no tempo ideal (2,8 h) para encerrar a batelada	100
Tabela 20. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (2,8 h) para encerrar a batelada	101
Tabela 21. Concentrações no tempo ideal (1,9 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação fixa	103
Tabela 22. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (1,9 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação fixa.....	104
Tabela 23. Concentrações no tempo ideal (3,8 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação fixa de maltose e em pulsos de sacarose.....	106
Tabela 24. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (3,8 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação em pulsos	107
Tabela 25. Concentrações no tempo ideal (1,1 h) para encerrar a semi-batelada com	

alimentação variável	110
Tabela 26. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (1,1 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação variável	111
Tabela 27. Limites laterais do espaço de busca das vazões de alimentação de sacarose e maltose no método PSO	117
Tabela 28. Funções objetivo usadas no PSO	117
Tabela 29. Parâmetros usados no PSO	117
Tabela 30. Concentrações no final da operação (14,1 h) da Otimização 1.....	118
Tabela 31. Concentrações no final da operação (21,1 h) da Otimização 2.....	119
Tabela 32. Concentrações no final da operação (3,1 h) da Otimização 3.....	120
Tabela 33. Concentrações no final da operação (14,4 h) da Otimização 4.....	121
Tabela 34. Concentrações no final da operação (16,4 h) da Otimização 5.....	122
Tabela 35. Concentrações no final da operação (3,3 h) da Otimização 6.....	123
Tabela 36. Concentrações no final da operação (0,9 h) da Otimização 7.....	124

LISTA DE SÍMBOLOS

a	parâmetro do valor máximo do k_{r3} [$L^2/mol \cdot UI \cdot s$]
A	concentração de acceptor [mol/L]
AG_i	concentração de oligossacarídeo com uma molécula de acceptor e i monômeros de glicose [mol/L]
b	parâmetro da concentração de “gatilho de consumo” do k_{r3} [mol/L]
DX_i	concentração de dextrana com tamanho i [mol/L]
E	concentração de enzima [UI/L]
EDX_i	concentração de complexo enzima-dextrana com tamanho i no modelo 3 [UI/L]
EG_i	concentração de complexo enzima-dextrana com tamanho i no modelo 2 [UI/L]
E_t	concentração de enzima total [UI/L]
F	concentração de frutose [mol/L]
G	concentração de glicose [mol/L]
G_i	concentração de dextrana com tamanho i no modelo 2 [mol/L]
i	tamanho da cadeia oligomérica ou polimérica
K	parâmetro de ajuste para a constante de propagação [$L/UI \cdot s$]
k_i	constante cinética de iniciação para formação de EG_1 [$L/UI \cdot s$]
k'_i	constante cinética de iniciação para formação de EDX_1 [$L/UI \cdot s$]
k_{dx}	constante cinética de terminação das dextranas do modelo 2 [$L/UI \cdot s$]
k_{pi}	constante cinética de propagação dos complexos EG_i [$L/UI \cdot s$]
k'_{pi}	constante cinética de propagação dos complexos EDX_i [$L/UI \cdot s$]
k_{ri}	constante cinética de consumo do AG_i [$L/UI \cdot s$]
k_{ti}	constante cinética de terminação dos complexos EG_i [$L/UI \cdot s$]
k'_t	constante cinética de terminação dos complexos EDX_i [$L/UI \cdot s$]
v_s	vazão variável de alimentação de sacarose [L/h]
V_0	Volume inicial da reação [L]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Alimentos funcionais e oligossacarídeos	19
2.2	Benefícios à saúde e aplicações comerciais de oligossacarídeos	22
2.3	Obtenção de oligossacarídeos	25
2.4	Catálise Enzimática	28
2.5	Dextrana-sacarase	30
2.6	Mecanismos conceituais da dextrana-sacarase	34
2.7	Cinética de polimerização	35
2.8	Método do Enxame de Partículas (PSO)	38
2.9	Testes estatísticos	42
3	CONJUNTO DE DADOS EXPERIMENTAIS USADOS NA FORMULAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS	43
3.1	Síntese I: Batelada alimentada em pulsos de 1h	44
3.2	Síntese II: Batelada alimentada em pulsos de 2h	46
3.3	Síntese III: Batelada de 48h	47
4	MODELOS MATEMÁTICOS	49
4.1	Modelo 1: Produção apenas de oligossacarídeos	50
4.2	Modelo 2: Produção de oligossacarídeos e dextrana pela mesma rota	52
4.3	Modelo 3: Produção de oligossacarídeos e dextrana por rotas enzimáticas distintas	54
4.4	Balanços de Massa para Reator em Batelada	59
4.5	Estimativa de parâmetros cinéticos	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1	Ajuste dos parâmetros cinéticos com a Síntese I	68
5.1.1	<i>Regressão não linear do Modelo 1</i>	69
5.1.2	<i>Regressão não linear do Modelo 2</i>	74
5.1.3	<i>Regressão não linear do Modelo 3</i>	79
5.1.4	<i>Simulações da Síntese I</i>	87
5.2	Validação com a Síntese II	91
5.3	Validação com a Síntese III	94
6	ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS E OTIMIZAÇÃO	98
6.1	Operação Batelada	99
6.2	Operação Semi-batelada com alimentação fixa	101

6.3	Operação Semi-batelada com alimentação em pulsos	104
6.4	Operação Semi-batelada com alimentação variável	107
6.5	Otimização pelo método PSO	111
6.5.1	<i>Otimização 1</i>	118
6.5.2	<i>Otimização 2</i>	118
6.5.3	<i>Otimização 3</i>	119
6.5.4	<i>Otimização 4</i>	120
6.5.5	<i>Otimização 5</i>	121
6.5.6	<i>Otimização 6</i>	122
6.5.7	<i>Otimização 7</i>	123
7	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são ingredientes alimentares que conferem benefícios à saúde, além de suas funções nutricionais básicas. Estes efeitos benéficos ocorrem devido a alterações fisiológicas e/ou metabólicas promovidas após o consumo em quantidades adequadas.

A produção de alimentos funcionais tem crescido nos últimos anos em resposta ao interesse do consumidor em obter saúde e bem-estar. As duas grandes classificações de alimentos funcionais são os probióticos e prebióticos. Dentre os prebióticos, os oligossacarídeos são os compostos que possuem maior destaque, pois seus benefícios à saúde são mais evidentes.

Oligossacarídeos são carboidratos não digeríveis com grau de polimerização (DP) entre 3 e 10. Devido a ampliação do consumo deste tipo de alimento, pesquisas no âmbito acadêmico e industrial têm sido observadas nos últimos anos (SORNDECH et al., 2018).

O efeito prebiótico de oligossacarídeos tem sido evidenciado em testes *in vitro*, animais e humanos. Os benefícios mais proeminentes relatados são: redução do desconforto estomacal, prevenção de constipação, resposta glicêmica reduzida, redução de triglicerídeos séricos, aumento dos níveis de HDL, prevenção do crescimento de *Clostridium difficile* e bacteroides (BHART et al., 2015; GOURINENI et al., 2018; WANG et al., 2017).

Oligossacarídeos naturais estão presentes em alimentos tradicionais consumidos na Ásia, como: saquês, molhos missô e de soja (TUNGLAND; MEYER, 2002). Atualmente, as autoridades competentes nos Estados Unidos, União Europeia, Canadá e Austrália classificam oligossacarídeos como ingredientes seguros para consumo. Assim, o número de produtos comerciais contendo estes compostos vem aumentando consideravelmente. O mercado tem grande aceitação destes alimentos na forma sólida e na forma líquida com a finalidade edulcorante. Algumas bebidas utilizam oligossacarídeos como substituinte parcial da sacarose.

Cada produto possui um valor máximo recomendado de oligossacarídeos na sua composição. Sucos de fruta devem conter no máximo 8,5%, enquanto energéticos podem chegar a 6,5%, condimentos podem conter até 33 % de oligossacarídeos na composição do produto final.

Nos últimos 26 anos, diversas patentes foram depositadas na Classificação Cooperativa de Patentes (CPC) e Classificação Internacional de Patentes (IPC) relatando o uso de oligossacarídeos na composição de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Produtos comerciais contendo estes componentes são comercializados no Japão há décadas, mas a comercialização nos Estados Unidos, União Europeia e Canadá é recente. O crescimento

desses mercados foi significativo em 2017. Os Estados Unidos detêm aproximadamente 701 patentes relacionadas ao tema, cerca de 40,6% do total global.

Estima-se que o faturamento global de produtos que contenham prebióticos será de 7,11 bilhões de dólares em 2024. O crescimento previsto dos investimentos é na ordem de 27,2% nos principais oligossacarídeos até 2022. Entre os anos 2011-2016, o consumo de prebióticos na Ásia e Oceania representou cerca de 26% do consumo global, enquanto a Europa consumiu cerca de 12% da produção, América do Norte 17% e América Latina 19% (SORNDECH et al., 2018).

Oligossacarídeos são encontrados na natureza em pequenas quantidades. Devido a isso, é inviável, economicamente, extrair-los de uma matriz natural. Tradicionalmente, a produção de isomaltooligossacarídeos (IMOs) e maltooligossacarídeos (MOs) do amido requer um processo de múltiplas etapas, incluindo liquefação, dois passos de sacarificação e purificação (DOBRUCHOWSKA et al., 2012; LEE et al., 2002).

As tecnologias usadas industrialmente para obtenção destes carboidratos geralmente usam as glucanotransferases, hidrolases e transglucosidases. A associação e recombinação de enzimas é útil para uma maior eficiência na síntese de múltiplas estruturas (LEE et al., 2002; RUDEEKULTHAMRONG; SAWASDEE; KAULPIBOON, 2013).

A literatura reporta que a enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5) é uma alternativa viável para síntese de oligossacarídeos. Esta enzima é largamente usada para a produção de dextrana, polissacarídeo formado por ligações α -1,6 entre moléculas de glicose. Esta enzima produz oligossacarídeos na presença de carboidratos aceptores. Os principais aceptores são: isomaltose, maltose, nigerose, isomaltotriose, maltotriose e d-glicose, onde a isomaltose é o aceptor mais forte e a d-glicose é o mais fraco (HU et al., 2017).

Os principais estudos realizados e as patentes depositadas não abordam claramente o mecanismo da produção de oligossacarídeos. Sabe-se pouco sobre a cinética enzimática envolvida, assim, o conhecimento desta, possibilita uma produção mais eficiente destes carboidratos.

A proposição de um modelo matemático que represente a cinética torna possível: o entendimento da afinidade entre os sítios ativos da enzima e os carboidratos, bem como comportamentos ímpares da enzima em relação a carboidratos específicos; a obtenção das possíveis rotas enzimáticas para a síntese de oligossacarídeos e dextranas e a distribuição de pesos moleculares ao longo da reação.

Modelos do tipo “caixa preta” são usados quando a complexidade e o número de equações do sistema são grandes, pois a solução do sistema converge mais facilmente. Em

contrapartida, estes modelos não conseguem abordar peculiaridades do sistema, pois estas técnicas consideram apenas dados de entrada e saída, perdendo quaisquer informações locais dentro do intervalo de tempo utilizado na simulação. Devido a estas desvantagens, optou-se pelo desenvolvimento de modelos fenomenológicos baseados no desenvolvimento de balanços materiais e cinética de reações em cadeia considerando etapas de iniciação/formação, propagação e terminação na síntese dos oligossacarídeos e das dextranas.

Nesse contexto, o foco deste trabalho é realizar a modelagem e simulação da síntese enzimática de oligossacarídeos usando dextrana-sacarase. Podem-se ressaltar os seguintes objetivos específicos: desenvolver um modelo matemático que represente a cinética, predizer a distribuição de pesos moleculares das dextranas produzidas, definir a melhor forma de operação e otimizar a produção de oligossacarídeos em larga escala.

Os diferenciais deste trabalho são: proposição da cinética enzimática de oligossacarídeos com maiores graus de polimerização, uma vez que a literatura reporta modelos que englobem oligossacarídeos com graus de polimerização até DP4; predição da concentração de dextranas individualmente, pois a literatura não reporta modelos que absorvam esta informação e os dados experimentais geralmente consideram apenas a quantidade total de dextrana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão apresentados os pontos chave sobre oligossacarídeos, seus benefícios à saúde, aplicações, formas de obtenção, bem como as teorias sobre enzimas, polimerização, o método do enxame de partículas e os testes estatísticos reportados na literatura que foram a base para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 Alimentos funcionais e oligossacarídeos

Atualmente, a procura por medidas que aumentem a expectativa de vida da população vem ganhando grandes proporções. A alimentação é um fator primordial para a manutenção de saúde, evitando e controlando várias doenças, com destaque das doenças crônicas não transmissíveis como: diabetes, hipertensão, neoplasias e insuficiência cardíaca.

Uma vida mais equilibrada, com prática de exercícios e o consumo de alimentos mais saudáveis, tem sido o maior foco na busca de saúde. Assim, a demanda por alimentos funcionais tem crescido consideravelmente. Alimentos funcionais são aqueles que, além de suprir energeticamente o corpo, “promovem saúde”, pois contêm compostos que afetam o metabolismo e a fisiologia, gerando assim, benefícios à saúde humana (RAIZEL et al., 2011).

Dentre os alimentos funcionais, dois grupos se destacam, os probióticos e prebióticos. A definição aceita internacionalmente de probióticos é: microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A definição de prebióticos é: ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal que resultam em benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (FORTES; MUNIZ, 2009).

Para que um ingrediente seja considerado prebiótico, deve cumprir os seguintes requisitos: ser de origem vegetal, formar parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas, não ser digerido por enzimas digestivas, não ser absorvido na porção superior do trato gastrointestinal, ser seletivamente fermentado por uma colônia de bactérias potencialmente benéficas ao cólon, alterando a composição microbiota (RAIZEL et al., 2011).

Os prebióticos inibem infecções por patógenos entéricos impedindo a adesão destes às células epiteliais gastrointestinais (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; SHOAF et al., 2006). Os efeitos prebióticos relacionados ao aumento da população de bifidobactérias no cólon levam à estimulação do sistema imune, produção de vitaminas do complexo B, inibição de patógenos,

redução dos níveis de colesterol sanguíneo e à restauração da microbiota normal (PATEL; GOYAL, 2012; WANG Y., 2009).

Os oligossacarídeos são carboidratos com graus de polimerização entre 3 e 10 monômeros, geralmente compostos por monômeros de glicose ligados a uma molécula aceptora terminal. Estes carboidratos possuem propriedades prebióticas, promovendo o crescimento de bactérias benéficas como *Acidophilus*, *Bifidus* e *Faecium*, e um decréscimo significativo de bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (CAMPBELL; FAHEY; WOLF, 1997; PASSOS; PARK, 2003).

Devido as características prebióticas, os oligossacarídeos são adicionados a vários produtos atualmente, como biscoitos, bebidas, iogurtes, cereais matinais, geleias e doces (ROBERFROID, 2002; SORNDECH et al., 2018).

Os principais oligossacarídeos encontrados na natureza e sintetizados industrialmente são: fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, galacto-oligossacarídeos (GOS), xilo-oligossacarídeos (XOS), isomalto-oligossacarídeos (IMOS) e malto-oligossacarídeos (MOS) (HU et al., 2017; KOLIDA; GIBSON, 2011; MORAIS; CONTESINI, 2019; PATEL; GOYAL, 2012).

Fruto-oligossacarídeos ou frutanos (FOS) são oligossacarídeos com tamanho de cadeia variando entre 3 e 10 monossacarídeos, compostos por unidades de frutose e um monômero de glicose terminal. Os FOS possuem um terço do poder edulcorante da sacarose, maior solubilidade que a sacarose, não cristalizam, não deixam a sensação de secura ou areia na boca e não precipitam.

Geralmente FOS são empregados em conjunto com edulcorantes com alto poder adoçante, resultando em um adoçante balanceado. Os FOS e inulina podem ser encontrados naturalmente em algumas frutas, hortaliças e plantas comestíveis. As fontes mais comuns são: banana, alho, trigo, tomate, cebola, mel, beterraba, centeio, cevada, alcachofra, chicória e aveia (RAIZEL et al., 2011).

A diferença básica entre FOS e a inulina é o grau de polimerização, onde o grau de polimerização da Inulina pode chegar até a 60 monômeros. As similaridades das propriedades funcionais destes compostos são decorrentes das ligações $\beta(2 \rightarrow 1)$ nas unidades frutossil. A via metabólica é a mesma para os dois compostos (FORTES; MUNIZ, 2009).

A empresa Orafiti patenteou a substituição de gordura por inulina em 1992. Em altas concentrações, acima de 25%, a inulina pode formar um gel, que, misturada com água ou leite, formam uma estrutura cremosa que pode substituir até 100% da gordura, mantendo as características do produto (ZACARCHENCO et al., 2013).

Galacto-oligossacarídeos (GOS) são formados pela transgalactolisação da lactose por meio da enzima β -galactosidase (E.C.3.2.1.23). O sítio ativo desta enzima é capaz de hidrolisar a lactose e transgalactolisar a galactose. As principais formas de ligação dos produtos obtidos são β -1,4 e β -1,6 (JURADO et al., 2002; MARTINS; BURKERT, 2009).

A síntese de GOS a partir do soro do leite ou derivados lácteos apresenta uma maior conversão devido a altas concentrações de lactose. As principais vantagens de produzir diretamente em derivados lácteos são: obtenção de produtos aptos ao consumo por intolerantes à lactose; melhor solubilidade, redução de cristalização em sorvetes, doce de leite e leite condensado; incremento no poder dulçor, diminuindo a necessidade da adição de sacarose, entre outros benefícios (MARTINS; BURKERT, 2009).

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros constituídos por moléculas de xilose, naturalmente encontrados em frutos, vegetais, leite e mel. Os XOS podem ser usados na indústria alimentícia e farmacêutica. A obtenção industrial é realizada através de materiais lignocelulósicos, principalmente por resíduos florestais e agroindustriais, como sabugo de milho, amêndoas, cascas de arroz, cevada e aveia (EVTUGUIM et al., 2003; MENEZES; DURRANT, 2008; MOURA et al., 2007; NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007).

O poder edulcorante dos XOS é cerca de 30% da sacarose. Eles são estáveis em pHs entre 2,5 e 8,0, apresentando grandes vantagens em relação aos outros oligossacarídeos, pois os demais são estáveis em uma faixa mais estreita de pH.

Alguns testes foram realizados com o consumo regular de XOS em humanos. Observou-se que a xilobiose (X_2) não foi excretada na urina ou fezes em 24 horas. Também não foi evidenciado a hidrólise na saliva, pancreatina ou pelo suco gástrico, indicando que a degradação destes carboidratos foi realizada por bactérias intestinais. Mulheres grávidas com graves problemas de constipação foram submetidas a uma dieta regular contendo XOS, após algum tempo, percebeu-se que houve uma amenização considerável do quadro de constipação, sem apresentar efeitos adversos. (MENEZES; DURRANT, 2008; OKAZAKI; FUJIKAWA; MATSUMOTO, 1990; TATEYAMA et al., 2005).

Isomalto-oligossacarídeos (IMOS) e malto-oligossacarídeos (MOS) são oligômeros constituídos por moléculas de glicose e uma molécula terminal de isomaltose ou maltose. A ligação α -1,4 caracteriza os MOS, enquanto a ligação α -1,6 caracteriza os IMOS.

As quatro principais rotas de obtenção de MOS e IMOS são: hidrólise do amido, transferência do resíduo glicosil presente na sacarose para moléculas aceptoras a partir da dextrana-sacarase; degradação de cadeias lineares de dextrana com altos pesos moleculares a

partir da dextranase e a sinergia destas enzimas convertendo sacarose (DOBRUCHOWSKA et al., 2012; KUBIK; SIKORA; BIELECKI, 2004; LEE et al., 2002; MORAIS; CONTESINI, 2019; WU et al., 2017).

Produtos comerciais com IMOS do amido consistem predominantemente de oligômeros com DP2-DP4 e são parcialmente digeríveis. Oligômeros com maiores graus de polimerização são indigeríveis e apresentam ação prebiótica mais proeminente (GOFFIN et al., 2011; HU et al., 2013).

A força do acceptor na produção de IMOS e MOS é um fator determinante para o alongamento da cadeia. A razão de sacarose e acceptor afeta diretamente no rendimento da reação, bem como no grau de polimerização dos produtos. A análise da força acceptora para vários carboidratos mostrou que a isomaltose apresentou um rendimento de 110%, a maltose 95%, a nigerose 59%, isomaltotriose 49%, maltotriose 39% e a glicose 25% na síntese de oligossacarídeos (HU et al., 2017).

2.2 Benefícios à saúde e aplicações comerciais de oligossacarídeos

Os oligossacarídeos apresentam vantagens em relação às fibras alimentares, visto que não aumentam a viscosidade das soluções, não possuem efeito espessante, não se ligam com a água e são mais solúveis. Durante a fermentação bacteriana no cólon, os oligossacarídeos são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (FORTES; MUNIZ, 2009). A Figura 1 ilustra o cólon humano, local aonde os lactobacilos e bifidobactérias estão presentes.

Figura 1. Representação do cólon humano



Fonte: (Saiba tudo sobre a diverticulite, uma doença que afeta o intestino, 2018)

A literatura elucida vários efeitos benéficos dos AGCCs produzidos, dentre eles: estímulo da proliferação do epitélio intestinal, principal fonte de energia para o enterócito, estímulo do desenvolvimento de células epiteliais ileais e colônicas, efeitos benéficos na homeostase da glicose e no metabolismo lipídico, possível prevenção contra o câncer de intestino grosso, redução do pH intraluminal e das concentrações séricas de ureia e amônia, intensificação da absorção de sólido e água e estímulo do fluxo sanguíneo visceral (FORTES; MUNIZ, 2009).

Estudos com humanos e ratos mostraram que a ingestão de FOS na alimentação aumenta a produção de ácido láctico no organismo. Este ácido láctico junto com outros AGCCs diminuem o pH do cólon, tornando o ambiente favorável para a proliferação de lactobacilos e bifidobactérias e tornam o ambiente desfavorável para bactérias patogênicas. Os AGCC produzidos aumentam a absorção de sódio, cobre, magnésio, ferro, potássio e água, prevenindo assim diarreias (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; BRUGGENCATE, 2006; PATURI et al., 2015; ZAFAR et al., 2004).

Devido ao fato de não serem calóricos e possuírem um terço do poder edulcorante da sacarose, os oligossacarídeos podem ser ingeridos seguramente por pessoas que possuam Diabetes Mellitus. Evidências científicas têm demonstrado que a ingestão de FOS auxiliam na regulagem de lipídeos em animais de laboratório. A administração adequada destes carboidratos ameniza quadros de constipação em idosos, pois bifidobactérias e lactobacilos têm efeito laxativo (FORTES; MUNIZ, 2009).

IMOS e MOS, em comparação com FOS e GOS, possuem maior atividade funcional. Os IMOS são parcialmente digeridos no jejuno pela isomaltase e os oligômeros restantes são fermentados por bactérias no cólon. Logo, IMOS são classificados como oligossacarídeos de digestibilidade lenta, assim, prebióticos de fermentação lenta (GOFFIN et al., 2011).

IMOS possuem alta estabilidade em processamento de alimentos e bebidas, baixo poder edulcorante, baixa viscosidade, baixa atividade de água, são altamente higroscópicos e indigeríveis por leveduras. Já os FOS são rapidamente fermentáveis e não são muito resistentes, assim, são instáveis sob condições ácidas (GOURINENI et al., 2018).

Em idosos, o consumo de IMOS a longo prazo melhorou a população microbiota no cólon, a função intestinal e os níveis de colesterol sanguíneo (YEN et al., 2011).

Produtos funcionais contendo prebióticos destinados à infância são especialmente controlados, devido a ação hipocolesterolêmica dos oligossacarídeos, pois o colesterol é essencial para o metabolismo infantil (ALLIET et al., 2007).

Testes com uma população de 50 ratos analisaram o perfil de fermentação de

bifidobactérias de acordo com o comprimento de cadeia dos FOS e inulina. Notou-se que modificações no tamanho da cadeia do oligossacarídeo afetam a composição da microflora intestinal. Em ambos os grupos, a contagem de bifidobactérias cresceu, mas os efeitos prebióticos foram mais significativos no grupo que recebeu FOS (CHO; FINOCCHIARO, 2010).

Um estudo realizado avaliou o efeito prebiótico no suco de caju adicionado de dextran-sacarase livre. Foi evidenciado aumento expressivo de lactobacilos após a ingestão do suco contendo a enzima. (VERGARA et al., 2010).

A viabilidade de duas espécies de bifidobactérias (*B. longum* e *B. animalis*) durante 28 dias a 4 °C adicionadas ao iogurte com e sem FOS foi examinada. A espécie *B. longum*, apresentou maior estabilidade. A viabilidade de ambas foi aumentada no iogurte adicionado com FOS, corroborando a hipótese que FOS estimulam a fermentação de bifidobactérias (AKALIN; FENDERYA; AKBULUT, 2004; BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; BRUGGENCATE, 2006).

Estudos realizados com foco na utilização de oligossacarídeos na formulação de medicamentos para liberação controlada de princípios ativos, como agentes carreadores, têm mostrado um grande mercado para oligossacarídeos na indústria farmacêutica (COVIELLO et al., 2005).

O grande potencial de aplicações destes açúcares nas áreas de alimentos, rações animais, fármacos, cosméticos e como agentes imunomoduladores, tem conduzido novas pesquisas para viabilizar sua obtenção e elucidar suas propriedades biológicas e funcionais (REMAUD-SIMON et al., 2000).

Variedades de produtos contendo IMOS são comercializadas nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália e Nova Zelândia, por exemplo: bebidas refrigerantes, bebidas energéticas, isotônicas e esportivas, sucos de frutas, legumes processados, laticínios, barras de cereais, doces, entre outros (SORNDECH et al., 2018).

A Tabela 1 mostra alguns produtos contendo IMOS que se destacam mundialmente. O produto mais vendido é o VitaFiber™. A venda deste produto em dezembro de 2016 foi de aproximadamente 26 milhões de dólares (SORNDECH et al., 2018).

Tabela 1. Principais produtos comerciais contendo IMOS

Produto Comercial	Empresa Produtora	País
Wako IMOs [®]	Wako Pure Chemical Industries Ltda.	Japão
AdvantaFiber 90 [®]	Top Health Ingredients, Inc.	China
IMO-900 [®]	Baolingbao Biotechnology, Co.	China
Happy Oligo [®]	Springlilly Pte Ltda.	Singapura
ISOThrive [™]	ISOThrive, LLC.	Estados Unidos
FiberYum [™]	Raw Indulgence Ltda.	Estados Unidos
VitaFiber [™]	Bioneutra Global Corp.	Canadá
ImoSweet [™]	Aquapharm Health & Nutrition GmbH	Alemanha

Fonte: elaborada pelo autor

A Beneo-Orafti S.A. desenvolveu um creme epilatório com oligossacarídeos na composição, destacando que o produto tem as mesmas características epilatórias das ceras compostas por sacarose, mas com temperatura de aplicação menor, diminuindo assim, riscos de queimaduras durante o uso (GONRY; BOOTEN, 2008).

A Wisconsin Pharmacal Company patenteou supositórios prebióticos para inserção vaginal com oligossacarídeos na composição. Este produto foi desenvolvido para promover o crescimento da flora vaginal, preferencialmente lactobacilos produtores de ácido láctico, e dificultar o crescimento de microrganismos patogênicos, como *Gardenerella vaginalis* e *Candida albicans*. Algumas tentativas para produtos contendo probióticos foram realizadas, mas a viabilidade destes microrganismos ainda é um grande obstáculo (CURRIE; YOUNG; WUNDROCK, 2015).

Novartis Ag e Nestec S.A. patentearam um produto de uso oral para ser consumido diariamente na alimentação, como substituto parcial de sacarose composto por oligossacarídeos para prevenção e controle de inflamações intestinais, diarreia e constipação (GIBSON; KOLIDA, 2004).

2.3 Obtenção de oligossacarídeos

Devido ao grande número de combinações possíveis das ligações glicosídicas entre as unidades monoméricas dos açúcares que compõem a estrutura molecular dos oligossacarídeos, a obtenção de carboidratos específicos é difícil. Estes compostos podem ser produzidos por meio de rotas físicas, químicas e enzimáticas. (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD,

2006).

As técnicas físicas e químicas são pouco utilizadas porque não apresentam seletividade e não são específicas. Alguns métodos físicos utilizados atualmente são: radiação de energia ionizante, micro-ondas e ondas ultrassônicas. Destacam-se entre as técnicas químicas, as reações de condensação e hidrólise ácida. Na reação de condensação, ocorrem problemas de separação e purificação dos produtos (AL-ASSAF; PHILLIPS; WILLIAMS, 2006; BEKERS et al., 2005; GIESE; HIROSI; SILVA, 2011).

A síntese de oligossacarídeos catalisada por enzimas representa uma alternativa interessante aos métodos químicos clássicos por permitir o controle da regioseletividade e da estereoquímica dos produtos da reação (PERUGINO et al., 2004). Duas classes de enzimas podem ser utilizadas nestas sínteses, glicosidases, quebram ligações glicosídicas e glicosiltransferases, promovem a formação de ligações glicosídicas. Estas enzimas são produzidas por fungos, leveduras e bactérias.

A inulina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e é produzida por 36 mil espécies de plantas. Este polifrutano é estável e muito solúvel, cerca de 60 g/L à 10 °C e 330 g/L à 90 °C, mostrando-se bem útil na indústria alimentícia.

A despolimerização deste composto por meio de inulinases gera FOS e dextrana. A quebra das ligações $\beta(2 \rightarrow 1)$ nas unidades frutossil é realizada por meio da hidrólise enzimática e ocorre randomicamente, assim, misturas de FOS e dextranas com graus de polimerização diferentes são obtidos ao longo da reação. As propriedades dos FOS obtidos e da inulina são semelhantes. Estudos em escala laboratorial produziram FOS com rendimentos entre 60 e 86 % com o uso de inulinases (SINGH; SINGH; KENNEDY, 2016).

Produtos como *Raftilose*[®] (Orafit Ltda., Bélgica) e *Frutafit*[®] (Imperial-Suikner Unie, Holanda), formados por FOS, são obtidos pelo processo de hidrólise parcial da inulina por meio de rota enzimática utilizando inulinase (FORTES; MUNIZ, 2009; PASSOS; PARK, 2003).

Frutosiltransferases são classes de enzimas que possuem atividade de transferir unidades de frutose. Estas enzimas são capazes de produzir FOS a partir da sacarose e são classificadas em frutosiltransferases (E.C. 2.4.1.99) e β -D-frutofuranosidases (E.C. 3.2.1.26).

A Genencor International Inc. patenteou a produção de FOS usando frutosiltransferases dentro de sucos de laranja e maçã. A eficiência na produção chegou a 28,71% de 1-kestose (GF₂), 26,03% de nistose (GF₃) e 2,63% de 1- β -frutofuranosilnistose (GF₄) após 24 horas (HENDERSON; KING; SHETTY, 2007).

A Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) patenteou a obtenção de FOS a partir de frutosiltransferases em escala industrial com biorreator de leito fixo para reações após 24 e

48 h. Este processo ocorre entre 40 e 60 °C, pH entre 4,0 e 6,0 e utilizando de 30 a 70 % (p/v) de sacarose. Obtém-se deste processo GF₂, GF₃ e GF₄ em diferentes composições, dependendo do tempo de reação. Os rendimentos encontrados após 72 h foram 66,4 e 58,33 % para os pHs 4,5 e 6,0, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2009).

Os produtos: *Neosugar*[®], *Meiologo*[®], *Profeed*[®] e *Nutraflora*[®], produzidos no Japão pela *Meiji Seika Ltda* e *Actilight*[®], produzido na Europa pela *Béghin Meiji Industries*, são obtidos industrialmente pela oligomerização de sacarose utilizando a enzima frutossiltransferase (β -frutossiltransferase) (FORTES; MUNIZ, 2009; PASSOS; PARK, 2003).

Combinações de α -amilase, β -amilase, invertase, e transglucosidase podem formar diversos IMOS durante a reação a partir do amido (BASU; MUTTURI; PRAPULLA, 2016; DUAN et al., 2011; SORNDECH; TONGTA; BLENNOW, 2017).

Alguns trabalhos relatam que IMOS e MOS podem ser obtidos a partir de α -glucosidases e glucanosacarase usando maltose como acceptor (DAY; CHUNG, 2008; OJHA; MISHRA; CHAND, 2015; VERCAUTEREN; NGUYEN, 2010; ZHANG et al., 2010). Outros mostram o uso de dextranase para realizar a hidrólise de dextrana (substrato) para a síntese de IMOS e MOS (BERTRAND et al., 2014; CHALANE et al., 2017).

Dextrana é um termo genérico dado a um grupo de polissacarídeos sintetizados a partir da sacarose compostos por cadeias de d-glicose conectadas por ligações α -1 \rightarrow 2, α -1 \rightarrow 3, α -1 \rightarrow 4 e α -1 \rightarrow 6 para vários graus de polimerização. Os primeiros trabalhos sobre a dextranase foram publicados na década de 70 (KIM; ROBYT, 1996; ROBYT; WALSETH, 1979).

Atualmente sintetizam-se dextranas com uma grande variedade de estruturas, podendo ser pouco ou altamente ramificadas. O peso molecular das principais dextranas produzidas varia entre $1 \cdot 10^3$ e $2 \cdot 10^6$ daltons. (RODRIGUES, 2003).

Sintetizaram-se oligossacarídeos usando suco de caju como substrato e dextranase livre produzida por *Leuconostoc citreum* B-742. Observou-se que quanto maior a razão acceptor/sacarose, maior conversão de sacarose em oligossacarídeos. O rendimento máximo obtido foi de 76,96 % de oligossacarídeos. Com esta corrida, a conversão de dextrana foi de 23,04 %. Neste estudo, o maior grau de polimerização (DP) sintetizado foi DP6 (RABELO; FONTES; RODRIGUES, 2009).

Usou-se suco de acerola como substrato para produzir oligossacarídeos. Altas concentrações de oligossacarídeos e baixas concentrações de dextrana foram obtidas, evidenciando que reações com aceptores ocorreram. O melhor resultado encontrado neste trabalho foi de 87,18 % de oligossacarídeos, 0,37 % de dextrana e 12,55 % de açúcares redutores no produto. O grau de polimerização máximo encontrado foi DP13, mas em pequenas

quantidades (ARAÚJO et al., 2015).

Avaliou-se a produção de IMOS em sucos de manga e abacaxi usando dextrana-sacarase produzida por *Weissella cibaria* RAB12. Obtiveram-se IMOS com graus de polimerização até DP5 em ambos os sucos. O produto final do suco de manga continha 12,61 % de IMOS, enquanto que o suco de abacaxi continha 10,62 % (BARUAH; DEKA; GOYAL, 2017).

O estudo realizado por Kim *et al.* (2009) analisou o uso de combinações entre dextrana-sacarase e dextranase. Esta sinergia de enzimas mostrou-se vantajosa por produzir IMOS com graus de polimerização maiores, chegando até DP10 em quantidades consideráveis. A composição final de IMOS neste trabalho foi DP3: 4,15%, DP4: 12,89%, DP5: 20,1%, DP6: 19,56%, DP7: 15,95%, DP8: 10,27%, DP9: 9,29% e DP10: 7,79% (KIM et al., 2009).

A alteração da cadeia proteica da dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* 0326 foi avaliada na produção de IMOS. Esta enzima sintetizada por microrganismo modificado produziu cerca de 53% de oligossacarídeos após 48h usando uma concentração inicial equimolar de sacarose e maltose, 200 mM (LI et al., 2017).

Estudou-se a síntese de IMOS na presença de dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F usando sacarose como substrato e maltose como acceptor. A solução reacional foi submetida a pulsos regulares de substrato e acceptor. O maior grau de polimerização de IMOS obtido foi DP9, mas em quantidades desprezíveis, abaixo da faixa de medição do equipamento utilizado para leitura. Os traços de DP9 foram evidenciados apenas qualitativamente. (RABELO, 2012).

Estudos avaliaram a produção de panose, maltooligossacarídeo com DP3, a partir de sacarose e dextrana-sacarase usando maltose como acceptor e, posteriormente, usaram redes neurais para a otimização da síntese de panose usando dextrana-sacarase, sacarose e maltose. As condições otimizadas definidas com a operação de batelada alimentada foram: concentração inicial de sacarose, 100 mmol/L, razão de maltose/sacarose, 5,58, vazão de alimentação, 3000 L/h, produzindo 35,3 g/L h de panose. Este modo de operação apresentou produtividade 74% superior à operação em batelada (FERNANDES; RODRIGUES, 2006, 2007; RABELO et al., 2006).

2.4 Catálise Enzimática

Enzimas são proteínas com alto peso molecular que atuam em um substrato (reagente) para transformá-lo quimicamente em um produto com uma velocidade alta, cerca de 10^3 a 10^{17} vezes superior a velocidade da reação não-catalisada.

Reações biológicas essenciais são possíveis apenas pela presença de enzimas. A quantidade de enzima é ínfima, quando comparada com a quantidade de substrato que ela é capaz de catalisar. Estas proteínas afetam apenas as taxas de velocidade, não alterando o equilíbrio químico.

Enzimas possuem alta especificidade devido à grande complexidade de sua estrutura. Assim, uma enzima pode usualmente catalisar um tipo único de reação. A formação de produtos indesejáveis pode ser controlada em reações enzimáticas devido a esta estereosseletividade (FOGLER, 2009).

Um parâmetro importante para avaliação de uma enzima é a atividade de enzima que designa a própria atividade catalítica da enzima, expressa em unidade de velocidade. Considera-se uma unidade (U) a quantidade de enzima capaz de converter 1 μmol de substrato por minuto em condições específicas de pH, temperatura e força iônica com concentração de saturação de substrato.

As enzimas são enquadradas em seis classes, onde: oxirredutases são as que catalisam reações de oxi-redução; transferases realizam a transferência de grupos entre duas moléculas; hidrolases hidrolisam ligações covalentes do substrato; liases catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise e oxidação; isomerases modificam a estereoquímica da molécula e as ligases são as enzimas que sintetizam uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas, juntamente com a hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado.

A catálise ocorre em regiões específicas da enzima denominadas de sítios ativos. Estes sítios são resíduos de aminoácidos capazes de interagir com o substrato e formar produtos. Durante a formação do complexo enzima-substrato, os sítios ativos envolvidos se ligam ao substrato formando um intermediário denominado complexo enzima-substrato. Após a catálise, o sítio libera o produto e torna-se disponível novamente.

Dois modelos de ligação descrevem as interações entre a enzima e o substrato, são eles: Chave-Fechadura e Encaixe-Induzido. O primeiro considera que a enzima possui o sítio ativo complementar ao substrato, fazendo com que eles se encaixem perfeitamente. O segundo é usado para explicar que sítio ativo é levemente diferente do substrato e há uma conformação tanto da enzima quanto da molécula para que haja a catálise (FISCHER, 1894; ILLANES, 2008; KOSHLAND, 1958). Além dos substratos, outras moléculas podem interagir com os sítios ativos, estes compostos são chamados de moduladores.

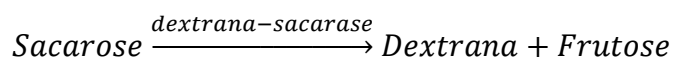
Moduladores são substâncias que interagem reversivelmente com enzimas afetando o comportamento da cinética. Os moduladores são classificados como ativadores e inibidores.

Ativadores aumentam a atividade catalítica da enzima, já os inibidores afetam negativamente a catálise (ILLANES, 2008).

2.5 Dextrana-sacarase

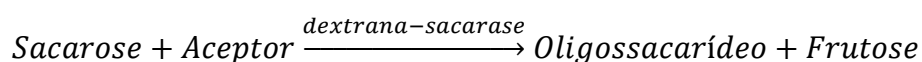
Dextrana-sacarase (E.C. 2.4.1.5) é uma enzima extracelular tradicionalmente obtida a partir da fermentação de *Leuconostoc spp.* em meio contendo sacarose como fonte de carbono (MORAIS; CONTESINI, 2019).

Esta enzima pertence às transferases, especificamente ao grupo das hexosiltransferases, pois promovem a transferência de unidades de hexoses ($C_6H_{12}O_6$). Esta transferência ocorre pela quebra de sacarose em unidades de glicose e frutose, possibilitando a transferência destes monossacarídeos para formação dos biopolímeros. Na presença apenas de sacarose (substrato), as moléculas de glicose são polimerizadas formando dextrana (HONORATO et al., 2007). De maneira simplificada, síntese de dextrana é mostrada a seguir:



As dextranas produzidas possuem graus de polimerização diversos. Rodrigues (2003) realizou um estudo para síntese de dextrana com peso molecular controlado pela adição de maltose como acceptor. As moléculas acceptoras são substâncias que agem como agente de terminação de cadeia, interagindo com o complexo enzima-substrato, fazendo com que esta molécula seja o último monômero do biopolímero formado.

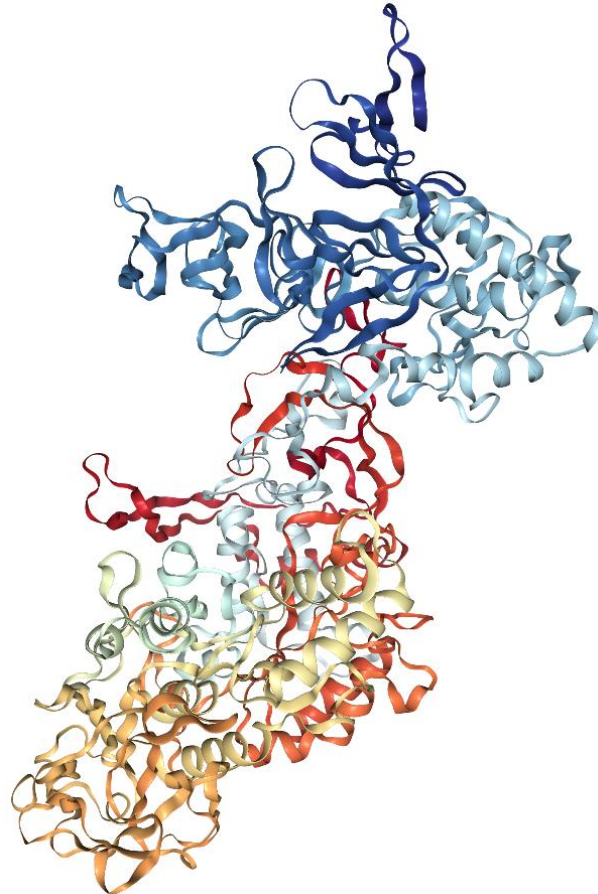
Na presença de sacarose como substrato e um acceptor, a dextrana-sacarase produz oligossacarídeos e frutose, onde o acceptor finaliza a cadeia do biopolímero. Cada acceptor produz uma classe de oligossacarídeos, por exemplo: o uso de maltose como acceptor gera maltooligossacarídeos, o uso de isomaltose produz isomaltooligossacarídeos (VERGARA et al., 2010). De forma geral, a reação de sacarose e acceptor catalisada por dextrana-sacarase é apresentada a seguir:



A dextrana-sacarase possui uma estrutura tridimensional complexa com um formato que se assemelha a uma concha, pois possui uma região vazia no centro da enzima. Nesta porção,

há uma maior facilidade de acesso do substrato. A estrutura da dextrana-sacarase é ilustrada pela Figura 2.

Figura 2. Estrutura tridimensional da dextrana-sacarase



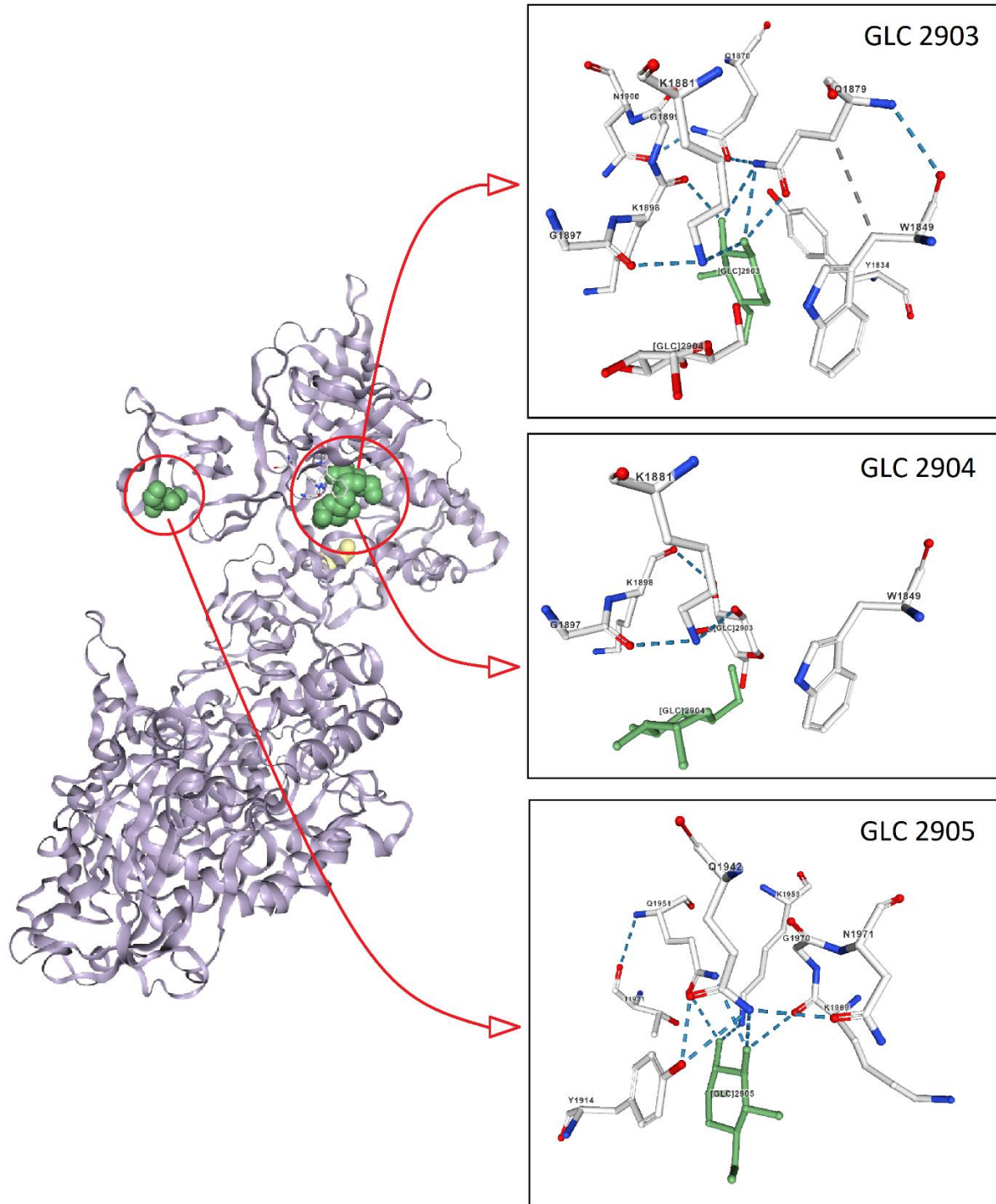
Fonte: (BRISON et al., 2015)

Os perfis colorimétricos da Figura 2 são baseados na fração de carbonos terminais e nitrogênios terminais presentes em porções específicas da enzima. A tonalidade azul escura significa grandes quantidades de N-terminais em determinada região da proteína. A cor vermelha escura indica a presença de grandes quantidades de C-terminais. As tonalidades intermediárias mostram que ambas as terminações estão presentes em uma porção específica da enzima (BERMAN et al., 2000).

Regiões com grandes quantidades de terminações aminas (N-terminais) possibilitam maior número de ligações de hidrogênio. Estas ligações podem aumentar a afinidade dos aminoácidos terminais destas regiões com carboidratos, uma vez que estes compostos possuem grupamentos hidroxilas que podem realizar esta ligação. Logo, os sítios ativos para a atividade de transferência de hexoses tendem a se localizar nestas regiões. A Figura 3 mostra a localização

e formato dos aminoácidos terminais da dextrana-sacarase que possuem afinidade com glicose.

Figura 3. Localização e estrutura dos sítios ativos da dextrana-sacarase que interagem com glicose (GLC)



Fonte: Adaptado de (BRISON et al., 2015)

Podemos observar na Figura 3 que a dextrana-sacarase possui três sítios ativos com atividade catalítica para a glicose: GLC 2903, GLC 2904 e GLC 2905. As moléculas verdes são

glicoses que interagem com os sítios, as demais são as moléculas que formam os sítios ativos. Os aminoácidos terminais presentes nos três sítios ativos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Aminoácidos terminais que compõem os sítios ativos GLC 2903, GLC 2904 e GLC 2905 da dextrana-sacarase

GLC 2903	GLC 2904	GLC 2905
Tirosina (TYR) 1834	Triptofano (TRP) 1849	Tirosina (TYR) 1914
Triptofano (TRP) 1849	Lisina (LYS) 1881	Treonina (THR) 1921
Glutamina (GLN) 1870	Glicina (GLU) 1897	Glutamina (GLN) 1942
Glutamina (GLN) 1879	Lisina (LYS) 1898	Glutamina (GLN) 1951
Lisina (LYS) 1881		Lisina (LYS) 1953
Glicina (GLU) 1897		Lisina (LYS) 1969
Lisina (LYS) 1898		Glicina (GLU) 1970
Glicina (GLU) 1899		Asparagina (ASN) 1971
Asparagina (ASN) 1900		

Fonte: elaborada pelo autor

Observamos na Figura 3 e na Tabela 2 que os sítios ativos de GLC 2903 e GLC 2904 possuem alguns aminoácidos terminais em comum, mas as interações entre os aminoácidos e a glicose são diferentes. O GLC 2904 não apresenta ligações de hidrogênio entre o substrato e os aminoácidos, já o GLC 2903 possui várias ligações de hidrogênio entre o sítio ativo e o substrato. Devido a estas interações diferentes, pode-se notar que os sítios são distintos. Logo, sínteses diferentes podem ocorrer em cada sítio.

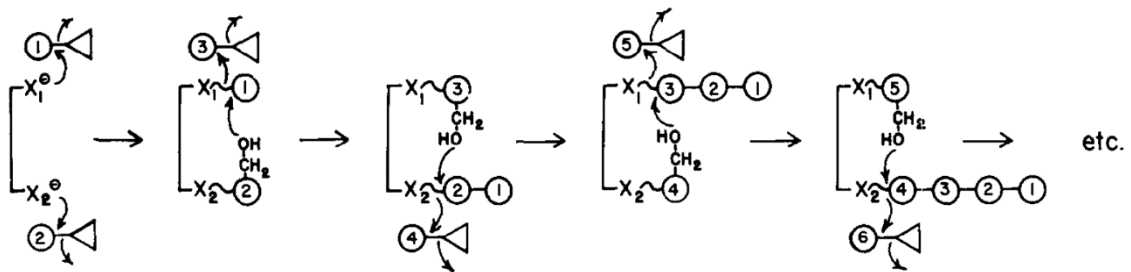
Os sítios GLC 2903 e GLC 2905 possuem aminoácidos diferentes e são localizados em porções distintas da enzima, mas possuem interações semelhantes entre a glicose e os aminoácidos terminais que compõem estes sítios. Logo, uma certa equivalência pode ocorrer.

Estudos realizados indicaram que a formação de dextrana ocorre por meio de sítios equivalentes em localizações distintas da enzima com mecanismo de “ping-pong” entre os dois sítios, promovendo o crescimento da cadeia da dextrana. (KIM; ROBYT, 1996; ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974; ROBYT; WALSETH, 1978, 1979; ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008).

2.6 Mecanismos conceituais da dextrana-sacarase

O primeiro mecanismo reacional sugerido para a síntese de dextrana a partir da dextrana-sacarase considerou o uso de dois sítios ativos (ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974; ROBYT; WALSETH, 1978). A Figura 4 apresenta o mecanismo, onde o círculo representa a glicose, o triângulo, a frutose, o conjunto círculo-triângulo a sacarose e X_1^\ominus e X_2^\ominus são os sítios ativos.

Figura 4. Mecanismo da síntese de dextrana a partir da dextrana-sacarase considerando dois sítios ativos equivalentes



Fonte: (ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974)

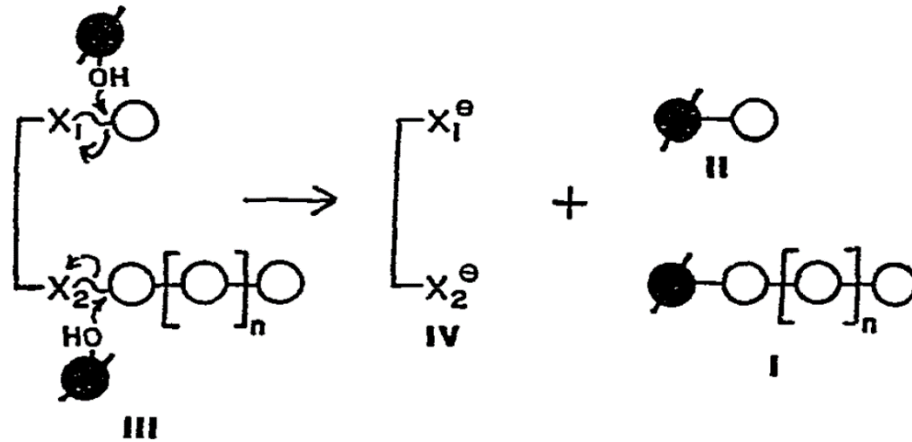
Este estudo utilizou marcadores com ^{14}C nas moléculas de sacarose para auxiliar no desenvolvimento da teoria. O mecanismo sugerido considera que a dextrana-sacarase possui dois sítios ativos nucleofílicos equivalentes. Cada sítio ataca a ligação α -1 \rightarrow 2 da sacarose formando um complexo glicosil e liberando uma molécula de frutose.

Na etapa seguinte, o grupo $\text{C}_6 - \text{OH}$ de um dos complexos ataca o C_1 do outro complexo formando uma ligação glicosídica α -1 \rightarrow 6. Assim, o par de elétrons volta para o sítio, tornando-o ativo novamente. Este sítio ativo ataca outra molécula de sacarose livre formando um novo complexo glicosil.

Este complexo glicosil formado ataca nucleofílicamente o C_1 da glicose terminal do outro complexo, onde o complexo atacado capta uma glicose de outra sacarose livre. Estes complexos ficam alternando os ataques, aumentando o grau de polimerização da dextrana.

Neste mecanismo, a liberação da dextrana pela enzima ocorre quando a concentração de aceptores (glicose, frutose) é suficiente para que eles interajam com o sítio ativo e um de seus grupos hidroxila ataquem nucleofílicamente o C_1 da glicose terminal, tornando o sítio ativo novamente. A Figura 5 mostra o mecanismo de liberação de dextrana com acceptor proposto.

Figura 5. Mecanismo de liberação de dextrana com acceptor considerando a existência de dois sítios ativos equivalentes



Fonte: (ROBYT; WALSETH, 1978)

Onde, molécula do acceptor marcado com ^{14}C (círculo preenchido), glicose (círculo vazado), dextrana produzida (I), oligossacarídeos produzidos com o acceptor (II), ataque do acceptor ao complexo enzima/dextrana (III) e enzima nascente livre (IV).

Um estudo realizado por Robyt *et al.* (2008) ratificaram a teoria da síntese de dextrana por meio de dois sítios equivalentes por meio do mecanismo de “ping-pong” para o alongamento da cadeia do biopolímero, mas neste estudo, a molécula acceptora considerada é a água, caracterizando uma etapa de hidrólise. diferentemente dos primeiros mecanismos propostos que consideravam que o acceptor eram os açúcares redutores. Assim, nesta nova teoria, a síntese de oligossacarídeos não ocorre pela mesma rota enzimática. (ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008)

2.7 Cinética de polimerização

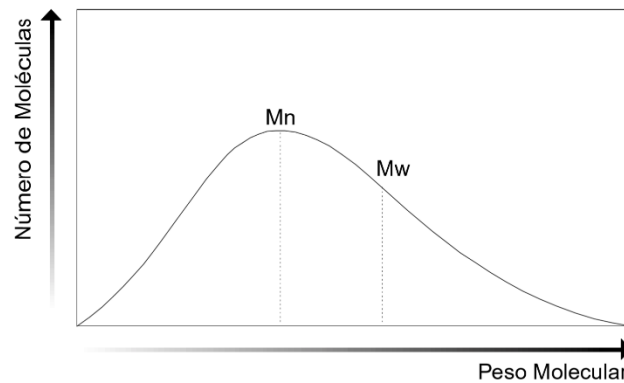
Polímeros são moléculas orgânicas que apresentam em sua estrutura molecular unidades relativamente simples que se repetem, ligadas entre si por ligações covalentes do tipo sp^3 . A grande estabilidade físico-química destes compostos é atribuída a estas ligações. Assim, grandes cadeias podem ser observadas neste tipo de composto. As unidades que se repetem são denominadas monômeros. A repetição de unidades monoméricas de glicose produz oligossacarídeos e dextranas. (BATHISTA E SILVA; SILVA, 2003).

Homopolímeros são macromoléculas derivadas de um único tipo de monômero, já os copolímeros são formados por dois ou mais tipos de monômeros em sua estrutura. O grau de polimerização (DP) é o número de unidades monoméricas presentes em uma molécula de

polímero.

Diferentemente das substâncias químicas de baixo peso molecular, os polímeros são heterogêneos, apresentando uma mistura de moléculas com diferentes pesos molares, pois são formados pela adição de grandes quantidades de monômeros. Assim, uma distribuição de comprimentos de cadeia é observada. Desta forma, não é possível obter um valor único e definido do peso molar. Este deve ser calculado baseado na média dos pesos moleculares presentes no polímero. A Figura 6 mostra a distribuição de pesos molares de um polímero genérico.

Figura 6. Distribuição de pesos molares de um polímero



Fonte: (FERNANDES; LONA, 2004)

Onde, M_n é o peso molecular médio numérico e M_w é o peso molecular médio ponderal. As equações para estimar estes dois valores são representadas pelas Equações 2.2 e 2.3.

$$M_n = \frac{\text{Peso total de polímero}}{\text{Número total de moléculas de polímero}} \quad (2.2)$$

$$M_w = \frac{\sum c_i M_i}{\text{Peso total}} \quad (2.3)$$

Onde, c_i é o peso total das moléculas de comprimento i e M_i é o peso do polímero de comprimento i . De posse destes dois valores, pode-se estimar a amplitude dos pesos molares por meio da dispersidade, obtida pela relação:

$$D = \frac{M_w}{M_n} \quad (2.4)$$

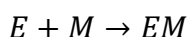
Esta propriedade relaciona o grau de homogeneidade da cadeia polimérica. Quanto mais próximo da unidade, mais homogêneo é o polímero. As propriedades físicas e químicas de um polímero são altamente dependentes do tamanho médio e da dispersidade das cadeias.

Devido a esta dependência, polímeros são caracterizados principalmente por seu peso molecular. Tanto o peso molar quanto a dispersidade são determinados pelas condições operacionais da reação. A arquitetura molecular de um polímero influencia diretamente nas propriedades físicas e químicas. Os polímeros podem ser lineares, ramificados e em rede.

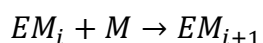
Polímeros lineares são aqueles que cada monômero se liga apenas a outros dois monômeros, podendo haver pequenas ramificações. Definem-se como ramificados, os polímeros que possuem monômeros ligados a mais de dois outros monômeros, onde as ramificações não são da estrutura do monômero. Os polímeros em rede (crosslinked) são aqueles que as ramificações da estrutura se interconectam, formando cadeias cruzadas.

Reações de polimerização são reações em cadeia definidas por três principais etapas: iniciação, propagação e terminação. Em biopolímeros sintetizados a partir de rotas enzimáticas, a polimerização ocorre por coordenação, onde o crescimento da cadeia é orientado por meio dos sítios ativos das enzimas.

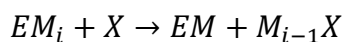
A etapa de iniciação ou formação se caracteriza pelo ataque nucleofílico do sítio ativo da enzima (E) na molécula de monômero (M), formando o complexo enzima-monômero (EM). A representação esquemática desta etapa é:



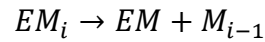
Após a etapa de iniciação, o complexo enzima-monômero ataca uma nova molécula de monômero, alongando a cadeia ligada à enzima, identificando a etapa de propagação. A reação genérica da etapa de propagação de um complexo EM_i é mostrada a seguir:



A etapa de terminação pode ocorrer de duas principais formas: terminação por agente de transferência ou espontânea. A terminação por agente de transferência de cadeia ocorre quando um aceptor (X), composto com afinidade pelo sítio ativo, é atacado pelo complexo, liberando o polímero. A seguir, podemos observar a representação genérica desta etapa:



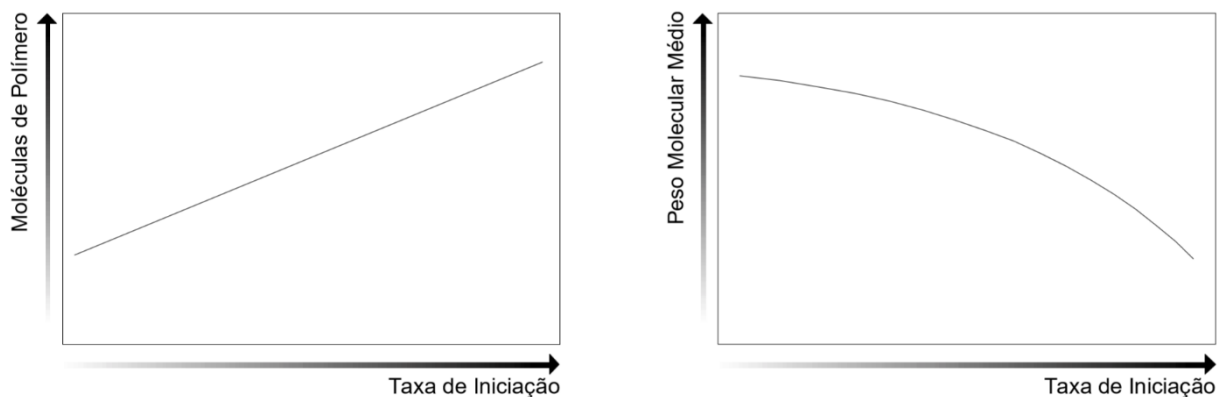
A terminação espontânea pode ocorrer pela simples conformação tridimensional do complexo, fazendo com que a enzima libere uma parte do polímero ligado ao sítio ativo, mantendo apenas um monômero ligado à enzima, liberando o restante da cadeia polimérica. A forma genérica é apresentada a seguir:



As hipóteses usadas na modelagem de polimerização por via enzimática são que as reações são elementares e irreversíveis, as constantes de reação são independentes do tamanho da cadeia, a hipótese do estado pseudo-estacionário (HEPE) pode ser aplicada para os complexos enzima-substrato e que o comprimento de cadeia é considerado longo a partir de 5 monômeros.

O aumento na taxa de iniciação/formação produz mais moléculas de polímero. Este aumento faz com que menos moléculas de monômeros estejam disponíveis para alongamento da cadeia. Logo, o peso molecular dos biopolímeros produzidos tendem a ser menores. A Figura 7 mostra a influência da taxa de iniciação/formação na quantidade e peso molar de polímeros formados.

Figura 7. Influência da taxa de iniciação/formação na quantidade e peso molecular de polímeros formados



Fonte: (FERNANDES; LONA, 2004)

2.8 Método do Enxame de Partículas (PSO)

Muitos problemas de engenharia apresentam sistemas não-lineares e complexos. Assim, espaços de busca para solução podem estimar várias soluções otimizadas, obtendo muitas vezes,

máximos locais. Devido a isso, muitos problemas não são solucionados por métodos analíticos, mas sim por algoritmos de otimização. Os métodos de otimização são divididos em determinísticos e estocásticos.

Os métodos determinísticos ou clássicos usam as derivadas de primeira e segunda ordem para orientar a direção da busca, convergindo rapidamente para o ponto ótimo da função objetivo. A desvantagem destas técnicas reside na possibilidade da otimização local, pois as funções podem ser não convexas e multimodais, além da falta de continuidade das funções e de restrições impostas.

Os métodos estocásticos ou randômicos são algoritmos baseados em populações. Constroem-se populações iniciais e utilizam-se buscas locais para avaliar a solução da população como um todo. Considera-se que as soluções (indivíduos) evoluem a partir de regras definidas que consideram o intercâmbio de informações entre os indivíduos, direcionando uma solução otimizada para a população.

As principais vantagens destas técnicas são que dispensam a utilização de derivadas para otimização; o esforço computacional é distribuído sobre a população e não apenas em um único ponto; obtêm ótimos globais, evitando os ótimos locais. Como desvantagens, podem-se destacar que os valores ótimos podem variar a cada simulação pelo fato de serem estocásticos e a compilação necessita de um tempo muito maior que os métodos determinísticos.

Técnicas de otimização por enxame são alguns dos métodos estocásticos mais usados. As técnicas de inteligência de enxames mais usadas são a otimização por enxame de partículas, colônia de formigas, algoritmos de coleta de alimentos por bactérias e colônia de abelhas (PEREIRA, 2016).

Um estudo sobre o comportamento coletivo de bando de pássaros deu origem a otimização por enxame de partículas (Particle Swarm Optimization - PSO). Observou-se que, quando um pássaro que compõe um bando encontra alimento, os demais o seguem. Assim, o local que contiver mais pássaros será o mesmo que terá abundância de alimentos. Há uma cooperação entre os pássaros, onde informações de indivíduos são partilhadas para o bando, mesmo que instintivamente (HEPPNER; GRENANDER, 1990).

Um algoritmo de otimização conhecido como enxame de partículas foi desenvolvido para maximizar a função objetivo por meio de simulações que imitam o comportamento do bando de pássaros a procura de alimento (EBERHART; KENNEDY, 1995). As analogias entre os termos do modelo e o bando de pássaros são apresentadas na Tabela 3:

Tabela 3. Analogia entre os termos do PSO, o bando de pássaros e o significado físico de cada termo do método

Termo	Analogia ao bando de pássaros	Significado físico dos termos
Partícula	Pássaro	Combinação das condições a serem otimizadas
Enxame	Bando de pássaros	Conjunto de todas as combinações
Espaço de busca	Área sobrevoada pelos pássaros	Faixa de valores da variável independente
Posição	Localização de cada pássaro durante o voo	Valor atual da variável independente
Solução ótima	Localização do pássaro onde ele encontrou o alimento	Valores otimizados dentro do espaço de busca
Fitness	Função de avaliação	Função a ser otimizada
<i>pbest</i>	Melhor posição conhecida pelo pássaro (experiência pessoal)	Valores calculados para cada partícula na atual iteração
<i>gbest</i>	Melhor posição conhecida pelo enxame (experiência coletiva)	Melhor valor entre os valores calculados na atual iteração

Fonte: elaborada pelo autor

Cada partícula desloca-se através do espaço de busca usando a posição atual dentro deste espaço ($X_{i,k}$) e sua velocidade atual ($V_{i,k}$). Onde i é a partícula e k é a iteração. Em cada iteração a posição e a velocidade do enxame são atualizadas a partir dos melhores valores encontrados. Os valores ótimos são armazenados de duas maneiras: *pbest* é o valor ótimo de uma única partícula e *gbest* é o melhor valor definido por qualquer partícula do bando até o momento, conhecido como valor global. De posse desses valores, a velocidade e posição das partículas são atualizadas por meio das Equações 2.5 e 2.6, respectivamente.

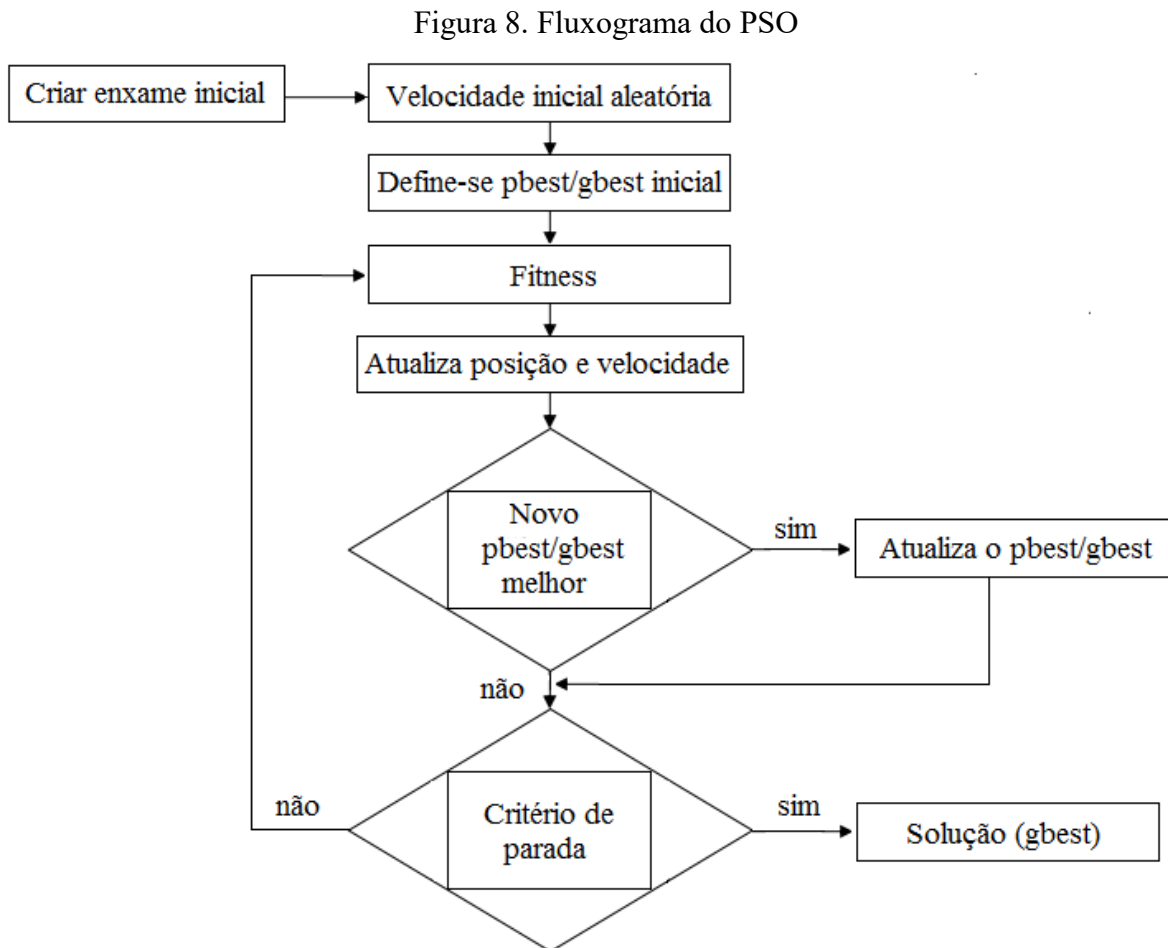
$$V_{i,k+1} = wV_{i,k} + c_1r_1(pbest_{i,k} - X_{i,k}) + c_2r_2(gbest_{i,k} - X_{i,k}) \quad (2.5)$$

$$X_{i,k+1} = X_{i,k} + V_{i,k+1} \quad (2.6)$$

Onde r_1 e r_2 são números randomizados entre 0 e 1, c_1 é o parâmetro cognitivo e c_2 é o parâmetro social, w auxilia na melhor busca do ponto ótimo, pois reduz o efeito da velocidade máxima. O segundo e o terceiro termos da Eq. 2.5 representam as distâncias entre a partícula i e as melhores posições dela e do bando até o momento, respectivamente (POLI; KENNEDY;

BLACKWELL, 2007; SHI; EBERHART, 1998).

As iterações seguem até que o valor de *gbest* seja definido como mínimo global e chegue aos critérios de parada impostos na simulação. A Figura 8 mostra, de forma resumida, o algoritmo do método do enxame de partículas.



Fonte: (PEREIRA, 2016)

A trajetória percorrida pelo enxame e o tempo de simulação afetam diretamente na evolução das iterações. Assim, o número de partículas, iterações e as faixas do espaço de busca e velocidade devem ser definidos corretamente. (COSTA et al., 2015)

O número de partículas e iterações afetam diretamente na obtenção da solução ótima, pois a quantidade de análises depende desses parâmetros. Os espaços de busca e velocidade usam valores de máximo e mínimo para buscas, altas velocidades fazem com que o algoritmo convirja rapidamente, mas deixa de explorar algumas regiões que podem conter mínimos locais relevantes, baixas velocidades aumentam consideravelmente o tempo de simulação.

Outro fator determinante no algoritmo é estrutura usada para interligar as partículas. As

topologias podem ser locais e globais. Na topologia local, cada partícula interage apenas com duas partículas vizinhas formando um anel, assim a troca de informações é mais lenta. Na topologia global, todas as partículas interagem entre si, chegando a uma convergência mais rápida, mas isso não garante que a solução obtida seja a melhor possível. (PEREIRA, 2016)

2.9 Testes estatísticos

Usualmente usa-se o coeficiente de determinação e inspeção visual para validar um modelo proposto com um conjunto de dados experimentais. Contudo, a avaliação deve ser realizada com análises estatísticas específicas, considerando erros experimentais intrínsecos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Um dos métodos largamente utilizados na literatura para avaliar a representatividade de um modelo matemático com os dados experimentais é o desvio padrão residual (RSD). O cálculo do RSD para n pontos experimentais usando os dados experimentais e simulados é apresentado na Equação 2.7.

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{i,exp} - X_{i,sim})^2}{n}} \quad (2.7)$$

A dispersão do conjunto de dados experimentais entre as amostras pode ser representada pelo intervalo de confiança. A precisão do intervalo de confiança depende do desvio padrão, da média amostral, do número de pontos e de um fator de abrangência, geralmente usa-se o fator do teste t-student. O cálculo do intervalo de confiança é expresso pela Equação 2.8.

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{student} \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (2.8)$$

Onde \bar{X} é a média das amostras, n é o número de pontos experimentais, S é o desvio padrão e $t_{student}$ é o fator de abrangência do teste de t-student.

Outra forma de analisar a validação de um modelo matemático são os testes de hipótese. O Teste F é um teste de hipótese que avalia a diferença entre dois conjuntos de dados através de variância. Usa-se como parâmetro, os valores de F tabelados para avaliar se há diferença significativa entre os conjuntos de dados, caso o valor de F calculado seja menor que o tabelado

diz-se que os conjuntos não possuem diferenças significativas.

Assim, o uso do Teste F na validação estatística de um modelo matemático se faz útil. Pode-se usar este teste comparando o erro experimental e o erro simulado para avaliar a significância do modelo com os dados. O modelo é considerado estatisticamente adequado quando o erro experimental é maior que o erro aparente calculado a partir dos dados simulados. O erro aparente calculado é representado por:

$$E_{sim} = RSD \sqrt{\frac{n}{F_{tab} \sum_i^n X_{i,exp}^2}} \quad (2.9)$$

Onde E_{sim} é o erro aparente do modelo, F_{tab} é o fator F tabelado, n é o número de pontos comparados e X_{exp} são os dados experimentais. Sabe-se que na maioria dos processos enzimáticos usa-se um erro experimental de aproximadamente 10 % (MANOEL et al., 2015; PEREIRA, 2016).

3 CONJUNTO DE DADOS EXPERIMENTAIS USADOS NA FORMULAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS

O presente trabalho consiste apenas em modelagens matemáticas e simulações, logo, nenhum procedimento experimental foi realizado. Todos os dados usados nesta tese foram coletados da literatura.

Neste capítulo serão apresentados, resumidamente, os procedimentos reportados na literatura para obtenção dos dados experimentais. Três conjuntos de dados foram usados e denominados como sínteses I, II e III. O substrato e o acceptor usados nas três sínteses foram sacarose e maltose, respectivamente.

Os conjuntos de experimentos I e II foram coletados da tese de doutorado de Rabelo (2012). O procedimento experimental de Rabelo (2012) foi realizado em parceria com o Núcleo de Análise e Desenvolvimento de Processos (NADP-UFC). O conjunto de dados III foi retirado do estudo realizado por Li *et al.* (2017). Os dados da síntese I foram usados para ajustar os parâmetros cinéticos dos modelos propostos. Para validação dos modelos, utilizaram-se os valores das sínteses II e III.

3.1 Síntese I: Batelada alimentada em pulsos de 1h

A obtenção e caracterização da enzima nas sínteses I e II são as mesmas, pois ambas foram obtidas pelo mesmo trabalho de Rabelo (2012). Considerou-se que a Unidade Internacional (UI) da atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de frutose por minuto em 30 °C e pH 5,2.

A enzima utilizada nestes dados foi a dextrana-sacarase produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Os procedimentos para produção e análise da atividade enzimática foram reportados em (RABELO et al., 2006). A atividade enzimática obtida foi 25,1 UI/mg.

A síntese ocorreu em um reator de vidro com controle de temperatura e agitação. O volume inicial do reator foi de 40 mL contendo 40 g/L de sacarose e 45 g/L de maltose em uma solução tampão de acetato de sódio 20 mM + 0,05 g/L de CaCl₂. O pH e a temperatura foram ajustados em 5,2 e 30 °C, respectivamente. Adicionou-se 1 UI/mL de enzima no meio reacional.

Prepararam-se duas soluções concentradas, onde a primeira continha uma mistura de 200 g/L de sacarose e 200 g/L maltose e a segunda solução concentrada com 200 g/L de sacarose. A reação ocorreu durante 13 horas. A cada hora, foi retirada uma alíquota de 2 mL da solução reacional para análise. Após a remoção da amostra, pulsos das soluções concentradas foram injetados no reator.

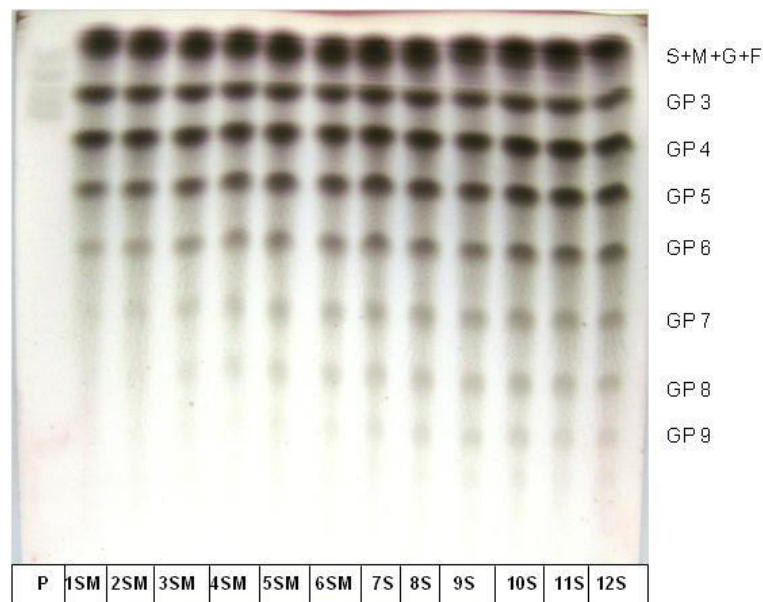
Nas seis primeiras horas, adicionavam-se 2 mL da solução concentrada contendo sacarose e maltose. Nas seis horas seguintes, adicionavam-se 2 mL da solução concentrada de sacarose. Dessa maneira, o volume reacional se manteve constante durante todo o experimento.

Após a retirada da amostra, a dextrana foi quantificada por meio do método Fenol-Sulfúrico. Apenas a quantidade total de dextrana foi avaliada, perdendo assim, informações acerca do grau de polimerização delas.

Os isomaltooligossacarídeos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada fina (TLC). As informações do TLC foram qualitativas, evidenciando apenas a presença ou ausência de produtos. Devido a maior sensibilidade do TLC, traços de oligossacarídeos com maiores graus de polimerização foram observados nesta análise.

A Figura 9 mostra o resultado obtido no TLC para a síntese I. Nesta imagem, *S* significa sacarose, *G* a glicose, *M* a maltose, *F* a frutose, *GP_i* representa isomaltooligossacarídeos com DP_i.

Figura 9. Imagem da Cromatografia de Camada Fina (TLC) da síntese I. (S) Sacarose, (M) Maltose, (G) Glicose, (F), Frutose, (GP_i) Isomaltooligossacarídeos com grau de polimerização *i*.



Fonte: (RABELO, 2012)

A nomenclatura do grau de polimerização usada nos dados será a mesma usada no desenvolvimento dos modelos, onde a representação será uma molécula aceptora com os monômeros de glicose. Assim, AG2 possui dois monômeros de glicose e um de acceptor. Analogamente, AG2 representa DP3. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos pelo HPLC em cada amostra.

Tabela 4. Concentrações dos carboidratos obtidas pela Síntese I

Tempo [h]	AG2 [g/L]	AG3 [g/L]	AG4 [g/L]	AG5 [g/L]	AG6 [g/L]	DX [g/L]
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	13,75	3,02	3,90	0,00	0,00	0,74
2	16,97	4,31	7,73	0,78	0,00	1,04
3	21,26	7,74	10,38	1,84	0,00	0,87
4	24,41	8,91	14,10	2,80	0,00	0,79
5	23,16	9,88	14,59	3,21	0,00	0,81
6	20,50	8,81	13,60	3,27	1,07	1,33
7	22,90	10,51	3,75	4,26	0,99	1,47
8	34,88	15,01	6,11	6,61	1,89	1,10
9	35,77	17,53	5,72	7,74	2,11	1,46
10	36,52	19,10	7,26	8,82	2,55	1,83
11	36,24	19,99	7,16	9,25	2,68	1,56
12	37,53	21,77	7,44	9,70	2,60	1,73
13	32,11	19,68	7,38	9,05	2,21	1,74

Fonte: (RABELO, 2012)

Onde *DX* equivale ao total de dextranas. Os dados publicados não relatam qualquer informação sobre repetibilidade dos experimentos e nem desvio padrão, assim, análises estatísticas sobre o erro experimental não foram realizadas (RABELO, 2012).

3.2 Síntese II: Batelada alimentada em pulsos de 2h

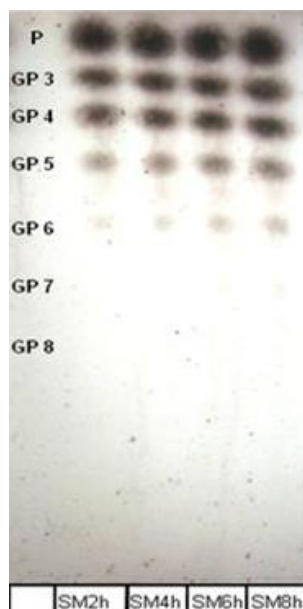
Nesta síntese, o volume inicial da reação foi de 10 mL consistindo de uma solução tampão de acetato de sódio 20 mM + 0,05 g/L de CaCl₂ com uma concentração de 40 g/L de sacarose e 45 g/L de maltose. Adicionou-se 1 UI/mL de dextrana-sacarase.

A reação teve uma duração de 8 horas. A cada 2 horas uma alíquota de 1 mL era removida para analisar a composição. As análises foram realizadas com o mesmo procedimento da síntese I. Após a retirada da alíquota, eram adicionados 0,1 g de maltose e 0,1 g de sacarose em pó.

Nesta síntese, o maior grau de polimerização obtido foi AG5 (DP6) tanto no HPLC quanto no TLC. A Figura 10 ilustra os isomaltoligossacarídeos obtidos ao longo da reação.

Nesta imagem, a sacarose, maltose, frutose e glicose são representadas por *P*.

Figura 10. Imagem da Cromatografia de Camada Fina (TLC) da síntese II. (P) Sacarose + Maltose + Glicose + Frutose, (GPi) Isomaltooligossacarídeos com grau de polimerização *i*.



Fonte: (RABELO, 2012)

Os dados obtidos nesta síntese também não informaram valores estatísticos dos desvios experimentais (RABELO, 2012). A Tabela 5 apresenta os resultados das análises do HPLC para estes experimentos.

Tabela 5. Concentrações dos carboidratos obtidas pela Síntese II

Tempo [h]	AG2 [g/L]	AG3 [g/L]	AG4 [g/L]
0	0,00	0,00	0,00
2	14,58	2,69	4,27
4	18,31	4,42	6,35
6	22,57	7,04	8,62
8	24,46	7,75	10,15

Fonte: (RABELO, 2012)

3.3 Síntese III: Batelada de 48h

Os dados explicitados nesta seção também são oriundos da literatura. O estudo de Li *et*

al. (2017) usou uma enzima produzida por um microrganismo modificado geneticamente. Nestes experimentos, a dextrana-sacarase foi obtida da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* 0326 com plasmídeo da *Escherichia coli* BL 21 (DE3). A mutação residiu no truncamento da região de ligação de glucano, deletando o fragmento 1494 bp do C-terminal. O objetivo desta alteração foi interromper o crescimento de polímeros sem afetar a transferência de unidades glicosídicas, assim a produção de oligossacarídeos não se alteraria.

A atividade enzimática foi determinada após reações com 1 h de duração à 25 °C em 3 mM de um tampão de ácido acético com acetato de cálcio em pH 5,4, contendo 30 nM de enzima purificada. A reação foi interrompida por uma incubação à 100 °C por 10 min. A amostra foi filtrada em membrana com 0,45 µm. A atividade enzimática foi de aproximadamente 56,9 UI/mg para 50 mM de sacarose e 100 mM de maltose.

A síntese foi conduzida em um reator batelada com volume reacional de 100 mL à 25 °C com pH 5,4 em um tampão de 3 mM ácido acético com acetato de cálcio contendo 68,4 g/L (200mM) de sacarose e maltose. O tempo total de reação foi de 48 horas. As amostras foram retiradas nos intervalos de tempo de 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata. A Tabela 6 exhibe os dados obtidos dos oligossacarídeos e dextranas totais.

Tabela 6. Concentrações dos carboidratos obtidas pela Síntese III

Tempo [h]	Oligossacarídeos [g/L]	Dextranas [g/L]
0	0,0	0,0
2	6,8 ± 1,4	0,06 ± 0,004
4	14,9 ± 2,4	0,13 ± 0,01
8	19,6 ± 4,2	0,18 ± 0,02
12	26,5 ± 5,8	0,21 ± 0,04
24	35,9 ± 3,6	0,38 ± 0,02
48	36,1 ± 3,4	0,4 ± 0,03

Fonte: (LI et al., 2017)

As alíquotas foram analisadas em HPLC e espectrofotômetro de massa. O peso molecular dos oligossacarídeos produzidos foi determinada pelo espectrofotômetro com ionização por pulverização de elétrons usando o sistema Agilent 6520 Q-TOF LC/MS (LI et al., 2017).

4 MODELOS MATEMÁTICOS

Muitas reações enzimáticas simples são bem representadas pela cinética proposta por Michaelis-Menten e suas derivações, mas em reações mais complexas, estes modelos não conseguem prever a cinética.

A síntese de biopolímeros por rotas enzimáticas ocorre por meio de várias reações em cadeia entre os monômeros e os sítios ativos da enzima. Devido à complexidade das reações envolvidas, as teorias cinéticas tradicionais não representaram os dados experimentais usados neste trabalho. Assim, o uso de outras abordagens foi necessário na modelagem matemática dessas reações.

Estudos avaliaram a síntese enzimática de dextrana com peso molecular controlado pela presença de maltose como aceptor. Foi utilizada a cinética de polimerização e o método dos momentos para estimar o peso molecular das dextranas obtidas. Estes estudos foram pioneiros no uso de teorias de reações em cadeia para produção de biopolímeros por rotas enzimáticas (FERNANDES; RODRIGUES, 2006, 2007; HEINCKE et al., 1999; RODRIGUES, 2003).

Neste tópico são desenvolvidos os modelos matemáticos para a cinética enzimática de oligossacarídeos catalisada por dextrana-sacarase. Todos os modelos consideram que as reações ocorrem em cadeia, apresentando as etapas de iniciação/formação, propagação e terminação.

A literatura reporta mecanismos conceituais que um conjunto de sítios ativos da dextrana-sacarase realiza a síntese de oligossacarídeos e dextranas a partir da sacarose. (KIM; ROBYT, 1996; ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974; ROBYT; WALSETH, 1978; ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008; TANRISEVEN; ROBYT, 1992).

Uma vez que a literatura não reporta um modelo consolidado para a síntese de oligossacarídeos, foram desenvolvidos três modelos matemáticos para a cinética de oligomerização com uso de dextrana-sacarase. Por meio das simulações, os modelos foram confrontados com os dados experimentais com a finalidade de avaliar qual modelo melhor representa a cinética.

Cada modelo possui considerações específicas de acordo com a complexidade da cinética proposta. Resumidamente, as abordagens dos três modelos desenvolvidos foram:

- **Modelo 1:** Apenas oligossacarídeos são produzidos pela dextrana-sacarase;
- **Modelo 2:** Oligossacarídeos e dextranas são produzidos pelos mesmos sítios ativos, onde a dextrana é sintetizada basicamente pelo alongamento da cadeia

ligada a enzima na etapa de propagação;

- **Modelo 3:** Oligossacarídeos e dextranas são produzidos por sítios diferentes e a ligação da sacarose em um dos sítios causa um impedimento estérico no outro sítio.

As hipóteses simplificadoras comuns utilizadas nos três modelos foram:

- Reações isotérmicas;
- pH constante ao longo das reações;
- Não há desnaturação ou desativação da enzima.

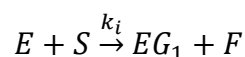
4.1 Modelo 1: Produção apenas de oligossacarídeos

O primeiro modelo desenvolvido contemplou apenas a produção de oligossacarídeos, desprezando a síntese de dextrana. Devido a esta consideração, este modelo é o mais simples entre os propostos.

Esta abordagem foi usada para verificar se a síntese de oligossacarídeos é independente da produção de dextranas, pois a concentração obtida de dextranas foi pequena em comparação às de oligossacarídeos. Na síntese I, a concentração de dextranas no fim do experimento foi 1,74 g/L, enquanto que a de oligossacarídeos totais foi 70,43 g/L.

O grau de polimerização de oligossacarídeos considerado no equacionamento foi até AG_6 , pois este foi o maior oligômero mensurado nos experimentos usados neste trabalho. Os modelos 1 e 2 consideraram que a enzima catalisa apenas a formação e alongamento do complexo enzima-substrato.

A etapa de iniciação foi considerada como a reação entre o sítio ativo da enzima (E) e uma molécula de sacarose (S), produzindo assim, um complexo enzima-substrato (EG_1) e liberando uma molécula de frutose com uma constante cinética k_i . Essa reação ocorre devido ao ataque nucleofílico que o sítio ativo realiza na molécula de sacarose. A etapa de iniciação segue:



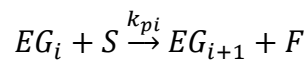
De posse das hipóteses simplificadoras, a lei de velocidade para a etapa de iniciação

assume a seguinte forma:

$$r_i = k_i[E][S] \quad (4.1)$$

A etapa de propagação consiste numa sequência de reações onde ocorre o alongamento da cadeia oligomérica ligada à enzima na forma do complexo enzima-oligômero (EG_i) com i monômeros de glicose. Estas reações começam com o complexo (EG_1) e terminam no complexo (EG_{n-1}), onde $n = 6$, pois é o maior oligômero considerado neste modelo.

Estas reações acontecem devido aos ataques nucleofílicos consecutivos que o complexo enzima-substrato realiza em moléculas de sacarose presentes no meio reacional. Devido a este ataque, a molécula de glicose é incorporada à cadeia oligomérica no complexo enzima-substrato e uma molécula de frutose é liberada. A seguir, vemos a representação genérica da etapa de propagação:



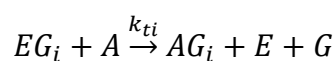
A constante cinética da propagação é identificada por k_{pi} . A lei de velocidade geral para propagação do complexo enzima-substrato EG_i é:

$$r_{pi} = k_{pi}[EG_i][S] \quad (4.2)$$

Conforme o complexo enzima-substrato é alongado, maior a influência do impedimento estérico no avanço da propagação, pois a complexa estrutura da enzima dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo. Devido a isso, a constante cinética de propagação é função do grau de polimerização do complexo (i), de acordo com:

$$k_{pi} = K/i \quad (4.3)$$

A terminação é caracterizada pelo ataque na molécula aceptora (A) pelo complexo enzima-substrato (EG_i) produzindo o oligossacarídeo (AG_i) e liberando a enzima (E) e uma molécula de glicose (G), conforme a reação:



A molécula acceptora é considerada como um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e outro monossacarídeo. Assim, a molécula de glicose do acceptor é liberada e o outro monossacarídeo liga-se ao oligômero de glicose, caracterizando o oligossacarídeo (AG_i).

Diferentemente das etapas de iniciação e propagação, a terminação possui uma constante cinética para cada tamanho de oligômero. O uso de uma constante de terminação para cada oligômero facilita a predição individual destes compostos, assim, a lei de velocidade de terminação genérica é:

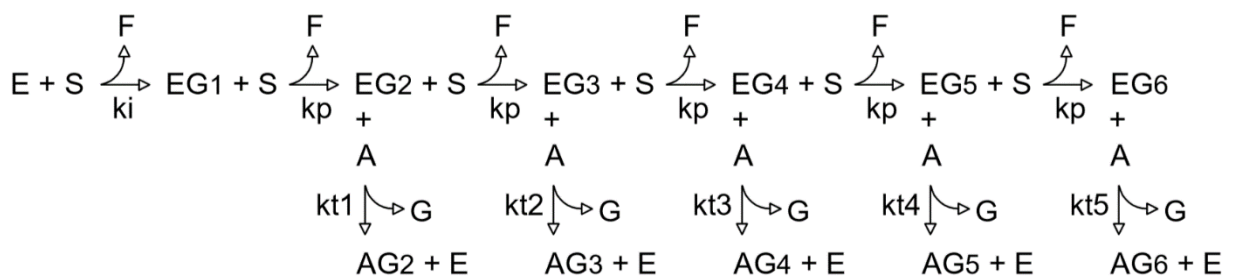
$$r_{ti} = k_{t(i-1)}[EG_i][A] \quad (4.4)$$

A quantidade total de enzimas presente equivale ao somatório da quantidade de enzima e das enzimas presentes nos complexos enzima-substrato, assim:

$$[E_t] = [E] + \sum_{i=1}^n [EG_i] \quad (4.5)$$

A Figura 11 exibe uma visão geral das reações consideradas no Modelo 1. Não é considerada a etapa de terminação com o complexo EG_1 , pois oligossacarídeos são considerados a partir dos trissacarídeos.

Figura 11. Visão geral das reações dos oligossacarídeos no Modelo 1. (E) Enzima, (S) Sacarose, (F) Frutose, (A) Aceptor, (G) Glicose, (EG_i) Complexo Enzima-Substrato com grau de polimerização i , (AG_i) Oligossacarídeo com grau de polimerização i



Fonte: elaborada pelo autor

4.2 Modelo 2: Produção de oligossacarídeos e dextrana pela mesma rota

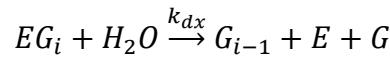
O modelo 2 considerou a produção de oligossacarídeos e dextrana, tornando o modelo mais realista. A síntese destes polissacarídeos foi considerada como o simples alongamento da

cadeia ligada à enzima, por meio da mesma rota enzimática.

Neste modelo usaram-se as mesmas constantes de iniciação e propagação tanto para a síntese de oligossacarídeos quanto para dextranas. As diferenças residem nas constantes de terminação para oligossacarídeos (k_{ti}) e para dextranas (k_{dx}).

Apenas uma constante de terminação foi usada para a dextrana k_{dx} , pois a molécula de água, aceptor desta reação, é considerada suficientemente pequena para ter fácil acesso ao sítio ativo e porque os resultados experimentais usados não individualizaram as dextranas, obtendo apenas a quantidade total de dextranas.

A obtenção de dextranas é ocasionada pela reação de hidrólise do complexo enzima-substrato (EG_i), liberando o polissacarídeo de glicose (G_{i-1}) com grau de polimerização $i - 1$, uma molécula de glicose (G) e a enzima (E). Assim, a etapa de terminação de dextranas pode ser representada por:

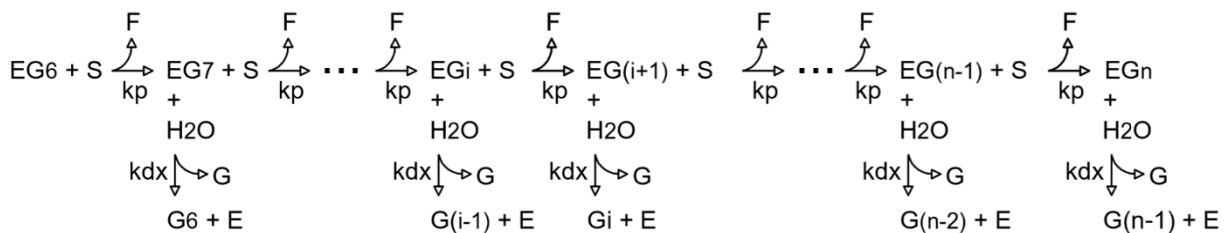


A lei de velocidade para uma dextrana com grau de polimerização i é expressa por:

$$r_{dxi} = k_{dx}[EG_{i+1}] \quad (4.6)$$

A grande força aceptor da maltose aumenta a seletividade das reações de oligomerização em relação a formação de dextrana (HU et al., 2017). Portanto considerou-se que hidrólise ocorreu a partir de EG_7 , pois oligossacarídeos foram mensurados quantitativamente até AG_6 . Sucintamente, as reações de hidrólise para formação de dextranas são apresentadas pela Figura 12. A cinética dos oligossacarídeos neste modelo é a mesma usada no modelo 1.

Figura 12. Visão geral das reações das dextranas no Modelo 2. (E) Enzima, (S) Sacarose, (F) Frutose, (A) Aceptor, (G) Glicose, (H_2O) Água, (EG_i) Complexo Enzima-Substrato com grau de polimerização i , (G_i) Dextranas com grau de polimerização i



Fonte: elaborada pelo autor

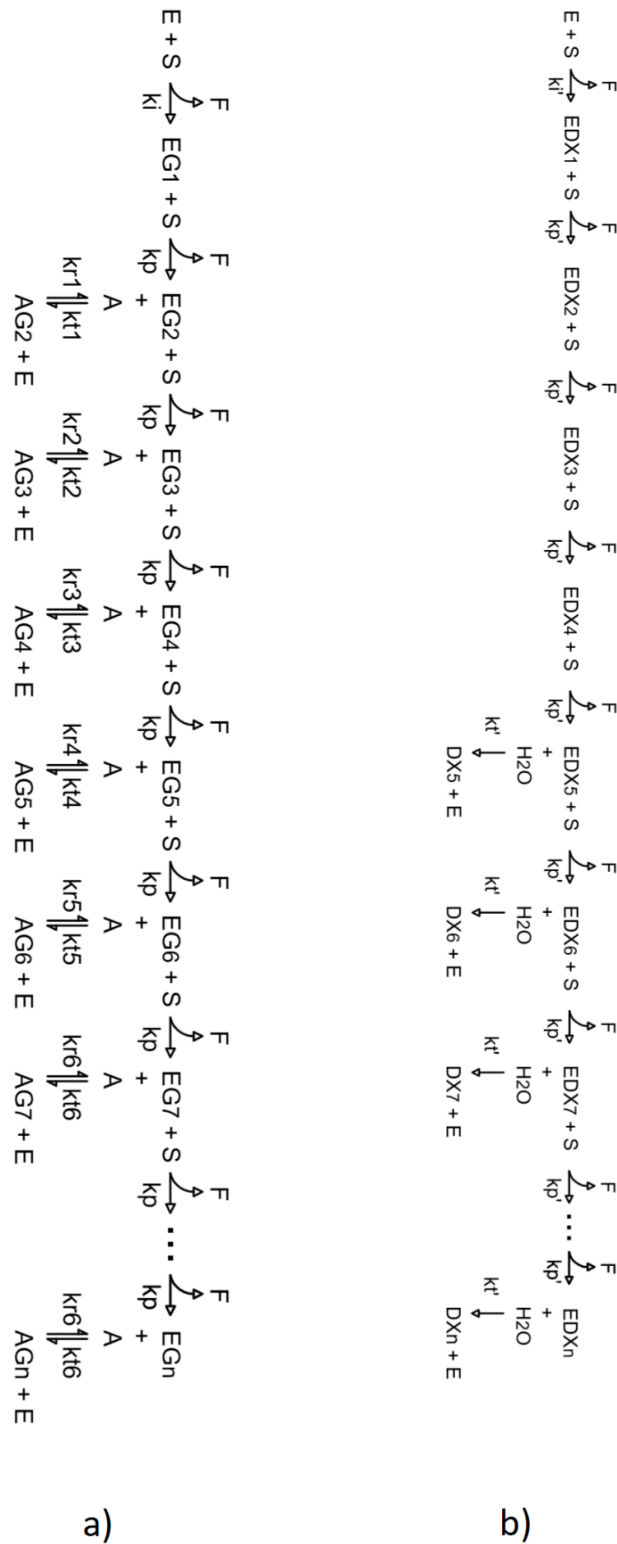
4.3 Modelo 3: Produção de oligossacarídeos e dextrana por rotas enzimáticas distintas

Neste modelo, as rotas enzimáticas de oligossacarídeos e dextranas são realizadas em sítios ativos diferentes. Os sítios considerados para a síntese de dextranas são GLC 2903 e GLC 2905 da dextrana-sacarase, pois as interações destes sítios com o substrato são semelhantes, como reportado na literatura (BERMAN et al., 2000; BRISON et al., 2015; ROBYT; WALSETH, 1978; ROBYT; YOON; MUKERJEA, 2008). Apesar da literatura indicar que o mecanismo de “ping-pong” promove a síntese da dextrana, este modelo engloba essa interação entre os sítios como etapa única para simplificar o equacionamento.

Para a síntese de oligossacarídeos, considerou-se que o sítio GLC 2904 promove esta reação. Uma vez que os sítios GLC 2903 e GLC 2904 são vizinhos e compartilham alguns aminoácidos terminais, a interação do substrato com um dos sítios inviabiliza a síntese promovida pelo outro sítio. Logo, se a sacarose se ligar a enzima no sítio de produção de oligossacarídeos, esta enzima só poderá realizar a síntese de dextrana após a liberação do oligossacarídeo formado e vice-versa.

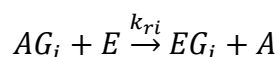
Distinguiram-se os complexos formados neste modelo, pois, ao considerar que sítios distintos realizam as sínteses, espera-se que conformações tridimensionais diferentes ocorram. Assim, os complexos da rota de formação de oligossacarídeos são denominados como complexo enzima-substrato (EG_i) e os complexos formados na síntese de dextranas são nomeados como complexo enzima-dextrana (EDX_i) ambos para um biopolímero com i unidades monoméricas ligadas à enzima. A Figura 13 ilustra a visão geral das sínteses de oligossacarídeos e dextranas abordadas no modelo 3.

Figura 13. Visão geral das reações de síntese de a) oligossacarídeos e b) dextranas no Modelo 3. (E) Enzima, (S) Sacarose, (F) Frutose, (A) Aceptor, (H₂O) Água, (EG_i) Complexo Enzima-Substrato com grau de polimerização *i*, (AG_i) Oligossacarídeo com grau de polimerização *i*, (EDX_i) Complexo Enzima-Dextrana com grau de polimerização *i*, (DX_i) Dextrana com grau de polimerização *i*



Verificou-se pelos dados experimentais da Síntese I que existem possíveis interações envolvendo os sítios ativos e os oligossacarídeos formados, principalmente AG_4 . Nestes experimentos, a concentração de AG_4 chegou a um valor máximo de 14,59 g/L e depois decaiu consideravelmente, chegando a 7,38 g/L.

O modelo 3 considerou que os oligossacarídeos podem ser substratos do sítio GLC 2904, interagindo com o sítio e formando os complexos enzima-substrato com grau de polimerização igual ao oligossacarídeo consumido, por exemplo, a reação de consumo de AG_4 produz EG_4 e libera uma molécula de acceptor (A). Genericamente, a reação de consumo de oligossacarídeos é expressa por:



Devido a reação de consumo de oligossacarídeos, há um aumento na concentração de complexos enzima-substrato com maiores graus de polimerização, conseqüentemente, um alongamento mais proeminente da cadeia oligomérica formada. A constante cinética da reação de consumo do oligossacarídeo AG_i com a enzima é identificada por $k_{r(i-1)}$. A Equação 4.7 representa a lei de velocidade genérica.

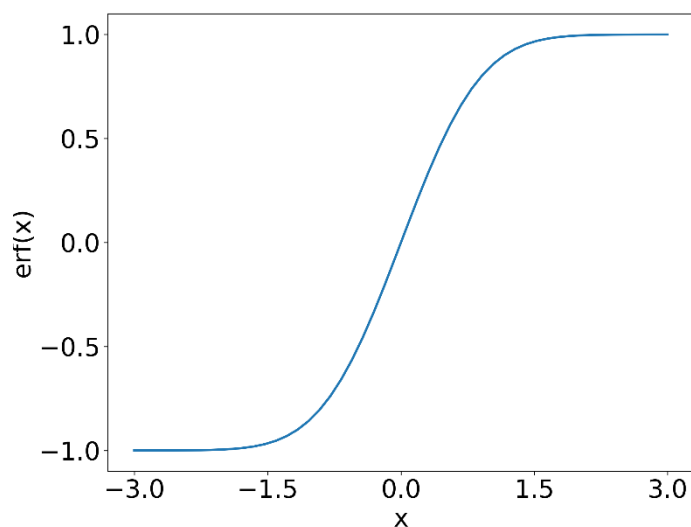
$$r_{ri} = k_{r(i-1)}[AG_i][E] \quad (4.7)$$

No caso particular do AG_4 , verificou-se que o consumo deste carboidrato só ocorre a partir de determinadas concentrações. A provável causa deste comportamento é o tamanho deste oligômero, que tem seu acesso ao sítio ativo dificultado.

Supôs-se que este oligômero só consiga se ligar à enzima em altas concentrações, interagindo com os sítios ativos, GLC 2903 e GLC 2904. Com esta interação, ocorre a alteração da conformação tridimensional da enzima e facilita a propagação dos complexos com maiores graus de polimerização. O comportamento se assemelha a um gatilho, pois esta alteração só é evidenciada após AG_4 atingir determinadas concentrações.

Matematicamente, este “gatilho de consumo” foi modelado baseado na função erro. A Figura 14 ilustra o comportamento da função erro.

Figura 14. Perfil da função erro



Fonte: elaborada pelo autor

Observa-se que esta função varia no intervalo $[-1,1]$. Em um curto intervalo de valores da variável independente, a função varia drasticamente do mínimo para o máximo. Assim, esta função foi adaptada para que conseguisse representar o fenômeno do gatilho citado.

Esta alteração foi incorporada diretamente no valor da constante cinética de consumo k_{r3} . Em baixas concentrações, a constante assume o valor nulo. A partir da concentração em que ocorre o “gatilho de consumo”, a constante migra para o valor máximo conforme a curva “S” semelhante à função erro. A obtenção da constante cinética k_{r3} é mostrada na Equação 4.8.

$$k_{r3} = a \cdot (\text{erf}([AG_4] - b) + 1) \quad (4.8)$$

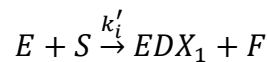
Na Eq. 4.8, o parâmetro a identifica o valor máximo e mínimo que a função pode alcançar, assim, seu valor numérico será metade do valor da constante cinética k_{r3} . $[AG_4]$ é a própria concentração do oligômero. O termo b define em que concentração haverá a mudança brusca do valor da função, representando o comportamento característico em “S” da função erro. Numericamente, b será a concentração do “gatilho de consumo”. O último termo, valor 1, serve apenas para ajustar o mínimo da função, fazendo com que a constante assuma o valor nulo em concentrações menores que a de gatilho e o intervalo da função seja $[0, k_{r3}]$.

Considerou-se para os demais oligossacarídeos que a reação de consumo era uma reação elementar, não havendo nenhum tipo de gatilho, como o usado para AG_4 . Usou-se uma

constante de terminação única k_{t6} e uma de consumo única k_{r6} para cadeias de oligossacarídeos maiores que AG_6 . Estas constantes tiveram a finalidade de generalizar o modelo, pois não se tem dados experimentais mensuráveis de oligossacarídeos com estes graus de polimerização para que se pudessem ajustar os parâmetros.

Na modelagem matemática da síntese de dextranas, as constantes cinéticas são k'_i , k'_p e k'_t para as etapas de iniciação, propagação e terminação, respectivamente. Considerou-se que a constante de terminação é a mesma para qualquer grau de polimerização de dextrana, pois a molécula de água é suficientemente pequena para acessar facilmente o sítio ativo. A água foi considerada como agente de terminação de cadeia, logo, o acceptor da síntese de dextrana.

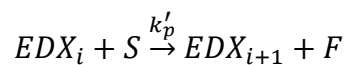
Quando um dos sítios ativos da síntese de dextrana, GLC 2903 ou GLC 2905, interage com a sacarose, forma-se o complexo enzima-dextrana (EDX_1) e libera uma molécula de frutose (F). A representação da etapa de iniciação para síntese de dextrana é:



Onde a lei de velocidade dessa iniciação é:

$$r'_i = k'_i[E][S] \quad (4.9)$$

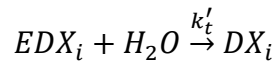
A etapa de propagação do complexo enzima-dextrana com grau de polimerização i assume a seguinte forma:



De posse da reação de propagação, obtém-se a lei de velocidade desta etapa:

$$r'_{pi} = k'_p[EDX_i][S] \quad (4.10)$$

A terminação ocorre a partir do complexo EDX_5 , corroborando que uma cadeia pode ser considerada longa a partir de 5 monômeros (FERNANDES; LONA, 2004). A terminação ocorre por uma reação de hidrólise, onde a água age como acceptor. Esta etapa é descrita genericamente por:



A lei de velocidade para a terminação é:

$$r'_t = k'_t[EDX_i] \quad (4.11)$$

A quantidade total de enzimas deste modelo é o somatório das enzimas livres, enzimas do complexo enzima-substrato e do complexo enzima-dextrana, podendo ser obtida pela Equação 4.12.

$$[E_t] = [E] + \sum_{i=1}^n [EG_i] + \sum_{i=1}^n [EDX_i] \quad (4.12)$$

4.4 Balanços de Massa para Reator em Batelada

De posse das cinéticas reacionais propostas, pode-se realizar o equacionamento para a síntese de oligossacarídeos em um reator batelada. Assumindo que o reator possui volume constante, o sistema é incompressível e que a mistura é perfeita, podemos realizar os balanços de massa por componente de acordo com a Equação 4.13.

$$Entra - Sai \pm Gerado = Acumula \quad (4.13)$$

Aplicando todas as hipóteses simplificadoras, para um componente X, a Eq. 4.13 se torna:

$$\frac{d[X]}{dt} = r_{Xi} \quad (4.13)$$

Onde r_{Xi} identifica as reações que envolvem o componente X. O equacionamento que será realizado a seguir, baseia-se no modelo 3, mas o procedimento é análogo para os modelos 1 e 2. Os balanços molares para enzima, sacarose, frutose, acceptor e glicose são descritos pelas Equações 4.15 a 4.19, respectivamente.

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} = & \left(-k_i[E][S] + \sum_{i=2}^6 k_{t(i-1)}[EG_i][A] - k_{r(i-1)}[AG_i][E] \right. \\ & + \sum_{i=7}^n k_{t6}[EG_i][A] - k_{r6}[AG_i][E] \left. \right) \\ & + \left(-k'_i[E][S] + \sum_{i=5}^n k_{t6}[EDX_i] \right) \end{aligned} \quad (4.15)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{dt} = & \left(-k_i[E][S] - \sum_{i=1}^{n-1} k_p[EG_i][S] \right) \\ & + \left(-k'_i[E][S] - \sum_{i=1}^{n-1} k'_p[EDX_i][S] \right) \end{aligned} \quad (4.16)$$

$$\frac{d[F]}{dt} = \left(k_i[E][S] + \sum_{i=1}^{n-1} k_p[EG_i][S] \right) + \left(k'_i[E][S] + \sum_{i=1}^{n-1} k'_p[EDX_i][S] \right) \quad (4.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} = & \left(\sum_{i=2}^6 -k_{t(i-1)}[EG_i][A] + k_{r(i-1)}[AG_i][E] \right) \\ & + \left(\sum_{i=7}^n -k_{t6}[EG_i][A] + k_{r6}[AG_i][E] \right) \end{aligned} \quad (4.18)$$

$$\frac{dG}{dt} = \left(\sum_{i=2}^6 k_{t(i-1)}[EG_i][A] + \sum_{i=7}^n k_{t6}[EG_i][A] \right) + \left(\sum_{i=5}^n k_{t6}[EDX_i] \right) \quad (4.19)$$

O balanço para o complexo EG_1 é apresentado pela Equação 4.20. Enquanto os balanços para os complexos entre EG_2 e EG_6 são expostos pela Eq. 4.21. A Equação 4.22 mostra, de forma geral, o balanço para os complexos EG_7 até EG_{n-1} . O complexo EG_n pode ser obtido pela Eq. 4.23.

$$\frac{d[EG_1]}{dt} = k_i[E][S] - k_p[EG_1][S] \quad (4.20)$$

$$\frac{d[EG_i]}{dt} = k_p[EG_{i-1}][S] - k_p[EG_i][S] - k_{t(i-1)}[EG_i][A] + k_{r(i-1)}[AG_i][E] \quad (4.21)$$

$$\frac{d[EG_i]}{dt} = k_p[EG_{i-1}][S] - k_p[EG_i][S] - k_{t6}[EG_i][A] + k_{r6}[AG_i][E] \quad (4.22)$$

$$\frac{d[EG_i]}{dt} = k_p[EG_{i-1}][S] - k_{t6}[EG_i][A] + k_{r6}[AG_i][E] \quad (4.23)$$

Os balanços molares dos oligossacarídeos formados AG_2 até AG_6 são representados genericamente pela Eq. 4.24. Os oligômeros AG_7 até AG_n são obtidos pela Eq. 4.25.

$$\frac{d[AG_i]}{dt} = k_{t(i-1)}[EG_i][A] - k_{r(i-1)}[AG_i][A] \quad (4.24)$$

$$\frac{d[AG_i]}{dt} = k_{t6}[EG_i][A] - k_{r6}[AG_i][A] \quad (4.25)$$

Os balanços dos complexos enzima-dextrana e dextranas são análogos aos balanços da cinética dos oligossacarídeos. Assim, a Eq. 4.26 caracteriza o balanço para o complexo EDX_1 , a Eq. 4.27 para EDX_2 até EDX_4 , a Eq. 4.28 para EDX_5 até EDX_{n-1} , a Eq. 4.29 representa o balanço para EDX_n . A Equação 4.30 mostra o balanço para as dextranas formadas DX_5 até DX_n .

$$\frac{d[EDX_1]}{dt} = k'_i[E][S] - k'_p[EDX_1][S] \quad (4.26)$$

$$\frac{d[EDX_i]}{dt} = k'_p[EDX_{i-1}][S] - k'_p[EDX_i][S] \quad (4.27)$$

$$\frac{d[EDX_i]}{dt} = k'_p[EDX_{i-1}][S] - k'_p[EDX_i][S] - k'_t[EDX_i] \quad (4.28)$$

$$\frac{d[EDX_i]}{dt} = k'_p[EDX_{i-1}][S] - k'_t[EDX_i] \quad (4.29)$$

$$\frac{d[DX_i]}{dt} = k'_t[EDX_i] \quad (4.30)$$

A concentração de enzima é dada em termos de atividade enzimática (UI/L). Os balanços de enzima e complexos são feitos usando esta unidade. O uso desse artifício não altera fisicamente a modelagem, pois essa unidade expressa uma quantidade real presente no meio reacional. Matematicamente, esta consideração afeta o valor numérico das constantes cinéticas. Partindo-se da Equação 4.1, podemos chegar à análise dimensional da lei de velocidade, por meio da Eq. 4.31.

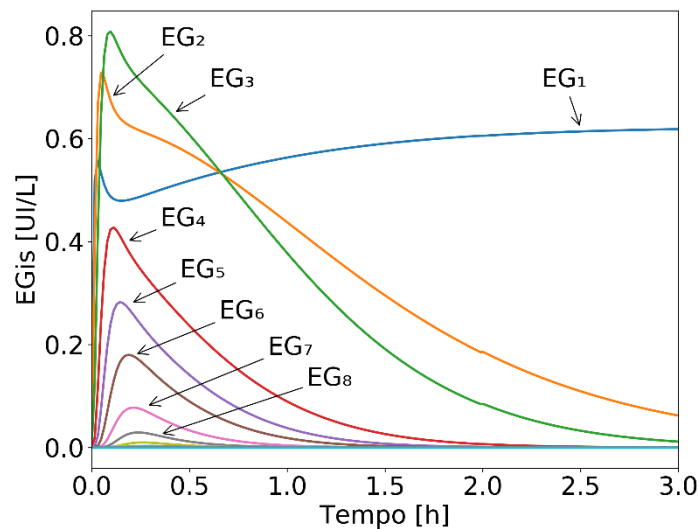
$$\frac{\text{mol}}{\text{L}\cdot\text{s}} = k_i \cdot \frac{\text{UI}}{\text{L}} \cdot \frac{\text{mol}}{\text{L}} \quad (4.31)$$

Assim, a unidade das constantes cinéticas se torna:

$$k_i = \frac{\text{L}}{\text{UI}\cdot\text{s}} \quad (4.32)$$

Pode-se ressaltar que, com esta abordagem, é possível obter os perfis dos complexos enzimáticos e da enzima ao longo da reação. Assim, a análise do balanço de enzimas é realizada. Os perfis característicos para os complexos EG_i 's do modelo 3 em um reator batelada são ilustrados pela Figura 15.

Figura 15. Perfis dos complexos enzima-substrato EG_i s em reator batelada obtidos com $S_0 = 40 \text{ g/L}$, $A_0 = 45 \text{ g/L}$ e $E_t = 10 \text{ UI/L}$



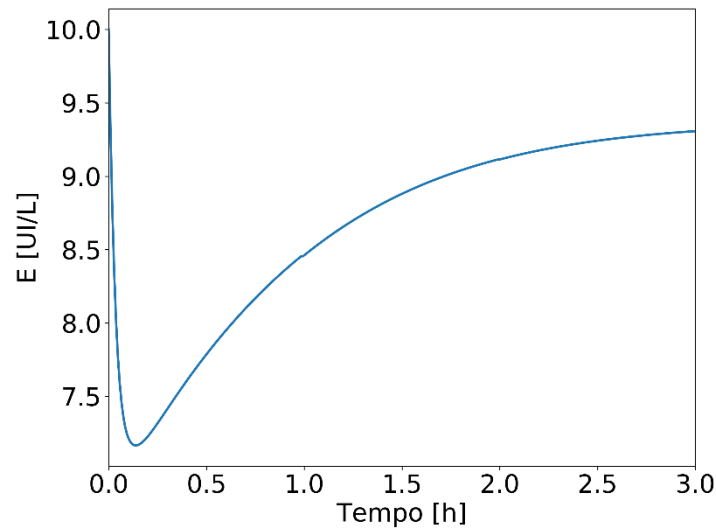
Fonte: elaborada pelo autor

O perfil do complexo EG_1 possui diferenças consideráveis quando comparado com os outros, pois sua velocidade de formação é maior que sua velocidade de consumo na maior parte do tempo de reação.

No início da reação, ocorre a formação do complexo EG_1 , pelo consumo de enzima e substrato, mas rapidamente é consumido por meio das etapas de propagação, possibilitando a formação dos complexos seguintes. Após a formação dos demais EG_i 's, as etapas de terminação começam a ocorrer, promovendo assim, um aumento considerável na quantidade de enzima,

conforme a Figura 16. Com o aumento na concentração de enzima, a formação de EG_1 cresce.

Figura 16. Perfil da enzima em reator batelada obtido com $S_0 = 40 \text{ g/L}$, $A_0 = 45 \text{ g/L}$ e $E_t = 10 \text{ UI/L}$



Fonte: elaborada pelo autor

Devido as considerações e complexidade de cada modelo, um número diferente de equações diferenciais é necessário para resolver o sistema. Com o aumento da complexidade do modelo, mais equações são necessárias para resolução do sistema. Este aumento na complexidade reflete diretamente no esforço computacional para obter as soluções. A Tabela 7 mostra o total de equações presentes em cada modelo para um grau de polimerização máximo de 30 unidades monoméricas.

Tabela 7. Número de equações nos modelos desenvolvidos considerando o grau de polimerização máximo de 30 monômeros

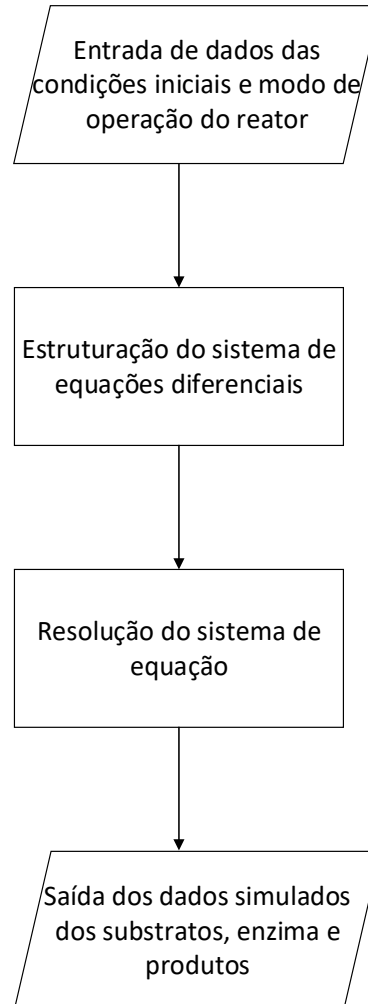
Modelo	Número de Equações Diferenciais
1	16
2	66
3	126

Fonte: elaborada pelo autor

Todas as equações são resolvidas simultaneamente por meio de um sistema de equações através do Método Jacobiano. O fluxograma lógico de simulação dos modelos desenvolvidos

para um reator é descrito sucintamente pela Figura 17.

Figura 17. Fluxograma lógico de simulação dos modelos



Fonte: elaborada pelo autor

Todas as equações usadas neste trabalho foram implementadas na linguagem de programação Python[®] com auxílio de seus módulos científicos. Algumas sub-rotinas e bibliotecas pré-programadas foram usadas, destacando-se:

- **numpy:** biblioteca que contém vários métodos numéricos de resolução de sistemas de equações, dentre eles, o método da Fatoração LU e o método Jacobiano, utilizados para resolver os sistemas de equações apresentados nas próximas seções;
- **scipy.optimize.leastsq:** sub-rotina que realiza a regressão não-linear usando o método de Levenberg-Marquardt para ajustar os parâmetros do modelo;

- **pyswarm:** biblioteca que possui as rotinas do método do enxame de partículas implementado. Esta ferramenta foi utilizada para otimizar as condições operacionais após a definição dos parâmetros do modelo mais adequado.

4.5 Estimativa de parâmetros cinéticos

O ajuste dos parâmetros cinéticos foi realizado por meio de uma rotina implementada em python usando o método não linear de mínimos quadrados de Levenberg-Marquardt. Os ajustes foram realizados com os dados da Síntese I. As funções objetivo usadas basearam-se na comparação entre os valores obtidos experimentalmente com os simulados para oligossacarídeos e dextranas, conforme a Eq.4.33.

$$Resíduo = \alpha \cdot (X_{experimental} - X_{simulado})^2 \quad (4.33)$$

As concentrações dos oligossacarídeos obtidos experimentalmente na síntese I apresentaram ordens de grandezas diferentes. Essa diferença é observada entre AG_2 e AG_6 , onde as concentrações finais foram 32,11 e 2,21 g/L, enquanto os valores simulados foram 34,94 e 2,68 g/L. A concentração obtida experimentalmente de AG_2 foi cerca de 14,53 vezes superior à de AG_6 . Devido à grande variação nos valores obtidos entre os vários oligossacarídeos, um fator multiplicativo α foi incorporado na função objetivo do ajuste.

O intuito da utilização deste fator α foi obter um melhor ajuste para os parâmetros cinéticos. Sem este artifício, a relevância dos oligossacarídeos maiores seria menor na função objetivo. Sem o uso do fator α , as funções resíduo seriam 8,59 e 0,22 para AG_2 e AG_6 , mostrando que o resíduo de AG_6 possui menor relevância matemática, propiciando maiores erros no ajuste de parâmetros que envolvem este oligossacarídeo.

Com o uso do fator α , os resíduos assumem os valores 8,59 e 4,42 para AG_2 e AG_6 , respectivamente. Logo, a influência do ajuste de AG_6 aumenta e faz com que os valores dos parâmetros sejam mais realistas. A Tabela 8 apresenta os valores usados para os valores do fator α nos oligossacarídeos e dextranas.

Tabela 8. Valores do fator α para aplicação dos pesos nas funções objetivo

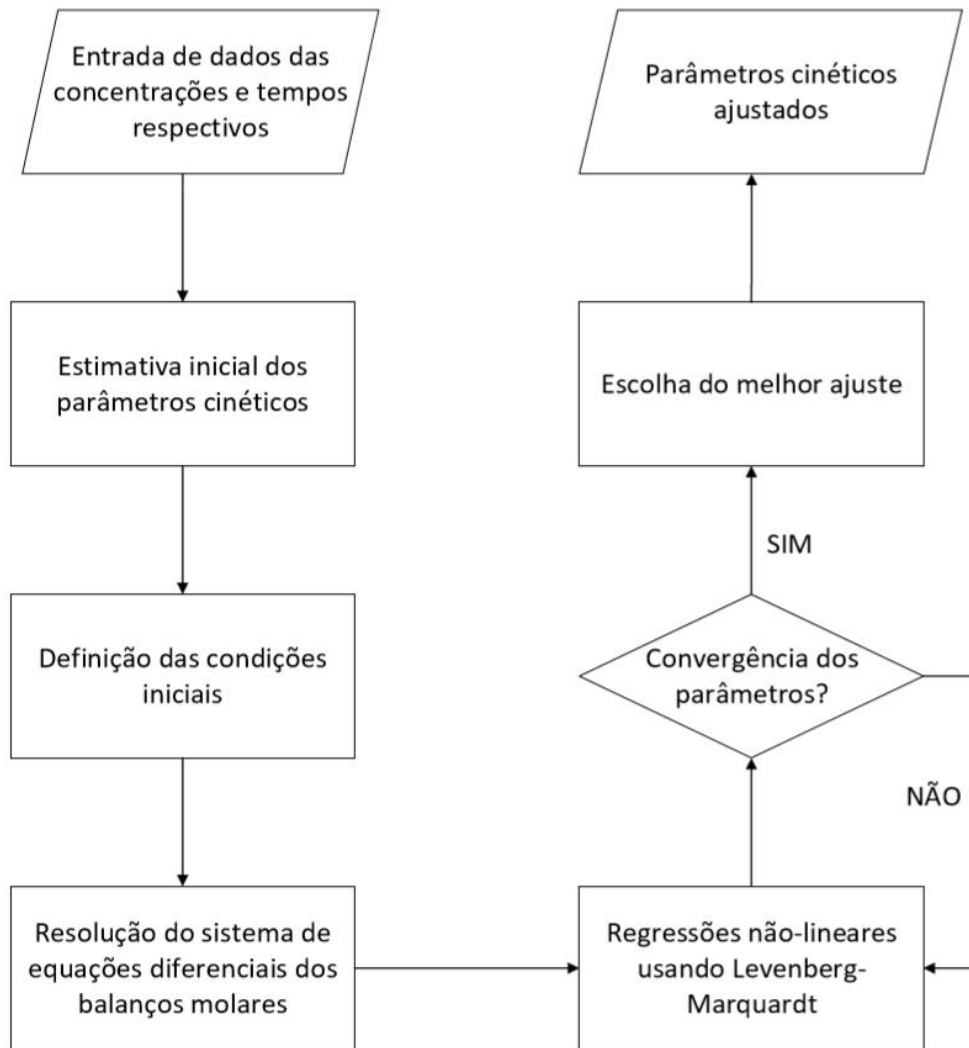
Carboidrato	Fator α
AG_2	1
AG_3	2
AG_4	2
AG_5	10
AG_6	20
DX_n	10

Fonte: elaborada pelo autor

A comparação dos dados das dextranas foi realizada usando os dados experimentais com o somatório de todas as dextranas obtidas na simulação. Uma vez que os dados coletados indicavam apenas a quantidade total de dextrana, não individualizando pelo grau de polimerização.

De forma geral, inicializa-se a rotina com as condições iniciais da reação e condições do reator. Após esta etapa, definem-se as estimativas iniciais dos parâmetros. Então o modelo é simulado com estes valores iniciais. Aplica-se o método de regressão não linear e comparam-se os valores simulados com os experimentais. Enquanto não há convergência, a rotina se repete alterando os valores dos parâmetros. Quando a convergência é alcançada, definem-se os parâmetros cinéticos. O fluxograma lógico para ajuste dos parâmetros é mostrado na Figura 18.

Figura 18. Fluxograma lógico para estimativa dos parâmetros cinéticos



Fonte: elaborada pelo autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentadas as simulações dos modelos desenvolvidos comparando com os três conjuntos experimentais supracitados. O primeiro conjunto foi utilizado para ajustar os parâmetros cinéticos. O segundo e terceiro foram usados para validar os modelos após o ajuste.

As sínteses I e II possuem particularidades em seu procedimento experimental, logo alterações sutis na implementação dos modelos foram realizadas e são explicadas nas seções respectivas.

A síntese III foi o único conjunto de dados que forneceu informações sobre desvios

padrões e erros experimentais. Os ensaios foram realizados em triplicatas, segundo os autores. Assim, considerou-se que os mesmos percentuais de erros são aceitáveis nas sínteses I e II para que o teste de hipótese pudesse ser feito nos três conjuntos. O erro experimental médio reportado nas primeiras 24h da Síntese III foi de aproximadamente 16,78%. Logo, o erro simulado dos modelos deve ser menor que este valor para que eles possam ser significantes.

5.1 Ajuste dos parâmetros cinéticos com a Síntese I

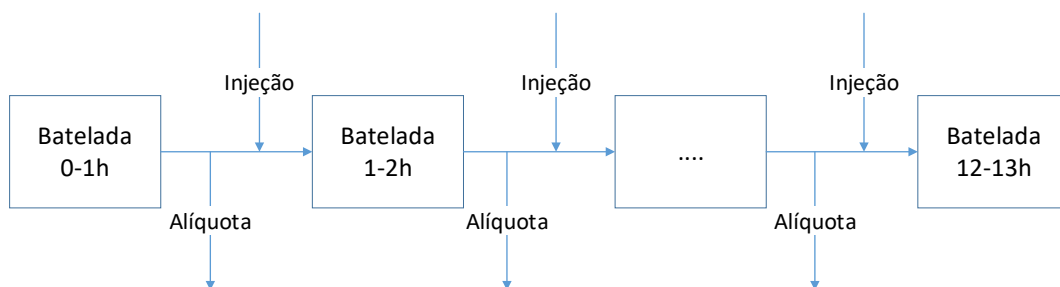
Estes experimentos possuem procedimentos definidos de retirada de alíquotas e injeção de substrato e/ou acceptor em intervalos de tempos regulares de 1h. Assim, o equacionamento dos balanços molares foi realizado como reatores em batelada entre os intervalos das alíquotas.

Já que os volumes de alíquota e pulso de injeção foram os mesmos e a retirada de alíquota e injeção do pulso foram realizadas num intervalo de tempo desprezível, o volume reacional permaneceu constante ao longo do experimento.

No total, foram consideradas 13 bateladas. Cada batelada considerada possuiu 1h de duração, onde a primeira começou no início da reação e finalizou no instante de retirada da alíquota. Após a retirada da alíquota e injeção de substrato e/ou produto, a batelada seguinte teve início. A condição inicial da batelada seguinte consistiu da condição final da batelada anterior, considerando a remoção da alíquota e adição do pulso injetado.

Esta abordagem de segmentação das bateladas serviu para englobar as especificidades do procedimento experimental, pois as alimentações foram realizadas na forma de pulsos e não continuamente. O esquema utilizado na modelagem matemática desse procedimento experimental é mostrado na Figura 19.

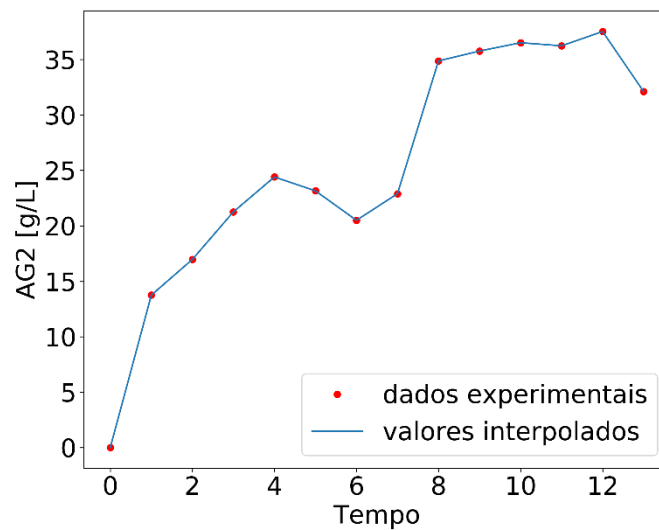
Figura 19. Esquema de bateladas consideradas na modelagem da Síntese I



Fonte: elaborada pelo autor

Para a realização do ajuste de parâmetros, os dados foram interpolados linearmente, produzindo uma quantidade grande de pontos a serem comparados com os valores simulados. No total, foram gerados 500 pontos para cada oligossacarídeo, facilitando assim, o ajuste dos parâmetros. A Figura 20 mostra os valores obtidos nos experimentos e os valores interpolados linearmente para AG_2 .

Figura 20. Valores interpolados para concentração de AG_2 na Síntese I



Fonte: elaborada pelo autor

5.1.1 Regressão não linear do Modelo 1

Após a rotina de regressão não linear, os parâmetros cinéticos do modelo 1 foram estimados. Estes valores são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos ajustados do Modelo 1 com os dados da Síntese I

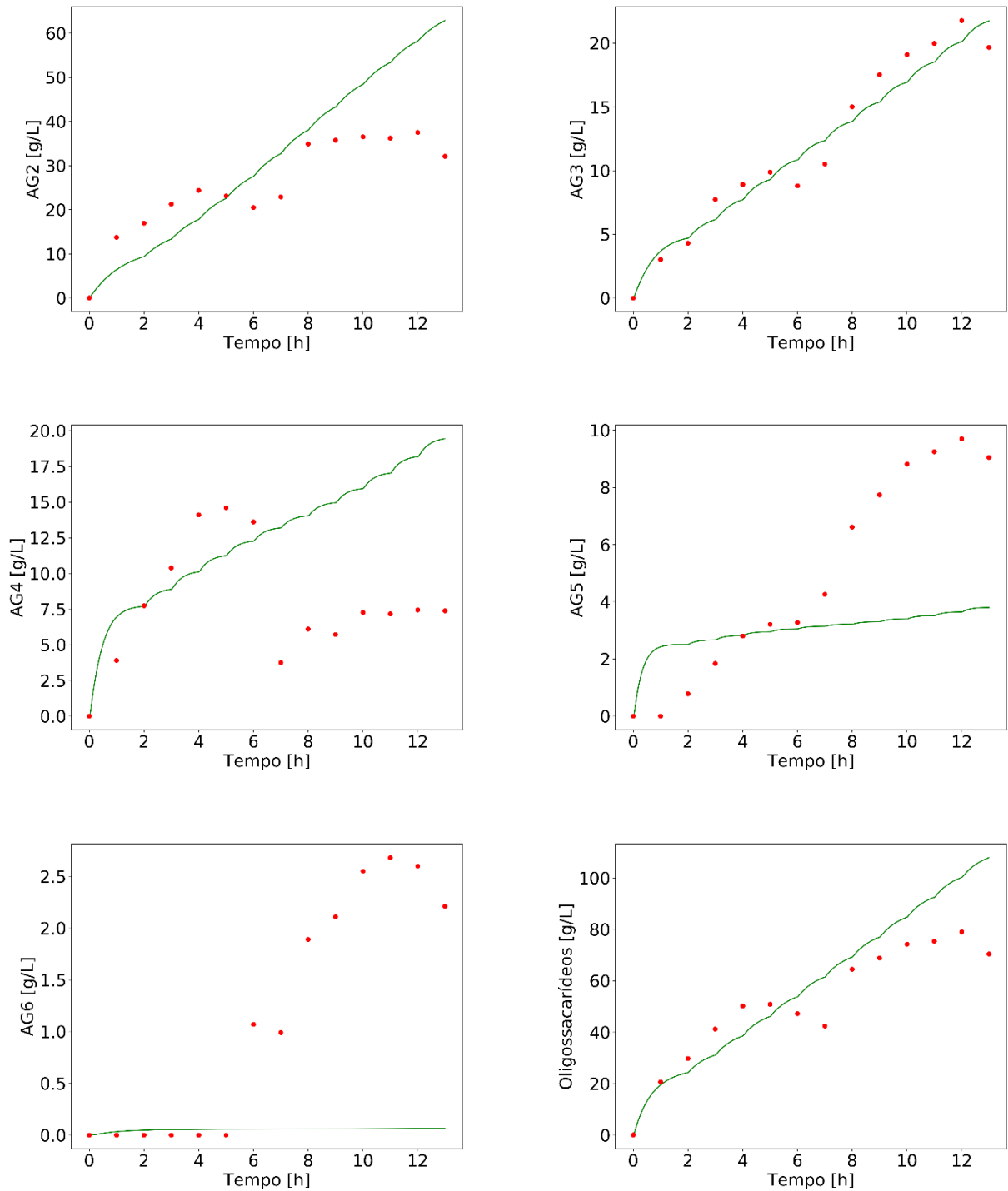
Parâmetro	Significado	Valor [L/UI · s]
k_i	Constante de iniciação	$1,53 \cdot 10^{-5}$
k_p	Constante de propagação	$4,44 \cdot 10^{-4}$
k_{t1}	Constante de terminação de AG ₂	$9,45 \cdot 10^{-5}$
k_{t2}	Constante de terminação de AG ₃	$4,25 \cdot 10^{-5}$
k_{t3}	Constante de terminação de AG ₄	$2,25 \cdot 10^{-4}$
k_{t4}	Constante de terminação de AG ₅	$3,05 \cdot 10^{-3}$
k_{t5}	Constante de terminação de AG ₆	$3,26 \cdot 10^{-6}$

Fonte: elaborada pelo autor

Podemos observar pela Tabela 9 que os valores das constantes cinéticas ajustados não são representativos, uma vez que as constantes de terminação dos oligômeros com menores graus de polimerização, AG₂ e AG₃, deveriam apresentar os maiores valores entre as constantes de terminação, pois estes oligossacarídeos são produzidos em maiores quantidades. Logo, este ajuste dá um indicativo inicial que o modelo não consegue prever a cinética enzimática.

Para uma análise mais completa, realizou-se a simulação do modelo 1 com as condições da Síntese I. A Figura 21 mostra os perfis de concentração dos carboidratos nesta simulação.

Figura 21. Simulações do modelo 1 com as condições e os dados experimentais da Síntese I.
 (●) pontos experimentais (g/L), (—) valores preditos pelo modelo 1 (g/L)

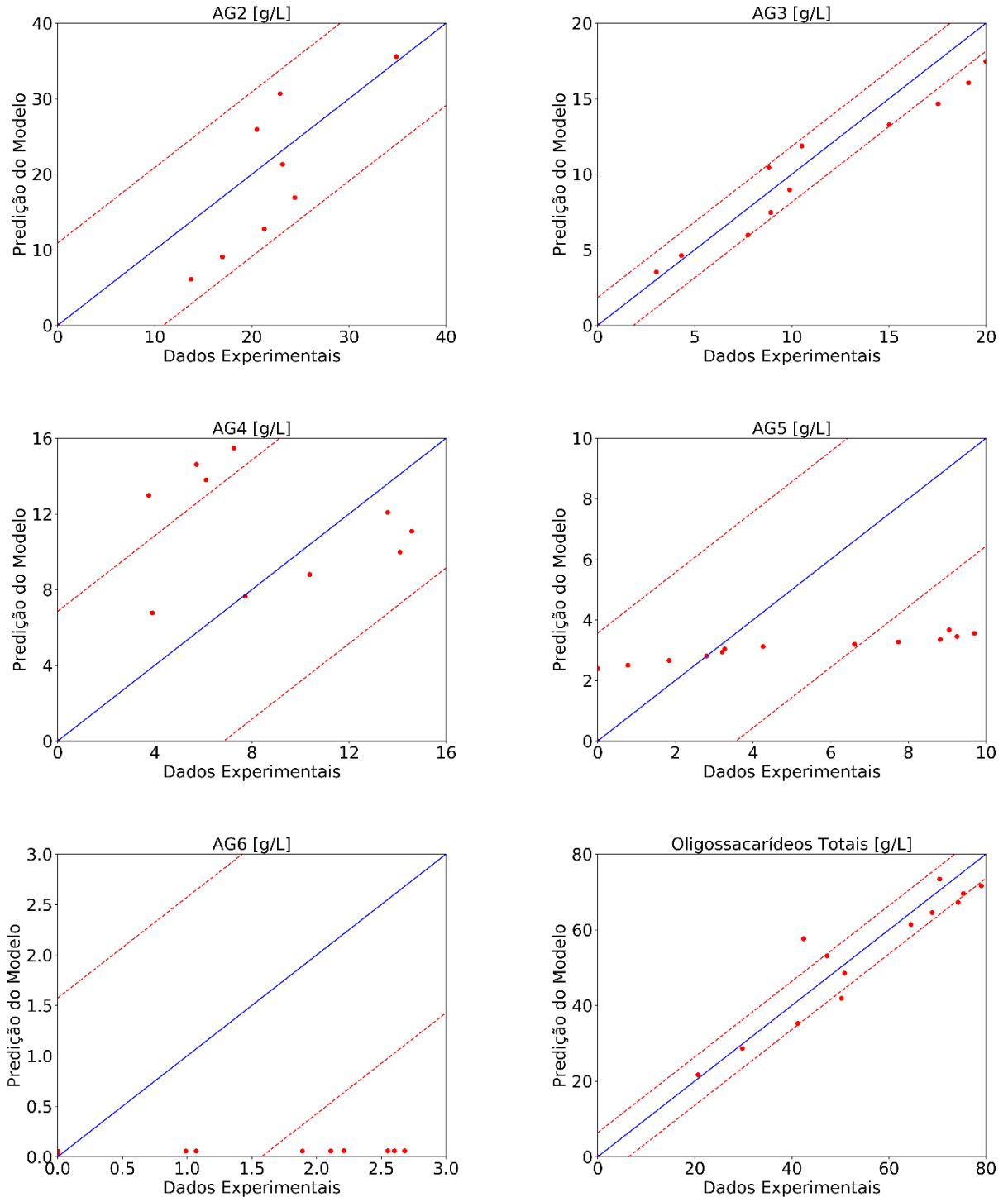


Fonte: elaborada pelo autor

Percebemos que os dados experimentais não foram representados pelo modelo 1. Apenas o perfil de concentração de AG_3 foi predito corretamente. Estes desvios indicam que a consideração que dextranas não influenciam a cinética não é válida. Algumas análises complementares com fundamentação estatística foram realizadas e são apresentadas a seguir.

A Figura 22 mostra o espalhamento dos pontos experimentais dos oligossacarídeos com as bissetrizes dos dados experimentais e simulados. A curva pontilhada em vermelho representa o intervalo de confiança de 95%, os pontos em vermelho identificam os dados experimentais e a reta azul é a bissetriz dos valores simulados e experimentais.

Figura 22. Simulações do Modelo 1 na Síntese I com o espalhamento dos dados experimentais. (--) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (—) reta bissetriz



Fonte: elaborada pelo autor

Observamos na Figura 22 que o espalhamento dos pontos experimentais em relação à bissetriz é grande para os oligossacarídeos de maiores graus de polimerização (AG_4 , AG_5 e AG_6). Este espalhamento é evidenciado pelos valores dos intervalos de confiança (I.C.), onde os valores de I.C. de AG_4 , AG_5 e AG_6 foram cerca de 87,89, 74,11 e 136,85 % dos valores médios das respectivas concentrações.

Mesmo visivelmente não representativo, as análises estatísticas foram realizadas para avaliar a representatividade do modelo com os dados. Assim, a Tabela 10 expõe as informações estatísticas realizadas.

Tabela 10. Valores estatísticos do Modelo 1 com os dados da Síntese I

Carboidrato	R^2	RSD	E_{sim}
AG_2	0,84	11,13	24,43
AG_3	0,96	1,88	8,34
AG_4	0,01	6,99	48,15
AG_5	0,72	3,64	36,99
AG_6	0,31	1,61	60,95
Oligossacarídeos Totais	0,89	12,44	13,47

Fonte: elaborada pelo autor

As análises estatísticas mostram que o modelo conseguiu ser representativo apenas para AG_3 e *Oligossacarídeos Totais*. O erro simulado foi menor que o erro experimental considerado, mesmo assim, conclui-se que este modelo não é adequado, pois o principal objetivo do modelo é representar os oligômeros separadamente. Outro fator determinante para o descarte deste modelo é a falta de informações acerca da dextrana, uma vez que não foi considerada no modelo.

5.1.2 Regressão não linear do Modelo 2

O modelo 2 é uma versão mais complexa do modelo 1 por contemplar a síntese de dextranas. Neste modelo, a síntese de dextrana ocorre pela hidrólise dos complexos enzima-substrato maiores. Os valores ajustados dos parâmetros são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos ajustados do Modelo 2 com os dados da Síntese I

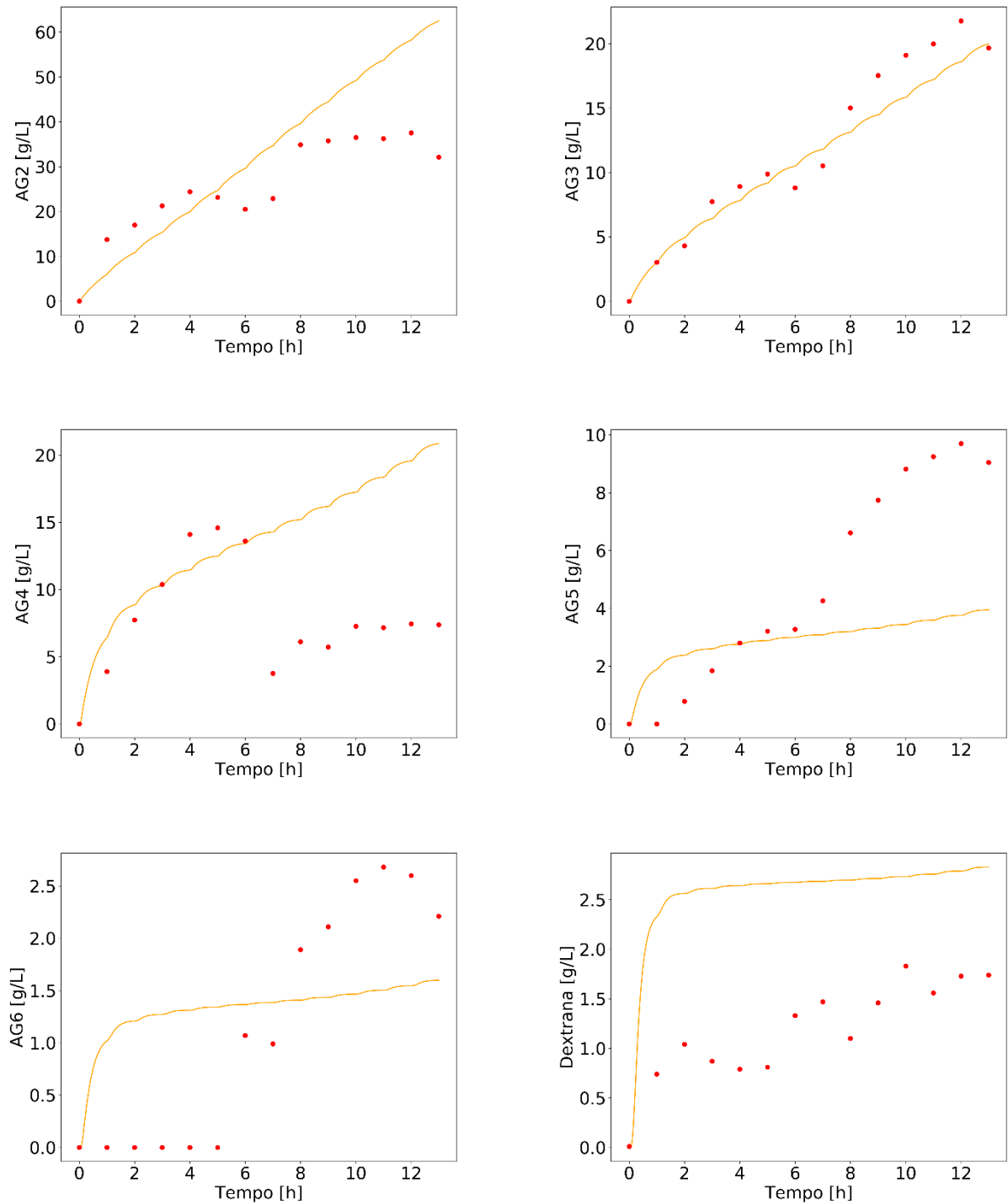
Parâmetro	Significado	Valor [L/UI · s]
k_i	Constante de iniciação	$1,81 \cdot 10^{-5}$
k_p	Constante de propagação	$2,71 \cdot 10^{-4}$
k_{t1}	Constante de terminação de AG ₂	$5,09 \cdot 10^{-5}$
k_{t2}	Constante de terminação de AG ₃	$1,85 \cdot 10^{-5}$
k_{t3}	Constante de terminação de AG ₄	$7,82 \cdot 10^{-5}$
k_{t4}	Constante de terminação de AG ₅	$3,24 \cdot 10^{-5}$
k_{t5}	Constante de terminação de AG ₆	$2,49 \cdot 10^{-5}$
k_{dx}	Constante de terminação de dextranas	$5,35 \cdot 10^{-6}$

Fonte: elaborada pelo autor

Comparando os parâmetros em comum dos modelos 1 e 2, percebemos que os valores de k_{t4} são muito diferentes, cerca de 94 vezes menor no modelo 2, sendo a maior diferença entre os parâmetros ajustados. Essa grande variação ocorre pelo aumento de k_i e diminuição das terminações anteriores a k_{t4} . A alteração destas constantes muda as taxas dessas etapas, consequentemente a concentração dos complexos envolvidos. Diferenças sutis nas concentrações dos complexos anteriores afetam diretamente na terminação de AG₅, devido ao efeito cascata da propagação.

A Figura 23 mostra os perfis de concentração de oligossacarídeos e dextranas obtidos pela simulação do modelo 2 com os parâmetros cinéticos ajustados apresentados na Tabela 11.

Figura 23. Simulações do modelo 2 com as condições e os dados experimentais da Síntese I.
 (●) pontos experimentais (g/L), (—) valores preditos pelo modelo 2 (g/L)

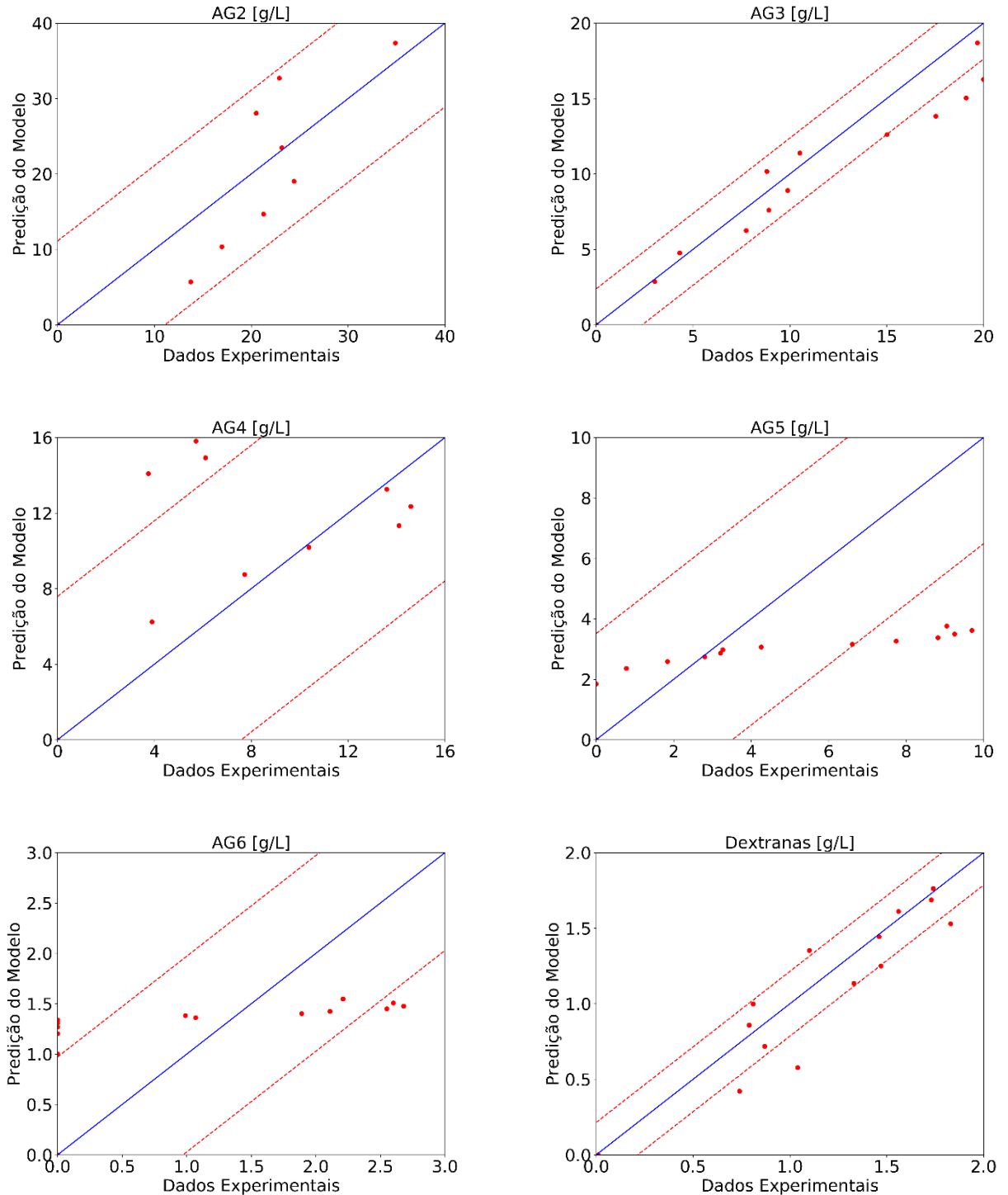


Fonte: elaborada pelo autor

A Figura 23 mostra que apenas a concentração de AG_3 foi predita corretamente. A maioria dos perfis obtidos com os modelos 1 e 2 foram semelhantes qualitativa e quantitativamente, apenas AG_6 apresentou diferenças grandes, uma vez que o modelo 2 predisse uma concentração de 1,59 g/L, enquanto o modelo 1 predisse uma concentração de 0,06 g/L.

O perfil de dextrana também não foi predito corretamente pelo modelo 2, indicando que o modelo 2 não conseguiu representar os dados experimentais. Algumas análises complementares com fundamentação estatística foram realizadas. Para ilustrar a representatividade deste modelo com os dados, o espalhamento dos pontos com a bissetriz dos dados experimentais e simulados foi plotado e é ilustrado pela Figura 24.

Figura 24. Simulações do Modelo 2 na Síntese I com o espalhamento dos dados experimentais. (--) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (—) reta bissetriz



Fonte: elaborada pelo autor

Os valores dos intervalos de confiança de AG_4 , AG_5 e AG_6 foram cerca de 97,39, 73,06 e 84,47 % dos valores médios das concentrações respectivas. Os desvios em AG_4 foram levemente maiores que os obtidos no modelo 1, os de AG_5 foram semelhantes e os de AG_6 foram metade neste modelo. Para uma avaliação dos desvios entre o modelo 2 e os dados experimentais, análises estatísticas foram realizadas e são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores estatísticos do Modelo 2 com os dados da Síntese I

Carboidrato	R^2	RSD	E_{sim}
AG_2	0,86	11,35	24,90
AG_3	0,96	2,43	10,75
AG_4	0,01	7,76	53,35
AG_5	0,75	3,59	36,47
AG_6	0,39	0,99	37,62
Oligossacarídeos Totais	0,91	13,19	14,28
Dextranas	0,44	0,51	24,40

Fonte: elaborada pelo autor

O modelo 2 foi menos significativo do que o modelo 1 na maioria dos dados. O único dado que o modelo 2 foi melhor foi em AG_6 , mas possuindo erros grandes e não representando os dados. Logo, este modelo não se mostra útil para a cinética enzimática de oligossacarídeos e dextranas.

A hipótese da síntese de oligossacarídeos e dextranas pelo mesmo conjunto de sítios ativos se mostrou inadequada pelas simulações realizadas. O modelo 1 possui duas vantagens em relação a este: maior significância, apesar de nenhum conseguir representar bem os dados e o menor esforço computacional na resolução do modelo 1, pois possui apenas 16 equações diferenciais, enquanto o modelo 2 possuiu 66 equações nas simulações realizadas.

5.1.3 Regressão não linear do Modelo 3

O modelo 3 considera que oligossacarídeos e dextranas são produzidos por sítios diferentes e que há consumo de oligossacarídeos pelo mesmo sítio ativo de síntese destes. Devido à complexidade do modelo proposto, o número de parâmetros cinéticos é maior do que os modelos anteriores. A Tabela 13 mostra os valores ajustados dos parâmetros deste modelo.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos ajustados do Modelo 3 com os dados da Síntese I

Parâmetro	Significado	Valor
k_i	Constante de iniciação dos oligossacarídeos	$5,58 \cdot 10^{-5*}$
k_p	Constante de propagação dos oligossacarídeos	$4,26 \cdot 10^{-4*}$
k_{t1}	Constante de terminação de AG ₂	$1,89 \cdot 10^{-4*}$
k_{t2}	Constante de terminação de AG ₃	$1,16 \cdot 10^{-4*}$
k_{t3}	Constante de terminação de AG ₄	$1,08 \cdot 10^{-4*}$
k_{t4}	Constante de terminação de AG ₅	$2,63 \cdot 10^{-5*}$
k_{t5}	Constante de terminação de AG ₆	$7,53 \cdot 10^{-6*}$
k_{t6}	Constante de terminação de AG ₇ até AG _n	$4,54 \cdot 10^{-7*}$
k'_i	Constante de iniciação das dextranas	$4,54 \cdot 10^{-7*}$
k'_p	Constante de propagação das dextranas	$8,73 \cdot 10^{-5*}$
k'_t	Constante de terminação das dextranas	$2,68 \cdot 10^{-6*}$
k_{r1}	Constante de reversibilidade de AG ₂	$2,09 \cdot 10^{-4*}$
k_{r2}	Constante de reversibilidade de AG ₃	$1,28 \cdot 10^{-4*}$
k_{r4}	Constante de reversibilidade de AG ₅	$1,45 \cdot 10^{-4*}$
k_{r5}	Constante de reversibilidade de AG ₆	$1,96 \cdot 10^{-4*}$
k_{r6}	Constante de reversibilidade de AG ₇ até AG _n	$4,54 \cdot 10^{-8*}$
a	Parâmetro do valor máximo de kr_3	$2,73 \cdot 10^{-4**}$
b	Parâmetro do “gatilho de consumo” de kr_3	13,07***

* [L/UI · s]

** [L²/mol · UI · s]

*** [mol/L]

Fonte: elaborada pelo autor

Observamos na Tabela 13 que o modelo 3 apresenta muitos parâmetros (18) quando comparados com os modelos anteriores. Todos estes parâmetros têm significado físico, não sendo usados apenas para o ajuste dos dados. Caso fossem usadas funções polinomiais para representar a cinética, os parâmetros poderiam até ser ajustados, mas fisicamente não representariam os fenômenos presentes, sendo meros ajustes matemáticos.

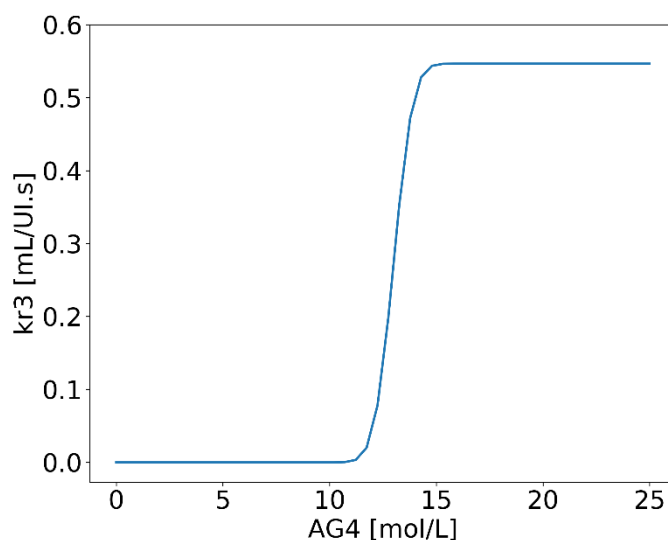
Os valores das constantes cinéticas de iniciação, propagação e terminação de oligossacarídeos são semelhantes aos valores ajustados no modelo 1. A maior variação residiu na constante de iniciação, cujo valor no modelo 3 é cerca de 3,65 vezes maior que o ajustado no modelo 1.

O aumento no valor da constante de iniciação ocorre pela consideração da síntese de dextrana por outro sítio, fazendo com que haja uma competição pela enzima disponível no meio. Esta disputa pela enzima ocorre porque o substrato pode se ligar tanto ao sítio que produzirá oligossacarídeos quanto ao sítio de síntese de dextranas. Assim, o maior valor numérico da velocidade específica de iniciação é necessário para que as concentrações de oligossacarídeos possam ser representadas pelo modelo 3.

Percebemos que os valores das constantes de terminação dos oligossacarídeos decrescem com o aumento do oligômero. O valor de k_{t1} é $1,89 \cdot 10^{-4}$, enquanto k_{t6} é $4,54 \cdot 10^{-7}$. Esta grande variação nos valores era esperada, pois a obtenção de oligossacarídeos com maiores graus de polimerização é muito menor que a de oligômeros com baixos pesos moleculares.

Os parâmetros a e b , mostrados na Tabela 13, foram usados para definir a constante k_{r3} de acordo com a Equação 4.8. A Figura 25 apresenta o perfil desta constante cinética em função da concentração de AG_4 .

Figura 25. Perfil da constante cinética k_{r3} com os parâmetros ajustados com os dados da Síntese I



Fonte: elaborada pelo autor

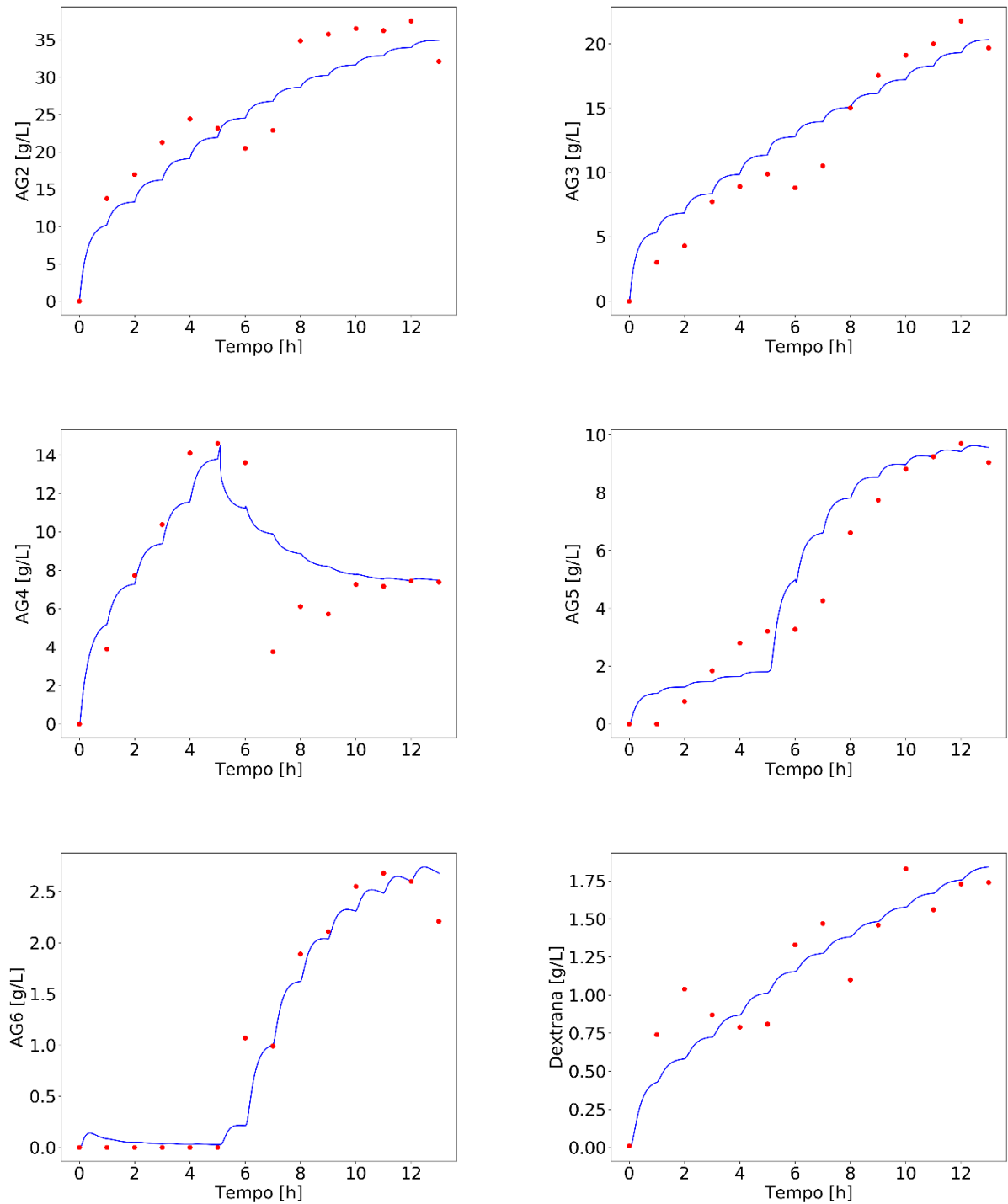
Percebemos que o valor de k_{r3} permanece nulo até a concentração de “gatilho de consumo” de AG_4 . O valor ajustado desta concentração é, aproximadamente, 13,07 mol/L. Neste ponto, o valor da constante aumenta consideravelmente em uma estreita faixa de concentração, assumindo seu valor máximo de $5,46 \cdot 10^{-4}$ L/UI · s em 15,03 mol/L de AG_4 .

Fisicamente, este salto no valor de k_{r3} indica que a concentração de AG_4 é grande o suficiente para interagir com o sítio ativo da enzima. Esta interação pode ocorrer por uma alteração conformacional da enzima, possibilitando o consumo de AG_4 .

Após a interação de AG_4 com a enzima, um aumento na concentração de complexo EG_4 ocorre, elevando a taxa de propagação para os complexos seguintes, conseqüentemente, produzindo mais oligossacarídeos de graus de polimerização superiores, como AG_5 e AG_6 .

A Figura 26 mostra os perfis de concentração de oligossacarídeos e dextranas simulados com o modelo 3 usando os parâmetros cinéticos ajustados mostrados na Tabela 13.

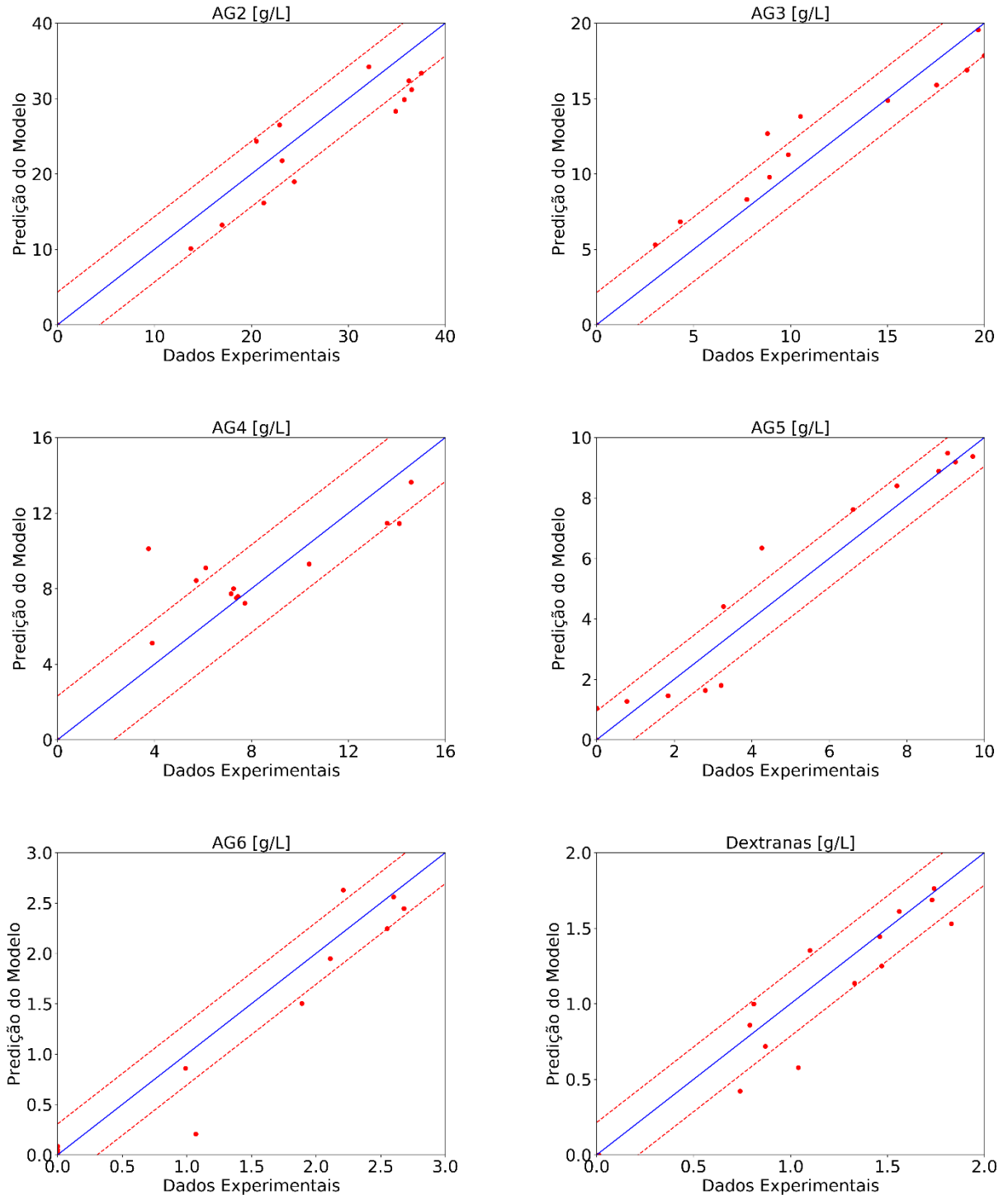
Figura 26. Simulações do modelo 3 com as condições e os dados experimentais da Síntese I.
 (●) pontos experimentais (g/L), (—) valores preditos pelo modelo 3 (g/L)



Fonte: elaborada pelo autor

Observamos que este modelo foi capaz de prever qualitativamente a maioria das concentrações de oligossacarídeos e dextranas. O perfil de AG_4 foi o único que apresentou diferenças qualitativas entre o modelo e os dados. Uma discussão mais detalhada das prováveis causas deste desvio é realizada na seção seguinte. A análise visual do espalhamento dos dados com a bissetriz dos valores experimentais e simulados pelo modelo 3 é apresentada na Figura 27.

Figura 27. Simulações do Modelo 3 na Síntese I com o espalhamento dos dados experimentais. (---) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (—) reta bissetriz



Fonte: elaborada pelo autor

Os valores dos intervalos de confiança de AG_4 , AG_5 e AG_6 foram cerca de 29,77, 19,76 e 26,67 % dos valores médios das concentrações respectivas. Os valores obtidos dos intervalos de confiança foram inferiores aos valores dos modelos 1 e 2, indicando uma maior representatividade deste modelo. Logo, análises estatísticas foram realizadas para avaliar a significância deste equacionamento com os dados experimentais e são expostas na Tabela 14.

Tabela 14. Valores estatísticos do Modelo 3 na Síntese I com os dados da Síntese I

Carboidrato	R^2	RSD	E_{sim}
AG_2	0,90	4,43	9,72
AG_3	0,95	2,18	9,65
AG_4	0,78	2,37	15,31
AG_5	0,91	0,97	9,86
AG_6	0,97	0,31	10,87
Oligossacarídeos Totais	0,92	6,52	7,06
Dextranas	0,89	0,21	10,37

Fonte: elaborada pelo autor

Observamos visualmente pela Figura 27 que o espalhamento dos dados experimentais foi bem menor neste modelo. Isto também é evidenciado pelos testes estatísticos realizados, pois a maioria dos carboidratos apresentou erro simulado abaixo de 11 %.

Os maiores desvios ocorreram em AG_4 , apresentando erro simulado de 15,31 %. Estes desvios ocorreram após a redução considerável da concentração de AG_4 . O comportamento da concentração deste oligômero é um ponto crítico no modelo, pois esta redução é explicada matematicamente pelo consumo deste produto.

Fisicamente, a consideração do “gatilho de consumo” sugere que haja uma afinidade considerável da enzima por AG_4 em altas concentrações, modificando a estrutura da enzima, possibilitando o consumo deste. Este modelo foi o único capaz de prever a redução na concentração de AG_4 , evidenciando a complexidade da cinética enzimática.

O erro simulado de AG_4 (15,31%) foi inferior ao erro experimental considerado (16,78%), indicando que o modelo 3 foi significativo, sendo adequado para este conjunto de dados. Assim, a hipótese de rotas enzimáticas análogas para oligossacarídeos e dextranas por meio de sítios diferentes se mostrou a mais promissora entre os modelos propostos.

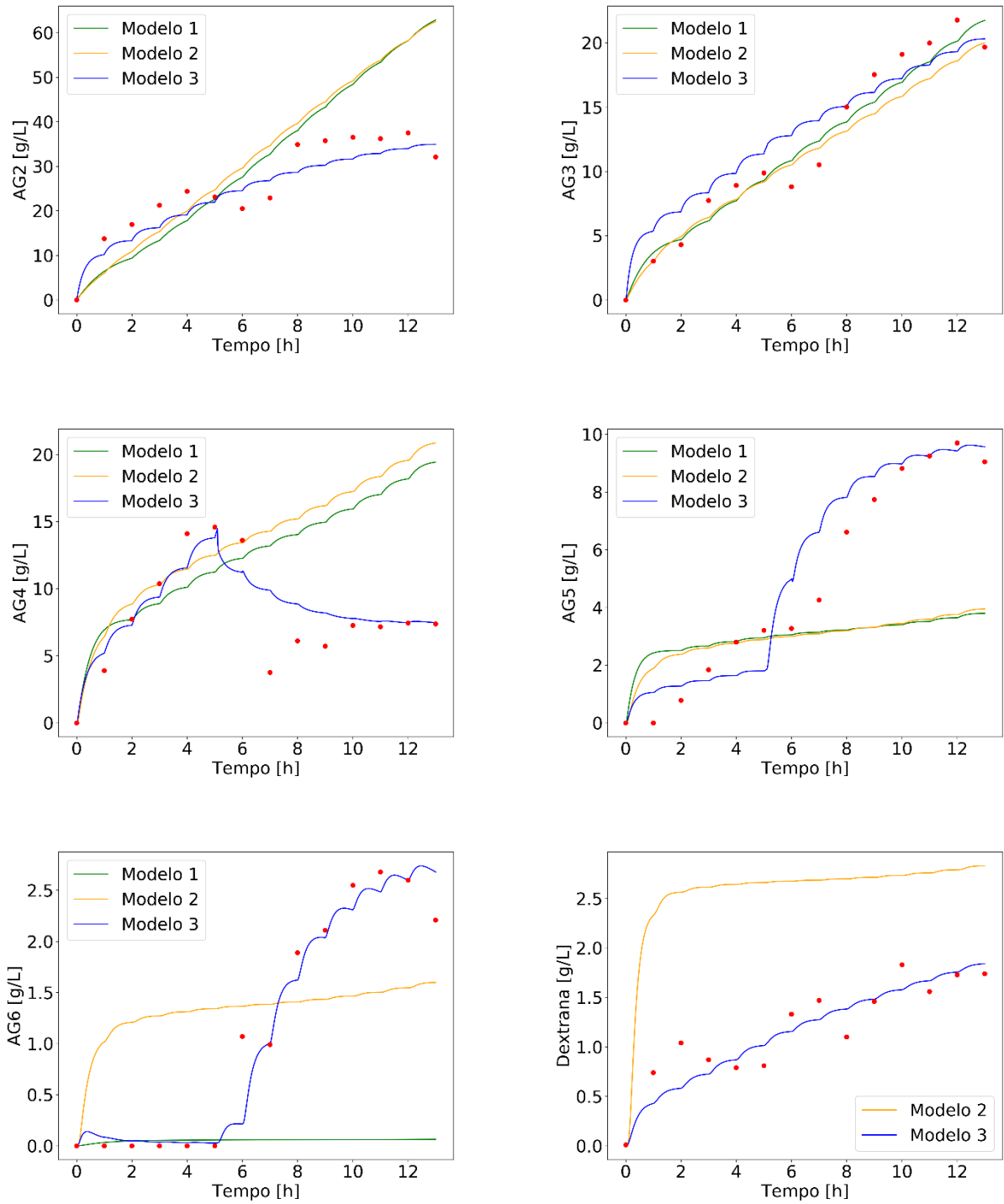
As prováveis causas destes erros não ficam claros na Figura 27 e na Tabela 14, por isso,

simulações posteriores foram realizadas para uma melhor análise. Estas simulações são mostradas e discutidas na próxima seção.

5.1.4 Simulações da Síntese I

Neste tópico são simulados novamente os três modelos após o ajuste juntamente com os dados experimentais da Síntese I. O objetivo desta simulação é uma melhor avaliação dos desvios entre os dados simulados e experimentais, bem como prováveis erros experimentais pontuais e deficiências em cada modelo proposto. As simulações para os três modelos são representadas pela Figura 28.

Figura 28. Simulações dos modelos 1,2 e 3 para Síntese I. (●) pontos experimentais (g/L), (—) valores preditos pelo modelo 1 (g/L), (—) valores preditos pelo modelo 2 (g/L), (—) valores preditos pelo modelo 3 (g/L)



Fonte: elaborada pelo autor

Os pulsos de injeção de substrato e/ou acceptor em todos os perfis puderam ser observados com mais clareza no modelo 3, evidenciado que este modelo foi o mais sensível. Os saltos de concentração de substrato e/ou acceptor fazem com que as taxas aumentem consideravelmente, formando mais produtos, de forma geral.

Podemos observar que os 6 primeiros pulsos, solução de sacarose e maltose, indicam saltos mais proeminentes na concentração dos oligossacarídeos e dextranas, pois há um aumento em todas as taxas de reação. Nos pulsos das horas seguintes, os saltos são mais suaves, pois apenas sacarose em solução é alimentada, logo a taxa de terminação tende a cair com o consumo de maltose ao longo da reação.

Os modelos 1 e 2 não conseguiram prever quase nenhum produto, pois os modelos consideraram apenas a formação de produtos, fazendo com que a concentração dos oligômeros não chegasse a um equilíbrio pelo consumo destes. Assim, as concentrações simuladas sempre apresentaram um crescimento ao longo do tempo.

Apenas AG_3 foi predito de maneira satisfatória nos dois primeiros modelos. Esta predição foi possível pelo ajuste dos parâmetros, pois a rotina convergiu apenas para este produto. A síntese de dextranas no modelo 2 também não foi bem representada, simulando valores superiores aos resultados experimentais. Devido às análises estatísticas supracitadas e a estas simulações, os modelos 1 e 2 foram descartados.

De forma geral, o modelo 3 foi capaz de prever qualitativa e quantitativamente os perfis de oligossacarídeos e dextranas, apresentando diferenças significativas em AG_4 . O comportamento experimental de AG_4 não foi o mesmo do simulado, pois os dados experimentais indicaram uma queda brusca na concentração de AG_4 e depois um aumento deste.

A concentração simulada de AG_4 correspondeu aos valores experimentais na maior parte do tempo, diferindo consideravelmente entre 6 e 8h, pois os valores obtidos foram cerca de 40 % menores que os simulados. Ao observar cuidadosamente os dados de todos os produtos, vemos que nas alíquotas de 6 e 7 horas, os valores obtidos experimentalmente são bem distintos dos simulados na maioria dos produtos. Mesmo com estas diferenças, o Teste F mostrou que o erro simulado de AG_4 foi menor que o erro experimental adotado.

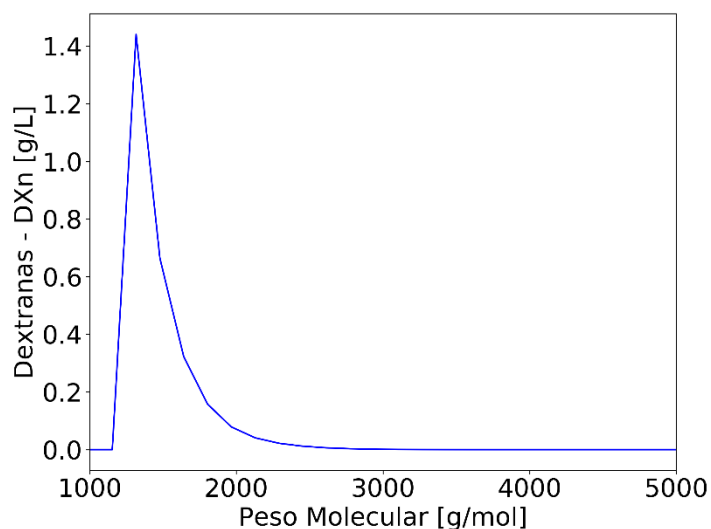
Já que os dados não foram obtidos em duplicata ou triplicata, não temos como avaliar se estas diferenças são erros experimentais pontuais ou fenômenos físicos que não foram considerados no modelo 3.

Acredita-se que estas divergências sejam erros experimentais, pois, com o consumo de AG_4 , um aumento considerável na concentração de AG_5 e AG_6 é observado. Confirmando assim, hipótese da concentração de “gatilho de consumo”. Os perfis de AG_5 e AG_6 foram preditos pelo

modelo, apresentando maiores diferenças nas mesmas alíquotas supracitadas.

A distribuição dos pesos molares das dextranas não pôde ser mensurada experimentalmente, então uma análise desta informação foi realizada apenas pelo resultado da simulação, uma vez que o modelo conseguiu prever bem o somatório das dextranas obtidas. Esta distribuição de pesos molares é ilustrada na Figura 29.

Figura 29. Distribuição dos pesos molares das dextranas do Modelo 3 na Síntese I



Fonte: elaborada pelo autor

A literatura reporta que a força aceptora da maltose interfere no aumento da cadeia de dextrana (HU et al., 2017). Nesta simulação, percebemos que a distribuição do peso molecular das dextranas obtidas na síntese enzimática é pequena.

Segundo as considerações do modelo 3, a estreita distribuição de peso molar é explicada pela afinidade da enzima com rota de produção de oligossacarídeos, refletida nos valores das constantes cinéticas.

Esta afinidade faz com que menos moléculas de sacarose sejam consumidas nas etapas de propagação de dextrana, dificultando o crescimento da cadeia. As características das dextranas produzidas seguem na Tabela 15.

Tabela 15. Propriedades das dextranas obtidas na simulação do Modelo 3 na Síntese I

Propriedade	Valor
Peso Molecular Médio Numérico (M_n)	1471,44 g/mol
Peso Molecular Médio Ponderal (M_w)	1621,44 g/mol
Dispersidade (D)	1,10

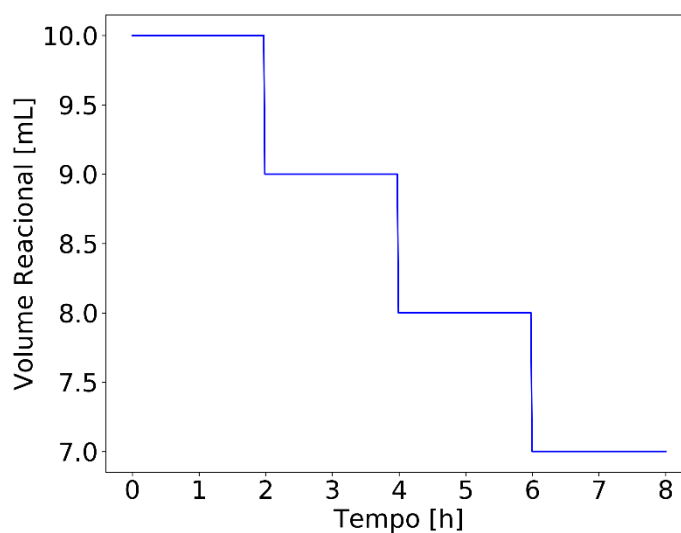
Fonte: elaborada pelo autor

Este trabalho não possuiu nenhuma etapa experimental, logo usaram-se outros conjuntos de dados para validar o modelo 3. As seções seguintes exibem as simulações do modelo 3 com os dados experimentais das sínteses II e III.

5.2 Validação com a Síntese II

Este experimento foi conduzido em um tubo de ensaio com 10 mL de volume reacional inicialmente. A cada duas horas, uma alíquota era removida para análise e alimentavam-se sacarose e maltose em pó. Logo, o volume reacional diminuiu ao longo do procedimento, conforme a Figura 30.

Figura 30. Volume Reacional na Síntese II



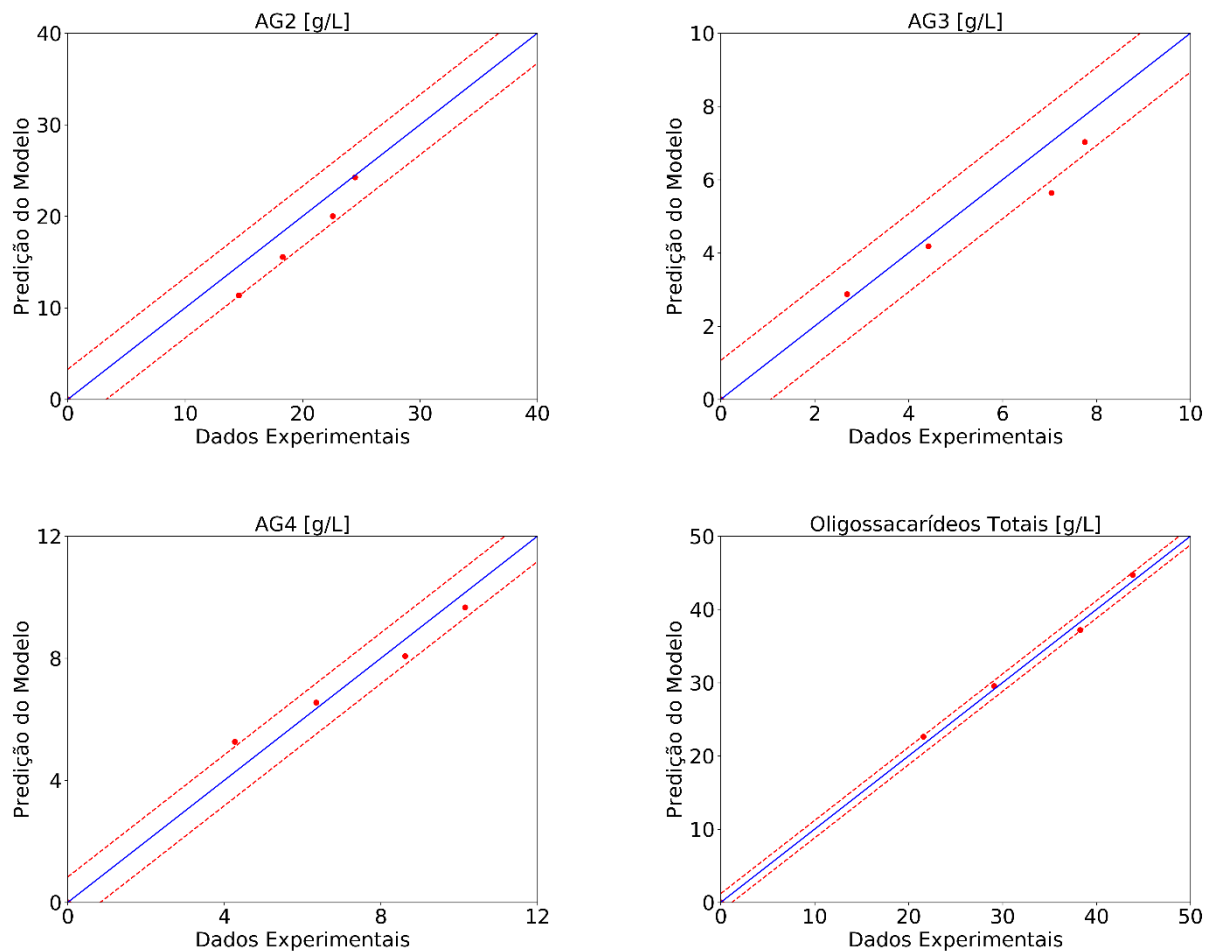
Fonte: elaborada pelo autor

Os decréscimos de volume no formato de degrau ao longo do experimento representam

as alíquotas de 1mL retiradas para análise dos produtos formados. A modelagem matemática foi semelhante à usada na seção anterior, considerando reatores bateladas entre as coletas de amostras.

Estes dados foram usados apenas para validar o modelo 3, assim, não houve necessidade de realizar a interpolação dos dados, pois os parâmetros cinéticos já foram ajustados. A Figura 31 ilustra o espalhamento dos pontos experimentais desta síntese.

Figura 31. Simulações do Modelo 3 na Síntese II com o espalhamento dos dados experimentais. (--) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (—) reta bissetriz



Fonte: elaborada pelo autor

Percebemos que o espalhamento dos dados foi bem menor que o observado na síntese I, mostrando que o modelo conseguiu representar melhor os pontos experimentais desta síntese. Para a confirmação da adequação do modelo, os dados estatísticos foram realizados e seguem na Tabela 16.

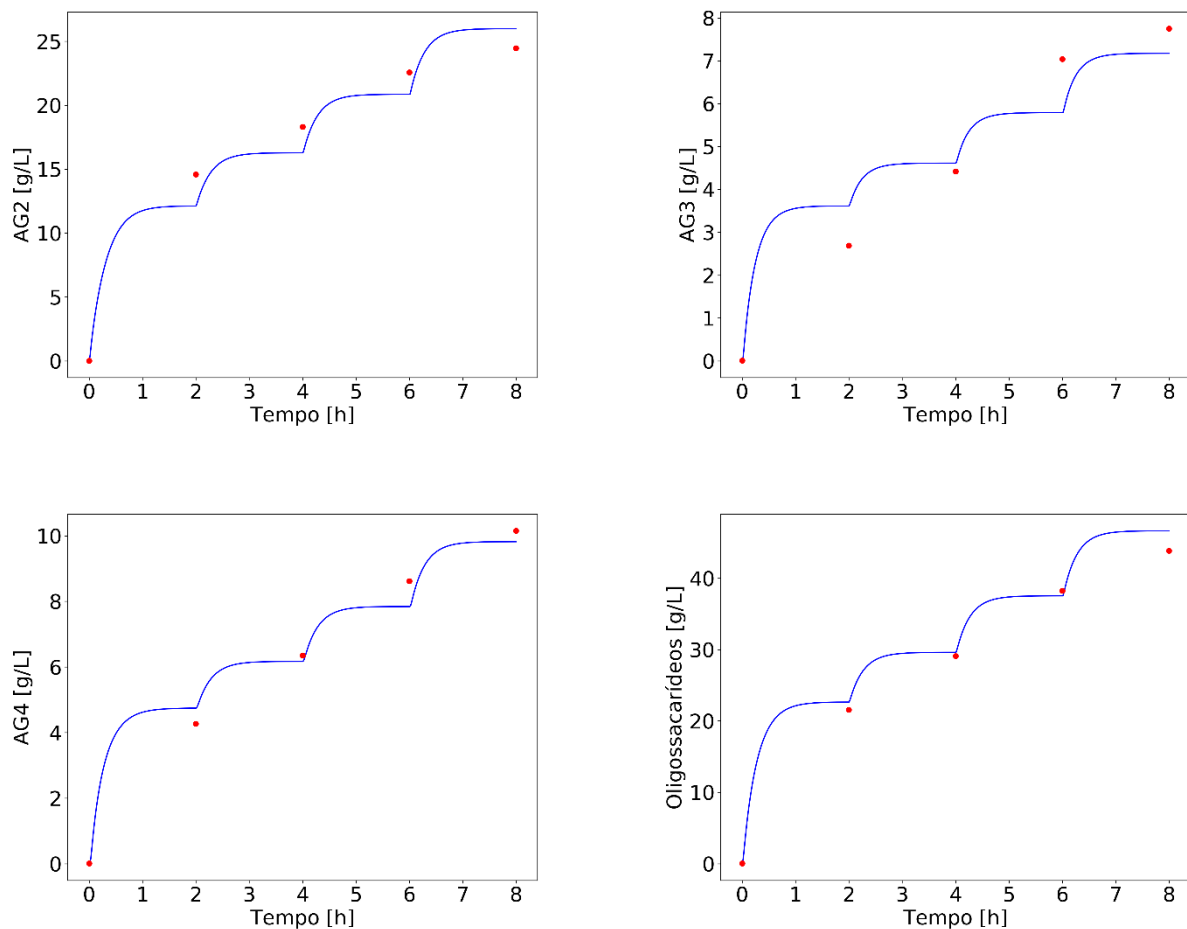
Tabela 16. Valores estatísticos do Modelo 3 com os dados da Síntese II

Carboidrato	R^2	RSD	E_{sim}
AG_2	0,90	2,46	7,59
AG_3	0,96	0,80	8,58
AG_4	0,93	0,62	5,09
Oligossacarídeos Totais	0,93	0,89	1,63

Fonte: elaborada pelo autor

Os erros simulados de todos os dados foram inferiores a 10%, indicando a grande significância do modelo com este experimento. Os menores desvios foram na quantificação dos oligossacarídeos totais, mostrando que o modelo representou bem o somatório dos carboidratos. Os perfis de concentração dos açúcares formados seguem na Figura 32.

Figura 32. Simulações do modelo 3 para Síntese II. (●) pontos experimentais (g/L), (—) concentrações previstas pelo modelo (g/L)



Fonte: elaborada pelo autor

Os perfis obtidos pelo modelo 3 indicam que todos os carboidratos apresentam saltos acentuados imediatamente após a adição de sacarose e maltose em pó. Estes saltos podem ocorrer porque a sacarose é consumida totalmente antes da injeção do pulso seguinte, conseqüentemente, as taxas de iniciação e propagação são zeradas. Isto é evidenciado pela concentração constante de produtos antes da adição de substrato. Após a adição de sacarose, as etapas de iniciação e propagação voltam a ocorrer, possibilitando a síntese de oligossacarídeos.

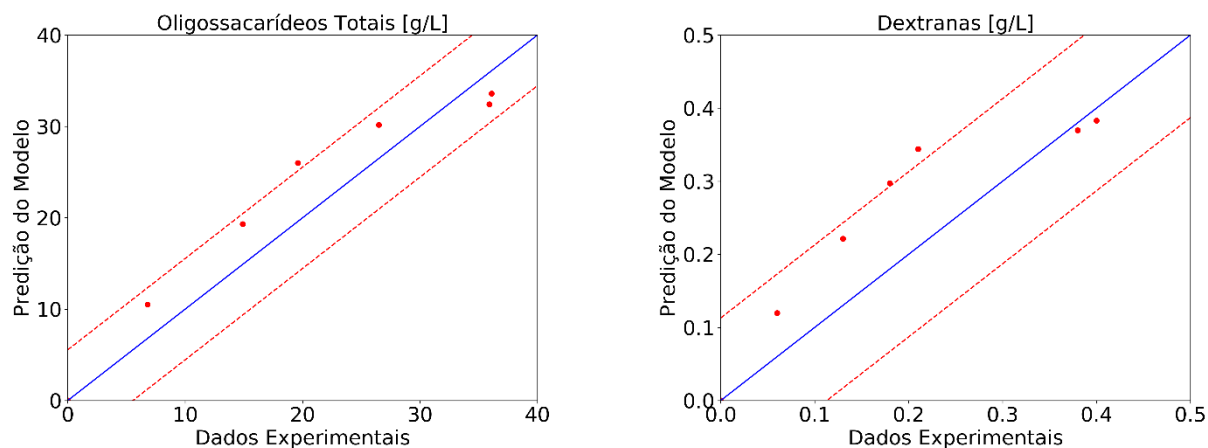
Os resultados simulados representaram qualitativamente todos os dados. As maiores diferenças foram observadas nas amostras de 2 e 6h. Na alíquota de 2h, a concentração simulada de AG_2 foi menor do que a obtida experimentalmente, este comportamento foi o inverso para AG_3 e AG_4 , entretanto, no somatório dos oligômeros, estas flutuações se anularam, apresentando erros simulados pequenos.

A concentração de “gatilho de consumo” de AG_4 não foi alcançada nestes dados, logo, não se pôde avaliar esta hipótese na síntese II. Apesar dos erros evidenciados em 2 e 6h, o teste de hipótese mostrou que o modelo representou os dados, portanto, validando o modelo.

5.3 Validação com a Síntese III

Neste conjunto de dados, apenas quantidades totais de oligossacarídeos e dextranas foram obtidas. A reação ocorreu durante 48 h e as amostras foram retiradas em 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. A modelagem matemática realizada foi de uma reação batelada ideal, desconsiderando qualquer perturbação no volume ou concentração por meio das alíquotas retiradas. Logo, o espalhamento dos dados analisados é mostrado na Figura 33.

Figura 33. Simulações do Modelo 3 na Síntese III com o espalhamento dos dados experimentais. (--) Intervalo de confiança de 95%, (●) pontos experimentais (g/L), (—) reta bissetriz



Fonte: elaborada pelo autor

Notamos que o espalhamento dos oligossacarídeos totais obtidos nesta síntese é maior que o das sínteses anteriores. Maiores divergências entre os dados simulados e experimentais já eram esperadas, pois a enzima utilizada foi obtida por uma variação genética de *Leuconostoc mesenteroides* com o uso de plasmídeo de *Escherichia coli* (LI et al., 2017).

A dextrana-sacarase usada nestes experimentos foi produzida por microrganismos que sofreram mutação, logo sua conformação tridimensional é diferente. Esta mudança na estrutura pode acarretar em mudanças na cinética enzimática por alteração dos aminoácidos terminais dos sítios ativos, afetando a atividade catalítica ou pelo impedimento estérico, mesmo assim, usaram-se estes dados para validar o modelo 3. Nenhuma alteração no modelo ou nos parâmetros cinéticos foi realizada. Para analisar a representatividade do modelo com estes dados, as análises estatísticas foram feitas e seguem na Tabela 17.

Tabela 17. Valores estatísticos do Modelo 3 com os dados da Síntese III

Carboidrato	R^2	RSD	E_{sim}
Oligossacarídeos Totais	0,93	4,20	8,49
Dextranas	0,93	0,08	16,14

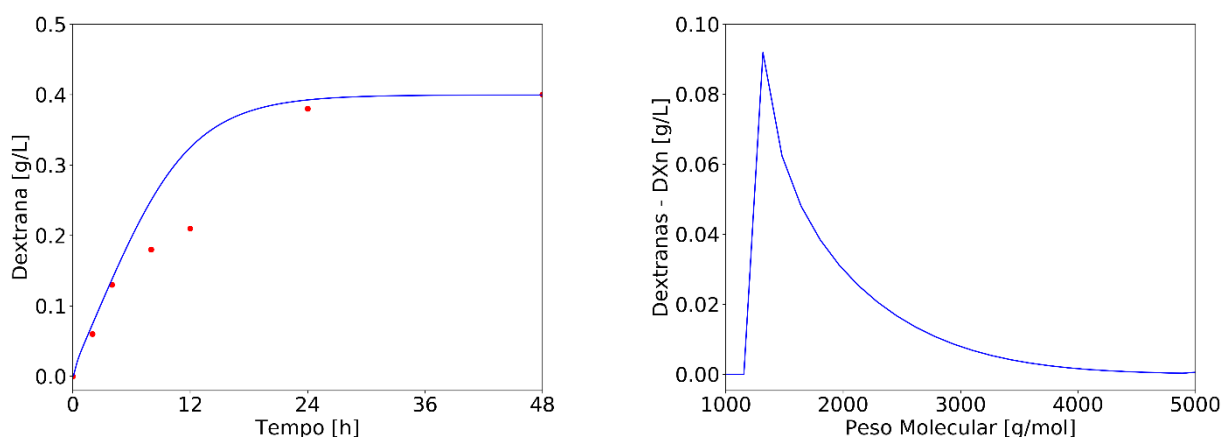
Fonte: elaborada pelo autor

Mesmo com o uso de enzima oriunda de um microrganismo modificado geneticamente, os testes de hipóteses mostraram que o modelo foi significativo, tanto para a produção de

oligossacarídeos quanto de dextranas. Vale ressaltar que o erro simulado de dextrana foi próximo ao erro experimental.

Estes desvios nos valores das dextranas (16,14%) evidenciam a possibilidade rotas enzimáticas levemente modificadas ou alteração na afinidade dos sítios ativos com os substratos, devido a nova conformação tridimensional da enzima. A alteração mais proeminente apenas nos valores das dextranas ratifica a hipótese que os sítios ativos da rota de síntese de oligossacarídeos e dextranas são distintos, uma vez que os dados experimentais dos oligossacarídeos totais foram bem representados pelo modelo 3, apresentando erro simulado de 8,49 %. A Figura 34 expõe as simulações das dextranas obtidas.

Figura 34. Simulações das dextranas na Síntese III. (●) pontos experimentais (g/L), (—) concentrações preditas pelo modelo (g/L)



Fonte: elaborada pelo autor

Observamos que o perfil simulado é qualitativamente equivalente aos dados experimentais. Quantitativamente, os pontos obtidos em 8 e 12 horas foram menores que os preditos no modelo, indicando assim, que os parâmetros cinéticos reais são menores que os usados na simulação.

Os menores valores nos parâmetros cinéticos indicam uma menor afinidade dos sítios ativos da enzima pela rota de síntese de dextranas, aumentando assim, a seletividade para a produção de oligossacarídeos. A menor afinidade do sítio ativo pela síntese de dextrana pode ter sido ocasionada por alteração nos aminoácidos terminais ou por um maior impedimento estérico do sítio.

As divergências ocorreram após um tempo reacional, indicando que as etapas de iniciação e propagação não sofreram grandes alterações. Logo, as mudanças conformacionais afetaram mais efetivamente as terminações, dificultando a liberação de dextranas com maiores graus de polimerização. Esta teoria é ratificada ao passo que os dados experimentais e simulados se aproximam ao final da reação, apresentando desvios de 2,56 % em 24 horas de reação.

A distribuição dos pesos molares nesta síntese foi maior que na Síntese I, pois não houve altas concentrações de acceptor para direcionar a síntese de oligossacarídeos. Em altas concentrações de maltose, as taxas de terminação de oligômeros seriam elevadas, liberando mais enzimas livres. Visto que a afinidade dos sítios de produção de oligossacarídeos é maior, esta rota seria preferencial, consumindo mais sacarose. A diminuição de sacarose no meio dificultaria a propagação dos complexos enzima-dextranas, ocasionando a hidrólise de cadeias com tamanho similares. A Tabela 18 mostra as propriedades das dextranas obtidas, confirmando assim, a maior distribuição de peso molecular.

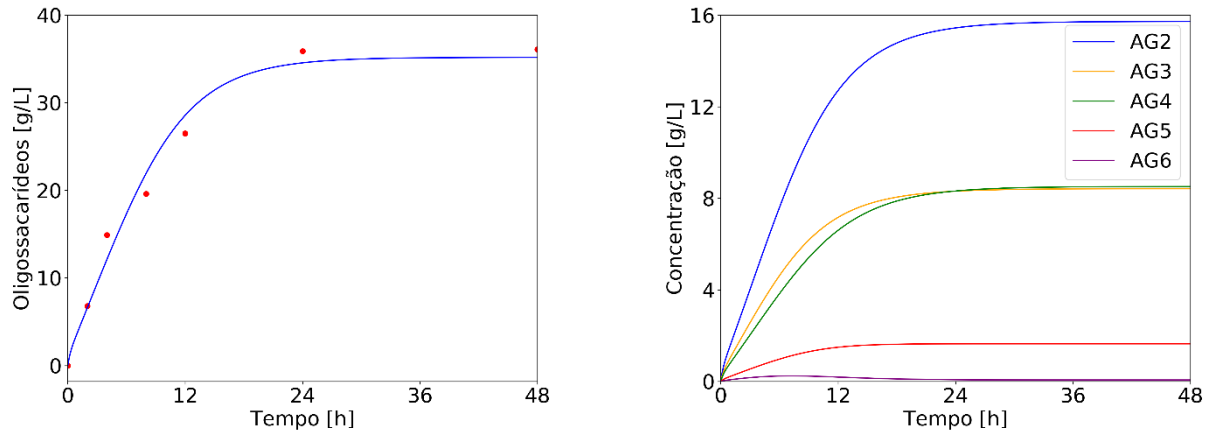
Tabela 18. Propriedades das dextranas obtidas na simulação do Modelo 3 na Síntese III

Propriedade	Valor
Peso Molecular Médio Numérico (M_n)	1914,93 <i>g/mol</i>
Peso Molecular Médio Ponderal (M_w)	2843,29 <i>g/mol</i>
Dispersidade (D)	1,48

Fonte: elaborada pelo autor

O perfil de concentração de oligossacarídeos totais representou bem os dados experimentais, mostrando que a enzima obtida por microrganismo modificado não sofreu alterações nos sítios relativos à síntese destes oligômeros. Os dados obtidos foram globais, portanto, variações das concentrações dos oligômeros individuais podem ter ocorrido. As simulações dos oligossacarídeos produzidos são mostradas na Figura 35.

Figura 35. Simulações dos oligossacarídeos na Síntese III. (●) pontos experimentais (g/L), (—) concentrações previstas pelo modelo (g/L)



Fonte: elaborada pelo autor

Uma vez que os dados experimentais de Li *et al.* (2017) informam a concentração de oligossacarídeos totais e os valores simulados conseguiram predizer este perfil, as simulações indicaram que as prováveis distribuições de AG_i s são as representadas pela Figura 35.

A simulação sugere que AG_6 foi produzido em pequenas quantidades, chegando a 0,15 g/L. A composição final de oligossacarídeos consistiu de 94,79 % de AG_2 , AG_3 e AG_4 . A dificuldade na propagação residiu nas baixas concentrações de sacarose, pois as taxas de iniciação e propagação nos primeiros oligômeros foram mais expressivas que as demais. De posse de todas as análises realizadas, considerou-se que o modelo foi validado com este conjunto de dados.

6 ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS E OTIMIZAÇÃO

Após a validação do modelo 3, realizaram-se algumas simulações com operações distintas para analisar a melhor forma de produzir oligossacarídeos. Os seguintes modos de operação foram estudados: batelada, semi-batelada com alimentação de substrato e aceptor em pulsos, semi-batelada com alimentação variável e semi-batelada com alimentação fixa.

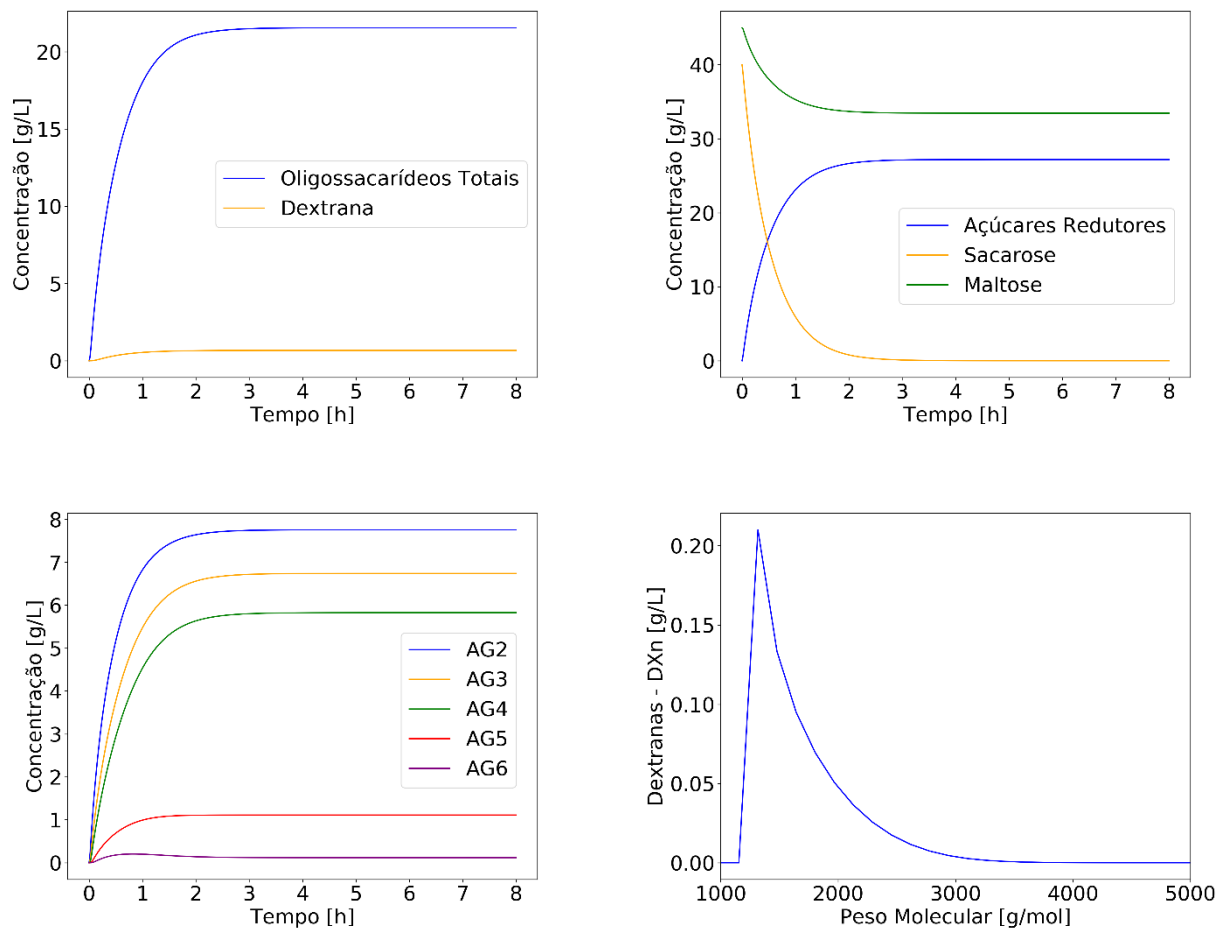
Todas as simulações foram realizadas com um volume reacional inicial de 1 L, contendo 40 g/L de sacarose e 45 g/L de maltose. A quantidade de enzima considerada foi de 0,5 UI/mL.

As hipóteses simplificadoras usadas no desenvolvimento dos modelos foram consideradas nestas simulações.

6.1 Operação Batelada

A operação em batelada foi a simulação mais simples usada, servindo como referência para comparação com os demais modos operacionais. As concentrações de oligossacarídeos e dextranas, bem como as de açúcares redutores, sacarose e maltose são apresentadas na Figura 36. A distribuição dos pesos molares de dextrana também é exposta a seguir.

Figura 36. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos molares das dextranas obtidos com a simulação da operação em batelada



Fonte: elaborada pelo autor

Observamos que o tempo ideal para encerrar a batelada ocorre em 2,8 h, obtendo 21,56 g/L de oligossacarídeos totais. A sacarose é consumida totalmente, enquanto a maltose se mantém em concentrações próximas à inicial, cerca de 89,71% do valor inicial. Os açúcares redutores representam a frutose e glicose formados durante as etapas de propagação e terminação, respectivamente. Os valores obtidos neste tempo seguem na Tabela 19.

Tabela 19. Concentrações no tempo ideal (2,8 h) para encerrar a batelada

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	7,76	9,36
AG3	6,74	8,13
AG4	5,83	7,03
AG5	1,11	1,34
AG6	0,12	0,14
DX	0,67	0,81
Sacarose	0	0
Maltose	33,46	40,37
Açúcares Redutores	27,21	32,82

Fonte: elaborada pelo autor

A concentração de açúcares redutores e maltose foi cerca de 73,19 % da composição da solução final. Estes carboidratos podem agir como substratos e/ou aceptores da dextran-sacarase em altas concentrações produzindo outros compostos, logo, objetiva-se reduzir a porcentagem destes componentes no final da reação.

Apenas traços de AG_6 foram obtidos, cerca de 0,55% da composição dos oligossacarídeos totais. Assim, a concentração deste oligômero foi uma variável considerada na análise da melhor forma de operação.

Quantidades pequenas de dextranas (0,67 g/L) foram observadas na simulação, e a distribuição de pesos molares foi pequena indicando grande similaridade destes carboidratos. Portanto, as propriedades físicas e químicas foram semelhantes. Os valores das propriedades das dextranas obtidas são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (2,8 h) para encerrar a batelada

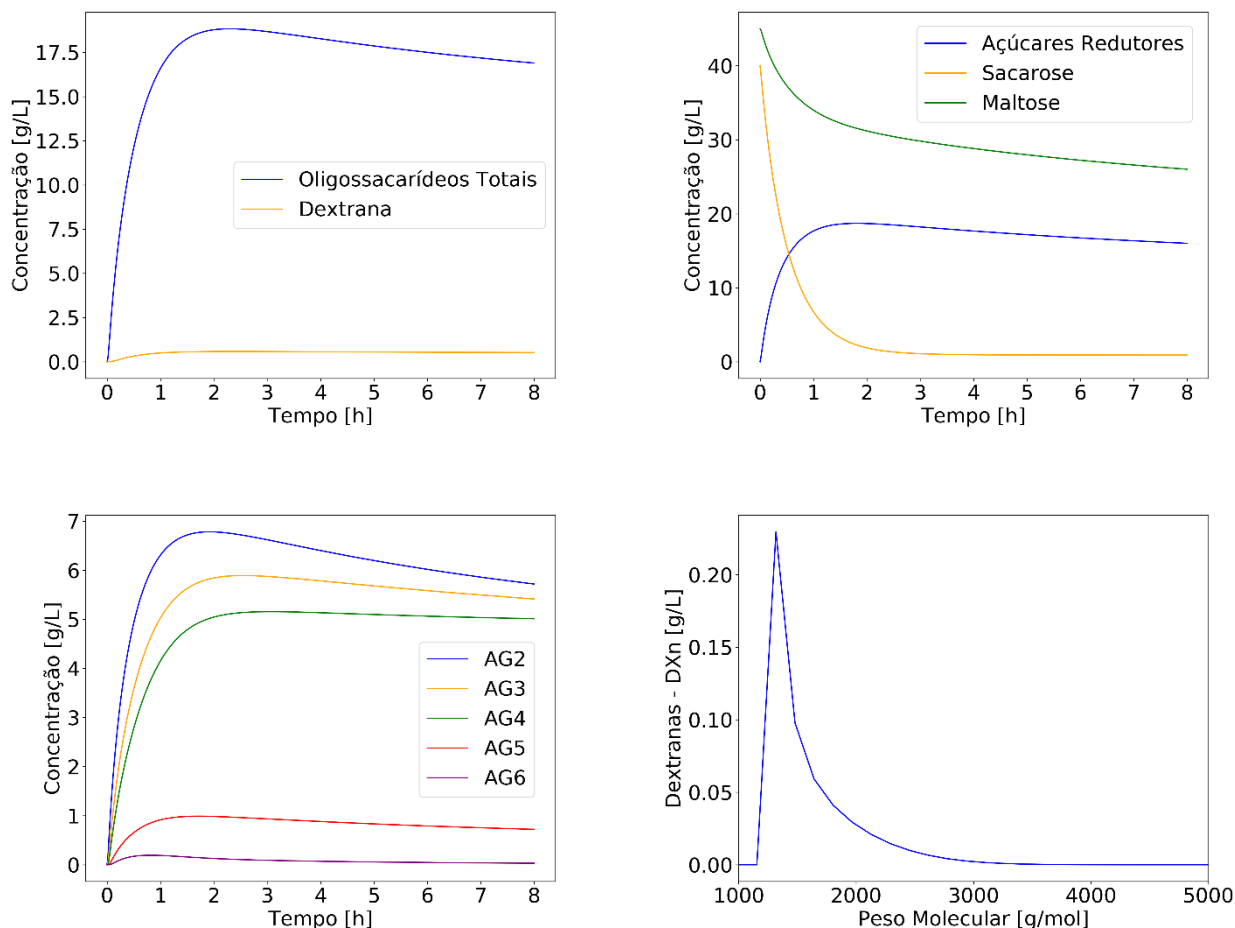
Propriedade	Valor
Peso Molecular Médio Numérico (M_n)	1673,63 <i>g/mol</i>
Peso Molecular Médio Ponderal (M_w)	2096,49 <i>g/mol</i>
Dispersidade (D)	1,25

Fonte: elaborada pelo autor

6.2 Operação Semi-batelada com alimentação fixa

Esta operação foi simulada como uma semi-batelada alimentada continuamente com maltose e sacarose com a mesma vazão, 50 mL/h. As concentrações das alimentações de maltose e sacarose foram 45 e 40 g/L, respectivamente. A Figura 37 mostra as concentrações dos carboidratos ao longo da reação.

Figura 37. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em semi-batelada com alimentação fixa



Fonte: elaborada pelo autor

O tempo ótimo para encerrar a operação ocorreu em 1,9 h. Neste tempo, a concentração de oligossacarídeos foi 18,75 g/L e o volume reacional 1,19 L. Após o ponto ótimo, a concentração de todos os produtos começa a decrescer. Esta redução se dá pelo efeito de diluição da corrente de maltose, pois este acceptor está em excesso, não sendo consumido na mesma proporção que é alimentado.

A síntese de dextranas foi mínima, indicada pela Figura 37, e a distribuição dos pesos molares das dextranas obtidas foi pequena. Uma análise melhor pode ser feita com os dados expostos na Tabela 21.

Tabela 21. Concentrações no tempo ideal (1,9 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação fixa

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	6,78	9,50
AG3	5,83	8,16
AG4	5,02	7,03
AG5	0,99	1,38
AG6	0,13	0,18
DX	0,58	0,81
Sacarose	2,02	2,82
Maltose	31,33	43,90
Açúcares Redutores	18,69	26,22

Fonte: elaborada pelo autor

O tempo ótimo para encerrar a operação foi cerca de 32,87 % menor em relação a operação em batelada. A composição final dos oligômeros foi semelhante nas duas operações, contudo fração de oligômeros totais, 26,25 %, foi a maior entre os modos de operação.

Outras vantagens desta estratégia são a simplicidade operacional; pequeno aumento no volume reacional e fração de açúcares redutores. Alimentações fixas de sacarose e maltose são fáceis de definir e operar em larga escala, diferentemente de alimentações variáveis e/ou intermitentes.

O aumento no volume reacional de 19 % foi o menor verificado entre os modos de operação simulados, reduzindo custos de purificação dos produtos, pois menores quantidades de solução necessitam de processamento posterior. A concentração de açúcares redutores foi baixa, 18,69 g/L, representando 26,22 % da composição final da solução. Logo, reações paralelas com estes açúcares possuem menor interferência.

Como desvantagens podemos citar as baixas concentrações de AG_5 e AG_6 . A composição final destes dois oligômeros é cerca de 1,56 % enquanto a operação com alimentação em pulsos apresenta 4,86 %.

A quantidade de dextranas sintetizadas foi baixa, sendo a segunda menor entre os modos de operação. As propriedades das dextranas desta simulação são exibidas na Tabela 22.

Tabela 22. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (1,9 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação fixa

Propriedade	Valor
Peso Molecular Médio Numérico (M_n)	1589,46 <i>g/mol</i>
Peso Molecular Médio Ponderal (M_w)	1886,92 <i>g/mol</i>
Dispersidade (D)	1,19

Fonte: elaborada pelo autor

Dentre as quatro estratégias operacionais, a que apresentou maior similaridade nas propriedades das dextranas foi esta simulação, pois o valor de dispersidade foi o menor obtido (1,19).

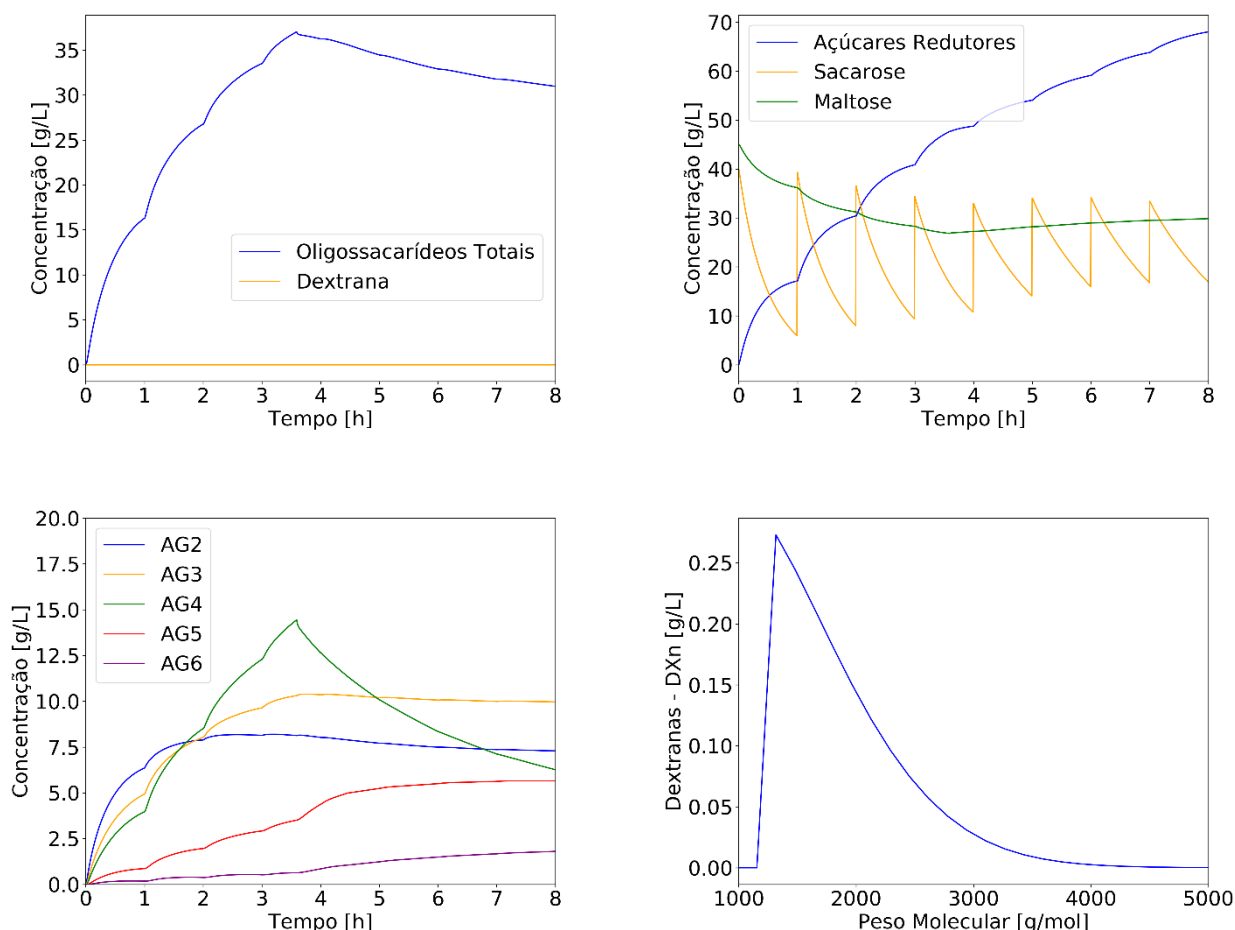
6.3 Operação Semi-batelada com alimentação em pulsos

Nesta operação, foram simuladas previamente três estratégias: alimentação em pulsos de sacarose e maltose, alimentação contínua de sacarose com pulsos de maltose e alimentação contínua de maltose com pulsos de sacarose. Entre as três estratégias, a última se mostrou mais vantajosa, portanto, apenas esta é exibida.

A simulação foi realizada em um reator com uma corrente de alimentação contínua de maltose com vazão de 50 mL/h. A alimentação de sacarose ocorreu por meio de injeções de volumes definidos de solução, 50 mL, a cada uma hora, caracterizando pulsos de sacarose com espaçamento de uma hora entre os pulsos. Estes pulsos simulados seguiram a mesma ideia do procedimento experimental de Rabelo (2012). A concentrações da corrente de maltose foi 45 g/L, já a concentração da solução de sacarose considerada nos pulsos foi de 40 g/L.

Os valores da vazão de alimentação de maltose (50 mL/h) e do volume dos pulsos injetados de sacarose (50 mL) foram definidos após simulações prévias. Com valores menores, a síntese não se mostrou promissora. Já com pulsos de sacarose com maior volume, o volume reacional aumentou consideravelmente e a composição final não sofreu alterações significantes. A Figura 38 mostra os perfis de concentração dos carboidratos ao longo da reação.

Figura 38. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em semi-batelada com alimentação fixa de maltose e em pulsos de sacarose



Fonte: elaborada pelo autor

Percebemos que a concentração máxima de oligossacarídeos ocorre em 3,8 h, sendo o ponto ótimo para encerrar a operação. O volume reacional é 89 % maior que o volume inicial. Este aumento no volume é decorrente das correntes de alimentação contínua de maltose e aos pulsos de sacarose.

Os pulsos de sacarose são claramente vistos pelos saltos de concentração a cada hora. Estes pulsos fazem com que as taxas de propagação sejam elevadas, possibilitando uma maior produção de oligômeros com graus de polimerização superiores. Dextranas com maiores tamanhos também são formadas devido ao aumento das taxas de propagação.

Com as altas concentração de sacarose, AG_4 alcança a concentração de “gatilho de consumo”, acarretando o consumo deste oligômero. Com este efeito, um aumento considerável

na concentração do complexo enzima-substrato EG_4 ocorre, aumentando a taxa de propagação dos complexos seguintes, produzindo mais AG_5 e AG_6 . Os valores desta simulação seguem na Tabela 23.

Tabela 23. Concentrações no tempo ideal (3,8 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação fixa de maltose e em pulsos de sacarose

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	7,73	5,83
AG3	10,21	7,71
AG4	10,19	7,69
AG5	5,22	3,94
AG6	1,21	0,92
DX	1,22	0,92
Sacarose	14,58	11,00
Maltose	28,16	21,26
Açúcares Redutores	53,98	40,73

Fonte: elaborada pelo autor

A concentração de oligossacarídeos totais é 34,56 g/L no tempo ideal para encerrar a batelada (3,8 h), mas a fração mássica destes componentes é 26,09%, sendo praticamente igual aos 26% da batelada. As maiores concentrações de AG_5 e AG_6 obtidas ocorrem nesta simulação, sendo uma vantagem em relação as demais estratégias operacionais.

Como pontos negativos, podem-se destacar o volume reacional, tempo de reação e concentrações de açúcares redutores. O acréscimo de 89% no volume final faz com que o volume inicial seja, no máximo, metade da capacidade do reator, necessitando de volumes relativamente grandes para produção em larga escala. O longo tempo de reação (3,8 h) também dificulta a operação, pois necessitam-se vários reatores em paralelo para obter uma produtividade considerável.

A concentração das dextranas totais é 82% maior que a operação em batelada e apresenta uma distribuição de pesos maior, indicando a obtenção de carboidratos com maiores graus de polimerização. Isto é evidenciado pelos dados da Tabela 24.

Tabela 24. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (3,8 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação em pulsos

Propriedade	Valor
Peso Molecular Médio Numérico (M_n)	1797,85 g/mol
Peso Molecular Médio Ponderal (M_w)	2971,57 g/mol
Dispersidade (D)	1,65

Fonte: elaborada pelo autor

O valor da dispersidade obtido indica que propriedades físicas e químicas levemente diferentes podem ser observadas nas dextranas obtidas. A distribuição dos pesos molares das dextranas nesta simulação é a maior encontrada ao longo deste trabalho.

6.4 Operação Semi-batelada com alimentação variável

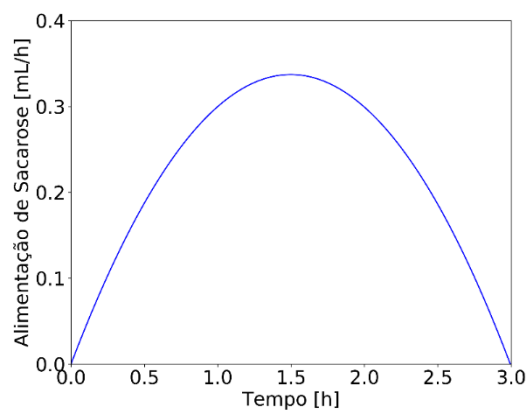
Pela simulação da semi-batelada em pulsos, observou-se que oligossacarídeos com maiores graus de polimerização foram obtidos em altas concentrações de sacarose. Assim, usou-se a estratégia de uma alimentação variável de sacarose para analisar o comportamento da síntese de oligossacarídeos.

A simulação realizada com esta estratégia operacional consistiu de uma alimentação contínua de 50 mL/h de maltose com 45 g/L e uma alimentação variável de sacarose com 40 g/L. A função da vazão de alimentação de sacarose com o tempo é representada pela Equação 6.1.

$$v_S = (-1e-4 \cdot t^3 - 1,5e-1 \cdot t^2 + 4,5e-1 \cdot t) \cdot V_0 \quad (6.1)$$

Onde v_S é a vazão de alimentação variável de sacarose e V_0 é o volume reacional inicial. Os valores dos parâmetros da Equação 6.1 foram obtidos após simulações prévias. O perfil da vazão de alimentação de sacarose é apresentado na Figura 39.

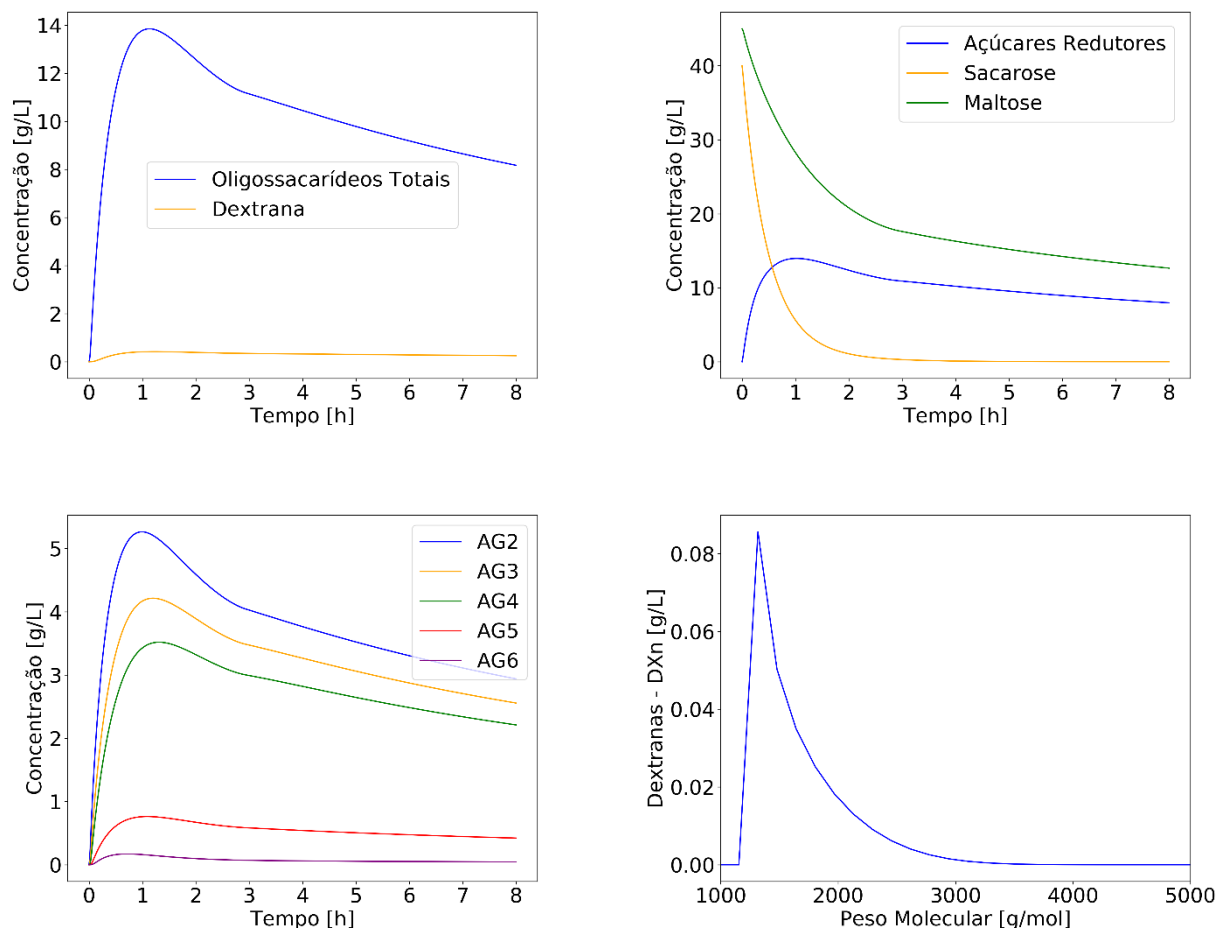
Figura 39. Perfil da vazão de alimentação variável de sacarose



Fonte: elaborada pelo autor

O objetivo desta alimentação variável foi analisar a adição crescente de sacarose evitando os saltos de concentração observados nos pulsos de injeção. Avaliou-se anteriormente o uso de alimentações variáveis com funções lineares, mas as concentrações de oligossacarídeos ao final da operação eram inferiores e o volume reacional superior aos obtidos com a função apresentada pela Eq. 6.1. Os perfis de concentração dos carboidratos obtidos são expostos na Figura 40.

Figura 40. Perfis de concentração dos carboidratos e distribuição dos pesos moleculares das dextranas obtidos com a simulação da operação em semi-batelada com alimentação variável



Fonte: elaborada pelo autor

O ponto ótimo para encerrar a operação foi em 1,1 h, apresentando um volume reacional de 1,27 L. A partir deste momento, houve basicamente uma diluição da solução, pois a maltose adicionada não foi consumida na mesma proporção e a concentração de sacarose era baixa.

Qualitativamente, os perfis desta simulação são semelhantes aos da alimentação fixa. O decréscimo mais acentuado das concentrações após o ponto ótimo ocorre pelo aumento da alimentação de sacarose em função do tempo. Uma vez que a concentração de maltose diminui, as taxas de terminação se reduzem, possibilitando a sínteses de carboidratos com maiores graus de polimerização. Uma discussão mais aprofundada pode ser feita após a análise dos dados expostos na Tabela 25.

Tabela 25. Concentrações no tempo ideal (1,1 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação variável

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	5,49	8,82
AG3	4,43	7,11
AG4	3,68	5,90
AG5	0,80	1,29
AG6	0,16	0,25
DX	0,44	0,70
Sacarose	4,49	7,22
Maltose	28,12	45,16
Açúcares Redutores	14,66	23,55

Fonte: elaborada pelo autor

Podemos destacar como vantagens desta estratégia a fração de açúcares redutores e o tempo de reação. A baixa fração mássica de açúcares redutores, 23,55 %, diminui o risco de possíveis reações paralelas dos açúcares redutores catalisadas pela enzima. O tempo ideal para encerrar a operação foi o menor obtido nas simulações, possibilitando uma maior produtividade.

A fração de AG_6 é maior que a obtida na alimentação fixa, em contrapartida, os demais oligômeros possuíram menores frações. Comparando-se ainda com a alimentação fixa, o volume reacional foi maior, acarretando em maiores custos de separação posteriormente.

A concentração máxima de oligossacarídeos, 14,56 g/L, e a fração destes compostos, 23,37 %, foram os menores valores simulados, sendo uma desvantagem, pois o objetivo é selecionar a estratégia que produza maiores frações de oligômeros.

Esta simulação apresentou as menores concentrações de dextranas, mas a dispersidade foi maior que a alimentação fixa, pois, a crescente alimentação da sacarose junto com o decréscimo da terminação, facilitaram o aumento das cadeias, conseqüentemente, uma maior distribuição de pesos molares. Os valores das propriedades das dextranas são exibidos na Tabela 26.

Tabela 26. Propriedades das dextranas obtidas no tempo ideal (1,1 h) para encerrar a semi-batelada com alimentação variável

Propriedade	Valor
Peso Molecular Médio Numérico (M_n)	1654,12 g/mol
Peso Molecular Médio Ponderal (M_w)	2138,89 g/mol
Dispersidade (D)	1,29

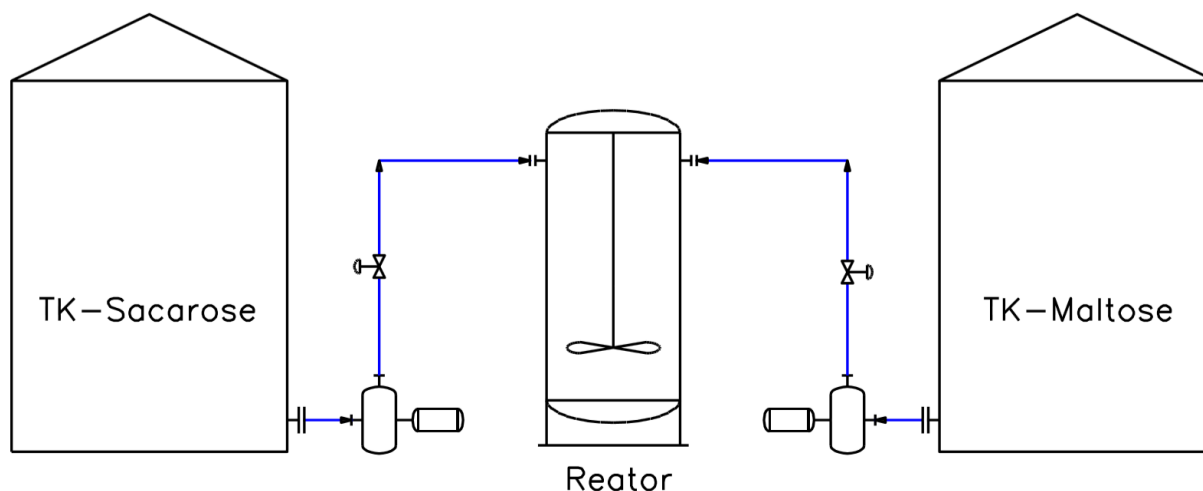
Fonte: elaborada pelo autor

6.5 Otimização pelo método PSO

O foco desta seção foi otimizar a estratégia mais adequada entre as simulações realizadas nos tópicos anteriores. Logo, utilizou-se o método de otimização do enxame de partículas para otimizar as condições operacionais.

Constatou-se que a operação mais promissora para síntese de oligossacarídeos foi a semi-batelada com alimentação fixa, pois se obteve maior fração de oligossacarídeos, menor volume reacional e tempo de reação relativamente pequeno. Assim, propôs-se um sistema operacional para a síntese em larga escala. Este sistema é ilustrado na Figura 41.

Figura 41. Sistema proposto para síntese de oligossacarídeos em larga escala



Fonte: elaborada pelo autor

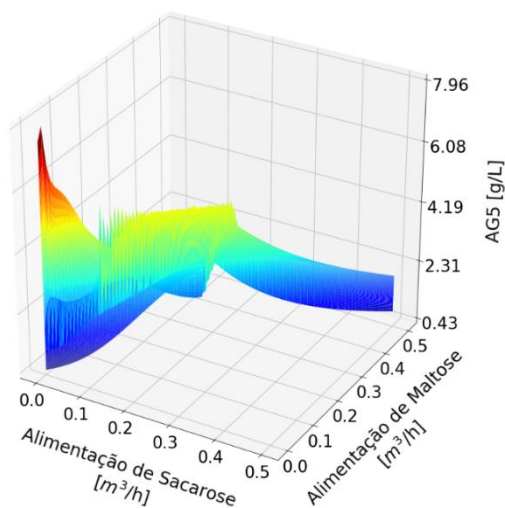
Neste sistema, o reator é carregado inicialmente com maltose, sacarose e dextran-sacarase. Após o início da operação, vazões definidas de cada componente são alimentadas continuamente ao reator até o tempo em que as concentrações de oligômeros cheguem ao valor máximo. Neste momento, as alimentações cessam e a reação é interrompida.

Estudos realizados observaram que a atividade enzimática chega ao seu valor máximo nas concentrações aproximadas de 280 g/L e 70 g/L de substrato (sacarose) e acceptor (maltose), respectivamente (LI et al., 2017). Portanto, todas as simulações realizadas com o sistema proposto foram conduzidas com volume inicial de 1 m³ contendo 280 g/L de sacarose e 70 g/L de maltose e 1 UI/mL de dextransacarase. Os tanques de alimentação possuíam as mesmas concentrações das condições iniciais.

Simulações iniciais foram realizadas com vazões de alimentação de sacarose e maltose variando entre 0 e 0,5 m³/h para avaliar o perfil das concentrações dos produtos de interesse em função destas vazões.

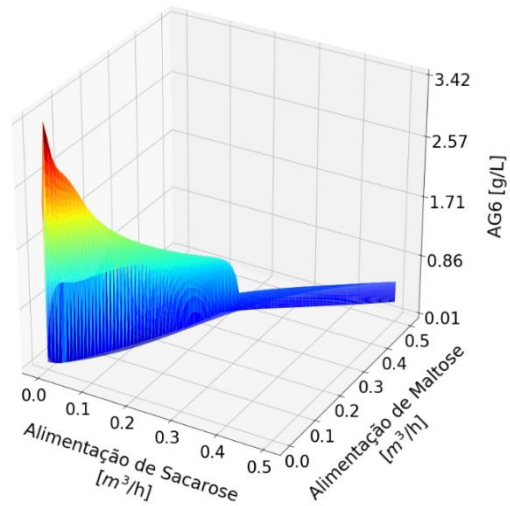
Os gráficos de superfície resposta das concentrações de AG_5 , AG_6 , oligossacarídeos totais e carboidratos totais em função das alimentações de sacarose e maltose são ilustrados pelas figuras a seguir:

Figura 42. Superfície resposta da concentração de AG_5 em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



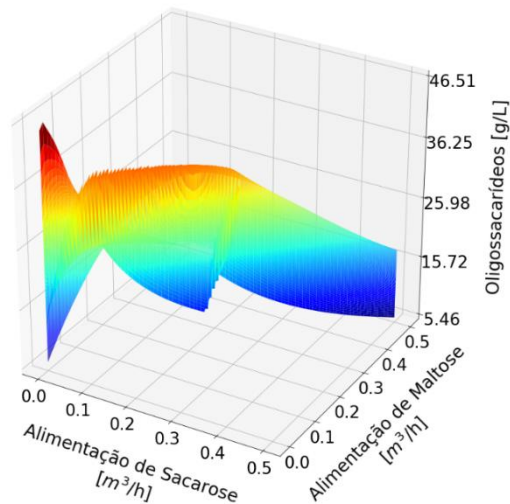
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 43. Superfície resposta da concentração de AG_6 em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



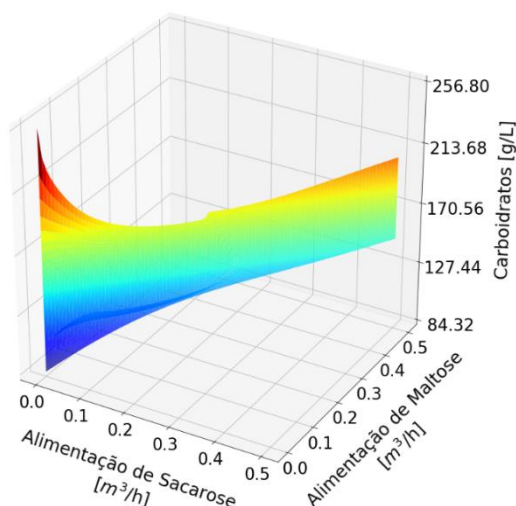
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 44. Superfície resposta da concentração de Oligossacarídeos totais em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 45. Superfície resposta da concentração de Carboidratos totais em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



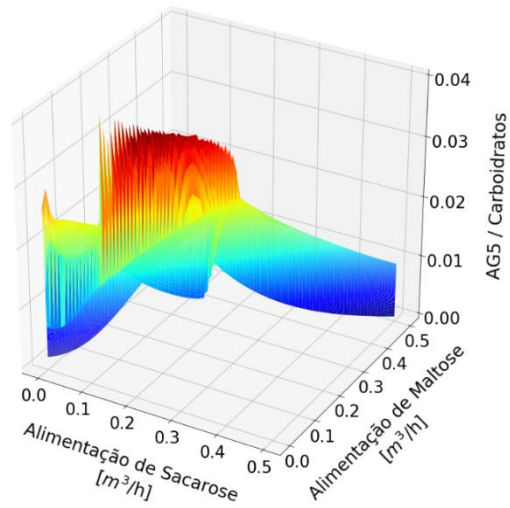
Fonte: elaborada pelo autor

Notamos que as superfícies resposta das concentrações de AG_5 e AG_6 são muito sensíveis a pequenas variações nas alimentações. Estas oscilações são decorrentes da estreita relação entre a concentração de substrato e acceptor com as taxas de propagação e terminação, evidenciando assim, a complexidade da cinética reacional. As maiores concentrações de AG_5 , AG_6 , oligossacarídeos totais e carboidratos totais ocorrem em baixas alimentações de sacarose e maltose.

Vale ressaltar que AG_5 apresentou valores consideráveis em vazões de alimentação maiores de sacarose e maltose. Este mesmo comportamento é observado na concentração de oligossacarídeos totais. Em altas vazões de alimentação, a concentração de carboidratos totais é alta. Estes valores são decorrentes de altas concentrações de açúcares redutores, sacarose e maltose. A concentração de enzima diminui consideravelmente com o aumento do volume, reduzindo a síntese de oligossacarídeos.

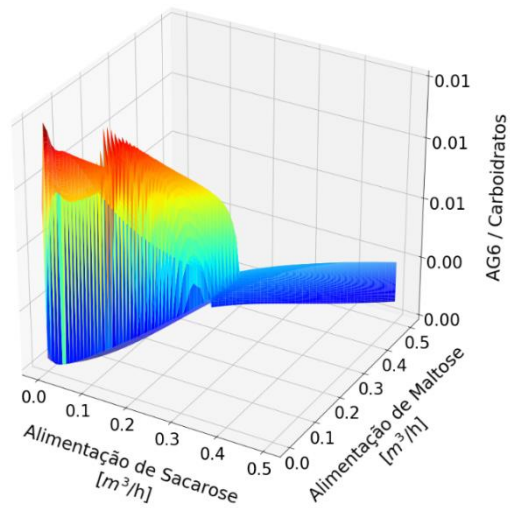
Tão importante quanto a concentração dos oligômeros é a fração dos componentes desejados na solução reacional ao final da operação, pois operações posteriores de purificação são necessárias para obter um produto comercial com maior valor agregado. Assim, gráficos de superfície da fração de AG_5 , AG_6 e oligossacarídeos totais em relação aos carboidratos totais foram gerados e apresentados a seguir:

Figura 46. Superfície resposta da fração AG_5 /Carboidratos totais em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



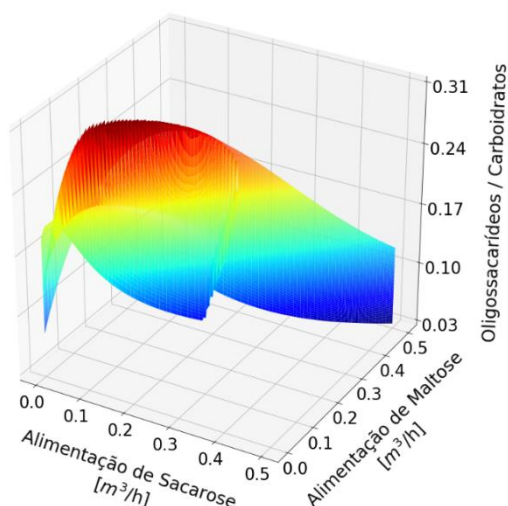
Fonte: elaborada pelo autor

Figura 47. Superfície resposta da fração AG_6 /Carboidratos totais em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 48. Superfície resposta da fração *Oligossacarídeos totais/Carboidratos totais* em função das alimentações contínuas de sacarose e maltose



Fonte: elaborada pelo autor

Percebemos que as máximas frações de oligossacarídeos em relação aos carboidratos totais ocorrem em alimentações de substrato e acceptor diferentes daquelas em que a concentração de oligossacarídeos é máxima. A concentração máxima de oligossacarídeos é obtida com alimentações de 10 e 1 L/h de sacarose e maltose, enquanto a máxima fração de oligossacarídeos é alcançada com alimentação de 109,1 e 235,1 L/h de sacarose e maltose.

Novamente, as superfícies resposta de AG_5 e AG_6 sofreram grandes oscilações com as mudanças nas alimentações. Estas grandes variações dificultam a otimização por métodos que utilizam mínimos locais, ratificando assim, a aplicabilidade do método do PSO.

Para o uso do método do enxame de partículas, foram definidas as variáveis de controle e a função objetivo. As variáveis de controle foram as vazões de alimentação de sacarose e maltose. Logo, restrições laterais no espaço de busca das variáveis de interesse foram impostas e são mostradas na Tabela 27.

Tabela 27. Limites laterais do espaço de busca das vazões de alimentação de sacarose e maltose no método PSO

	Limite Inferior	Limite Superior
	[m³/h]	[m³/h]
Vazão de Alimentação de Sacarose	0,0	0,5
Vazão de Alimentação de Maltose	0,0	0,5

Fonte: elaborada pelo autor

As funções objetivo usadas tiveram a finalidade de maximizar as concentrações de oligossacarídeos e frações destes em relação aos carboidratos totais. No total, seis otimizações foram realizadas por meio do método do enxame de partículas. As tabelas a seguir mostram as funções objetivo e os parâmetros usados no método PSO.

Tabela 28. Funções objetivo usadas no PSO

	Função Objetivo
Otimização 1	AG_5
Otimização 2	AG_6
Otimização 3	<i>Oligossacarídeos totais</i>
Otimização 4	$AG_5/Carboidratos\ totais$
Otimização 5	$AG_6/Carboidratos\ totais$
Otimização 6	<i>Oligossacarídeos totais/Carboidratos totais</i>

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 29. Parâmetros usados no PSO

Número de partículas do enxame	100
Fator de velocidade da partícula	0,5
Máximo de iterações	100
Passo mínimo	$1 \cdot 10^{-8}$
Tolerância da função objetivo	$1 \cdot 10^{-8}$

Fonte: elaborada pelo autor

6.5.1 Otimização 1

A otimização 1 consistiu na maximização a concentração de AG_5 no menor tempo de operação possível, aumentando assim, a produtividade deste oligômero. As variáveis de controle otimizadas indicaram que as vazões de alimentação devem ser 5 L/h da solução de sacarose (280 g/L) e 5 L/h da solução de maltose (70 g/L). O tempo ideal para encerrar a operação ocorreu em 14,1 h com um volume de 1,14 m³.

O volume reacional foi relativamente baixo, cerca de 14% maior que o valor inicial. Entretanto, o tempo de reação foi muito longo, dificultando o aumento de produção. As composições da solução reacional ao final da operação seguem na Tabela 30.

Tabela 30. Concentrações no final da operação (14,1 h) da Otimização 1

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	11,59	5,07
AG3	13,42	5,87
AG4	6,70	2,93
AG5	8,32	3,64
AG6	2,98	1,31
DX	1,87	0,82
Sacarose	0,36	0,16
Maltose	44,41	19,44
Açúcares Redutores	138,76	60,76

Fonte: elaborada pelo autor

A concentração de AG_5 foi a maior obtida entre as otimizações realizadas. Entretanto, as concentrações de açúcares redutores foram muito altas, cerca de 60,76% da composição final da solução. Logo, esta operação se mostrou inviável industrialmente.

6.5.2 Otimização 2

A maximização da concentração de AG_6 foi atingida com alimentação de 8,3 L/h de sacarose (280 g/L) e 5 L/h de maltose (70 g/L). O tempo reacional foi de 21,1 h com 1,28 m³. Este tempo foi bem superior ao obtido na otimização 1. O aumento na concentração de AG_6 foi cerca de 14,76% em relação a operação anterior. A desvantagem industrial desta operação

industrialmente reside no tempo de operação, sendo o maior obtido entre as otimizações. Os valores do ponto ideal seguem na Tabela 31.

Tabela 31. Concentrações no final da operação (21,1 h) da Otimização 2

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	11,47	5,22
AG3	14,46	6,58
AG4	5,37	2,45
AG5	7,91	3,60
AG6	3,42	1,56
DX	1,92	0,87
Sacarose	0,61	0,27
Maltose	39,28	17,88
Açúcares Redutores	135,29	61,57

Fonte: elaborada pelo autor

6.5.3 Otimização 3

A maximização da concentração de oligossacarídeos totais foi alcançada com alimentação de 10 L/h de sacarose (280 g/L) e 1 L/h de maltose (70 g/L). Estas condições operacionais se mostraram vantajosas por apresentar o menor tempo de duração, 3,1 h e o volume reacional semelhante a condição inicial, 1,03 m³.

A fração mássica de oligossacarídeos foi menor que as duas operações anteriores, mas a produtividade desta simulação é superior, pois o tempo de batelada equivalente a 21,86% do tempo da primeira operação e a 14,62% da segunda.

A concentração de açúcares redutores desta estratégia foi a maior obtida, sendo um ponto negativo desta operação pela possibilidade de reações paralelas. Os valores das concentrações no final da reação seguem na Tabela 32.

Tabela 32. Concentrações no final da operação (3,1 h) da Otimização 3

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	11,58	4,69
AG3	13,05	5,29
AG4	9,04	3,67
AG5	7,69	3,11
AG6	2,36	0,96
DX	1,91	0,77
Sacarose	1,37	0,56
Maltose	46,29	18,78
Açúcares Redutores	153,15	62,17

Fonte: elaborada pelo autor

6.5.4 Otimização 4

As alimentações de sacarose e maltose nesta otimização foram 115,4 L/h e 356,9 L/h, respectivamente. Em comparação com a otimização 1, os tempos de operação foram semelhantes, pois esta reação é cessada em 14,4 h. Já o aumento na fração mássica de AG_5 foi de 15,65%.

O volume reacional desta simulação foi de 7,81 m³, sendo muito distinto das demais operações. Este alto volume, inviabiliza a operação porque o reator deveria operar inicialmente com, no máximo, 12,5% da sua capacidade. Outra desvantagem seria o alto custo para purificação. Os valores obtidos no final da reação seguem na Tabela 33.

Tabela 33. Concentrações no final da operação (14,4 h) da Otimização 4

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	7,59	6,06
AG3	8,48	6,77
AG4	6,37	5,08
AG5	5,28	4,21
AG6	1,34	1,07
DX	0,99	0,79
Sacarose	8,69	6,94
Maltose	40,75	32,52
Açúcares Redutores	45,81	36,56

Fonte: elaborada pelo autor

Como vantagem desta operação, podemos citar as baixas concentrações de açúcares redutores e altas frações de oligossacarídeos totais, quando comparadas com as demais simulações.

6.5.5 Otimização 5

A otimização da fração de AG_6 em relação aos carboidratos totais ocorreu com as alimentações de sacarose e maltose de 10,4 L/h e 10,6 L/h, respectivamente. O volume reacional foi cerca de 3,8 % maior que a otimização da concentração de AG_6 (otimização 2). Entretanto, o tempo reacional foi reduzido em 22,13%. Os valores obtidos no final do processo são exibidos na Tabela 34.

Tabela 34. Concentrações no final da operação (16,4 h) da Otimização 5

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	11,18	5,26
AG3	13,67	6,43
AG4	5,26	2,47
AG5	7,69	3,62
AG6	3,26	1,53
DX	1,82	0,86
Sacarose	0,76	0,36
Maltose	40,74	19,16
Açúcares Redutores	128,22	60,31

Fonte: elaborada pelo autor

As concentrações e frações mássicas desta simulação foram muito semelhantes com as obtidas na maximização da concentração de AG_6 (otimização 2). O tempo de operação mesmo sendo menor que o necessário pela otimização 2, foi relativamente grande, 16,4 h, sendo um ponto crítico para a produção em larga escala.

6.5.6 Otimização 6

A otimização da fração de oligossacarídeos totais em relação aos carboidratos totais indicou que as vazões de alimentação ideais de sacarose e maltose eram 109,1 L/h e 235,1 L/h, respectivamente.

O tempo ótimo simulado para encerrar a operação foi de 3,3 h com volume de 2,12 m³. Em comparação com a otimização 3, o tempo reacional foi 6,17% superior. Já o volume apresentou um aumento de 105,82%. Logo, uma análise mais detalhada deve ser feita para julgar qual condição operacional é mais adequada. A Tabela 35 mostra os dados obtidos ao final da reação nesta simulação.

Tabela 35. Concentrações no final da operação (3,3 h) da Otimização 6

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	9,31	5,22
AG3	10,44	5,85
AG4	14,39	8,06
AG5	3,70	2,08
AG6	0,53	0,29
DX	1,38	0,77
Sacarose	10,45	5,85
Maltose	39,21	21,96
Açúcares Redutores	89,09	49,92

Fonte: elaborada pelo autor

A fração mássica de oligossacarídeos desta simulação é 21,5% enquanto que a otimização 3 apresenta 17,72%. Este aumento na composição reduz custos de purificação. Outra grande vantagem desta condição operacional são as menores concentrações de açúcares redutores, cerca de 41,83% menor, diminuindo assim, o risco de reações paralelas.

Ao compararmos os resultados das Tabela 21 e Tabela 35, notamos que a fração de oligossacarídeos desta simulação é inferior ao da semi-batelada com alimentação fixa simulada anteriormente. A concentração de açúcares redutores é bem superior nesta simulação, cerca de 90,38% maior que a obtida na operação com semi-batelada com alimentação fixa, sendo uma grande desvantagem.

6.5.7 Otimização 7

Uma nova condição operacional foi simulada com a finalidade de obter a melhor condição operacional. Este processo consistiu do uso das vazões de alimentação obtidas da otimização 6 com as concentrações de 40 e 45 g/L de sacarose e maltose. As concentrações iniciais foram as mesmas das correntes de alimentação. A Tabela 36 apresenta os resultados desta nova simulação.

Tabela 36. Concentrações no final da operação (0,9 h) da Otimização 7

Carboidrato	Concentração [g/L]	Fração mássica [%]
AG2	6,41	9,25
AG3	5,28	7,62
AG4	4,39	6,34
AG5	0,89	1,29
AG6	0,14	0,21
DX	0,48	0,69
Sacarose	2,49	3,59
Maltose	32,51	46,93
Açúcares Redutores	16,68	24,08

Fonte: elaborada pelo autor

Os dados da tabela acima são referentes ao tempo ótimo para encerrar a operação, 0,9 h. O volume reacional final foi 1,29 m³. Observamos que o tempo reacional foi o menor entre todas as operações deste trabalho, sendo inferior a uma hora de operação. Esta variável reflete diretamente na produtividade dos oligossacarídeos.

O volume reacional foi relativamente pequeno, apresentando um acréscimo de 29%. Logo, os custos para processamento não seriam tão grandes, quando comparado com os resultados da otimização 6.

Assim, esta simulação pode ser considerada a mais adequada para a síntese industrial de oligossacarídeos, pois apresenta uma fração de oligossacarídeos relativamente alta, menor tempo operacional, baixas frações de açúcares redutores e volume reacional relativamente pequeno quando comparada com as demais operações.

7 CONCLUSÕES

O modelo proposto que considera que oligossacarídeos e dextranas são produzidos por rotas distintas se mostrou uma boa alternativa para a cinética enzimática. Esta hipótese foi ratificada pelos dados de validação, pois a enzima provinda de microrganismo modificado afetou apenas a cinética de dextranas, indicando que os sítios são distintos. Mesmo com esta enzima alterada, o modelo conseguiu representar os dados experimentais.

O comportamento anômalo da concentração de AG_4 conseguiu ser predito por este modelo por meio da hipótese de “gatilho de consumo”, sendo um ponto crítico no desenvolvimento do modelo matemático. O modelo também conseguiu prever a concentração de dextranas de tamanhos distintos, sendo um grande diferencial, pois a maioria dos trabalhos citados na literatura não mensuram os carboidratos individualmente.

Concluiu-se pelas simulações que a melhor estratégia operacional para a síntese de oligossacarídeos em larga escala é a semi-batelada com alimentação fixa, pois ofertou o menor tempo operacional e um aumento de volume reacional relativamente baixo, 29 %.

As otimizações mostraram que, industrialmente, as vazões de alimentação de sacarose e maltose afetam diretamente no tempo de reação e na composição final dos produtos. A obtenção de produtos com altas concentrações de oligossacarídeos totais ocorre em altas vazões de sacarose e maltose, mas estes produtos possuem menores valores agregados, pois pequenas quantidades de oligossacarídeos maiores, AG_5 e AG_6 , são obtidos.

As otimizações com interesse na maximização de oligossacarídeos maiores, AG_5 e AG_6 , mostraram que as condições operacionais possuem baixas vazões de alimentação e baixa produtividade, em contrapartida, os produtos obtidos possuem valores agregados elevados.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, A. S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 613–621, 2004.
- AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 369–377, 2006.
- ALLIET, P. et al. Effect of prebiotic galactooligosaccharide, long-chain fructooligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. **Nutrition**, v. 23, p. 719–723, 2007.
- ARAÚJO, A. D. et al. Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 565–571, 2015.
- BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 323–333, 2006.
- BARUAH, R.; DEKA, B.; GOYAL, A. LWT - Food Science and Technology Purification and characterization of dextransucrase from *Weissella cibaria* RBA12 and its application in in vitro synthesis of prebiotic oligosaccharides in mango and pineapple juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 449–456, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.012>>.
- BASU, A.; MUTTURI, S.; PRAPULLA, S. G. Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1464–1471, 2016.
- BATHISTA E SILVA, A. L. B.; SILVA, E. O. **Conhecendo materiais poliméricos**. [S.l.]: Universidade Federal de Mato Grosso, 2003.
- BEKERS, M. et al. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1535–1539, 2005.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BERTRAND, E. et al. Dextranase immobilization on epoxy CIM® disk for the production of isomaltooligosaccharides from dextran. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 707–713, 2014.
- BHART, S. K. et al. Mechanism-based antidiabetic activity of Fructo and isomaltooligosaccharides: Validation by in vivo, in silico and in vitro interaction potential. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 317–327, 2015.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, p. 125–131, 2002.

- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos vol 2. In: SCHMIDELL, W. et al. (Org.). . **Biotechnol. Ind. Eng. Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. p. 123–178.
- BRISON, Y. et al. N-terminally truncated dextransucrase DSR-E from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 in complex with isomaltotriose. **Protein Data Bank**, 2015.
- BRUGGENCATE, S. J. M. Dietary of fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in healthmen. **J.Nutr**, v. 136, p. 70–74, 2006.
- CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 130–136, 1997.
- CHALANE, S. et al. Optimized endodextranase-epoxy CIM® disk reactor for the continuous production of molecular weight-controlled prebiotic isomalto-oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 105–113, 2017.
- CHO, S. S.; FINOCCHIARO, E. T. **Handbook of Prebiotics and Probiotics ingredients: Health benefits and food applications**. [S.l: s.n.], 2010.
- COSTA, J. A. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 249–259, 2015.
- COVIELLO, T. et al. A new scleroglucan/borax hydrogel: swelling and drug release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 95–107, 2005.
- CURRIE, J. E.; YOUNG, J. M.; WUNDROCK, J. **Prebiotic suppositories**. . [S.l.]: Google Patents. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US9011909>>. , 2015
- DAY, D. F.; CHUNG, C. H. **Isomaltooligosaccharides from leuconostoc as neutraceuticals**. . [S.l: s.n.]. , 2008
- DOBRUCHOWSKA, J. M. et al. Structural characterization of linear isomalto/malto oligomer products synthesized by novel GTFB 4,6- α -glucanotransferase enzyme from *Lactobacillus reuteri* 121. **Glycobiology**, v. 22, n. 4, p. 517–528, 2012.
- DUAN, G. et al. **Grain compositions containing prebiotic isomalto-oligosaccharides and methods of making and using same**. . [S.l: s.n.]. , 2011
- EBERHART, R.; KENNEDY, J. A new optimizer using particle swarm theory. 1995, [S.l: s.n.], 1995. p. 39–43.
- EVTUGUIM, D. V. et al. Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* labill. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 597–604, 2003.
- FERNANDES, F. A. N.; LONA, L. M. F. **Introdução à modelagem de sistemas de polimerização**. Ed. 1 ed. São Carlos: Booklink, 2004.
- FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Evaluation of Enzymatic Reactors for Large-Scale Panose Production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 142, p. 95–104, 2007.

_____. Optimization of panose production by enzymatic synthesis using neural networks. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1090–1096, 2006.

FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 2985–2993, 1894.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4.ed. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

FORTES, R. C.; MUNIZ, L. B. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides and inulin in the human body: an evidence-based study. **Science Health**, v. 20, p. 241–252, 2009.

GIBSON, G. R.; KOLIDA, S. **Prebiotic composition comprising fructo-oligosaccharides (fos) and galacto-oligosaccharides (gos) in the treatment or prevention of gastrointestinal tract disorders**. . [S.l.]: Google Patents. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/CA2508693A1?cl=en>>. , 2004

GIESE, E. C.; HIROSI, T.; SILVA, M. L. Production, properties and applications of oligosaccharides. **Agricultural Sciences**, v. 32, p. 683–700, 2011.

GOFFIN, D. et al. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 394–409, 2011.

GONRY, P.; BOOTEN, K. **Fructan-based epilatory compositions**. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://patents.justia.com/patent/8986716>>. , 2008

GOURINENI, V. et al. Gastrointestinal Tolerance and Glycemic Response of Isomaltooligosaccharides in Healthy Adults. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 6–15, 2018.

HEINCKE, K. et al. Kinetics of the dextranase acceptor reaction with maltose- experimental results and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 523–534, 1999.

HENDERSON, W. E.; KING, W.; SHETTY, J. K. **In situ fructooligosaccharide production and sucrose reduction**. . [S.l.]: Google Patents. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/WO2007061918A3?cl=fi>>. , 2007

HEPPNER, F.; GRENANDER, U. A stochastic nonlinear model for coordinated bird flocks. In: KRASNER, S. (Org.). **The Ubiquity of Chaos**. Ed. 1 ed. Washington: AAAS Publicatins, 1990. p. 247.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109–116, 2002.

HONORATO, T. L. et al. Production of lactic acid and dextran using cashew apple juice as substrate. **Scien. Food Technol.**, v. 27, p. 254–258, 2007.

HOSPITAL SAMARITANO. **Saiba tudo sobre a diverticulite, uma doença que afeta o intestino**. Disponível em: <<http://samaritano.com.br/highlighted-posts/gastro-saiba-tudo-sobre-diverticulite-uma-doenca-que-afeta-o-intestino-grosso/>>. Acesso em: 27 dez. 2018.

HU, Y. et al. Effect of acceptor carbohydrates on oligosaccharide and polysaccharide synthesis by dextransucrase DsrM from *Weissella cibaria*. **Food Research International**, v. 99, n. June, p. 603–611, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.026>>.

HU, Y. et al. Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and bifidobacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 108–114, 2013.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Netherlands: Springer, 2008.

JURADO, E. et al. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300–309, 2002.

KIM, D.; ROBYT, J. . F. Properties and uses of dextransucrase elaborated by a new class of *Leuconostoc mesenteroides* mutants. **Progress in Biotechnology**, v. 12, p. 125–144, 1996.

KIM, Y. et al. Enzyme and Microbial Technology Construction of a fusion enzyme of dextransucrase and dextranase : Application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. v. 44, p. 159–164, 2009.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in Health and Disease. **Rev. Food Sci. Technol.**, v. 2, p. 373–393, 2011.

KOSHLAND, D. E. J. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1958.

KUBIK, C.; SIKORA, B.; BIELECKI, B. Immobilization of dextransucrase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 555–560, 2004.

LEE, H. S. et al. Cooperative action of α -glucanotransferase and altogenic amylase for an improved process of isomaltooligosaccharide (IMO) production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2812–2817, 2002.

LI, Q. et al. International Journal of Biological Macromolecules Designing of a novel dextransucrase efficient in synthesizing oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 696–703, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.114>>.

MANOEL, E. A. et al. Enzyme and Microbial Technology Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>>.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230–240, 2009.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligosacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 587–592, 2008.

MORAIS, W. G. De; CONTESINI, F. J. Enzyme Immobilization for Oligosaccharide Production. v. 2, n. 2017, 2019.

MOURA, P. et al. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by Bifidobacterium and Lactobacillus strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 963–972, 2007.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2007.

OJHA, S.; MISHRA, S.; CHAND, S. Production of isomalto-oligosaccharides by cell bound α -glucosidase of Microbacterium sp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 486–494, 2015.

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. Effect of Xylooligosaccharide on the Growth of Bifidobacteria. **Bifidobacteria Microflora**, v. 9, n. 2, p. 77–86, 1990.

OLIVEIRA, E. A. et al. **Process for obtaining fructooligosaccharides in bioreactor using fructosyltransferase enzyme.** . [S.l: s.n.]. , 2009

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosaccharides: implications for human health and use in food. **Rural Science**, v. 33, p. 385–390, 2003.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **Biotech**, v. 2, p. 115–125, 2012.

PATURI, G. et al. Differential effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on gut microbiota and gene expression in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 204–213, 2015.

PEREIRA, A. S. **Modelagem e simulação do processo de produção de etanol a partir do suco do pendúnculo de caju, visando a otimização das condições operacionais.** 2016. 167 f. Universidade Federal do Ceará, 2016.

PERUGINO, G. et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 31–37, 2004.

POLI, R.; KENNEDY, J.; BLACKWELL, T. Particle Swarm Optimization: An overview. **Swarm Intelligence**, v. 1, p. 33–57, 2007.

RABELO, M. C. et al. Enzymatic Synthesis of Prebiotic Oligosaccharides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 31–40, 2006.

RABELO, M. C. **Síntese enzimática e separação cromatográfica de isomaltoligosacarídeos de cadeia longa.** 2012. 87 f. Universidade Federal do Ceará, 2012.

RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUES, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate. **Bioresource Technology**, v. 100, p.

5574–5580, 2009.

RAIZEL, R. et al. Effects of the consumption probiotics, prebiotics and symbiotics for the human organism. **Journal Science & Health**, v. 4, p. 66–74, 2011.

REMAUD-SIMON, M. et al. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 10, p. 117–128, 2000.

ROBERFROID, M. B. Fructo-oligosaccharide mal absorption: benefit for gastrointestinal functions. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 16, p. 173–177, 2002.

ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The Mechanism of Dextranucrase Action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 165, p. 634–640, 1974.

ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. Production, purification, and properties of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate Research**, v. 69, p. 95–111, 1979.

ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 433–445, 1978.

ROBYT, J. F.; YOON, S. H.; MUKERJEA, R. Dextranucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 3039–3048, 2008.

RODRIGUES, S. **Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose comoceptor**. 2003. 259 f. Universidade Estadual de Campinas, 2003.

RUDEEKULTHAMRONG, P.; SAWASDEE, K.; KAULPIBOON, J. Production of long-chain isomaltooligosaccharides from maltotriose using the thermostable amyloamylase and transglucosidase enzymes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 4, p. 778–786, 2013.

SHI, Y.; EBERHART, R. A Modified Particle Swarm Optimizer. 1998, [S.l.]: Conf on Evolutionary Computation, 1998. p. 69–73.

SHOAF, K. et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6920–6928, 2006.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 565–572, 2016.

SORNDECH, W. et al. LWT - Food Science and Technology Isomalto-oligosaccharides : Recent insights in production technology and their use for food and medical applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, n. January, p. 135–142, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.098>>.

SORNDECH, W.; TONGTA, S.; BLENNOW, A. Combination of amylase and transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 479–486, 2017.

TANRISEVEN, A.; ROBYT, J. F. Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of

dextranucrase, and the demonstration of a separate acceptor binding-site*. **Carbohydrate Research**, v. 225, p. 321–329, 1992.

TATEYAMA, I. et al. Effect of xylooligosaccharide intake on severe constipation in pregnant women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 51, n. 6, p. 445–448, 2005.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food. **Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 90–109, 2002.

VERCAUTEREN, R. L. M.; NGUYEN, V. S. **Process for preparing isomalto-oligosaccharides with elongated chain and low glycemic index**. . [S.l: s.n.]. , 2010

VERGARA, C. M. A. C. et al. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, p. 141–145, 2010.

WANG, W. et al. Isomalto-oligosaccharides ameliorate visceral hyperalgesia with repair damage of ileal epithelial ultrastructure in rats. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 2017.

WANG Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. **Food Res. Int.**, v. 42, p. 8–12, 2009.

WU, Q. et al. Fermentation properties of isomaltooligosaccharides are affected by human fecal enterotypes. **Anaerobe**, v. 48, p. 206–214, 2017.

YEN, C.-H. et al. Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, cebo-controlled, diet-controlled trial. **Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 445–450, 2011.

ZACARCHENCO, P. B. et al. Prebiotics in dairy products. **Institute of Food Technology**, v. 2, p. 36–44, 2013.

ZAFAR, T. A. et al. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 399–402, 2004.

ZHANG, L. et al. Sandwich-structured enzyme membrane reactor for efficient conversion of maltose into iso-maltooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9144–9149, 2010.