

Engenharia Bioquímica 1



Sumario

A seguir temos o sumário dos conteúdos abordados na disciplina:

- Microbiologia industrial.
- Cinética do crescimento e morte celular.
- Cinética de processos fermentativos.
- Cinética de reações enzimáticas. (inibição)
- Enzimas imobilizadas.
- Produção de enzimas e catálise enzimática.

Avaliações e notas:

- AV1 - 20%
- AV2 - 20%
- Seminários - 20%
- Estudos de caso - 20%
- Atividades em aula - 20%

Contato:

- diego.lemos@uftm.edu.br
- atendimento -

Bibliografia:

- 1.SHULER, M. L. & Kargi, F.Bioprocess Engineering. Basic concepts. Prentice Hall, 1992.
 - 2.BLANCH, H.W. Biochemical Engineering. 2 ed. CRC Press. 2007.
 - 3.DORAN, Pauline M. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press -2012.
-

Introdução

Objetivos

Esse curso busca:

- Possibilitar o aluno a trabalhar com a cinética envolvida em bioprocessos enzimáticos e microbianos.

Veremos:

- Reações enzimáticas e microbianas.

- Biorreatores.

Definições

Aqui temos algumas definições importantes:

- **Química:** estudo das estruturas e interações entre átomos e moléculas.
- **Biologia:** estudo das estruturas e interações das células e organismos vivos.
- **Bioquímica:** química da vida.
- **Carboidratos:** Compostos orgânicos com pelo menos 3 carbonos.
- **Catalisadores:** Espécies químicas que possuem a propriedade de aumentar a velocidade de uma reação sem que esta sofra alterações permanentes, tanto no que diz respeito à composição química como à quantidade.

Carboidratos

Os carboidratos possuem a seguinte **formula química geral:**

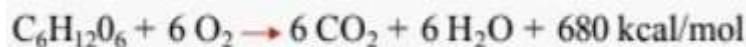


Um dos mais famosos carboidratos é a glicose, ele é produzido pela fotossíntese na reação:



A energia solar utilizada na fotossíntese permanece armazenada na forma de energia química nas ligações entre os átomos da molécula de glicose.

Ademais, a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica de liberação de energia em muitas células não fotossintetizantes:



Por fim, os carboidratos podem ser classificados mediante a unidades de açúcares em sua cadeia:

- **Monossacarídeos:** 1 unidade – glicose, frutose, galactose.
- **Dissacarídeos:** 2 unidades – sacarose, maltose e lactose
- **Oligossacarídios:** 3 a 10 unidades – rafinose e estaquiose
- **Polissacarídeos:** mais de 10 unidades – amido, celulose, glicogênio

Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos insolúveis e heterogêneos em água, porém solúveis em solventes orgânicos.

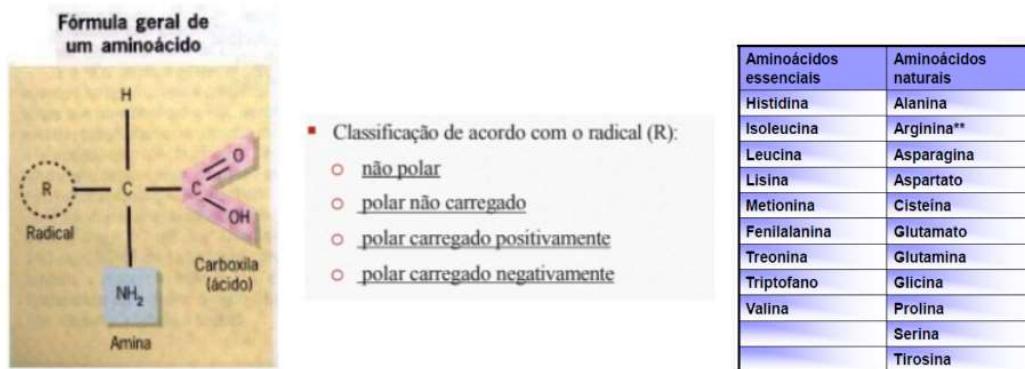
Os lipídios são classificados em dois grandes grupos:

- **Simples:** São compostos que por hidrólise dão origem somente a ácidos graxos e álcool.
- **Complexos:** São compostos que apresentam outros grupos na molécula, além dos ácidos graxos e alcoóis.

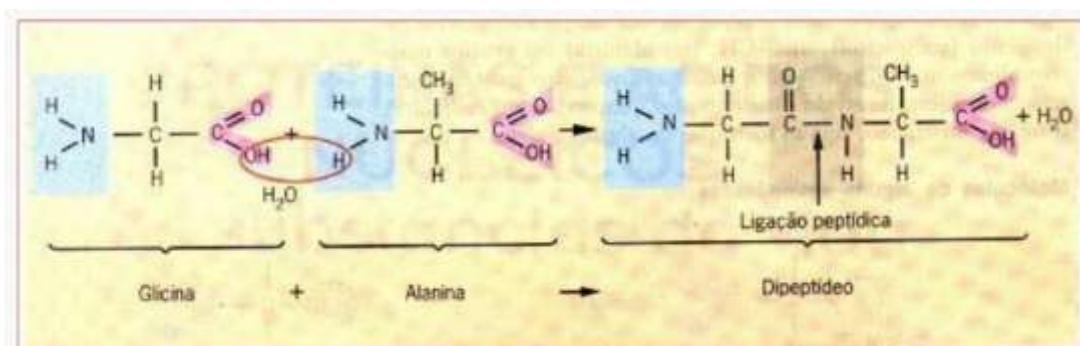
[1] Proteínas e Aminoácidos

As proteínas são compostos complexos formados por muitas moléculas orgânicas. São as macromoléculas mais abundantes nas células vivas.

As proteinas são formadas pelos 20 tipos de **aminoácidos** que são descritos abaixo. Além disso, eles são divididos entre essenciais e naturais, onde os essenciais são adquiridos na alimentação e os naturais produzidos pelo corpo:



Ademais, os aminoácidos se ligam através da **ligação Peptídica** descrita abaixo:



- Dipeptídio: União de 2 aminoácidos.
- Tripeptídio: União de 3 aminoácidos.
- Polipeptídio/Proteínas: União de 4 ou mais aminoácidos.

[2] Proteínas e Aminoácidos

Mediante a classificação das proteínas, temos:

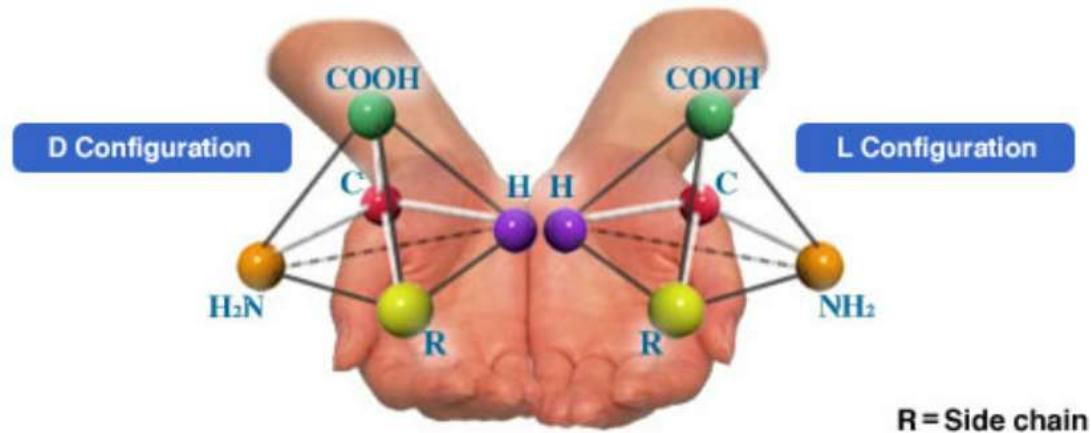


[3] Proteínas e Aminoácidos: Isomeros

Com relação aos aminoácidos temos que eles são divididos mediante ao arranjo espacial dos átomos. Desse modo, alinhado o radical e a carboxila do aminoácido, denomina-se "**L-aminoácido**" os que possuem o grupo amina a esquerda e "**D-aminoácido**" os que possuem o grupo amina a direita.

Ademais, devido ao fato de o carbono central do aminoácido ser um **carbono assimétrico** ele se torna o **centro quiral** e confere as moléculas de aminoácidos diferentes **propriedades ópticas**, a depender do arranjo espacial dos átomos.

Desse modo, com o auxilio de um **polarímetro**, atravessando um **feixe de luz polarizada** por meio de uma solução aquosa contendo o aminoácido é possível medir a ângulo de deflexão da luz no meio. Caso a luz tenha defletido para a esquerda o aminoácido predominante é "**Levógiro**" (L) e o contrário "**dextrogiro**" (D).



Enzimonologia

[1] Enzimas

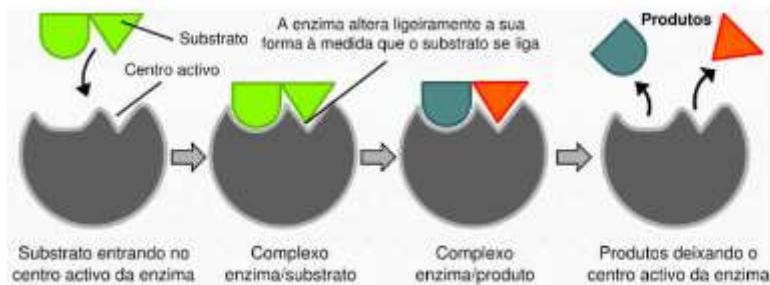
As enzimas são moléculas ou proteínas (formadas por aminoácidos) que atuam como catalisadores de reações específicas.

Desse modo, é importante ressaltar algumas características das enzimas:

- Cada enzima possui o **centro ativo** ou **sítio catalítico**, onde acontece a catalise.
- Possuem maior poder catalítico que os catalisadores sintéticos.
- Apresentam alto grau de especificidade;
- São produtos naturais biológicos;
- São altamente eficientes, acelerando a velocidade das reações (10^6 a 10^{12} + rápida);
- São econômicas, reduzindo a energia de ativação;

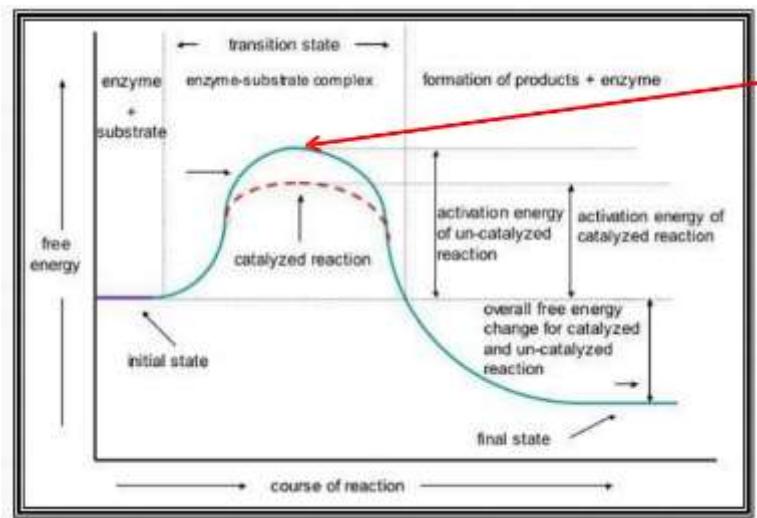
- Não são tóxicas;
- Condições favoráveis de pH, temperatura, polaridade do solvente e força iônica.

Ademais, temos o funcionamento da enzima:



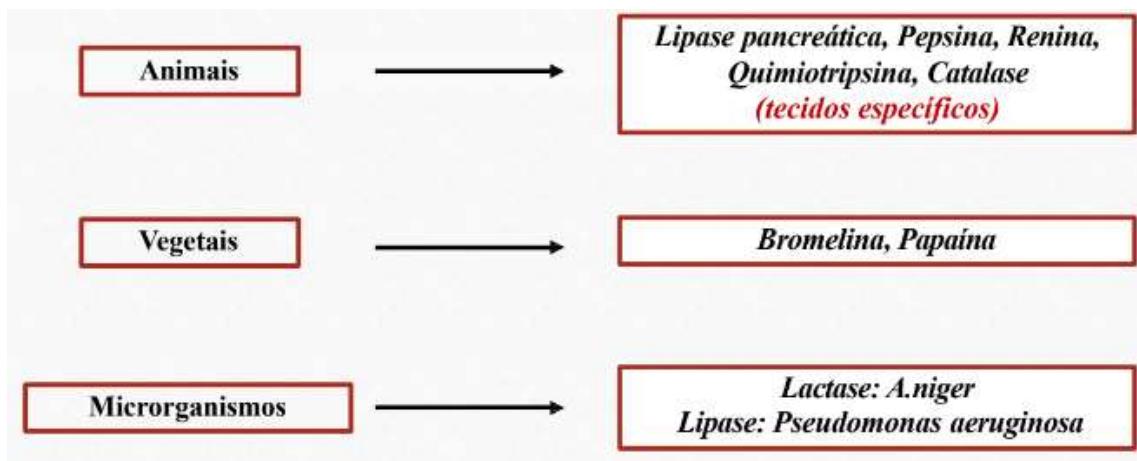
Com relação a cinética química, temos que as enzimas realizam as funções:

- **Aceleram a taxa de reação** no sentido do seu equilíbrio.
- Não alteram o estado final de um dado sistema químico.
- Participam da reação, mas ao final não têm sua concentração alterada.
- **Diminui a energia de ativação** de uma reação.

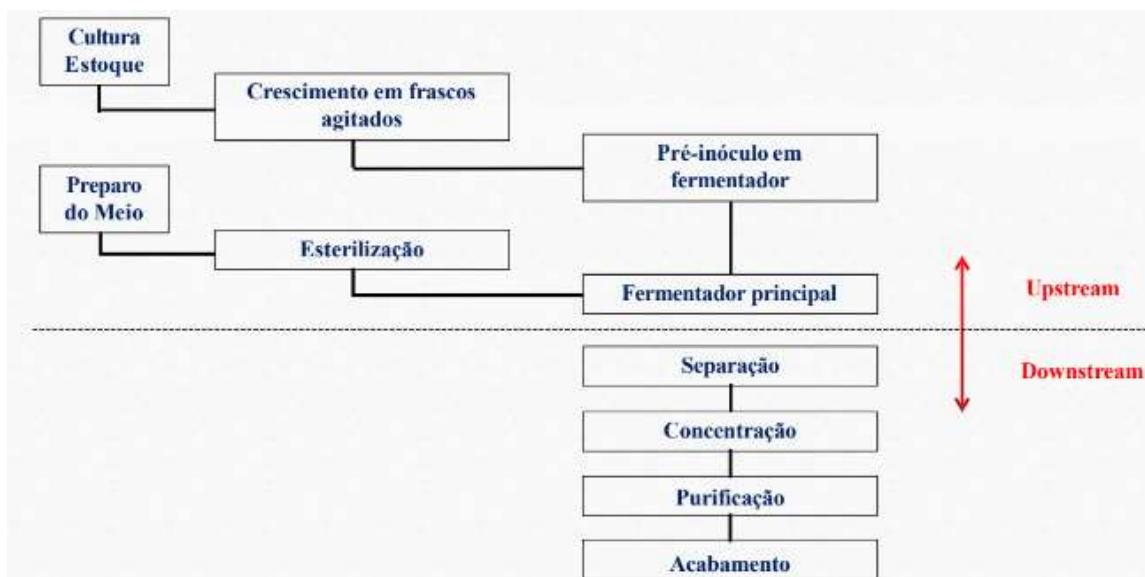


[2] Enzimas: Obtenção

As enzimas são obtidas de diversas fontes, sendo as mais comuns:



Com relação a obtenção de enzimas por microrganismos temos o processo produtivo:



[3] Enzimas: Aplicação industrial

Com relação as aplicações das enzimas temos:

- Redução da viscosidade.
- Melhoria da filtrabilidade.
- Clarificação e estabilização dos líquidos para sua conservação.
- Insolubilização das macromoléculas para formação de coágulo.
- Melhoria da digestibilidade.
- Melhoria da fermentabilidade
- Melhoria da textura.
- Melhoria da característica organolépticas.
- Aumento do poder adoçante.
- Redução da dificuldade para cristalização.
- Correção das deficiências enzimáticas de origem natural.

Além disso, temos algumas enzimas principais:

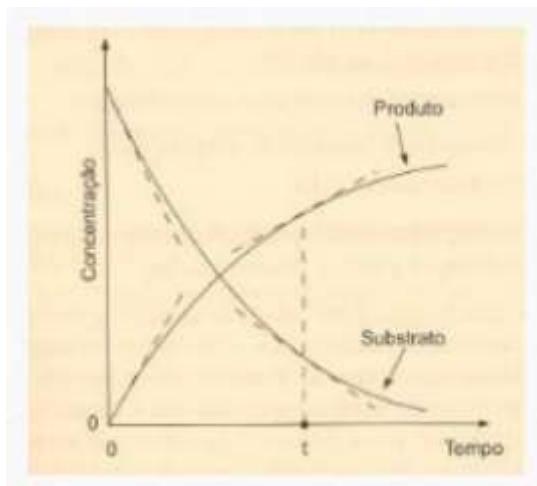
Enzima	Indústria	Aplicação
α -amilase	Panificação	Reduz a viscosidade do amido e acelera o crescimento da massa
	Cervejaria Têxtil	Liquefaz o amido Remoção de gomas de amido
Glicoamilase	Açucareira	Produção de xaropes de glicose
Proteases	Lavanderia	Incorporação em detergentes
	Curtume	Curtir e depilar o couro
	Alimentícia	Fabricação de queijos, amaciamento de carne
Pectinases	Alimentícia	Clarificação de sucos
Glicoseisomerase	Alimentícia	Produção de xaropes de frutose
Papaína	Alimentícia	Evitar turbidez da cerveja
Penicilina-amidase	Farmacêutica	Produção de antibióticos
Amiloacilase	Farmacêutica e alimentícia	Purificação de misturas racêmicas de aas
Celulase e hemicelulase	Papel	Hidrólise de material contendo celulose
Lipases	Lavanderia e alimenticia	Hidrólise de lipídios

28

Reações enzimáticas

Cinética química

A **cinética química** é medida pela **variação da concentração** dos reagentes/produtos **pelo tempo**. Desse modo, podemos construir o seguinte gráfico:



[1] Atividade enzimática

A atividade enzimática de uma enzima é feita pela avaliação da velocidade de reação que a enzima catalisa.

A **atividade enzimática** é em resumo a cinética da reação a qual possui as enzimas, dado em **(umol/min)** ou apenas **(U)**.

Já a **concentração de atividade enzimática** ou **atividade específica** é medida em unidades de **(umol/min . mL de enzima)** ou apenas **(U/mL)**. Também podemos medir essa grandeza por **(umol/min . g de enzima)** ou apenas **(U/g)**

[2] Atividade enzimática: Exemplo

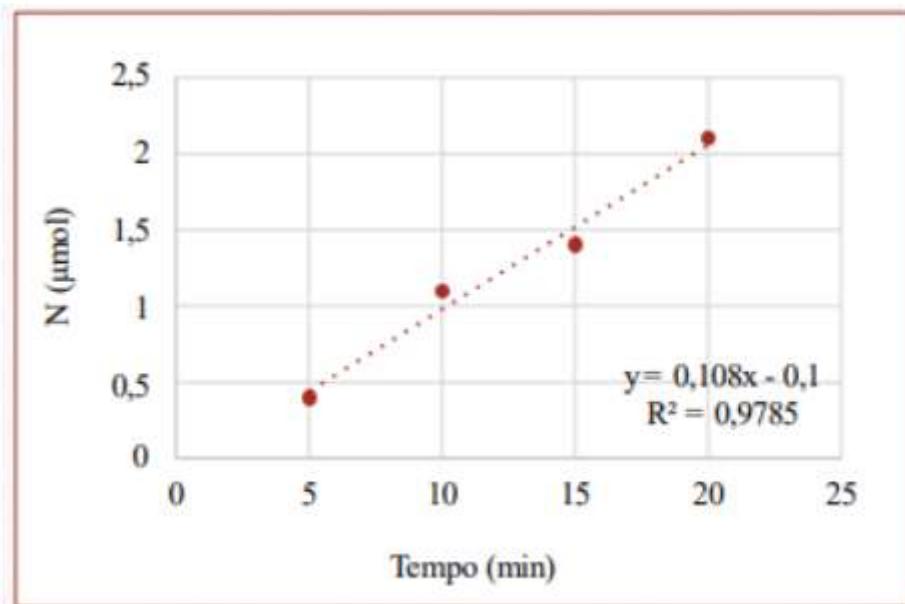
Abaixo temos um exemplo:

Ensaio: são preparados 4 tubos de ensaio idênticos contendo substrato e solução com enzima. Os 4 tubos são simultaneamente incubados a 30°C e a reação é interrompida em cada um dos tubos em tempos diferentes através da desnaturação da enzima. Ao final, o produto da reação é detectado através de espectrofotometria nos 4 tubos.

Sabe-se que foi adicionado 0,1 mL de enzima. E que a amostra contendo a enzima foi diluída 5 vezes antes de ser adicionada aos tubos

Tubo	Tempo (min)	Quantidade de Produto (umol)
1	5	0,4
2	10	1,1
3	15	1,4
4	20	2,1

Plotando o gráfico e realizando a regressão:



Chegamos que a **atividade enzimática** é:

$$v = 0,108 \text{ } \mu\text{mol/min} = 0,108 \text{ U} = \text{atividade enzimática}$$

Já a **concentração de atividade enzimática** é:

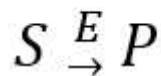
$$C_{enzimas} = 0,1 \text{ mL puro}$$

$$C_{enzimas_diluida} = \frac{C_{enzimas}}{5} = 0.2 \text{ mL}$$

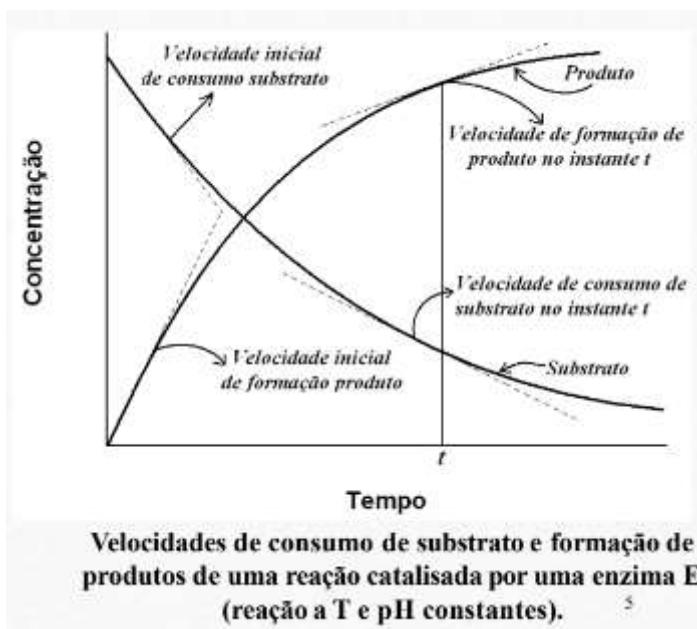
$$C_{atividade_enzimatica} = \frac{v}{C_{enzimas_diluida}} = \frac{0.108 \text{ U}}{0.2 \text{ mL}} = 5.4 \text{ U/mL}$$

[1] Reações enzimáticas

As reações enzimáticas possuem a seguinte expressão geral:



E possuem o seguinte diagrama cinético:

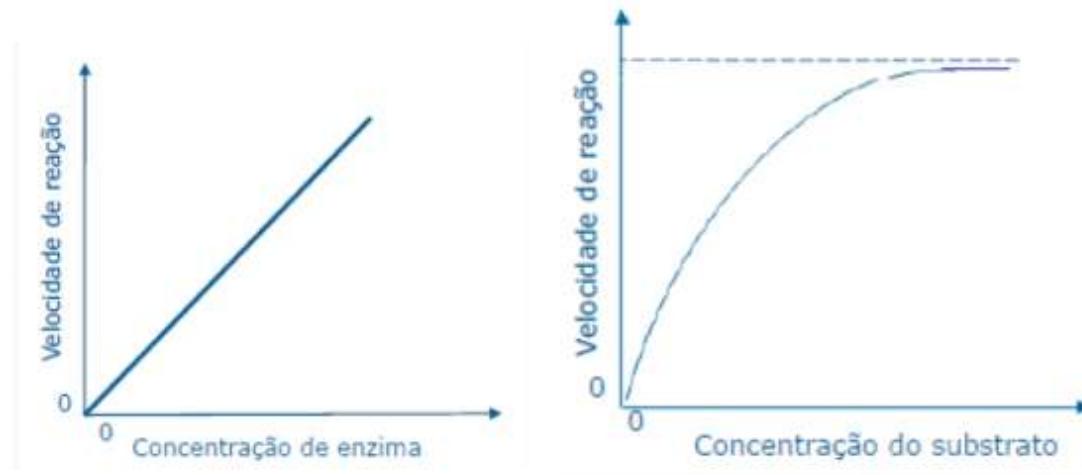


- Teremos grande interesse na **velocidade inicial da reação**.

[2] Reações enzimáticas: Influência das enzimas e substrato.

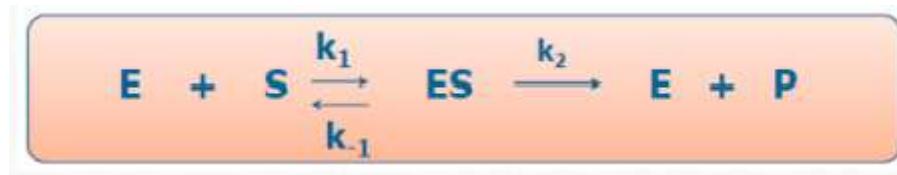
Em reações enzimáticas as concentrações de enzimas e do substrato são fundamentais na velocidade reacional.

Desse modo, temos que sua concentração influencia a velocidade da reação:



[3] Reações enzimáticas: Equacionamento

Agora iremos alterar o antigo mecanismo reacional para o mecanismo proposto por **Michaelis-Menten**:



Desse modo, iremos supor algumas hipóteses para este mecanismo:

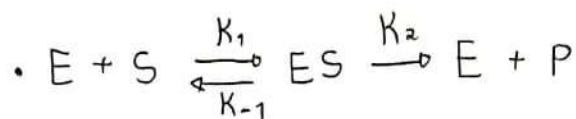
- 1º: O substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si formando o complexo enzima-substrato (ES).
- 2º: O complexo formado se decompõe, regenerando a enzima e formando os produtos da reação.

Ademais, segue-se o equacionamento para a dedução da **equação de Michaelis-Menten**:

Name: Isaac Miranda Camargo Atividade aula 3,4

* Dedução da equação de Michaelis - Menten: Pseudo estado estacionário.

- Analisando:



- Analisando os termos de reação:

$$\cdot E: -\frac{d[E]}{dt} = K_1 [E][S] - K_{-1}[ES] - K_2[ES]$$

$$\cdot S: -\frac{d[S]}{dt} = K_1 [E][S] - K_{-1}[ES]$$

$$\cdot ES: \frac{d[ES]}{dt} = K_1 [E][S] - (K_{-1} + K_2)[ES]$$

$$\cdot P: \frac{d[P]}{dt} = K_2[ES]$$

- Hipóteses:

.1º: Enzymas não desaturam ($[E_0] = [E] + [ES]$)

.2º: A reação inversa ($P \rightarrow S$) é desprezível.

.3º: Sistema fechado.

.4º: A concentração de $[ES]$ permanece constante com o tempo. ($\frac{d[ES]}{dt} = 0$)

2

- Deste modo:

$$\cdot \frac{d[\text{E}/\text{S}]}{dt} = K_1[\text{E}][\text{S}] - (K_{-1} + K_2)[\text{ES}]$$

$$\cdot [\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_m} \quad \cdot K_m = \frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1} \quad \therefore [\text{ES}] = \frac{[\text{E}_0][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} //$$

- Então temos que a taxa de formação do produtor, "equação de Michaelis-Menten", é:

$$\cdot \frac{d[\text{P}]}{dt} = K_2[\text{ES}]$$

$$\boxed{\cdot \frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{K_2[\text{E}_0][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} = \frac{V_{max}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}}$$

Onde:

$$K_m = \frac{(K_{-1} + K_2)}{K_1}$$

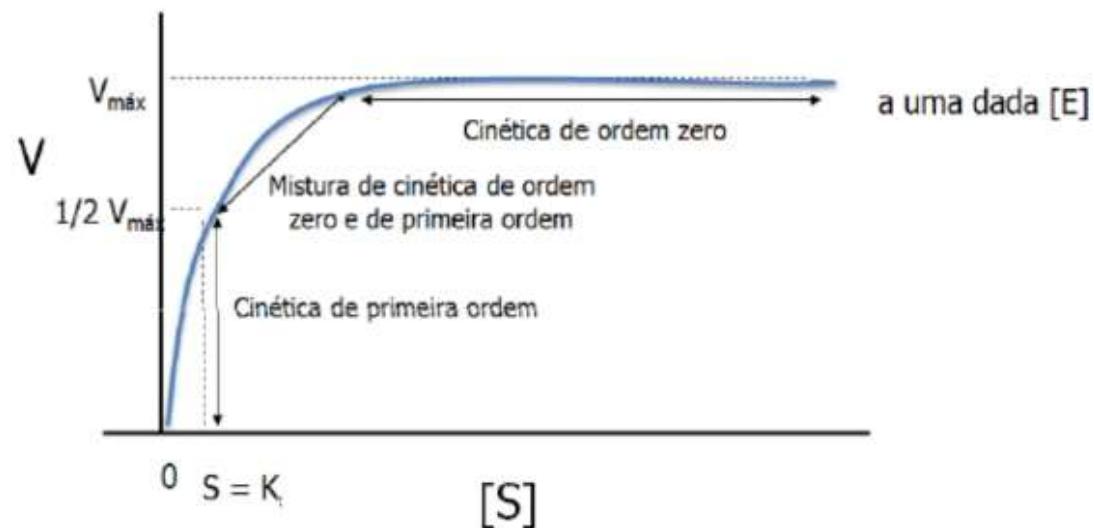
$$V_{max} = K_2[\text{E}_0]$$

[4] Reações enzimáticas: Interpretação

Com relação a **constante de Michaelis-Menten** (K_m), temos:

- K_m é usado para avaliar a **afinidade entre a enzima e o substrato**.
- **Quanto menor** for o valor de K_m , **maior será a afinidade** da enzima pelo substrato.
- $10^{-7} < K_m < 10^{-1}$
- O valor de K_m **independe da quantidade de enzima** utilizada.

Ademais, obtida a **equação de Michaelis-Menten** iremos interpretá-la. Para tal, por meio da equação é possível observar o comportamento da velocidade reacional em função da concentração de substrato:



Ademais, é definido a **fração de sítios ocupados** (f_{ES}) como sendo:

$$f_{ES} = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{V_{\text{max}}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Define-se **número de renovação** ou **turnover number** como:

$$V_{\text{MÁX}} = k_{\text{CAT}}[E_0] \quad K_{\text{CAT}} = K_2$$

E, por fim, define-se **eficiência catalitica** como:

$$E = \frac{K_{cat}}{K_m}$$

Linearização da Equação de Michaelis-Menten

A partir de agora chamaremos a $\frac{d[P]}{dt} = v$. Desse modo, reescreveremos a equação de Michaelis-Menten para obtenção de uma equação linearizável.

Linearização: Método de Lineweaver-Burk

$$\frac{v}{V_{MAX}} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{MAX}[S]} - \frac{1}{K_M}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

Linearização: Método de Hanes

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}} + \frac{[S]}{V_{MAX}}$$

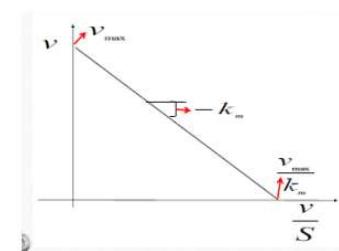
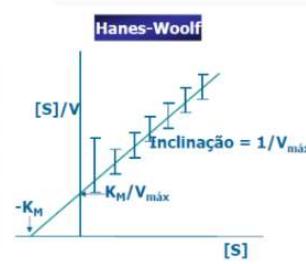
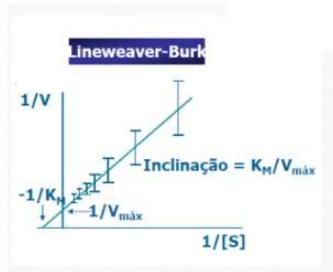
Linearização: Método de Eadie-Hofstee

$$[v \cdot V_{MAX}] \cdot \frac{1}{v} = \left[\frac{K_M}{V_{MAX}[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \right] \cdot [v \cdot V_{MAX}]$$

$$V_{MAX} = \frac{K_M \cdot v}{[S]} + v$$

$$v = V_{MAX} - K_M \frac{v}{[S]}$$

Por fim, podemos comparar os 3 métodos:



- Observa-se que o método de Hanes possui maior estabilidade.

Exemplo: Equação de Michaelis-Menten

- Questão:

A partir do modelo de Michaelis-Menten, responda:

- Qual a concentração de um substrato para que uma enzima com kcat de 30,0 s⁻¹ e Km de 0,005 M opere com um quarto da velocidade máxima?
- Determine a fração de Vmax que seria obtida nas seguintes concentrações de substrato: 1/2Km; 2Km e 10Km.

- Resposta:

* Questão :

- Analisando :

$$\cdot v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\cdot K_a = K_{cat} = 30 \text{ M}^{-1}$$

$$\cdot K_m = 0,005 \text{ mol/L}$$

- Determinando a concentração de substrato $[S]$: (letra "a")

$$\cdot v = \frac{V_{max}}{4} \quad \cdot 1 = \frac{4[S]}{K_m + [S]} \quad \cdot [S](4-1) = K_m$$

$$\boxed{\cdot [S] = \frac{K_m}{3} = 0,001666 \text{ mol/L}}$$

- Determinando (V_{max}) : (letra "b")

$$\therefore v = \frac{V_{max}(x K_m)}{K_m(1+x)} = V_{max} \cdot \frac{x}{1+x}$$

$$\boxed{\cdot [S] = 1/2 K_m : v = 0,333 V_{max}}$$

$$\boxed{\cdot [S] = 2 K_m : v = 0,666 V_{max}}$$

$$\boxed{\cdot [S] = 10 K_m : v = 0,909 V_{max}}$$

CS Scanned with CamScanner

[1] Exemplo: Linearização

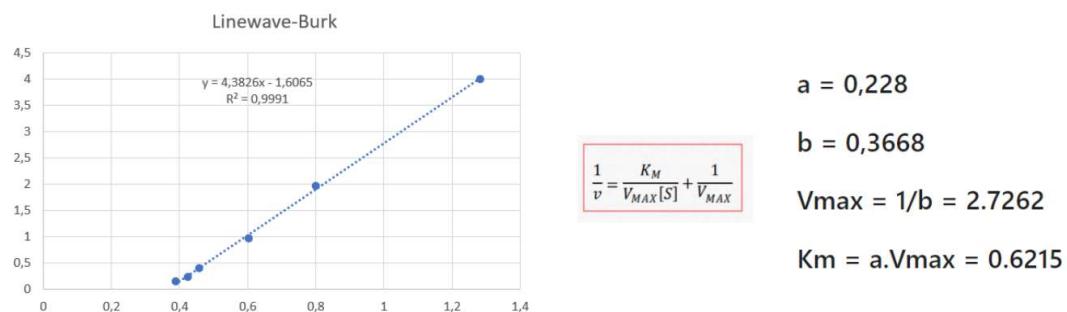
Abaixo temos o exemplo, utilizando ambos os métodos.

- Questão:

Com os dados de velocidade inicial de formação do produto em função da concentração inicial do substrato, determine os parâmetros Km e Vmáx empregando o método de Michaelis-Mentem.

S [g/L]	V [g/L.h]
0,25	0,78
0,51	1,25
1,03	1,66
2,52	2,19
4,33	2,35
7,25	2,57

- Resposta:



[2] Exemplo: Linearização

- Questão:

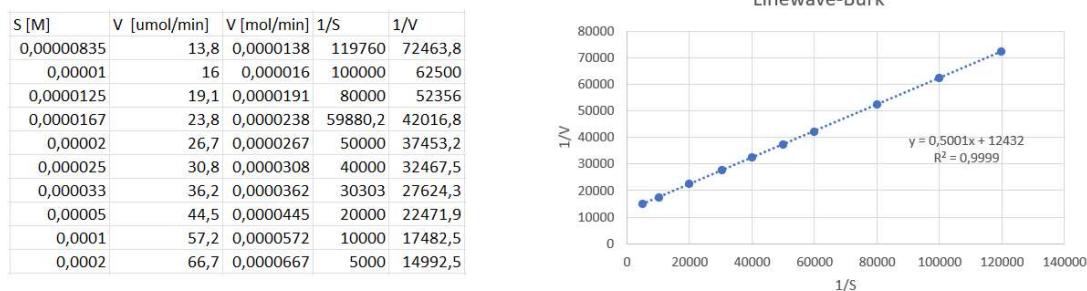
As velocidades iniciais de uma dada reação enzimática $S \rightarrow P$ foram determinadas a várias concentrações de substrato. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela a seguir:

S [M]	V [umol/min]
$8,35 \cdot 10^{-6}$	13,8
$1,00 \cdot 10^{-5}$	16,0
$1,25 \cdot 10^{-5}$	19,1
$1,67 \cdot 10^{-5}$	23,8
$2,00 \cdot 10^{-5}$	26,7
$2,50 \cdot 10^{-5}$	30,8
$3,30 \cdot 10^{-5}$	36,2
$5,00 \cdot 10^{-5}$	44,5
$1,00 \cdot 10^{-4}$	57,2
$2,00 \cdot 10^{-4}$	66,7

Determine K_M e V_{max} pelo método gráfico de Lineweaver-Burk

32

- Resposta:



$$a = 0,5001$$

$$b = 12432$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

$$V_{max} = 1/b = 8.0437 \times 10^{-5} \text{ mol/min}$$

$$K_m = a \cdot V_{max} = 4.0226 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

[3] Exemplo: Linearização

- Questão:

Calcule K_m e a V_{max} a partir dos seguintes dados:

S [mM]	V [mmol/s]
0,1	0,34
0,2	0,53
0,4	0,74
0,8	0,91
1,0	1,04

Usar os métodos: LINEWEAVER-BURK, HANES-WOOLF e EADIE-HOFSTEE.

- Resposta:

Linearização: Método de Lineweave-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$

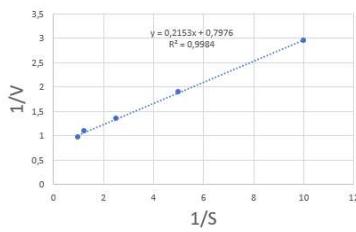
Linearização: Método de Hanes

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{V_{MAX}} + \frac{[S]}{V_{MAX}}$$

Linearização: Método de Eadie-Hofstee

$$v = V_{MAX} - K_M \frac{v}{[S]}$$

Lineweave-Burk



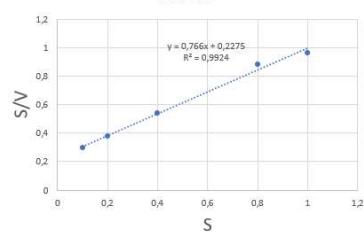
$$a = 0,2153$$

$$b = 0,7976$$

$$v_{max} = 1/b = 1.2537$$

$$K_m = a.v_{max} = 0.2699$$

Hanes



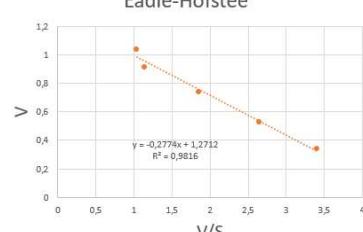
$$a = 0,766$$

$$b = 0,2275$$

$$v_{max} = 1/a = 1.3054$$

$$K_m = b.v_{max} = 0.2969$$

Eadie-Hofstee



$$a = -0,2774$$

$$b = 1,2712$$

$$v_{max} = b = 1,2712$$

$$K_m = -a = 0,2774$$

[4] Exemplo: Linearização

- Questão:

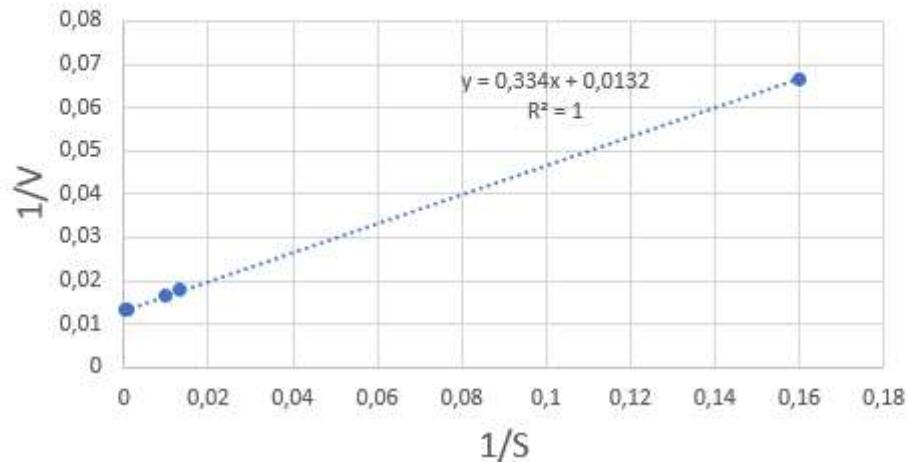
As velocidades iniciais de uma dada reação enzimática $S \rightarrow P$ foram determinadas a várias concentrações de substrato. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela a seguir:

S [M]	V [umol/min]
$1,00 \cdot 10^{-2}$	75,00
$1,00 \cdot 10^{-3}$	75,00
$1,00 \cdot 10^{-4}$	60,00
$7,50 \cdot 10^{-5}$	56,25
$6,25 \cdot 10^{-6}$	15,00

- Determine o K_m e V_{max} que pode ser obtida com a quantidade de enzima utilizada.
- Qual será a velocidade inicial para uma concentração de substrato igual a $2,3 \cdot 10^{-5}$ M?
- Qual será a velocidade inicial quando $[S] = 10^{-4}$ M e se for duplicada a concentração de enzima?
- Se $[S] = 0,04$ M, qual será a concentração do produto ao fim de 3 minutos?

- Resposta:

Lineweaver-Bulk



* Exercício:

- Letra "a": ($y = 0,334x + 0,0132$) Lineweaver-Bulk

$$\cdot v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \cdot \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\cdot V_{max} = \frac{1}{b} = 75,75 \text{ pmol/L} \cdot \text{min}$$

$$\cdot K_m = a \cdot V_{max} = 25,30 \text{ pmol/L}$$

- Letra "b":

$$\cdot [S] = 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L} = 23 \text{ pmol/L}$$

$$\cdot v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = 36,07 \text{ pmol/L} \cdot \text{min}$$

- Letra "c":

$$\cdot V_{max} = K_a [E_0] \rightarrow V_{max,sp} = 2K_a [E_0] \quad \therefore V_{max,12} = 2V_{max}$$

$$\cdot [S] = 10^{-4} \text{ mol/L} = 100 \text{ pmol/L}$$

$$\cdot v = \frac{2V_{max}[S]}{K_m + [S]} = 120,4 \text{ pmol/L} \cdot \text{min}$$

- Letra "d":

$$\cdot [S] = 0,04 \text{ mol/L} = 4000 \text{ pmol/L}$$

$$\cdot v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \cdot v = \frac{d[P]}{dt} = A$$

$$\cdot \int_0^{C_P t} d[P] = \int_0^t A dt$$

$$\cdot [P]_t = 3A = 225,82 \text{ pmol/L}$$

[5] Exemplo: Linearização

- Questão:

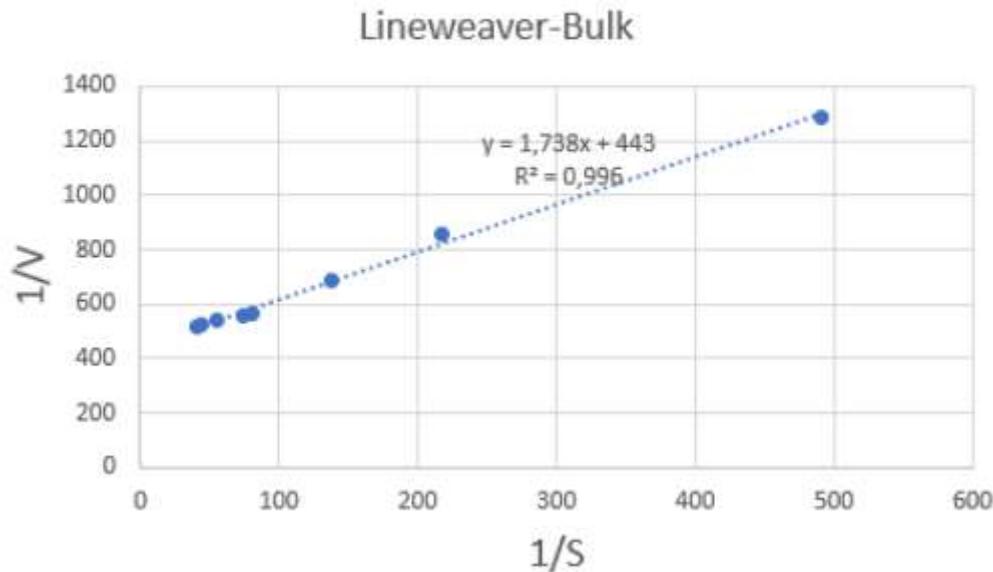
A lactase, também conhecida como β -galactosidase, catalisa a hidrólise da lactose para produzir glicose e galactose a partir do leite e do soro. Experimentos são realizados para determinar os parâmetros cinéticos para a enzima. Os dados de taxa (velocidade) inicial são os seguintes:

Concentração de lactose (mol/L * 10 ²)	Velocidade inicial da reação (mol/L.min * 10 ³)
2,50	1,94
2,27	1,91
1,84	1,85
1,35	1,80
1,25	1,78
0,73	1,46
0,46	1,17
0,204	0,779

Encontre V_{max} e K_m da enzima em estudo.

3

- Resposta:



$$a = 1,738$$

$$b = 443$$

$$V_{max} = 1/b = 0,002257 \text{ mol/L.min}$$

$$K_m = a \cdot V_{max} = 0,003923 \text{ mol/L}$$

[6] Exemplo: Linearização

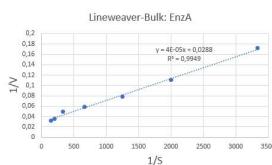
- Questão:

Uma droga anticancerígena requer ativação no fígado por enzimas do citocromo Uma mutagênese sítio-específica é usada para alterar a sequência de aminoácidos na tentativa de melhorar a cinética de ativação desta droga. A taxa de reação é estudada usando EnzA de rato e uma variante sítio-específica de EnzB produzida usando *Escherichia coli*. Os resultados são os seguintes.

Concentração da droga (mM)	Velocidade inicial da reação (mol/L·min)	
	EnzA	EnzB
0,3	5,82	17,5
0,5	9,03	24,5
0,8	12,7	24,0
1,5	17,1	23,9
3,0	20,2	27,3
5,0	27,8	33,1
7,0	31,5	27,7

- Determine as constantes cinéticas para as enzimas EnzA e EnzB.
- Quando a droga é administrada a pacientes, a concentração plasmática máxima da droga é relativamente baixa em torno de 100 a 200 μM . As propriedades cinéticas da variante EnzB são melhores do que as do rato EnzA para ativação da droga nesta situação? Explique sua resposta.
- A manipulação da enzima usando mutagênese sítio-específica melhorou a eficiência catalítica para a ativação da droga?

- Resposta:



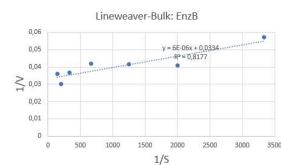
Letra a:

$$a = 4e-05$$

$$b = 0.0288$$

$$V_{\max} = 1/b = 34.7222 \text{ mol/L·min}$$

$$K_m = a \cdot V_{\max} = 0.00138 \text{ mol/L}$$



Letra a:

$$a = 6e-06$$

$$b = 0.0334$$

$$V_{\max} = 1/b = 29.9401 \text{ mol/L·min}$$

$$K_m = a \cdot V_{\max} = 0.00018 \text{ mol/L}$$

- Letra "b":

• Sim, para baixas concentrações da droga o EnzB possui melhores propriedades cinéticas. Isso se deve ao fato da velocidade máxima das enzimas (V_{\max}) serem muito próximas e a constante de Michaelis-Menten (K_m) para o enzima A ser maior que o do enzima B.

• Esse modo, para baixas concentrações da droga o alto valor de K_m para o enzima A implica em menores velocidades de reação.

$$\bullet 100 \leq [S] \leq 200 \text{ } \mu\text{M}$$

$$\bullet V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

EnzA

$$\bullet S = 100 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$$

$$\bullet V = 2,346 \text{ mol/L·min}$$

$$\bullet V = 10,693 \text{ mol/L·min}$$

$$\Delta \bullet S = 200 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L} \quad \bullet V = 4,349 \text{ mol/L·min} \quad \bullet V = 15,758 \text{ mol/L·min}$$

• Para baixas concentrações da droga o EnzB possui maiores valores de velocidade, desse modo é preferível a utilização dessa enzima.

- Letra "c": (Assumindo a base de cálculo $[E_0] = 1 \text{ mol/L}$)

$$\bullet \text{Enzima A: } \bullet V_{\max} = K_{\text{cat}} [E_0] \quad \bullet K_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E_0]}$$

$$\bullet E = \frac{K_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{V_{\max}}{[E_0] K_m} = 25.160,9 \frac{\text{L}}{\text{n.mol}}$$

• Enzima B:

$$\bullet E = \frac{V_{\max}}{[E_0] K_m} = 166.333,89 \frac{\text{L}}{\text{n.mol}}$$

• Sim, a eficiência catalítica da enzima aumentou após a manipulação da enzima.

[7] Exemplo: Linearização

- Questão:

Uma enzima que degrada ferromônio foi isolada. As cinéticas da reação foram estudadas em pH de 7,2 usando uma concentração fixa de enzima e temperaturas variando de 10 a 40°C. A tabela a seguir apresenta os resultados de velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato.

Concentração de ferromônio (μM)	Velocidade inicial da reação ($\mu\text{mol/L.s}$)			
	T = 10°C	T = 20°C	T = 30°C	T = 40°C
0,5	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-6}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$7,7 \cdot 10^{-6}$
1,0	$5,1 \cdot 10^{-6}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
1,0	$4,2 \cdot 10^{-6}$	$9,7 \cdot 10^{-6}$	$8,9 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
1,5	$6,1 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$
2,2	$7,1 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$
5,5	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$
5,5	$9,8 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
11,0	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$
11,0	$9,5 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$

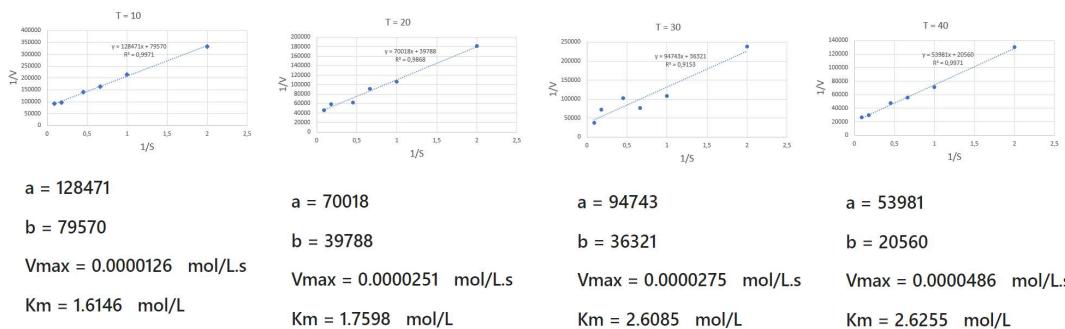
(a) Determine V_{\max} and K_m para a reação nas 4 temperaturas;

(b) Determine a energia de ativação para essa reação enzimática.

5

- Resposta:

Letra "a":



Letra "b":

- Determinando a energia de ativação para esta reação:

$$\bullet K = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \bullet \ln(K) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$$

- A constante cinética da reação (K) é proporcional à velocidade máxima da reação (V_{max}), desse modo:

$$\bullet \ln(V_{max}) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$$

- Linearizando: ($R = 8,314 \text{ L.KPa/K.mol}$)

$$\bullet a = -3673,4 \quad \bullet b = 1,7674$$

$$\bullet \frac{E_a}{R} = -a$$

$$\bullet E_a = 30.540,64 \text{ J/mol}$$

Scanned with CamScanner

$$J_{Az}^* = CD_{AB} \frac{dC_A}{dz} \dots$$

Reações enzimáticas com inibição

Inibidor

O **inibidor** é uma substância que reduz a taxa de uma reação enzimática. Ademais, o inibidor funciona da seguinte forma:

- Adentra o sítio ativo.
- influência negativamente a ligação do substrato.
- Influência a velocidade da reação.

Dito isso, os inibidores podem ser classificados mediante a sua ligação com a enzima:

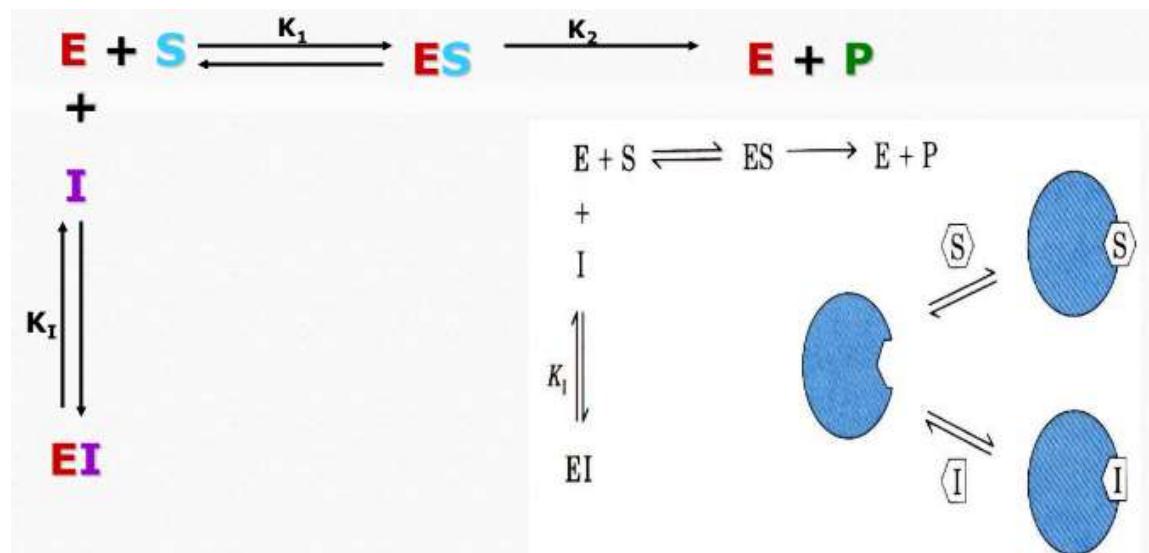


Onde:

- **Irreversível:** Uma vez conetada a enzima (E) e o inibidor (I) não pode ser desfeita.
- **Reversível:** A ligação enzima inibidor (EI) pode ser desfeita.

Cinética enzimática com inibição: Competitiva

Mediante a presença do **inibidor reversível competitivo** (I) a nova reação enzimática será representada por:



A dedução do modelo cinético está a seguir:

- Determinando as taxas de reação:

$$\cdot \frac{d[ES]}{dt} = K_1 [E][S] - K_2 [ES] - K_3 [ES]$$

$$\cdot \frac{d[EI]}{dt} = K_4 [E][I] - K_5 [EI]$$

$$\cdot \frac{d[P]}{dt} = K_3 [ES]$$

$$\cdot v = \frac{K_3 [E][S]}{K_m}$$

- Simplificando:

$$\cdot V_{max} = K_3 [E_0]$$

$$\cdot \frac{v}{V_{max}} = \frac{[E][S]}{[E_0] K_m} = \frac{[E][S]}{[E + EI + ES] K_m} = \frac{[E][S]}{([E] + [E] \frac{[I]}{K_I} + [E][S] \frac{1}{K_m})}$$

$$\cdot \frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}$$

- Definindo os hipóteses:

$$\cdot H_1: \frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \cdot H_2: E_0 = E + EI + ES$$

$$\cdot H_3: \frac{d[EI]}{dt} = 0$$

- Determinando o modelo cinético:

$$\cdot [ES] = \frac{K_1 [S][E]}{K_2 + K_3} = \frac{[E][S]}{K_m} \quad \cdot K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1}$$

$$\cdot [EI] = \frac{K_4 [E][I]}{K_5} = \frac{[E][I]}{K_I} \quad \cdot K_I = \frac{K_5}{K_4}$$

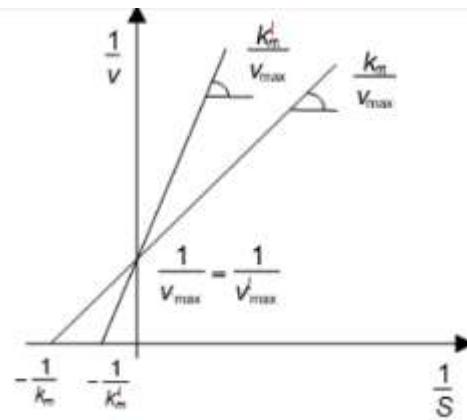
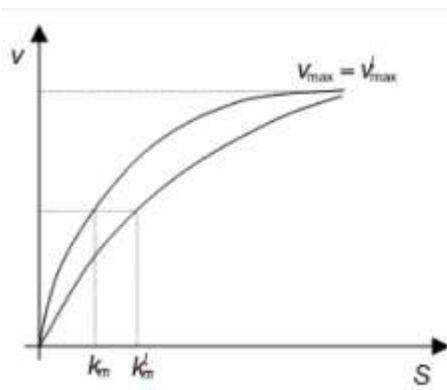
$$\cdot v = \frac{d[P]}{dt} = K_3 [ES] = \frac{K_3 [E][S]}{K_m}$$

Para reação enzimática com inibição competitiva, chegamos em:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + Km^I}$$

$$Km^I = Km \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

A representação gráfica é:

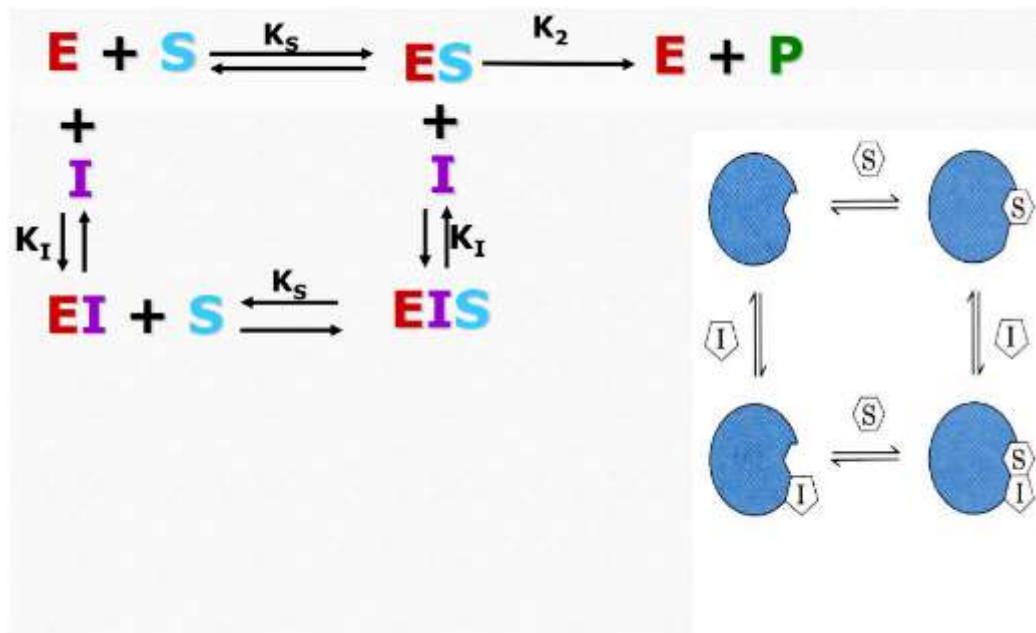


Representação gráfica de Inibição Competitiva

- Observação: Velocidade máxima é a mesma.

Cinética enzimática com inibição: Não-competitiva

Mediante a presença do **inibidor reversível não-competitivo** (I) a nova reação enzimática será representada por:



A dedução do modelo cinético está a seguir:

- Determinando os fatores de reação:

$$\cdot \frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] - K_2[ES] - K_3[ES]$$

$$\cdot \frac{d[EI]}{dt} = K_4[E][I] - K_5[EI]$$

$$\cdot \frac{d[EIS]}{dt} = \text{Algumas coisas}$$

$$\cdot \frac{d[P]}{dt} = K_3[ES]$$

- Hipóteses:

$$\cdot H_1: \frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \cdot H_2: E_o = E + ES + EI + EIS$$

$$\cdot H_3: \frac{d[EI]}{dt} = 0$$

$$\cdot H_4: \frac{d[EIS]}{dt} = 0$$

- Chegamos em:

$$\cdot [ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \cdot K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1}$$

$$\cdot [EI] = \frac{[E][I]}{K_I} \quad , K_I = \frac{K_3}{K_4}$$

$$\cdot [EIS] = \frac{[E][I][S]}{K_m K_F}$$

- Determinando a expressão para a formação de produto:

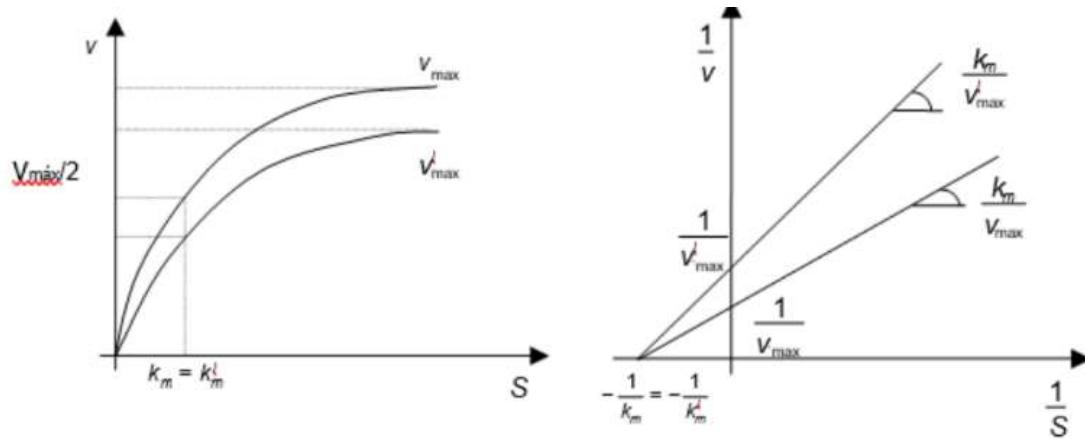
$$\boxed{\cdot V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_I})} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}}$$

Chengado em:

$$v = V_{max}^I \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$V_{max}^I = \frac{V_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_I})}$$

A representação gráfica é:

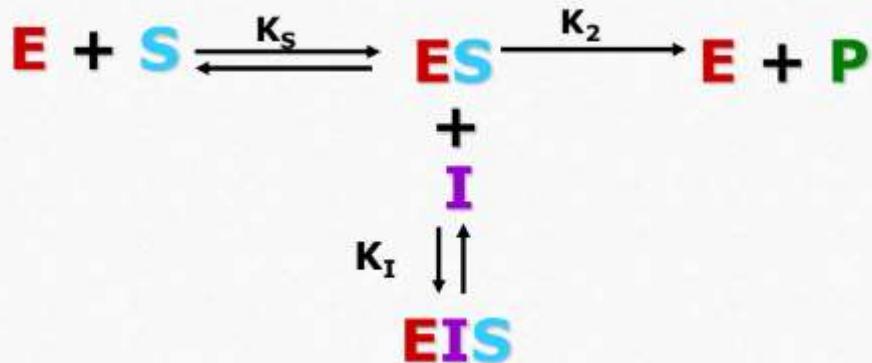


Representação gráfica da Inibição não Competitiva

- Observação: **Velocidade máxima da reação inibida é menor.**

Cinética enzimática com inibição: Acompetitiva

Mediante a presença do **inibidor reversível acompetitivo** (I) a nova reação enzimática será representada por:



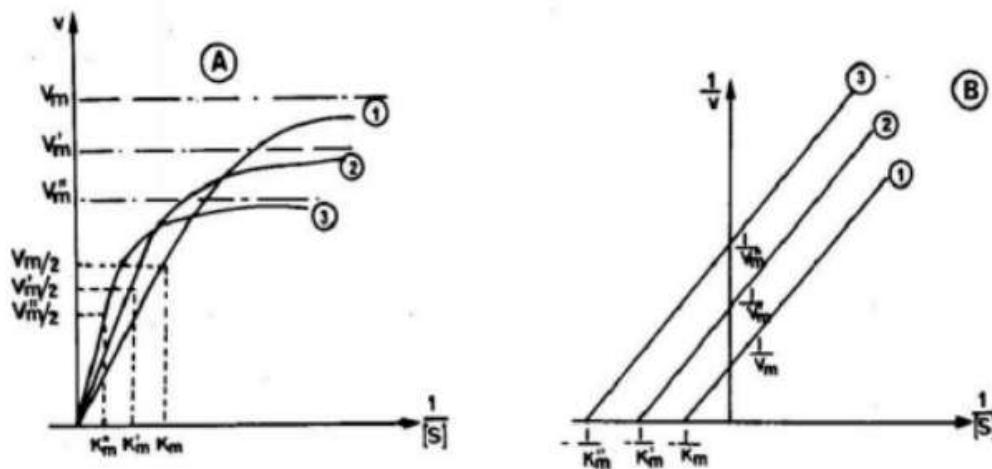
A dedução do modelo cinético não está escrita abaixo. Porem, os resultados podem ser conferido a seguir:

$$v = V_{max}^I \frac{[S]}{Km^I + [S]}$$

$$V_{max}^I = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

$$Km^I = \frac{Km}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

A representação gráfica é:



- Observação: **Velocidade máxima da reação inibida é menor.**

Exemplo: Linearização com inibição

- Questão:

A tabela abaixo apresenta velocidades iniciais de cinco misturas reacionais a várias concentrações de substrato. Em cada uma das misturas foi adicionada a mesma concentração de enzima. O experimento foi, então, repetido com um inibidor da enzima presente a uma concentração de 2,2 M em cada mistura reacional. Usando a equação de Lineweaver-Burk, traçar um gráfico com esses dados e determinar K_m para a situação sem inibidor e K_I para a situação com inibidor, bem como V_{max} para ambos os casos.

S [M]	V sem inibidor [mol/L·min]	V [mol/L·min] com inibidor a $[I] = 2,2\text{M}$
1,0	0,28	0,17
1,5	0,36	0,23
2,0	0,43	0,29
5,0	0,65	0,60
7,5	0,74	0,74

- Resposta:

* Questão:

- Analisando:

$$\cdot [I] = 2,2 \text{ mol/L}$$

$$\cdot \text{Equação Michaelis - Menten: } V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

- Supondo inibição competitiva:

$$\cdot V = \frac{V_{max}[S]}{K_m^{\pm} + [S]}$$

$$\cdot K_m^{\pm} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

- Pela equação de Lineweaver - Burk:

Dem inibição

$$\Delta \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Inibição competitiva

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m^{\pm}}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

- Determinando as constantes:

Dem inibição

$$\Delta \quad \cdot a = 2,5719$$

$$\cdot b = 1,027$$

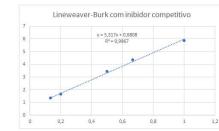
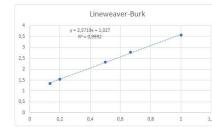
$$\begin{aligned} &\cdot V_{max} = 0,9737 \text{ mol/L} \cdot \text{min} \\ &\cdot K_m = 2,504 \end{aligned}$$

Inibição competitiva

$$\cdot a = 5,379$$

$$\cdot b = 0,6808$$

$$\begin{aligned} &\cdot V_{max} = 1,469 \text{ mol/L} \cdot \text{min} \\ &\cdot K_m^{\pm} = 7,81 \text{ mol/L} \\ &\cdot K_I = \frac{[I]}{\frac{K_m^{\pm}}{K_m} - 1} = 7,04 \text{ mol/L} \end{aligned}$$



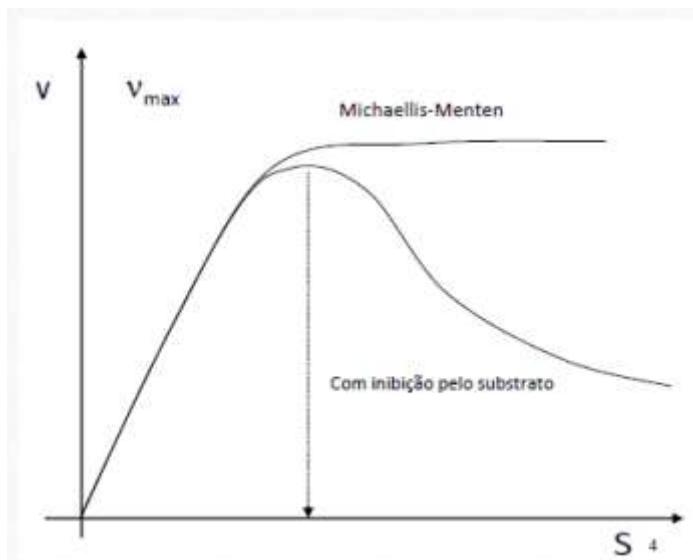
Inibição enzimática pelo substrato

[1] Inibição pelo substrato

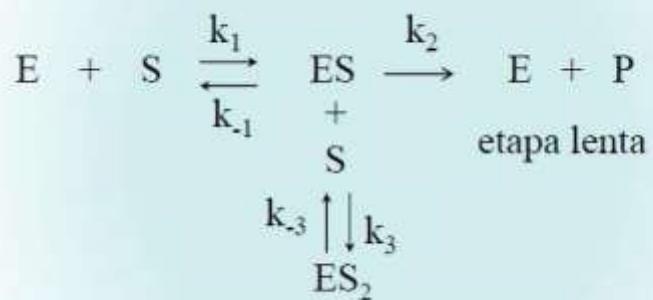
A inibição enzimática pelo substrato é um tipo de inibição enzimática em que a concentração excessiva de substrato inibe a atividade da enzima. Isso ocorre devido à

ocupação excessiva dos sítios ativos da enzima pelo substrato, impedindo que outros substratos possam se ligar à enzima e iniciar a reação.

Abaixo podemos ver um gráfico de uma reação enzimática inibida pelo substrato:



Para este tipo de reação supoem-se o seguinte mecanismo reacional:



[2] Inibição pelo substrato

Para se modelar matematicamente a reação enzimática inibida pelo substrato, inicia-se com a determinação das taxas de reação e em seguida a hipótese de equilíbrio:

$$\begin{aligned} \cdot K_m &= \frac{[E][S]}{[ES]} \rightsquigarrow [ES] = \frac{[S][E]}{K_m} \\ \cdot K_{SI} &= \frac{[ES][S]}{[ES_2]} \rightsquigarrow [ES_2] = \frac{[ES][S]}{K_{SI}} \rightsquigarrow [ES_2] = \frac{[E][S]}{K_m} \frac{[S]}{K_{SI}} \end{aligned}$$

$$* E_p = E + ES + ES_2$$

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E] + [ES] + [ES_2]} = \frac{\frac{[E][S]}{K_m}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_m} + \frac{[E][S]}{K_m K_{SI}}} \rightsquigarrow \frac{V}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[S]^2}{K_m K_{SI}}}$$

$\underbrace{\frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}}}$

$$\rightsquigarrow \frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_{SI}} \right)}$$

CS Scanned with CamScanner

$$\cdot \frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}}$$

EQUAÇÃO DA VELOCIDADE

Onde:

$$K_m = \frac{K_{-1} K_1}{K_3}, K_{SI} = \frac{K_{-3}}{K_3}$$

Inibição pelo substrato: Linearização

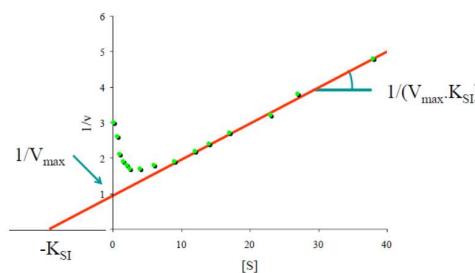
Para realizar a linearização da equação da velocidade seguiu-se os seguintes passos:

$$\cdot \frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}}$$

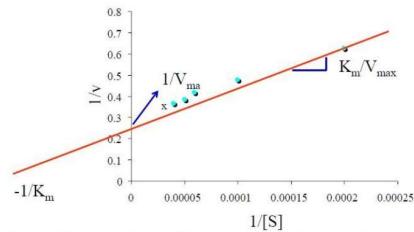
$$\cdot \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max} K_{SI}}$$

[S] >>> K_M (altas [S]):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{MAX}} + \frac{1}{v_{MAX} K_{SI}} [S]$$

[S] <<< K_{SI} (baixas [S]):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{MAX}} + \frac{K_M}{v_{MAX}} \frac{1}{[S]}$$

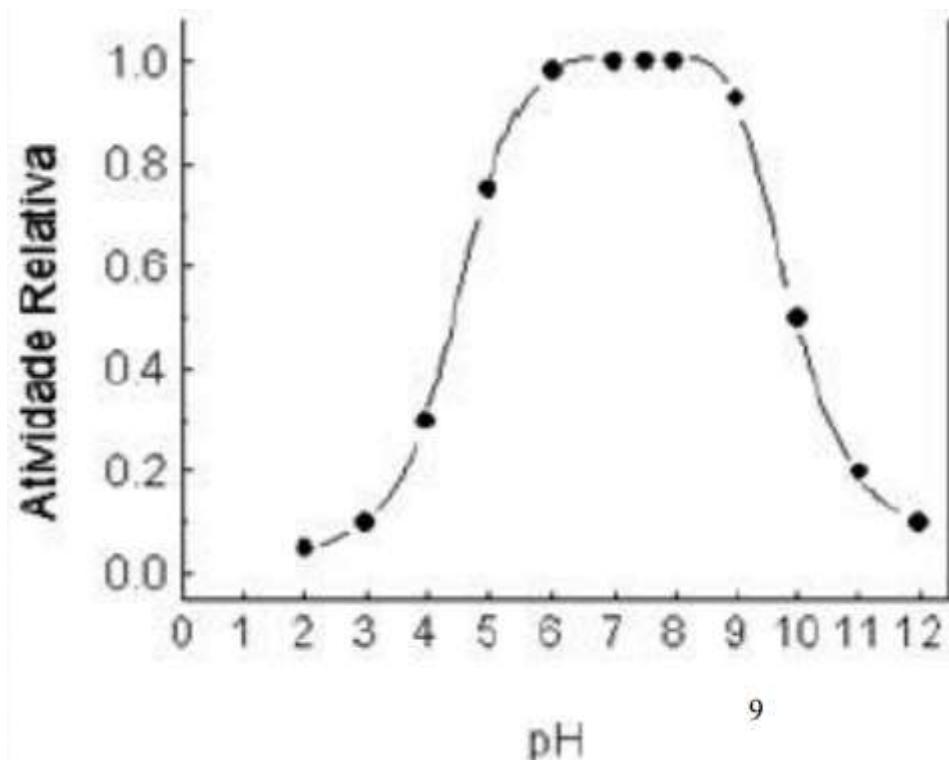


Efeito da temperatura e pH em reações enzimáticas

Influência do pH

Os aminoácidos que compõem as enzimas contêm grupos funcionais como amino, carboxila, hidroxila e grupos amida, que são ácidos ou bases. Esses grupos podem ser ionizados (perder ou ganhar prótons) dependendo do pH. Quando os grupos funcionais da enzima são ionizados, isso pode afetar a estrutura tridimensional da enzima e, consequentemente, sua atividade.

Ademais, o pH ótimo de uma enzima é o valor de pH no qual a enzima tem a maior atividade, ou seja, a maior velocidade de reação. Abaixo temos um gráfico de atividade relativa e pH:

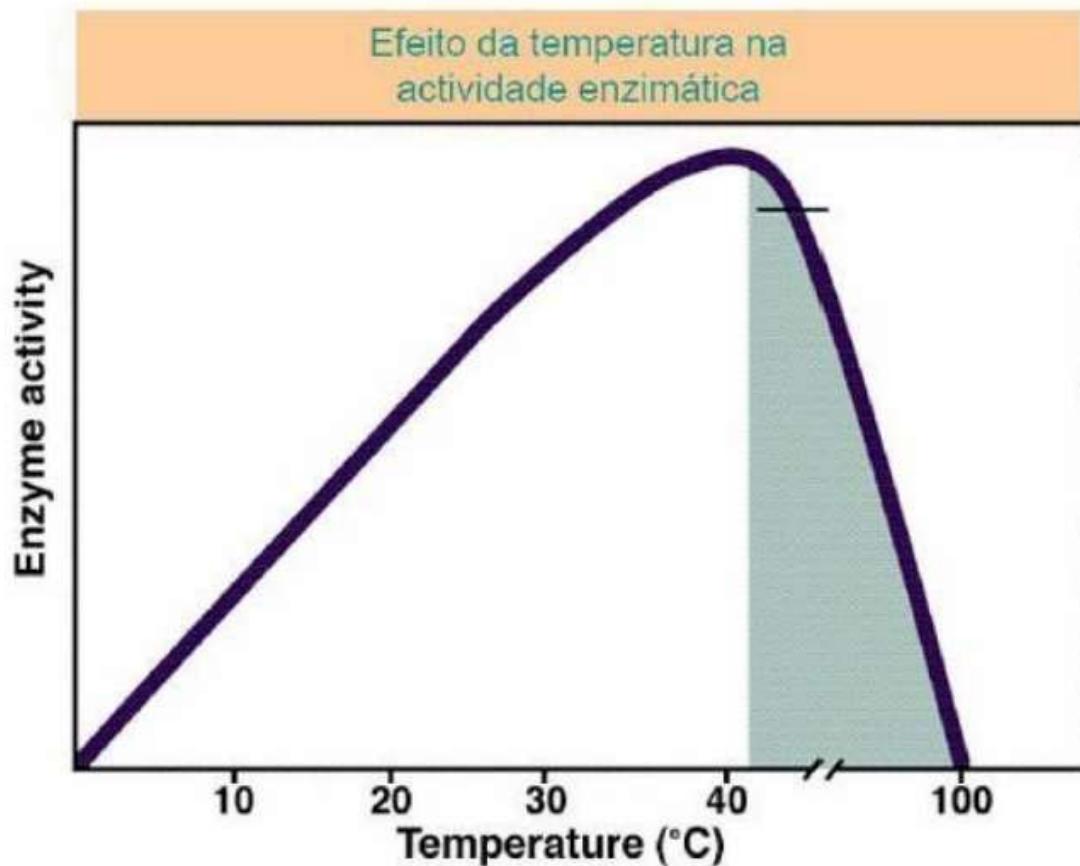


- Observação: O pH ótimo para uma enzima é geralmente obtido experimentalmente.

Influência da temperatura

A temperatura tem um grande impacto na atividade enzimática, pois aumentos na temperatura podem aumentar a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Isso ocorre porque aumentos na temperatura causam aumentos na agitação térmica das moléculas, incluindo as enzimas e suas moléculas substrato. Essa agitação térmica aumenta a probabilidade de colisões entre enzimas e substrato, o que aumenta a taxa de reação.

No entanto, aumentos excessivos na temperatura podem levar a uma diminuição na atividade enzimática, devido a **denaturação da proteína enzimática**, especialmente para enzimas de origem biológica. Abaixo temos 1 gráfico do efeito da temperatura na atividade enzimática:



Desse modo, aproximaremos a influência da temperatura na velocidade enzimática pela **equação de Arrhenius**:

$$K = K_0 \cdot \exp\left[\frac{-E_a}{RT}\right] \quad K = v$$

↓

$v = v_o e^{-\frac{E_a}{RT}}$

$$K_o = v_o$$

Onde:

- **v** = velocidade da taxa de reação
- **vo** = velocidade para uma reação em particular (parâmetro a ser estimado)
- **Ea** = energia de ativação (parâmetro a ser estimado)

- **R** = constante dos gases ideais
- **T** = temperatura absoluta (K)

A forma linearizada da equação obtida está abaixo, ela é usada para obtenção dos parâmetros:

Linearizando:

$$\ln v = \ln v_o - \frac{E_a}{RT}$$

Exemplo: Influência da temperatura

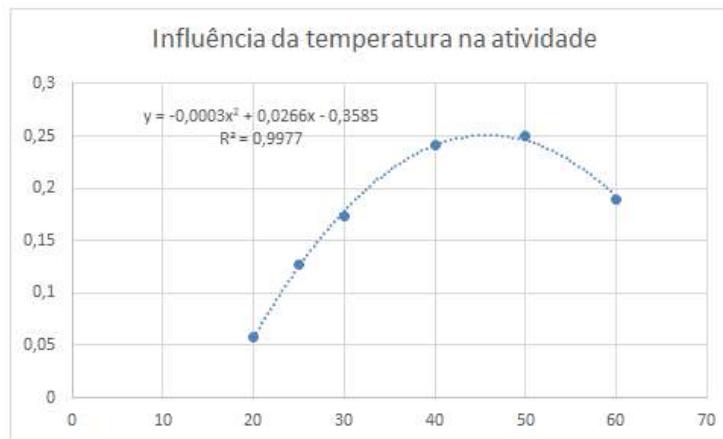
- Questão:

De acordo com os dados abaixo calcular os parâmetros associados ao efeito da temperatura na atividade enzimática.

TEMPERATURA (°C)	VELOCIDADE (mol/L.min)
20	0,0586
25	0,1279
30	0,173
40	0,241
50	0,25
60	0,19

- Resposta:

Analisando:



Analisando

$$y = -0,0003x^2 + 0,0266x - 0,3585$$

Determinando a temperatura ótima de operação:

$$-0,0006x + 0,0266 = 0$$

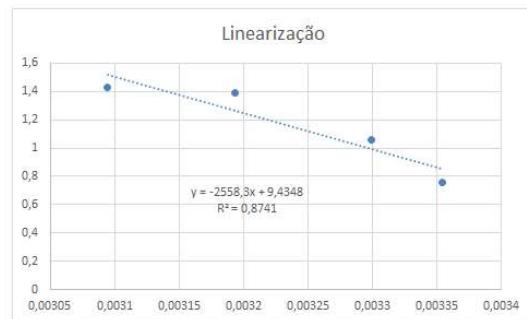
$$T = 44,3^\circ\text{C}$$

Obtendo os parâmetros cinéticos: ($R = 8,314 \text{ J/mol.K}$)

	Temperatura (°C)	Velocidade (mol/L.min)	T (K)	v (mol/m³.s)	1/T	ln v
0	20	0,0586	293,15	0,976666667	0,003411	-0,02361
1	25	0,1279	298,15	2,131666667	0,003354	0,756904
2	30	0,173	303,15	2,883333333	0,003299	1,058947
3	40	0,241	313,15	4,016666667	0,003193	1,390452
4	50	0,25	323,15	4,166666667	0,003095	1,427116
5	60	0,19	333,15	3,166666667	0,003002	1,15268

Linearizando:

$$\ln v = \ln v_o - \frac{E_a}{RT}$$



$$y = -2558,3x + 9,4348$$

$$\cdot \ln v_o = 9,4348$$

$$\cdot V_o = e^{9,4348} = 12516,46 \text{ mol/m}^3\text{.min}$$

$$\cdot \frac{E_a}{R} = 2558,3$$

$$\cdot E_a = 21.269,7 \text{ J/mol}$$

Desnaturação das enzimas

A denaturação é o processo pelo qual as moléculas de água e os solventes, por exemplo, causam alterações na estrutura tridimensional da enzima, fazendo com que a enzima perca sua atividade biológica.

Desse modo, surge a necessidade de modelar e quantificar o quanto veloz as enzimas desnaturam, para tal propõem-se a utilização de um modelo linear:

$$\frac{dE}{dt} = -k_d \cdot E$$

Onde:

E: concentração de enzima ativa

k_d : constante cinética de desnaturação numa dada T;

Integrando é possível determinar a concentração de enzima ativa no momento e o tempo até atingir determinado grau de desnaturação:

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

Onde:

E_0 : concentração de enzima ativa no tempo 0;

t: tempo de reação;

$$t = \frac{\ln(E_0) - \ln(E)}{K_D} = \frac{\ln \frac{E_0}{E}}{K_D}$$

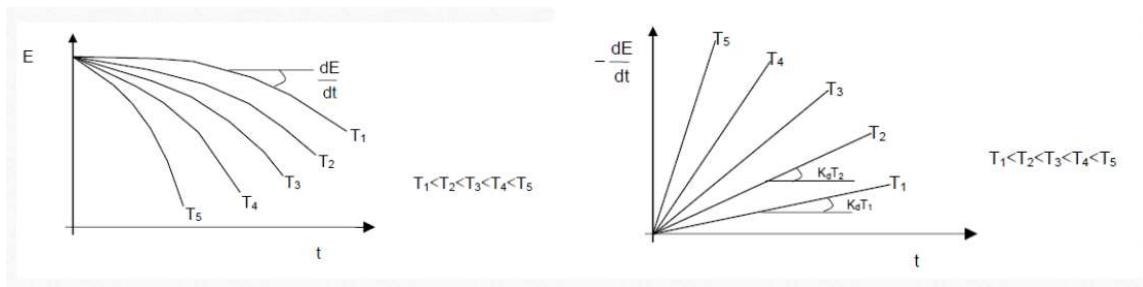
Ademais, define-se tempo de meia vida como o tempo onde $E = E_0/2$, metade das enzimas perderam sua atividade:

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k_d}$$

Por fim, podemos escrever a constante como uma função da temperatura, pela **equação de Arrhenius**:

$$k_d = k_d^* \cdot e^{-\frac{E_d}{RT}}$$

Abaixo temos gráficos da atividade enzimática em função do tempo:



Exemplo:

- Questão:

EXEMPLO 2

- Um grupo de pesquisadores descobriu uma nova enzima, que catalisa a reação abaixo, e que eles nomearam de felicidase: $\text{FELICIDADE} \leftrightarrow \text{TRISTEZA}$

Os pesquisadores iniciaram a caracterização da enzima.

- No primeiro experimento, com $[Et]$ de 4 nM, eles observaram que a $V_{\text{máx}}$ é $1,6 \mu\text{M.s}^{-1}$. Com base nesse experimento, qual é o k_{CAT} da felicidase?
- Em outro experimento, com $[Et]$ de 1 nM e concentração do substrato FELICIDADE de $30 \mu\text{M}$, os pesquisadores observaram que $V_0 = 300 \text{ nM.s}^{-1}$. Qual é o valor de K_M medido para a felicidase para o substrato FELICIDADE?
- Pesquisas posteriores indicaram que a felicidase isolada no primeiro experimento estava contaminada com um inibidor reversível, denominado RAIVA. Quando RAIVA foi totalmente removida da preparação de felicidase e os dois experimentos foram repetidos, observou-se que a $V_{\text{máx}}$ não foi alterada, mas o valor de K_M passou a $20 \mu\text{M}$. Com base nestas informações, qual o tipo de inibição realizada por RAIVA?

- Letra "a":

- Analisando: (Letra "a")

- $E_0 = 4 \text{ mV}$

- $V_{max} = 1,6 \mu\text{M}/\text{s}$

- Determinando a K_{cat} do enzima:

$$\boxed{\cdot K_{cat} = \frac{V_{max}}{E_0} = 400 \text{ 1/s}}$$

- Letra "b":

- Analisando: (Letra "b")

- $E_0 = 1 \text{ mM}$
- $[S] = 30 \mu\text{M}$
- $V_0 = 300 \text{ mM/h}$

- Determinando K_m :

$$\bullet V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad // \quad K_m = \frac{V_{max}[S]}{V} - [S] //$$

$$\bullet V_{max} = K_{cat} \cdot E_0 = 0,4 \mu\text{M/h} = 400 \text{ mM/h}$$

$$\bullet K_m = 10000 \text{ mM} = 10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

- Letra "c":

- Respondendo: (Letra "c")

- Analisando os resultados obtidos é possível elencar os pontos principais:
 - Velocidade máxima se manteve constante (V_{max})
 - O valor de K_m se alterou
 - Deste modo, é possível concluir que a inibição realizada pela raiva é reversível competitiva, onde a velocidade máxima não é alterada e a constante K_m é.

Reator enzimático

Reator enzimático

O reator enzimático é um recipiente onde se procede uma reação catalisada por uma enzima. Nestes reatores é necessária:

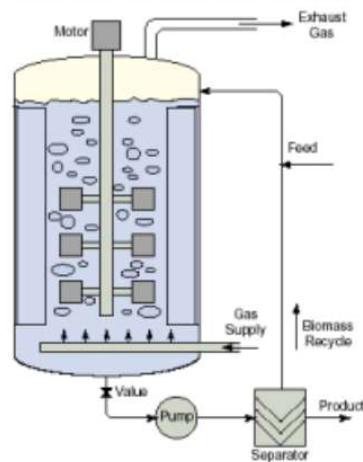
- Uniformidade na distribuição de nutrientes
- Aeração
- Condições adequadas de pH e temperatura

Os reatores enzimáticos podem ser em **batelada** ou **continuo**, além disso podem ter **enzimas livres** ou **enzimas imobilizadas**.

Reatores enzimáticos: Enzimas livres

Os reatores enzimáticos com enzimas livres consistem em:

- **Reator tipo tanque agitado (STR)**: Tanques cilíndricos aerados e agitados com agitação mecânica interna e entrada de ar na parte inferior.



- Aeracão:** o ar é injetado na parte inferior geralmente através de difusores para controlar o tamanho das bolhas e passa por filtros absolutos para evitar contaminação. A vazão do ar também é definida pelo usuário (vvm).
- O controle de **temperatura** é feito através de camisa com circulação de água ligada a um termostato.
- Os controles de pH, oxigênio dissolvido e espuma são realizados por sensores específicos. Existem entradas na parte superior para adição de ácido/base, antiespumante e para entrada de meio e retirada de amostras.
- A **esterilização** do reator pode ser feita *in situ* no caso de fermentadores industriais ou pode ser levado ao autoclave no caso de fermentadores de bancada.
- Além do controle de agitação, aeração, pH, temperatura também é importante considerar a geometria do tanque (relação H/D) que é importante para a transferência e homogeneização eficiente e o volume de meio presente.
- Os tanques geralmente são confeccionados em aço inox ou vidro, materiais que facilitam a limpeza e desinfecção.

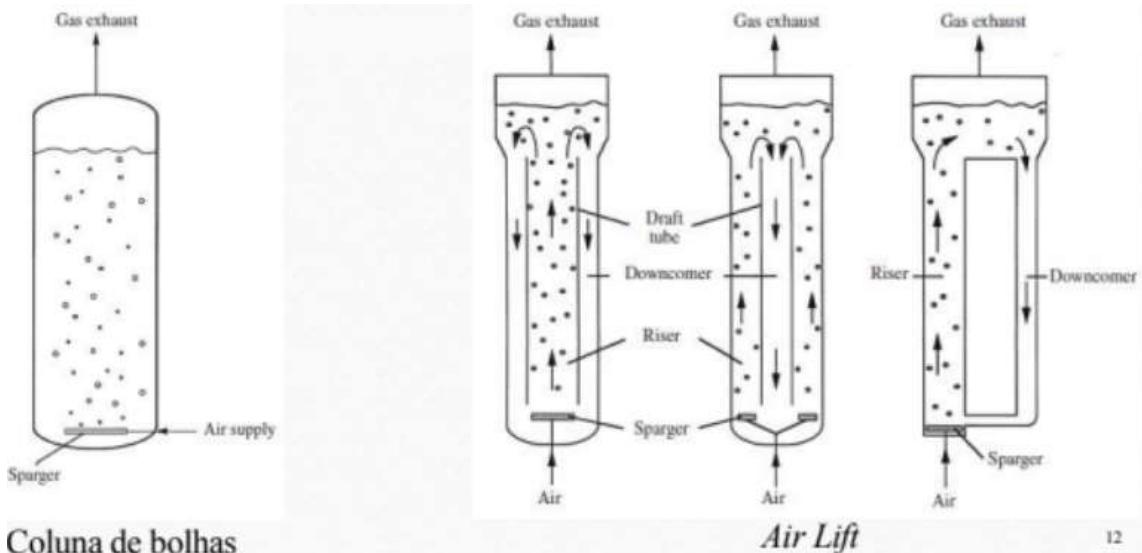
Vantagens

- Boa homogeneização;
- Fácil operação;
- Baixo custo de manutenção;

Desvantagens

- Baixa produtividade volumétrica;
- Cisalhamento (atrito) pode prejudicar alguns tipos de células.

- **Reatores pneumáticos:** Neste reator, o ar é injetado e disperso sem agitação mecânica e as bolhas são responsáveis pela agitação e aeração do sistema.

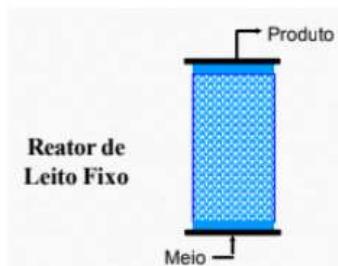


12

Reatores enzimáticos: Enzimas imobilizadas

Os reatores enzimáticos com enzimas imobilizadas consistem em:

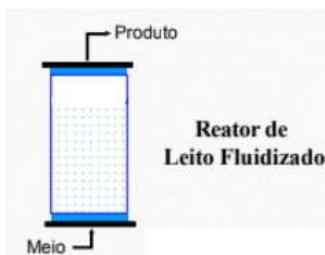
- **Reatores para enzimas imobilizadas em leito fixo:** Nestes reatores, as células ou enzimas são imobilizadas em partículas sólidas inertes (vidro, plástico, fibra vidro, argilas porosas, madeira) ou partículas de gel.



Vantagens do leito fixo = (células imobilizadas)

- Fácil recuperação do produto;
 - Utilização células que não estão crescendo (população constante);
- Desvantagens:**
- Deficiência na transferência de O_2 e nutrientes;
 - Entupimento e alterações de fluxo (caminhos preferenciais);
 - Homogeneização prejudicada;
 - Com tempo - perda de células aderidas ou aprisionadas (lavagem);

- **Reatores para enzimas imobilizadas em leito fluidizado:** Nestes reatores, as células são imobilizadas em pequenas partículas que ficam em suspensão e se movem com o líquido.



Vantagens do leito fluidizado

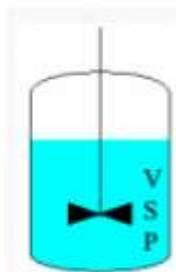
- Alta taxa de transferência e homogeneização;
- Baixo atrito;
- Fácil recuperação do produto (não precisa separar as células);
- Não há problemas de entupimento como leito fixo;
- Boa produtividade volumétrica (maior que leito fixo e tanques agitados);

Reator enzimático: Operação batelada

No reator batelada, ele é carregado com meio de cultura, inoculado com o microrganismo, e o processo segue até o esgotamento de nutrientes e/ou acúmulo do produto de interesse.

Ademais, o sistema é fechado, ou seja não ocorre adição de nutrientes (apenas ar, ácido e base) durante o cultivo.

Desse modo, considere o volume de controle abaixo:



Realizando o **balanço de massa do substrato** temos:

Balanço de massa**Integrando**

$$\frac{dm}{dt} = \dot{m}_{in} + \dot{m}_{out} + R_G + R_C$$

$m_{in} = m_{out} = 0$ – não há corrente de entrada ou saída do reator;

$$m = [S] \cdot V$$

$R_G = 0$ – não há geração de substrato;

$$R_C = r \cdot V \text{ – sendo } r = \frac{v_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]} \text{ – (Michaelis – Menten)}$$

$$-\int dt = \int \frac{K_M + [S]}{v_{MAX} \cdot [S]} d[S]$$

$$-\int dt = \int_{S_0}^{S_f} \frac{K_M}{v_{MAX} \cdot [S]} d[S] + \int_{S_0}^{S_f} \frac{[S]}{v_{MAX} \cdot [S]} d[S]$$

$$t_{BATCH} = \frac{K_M}{v_{MAX}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{v_{MAX}}$$

$$\frac{d[SV]}{dt} = -r \cdot V$$

$$\frac{Vd[S]}{dt} = -\frac{v_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]} \cdot V$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{v_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

Para reações com enzima imobilizada:

$$\frac{d[S]}{dt} = -\eta_T \frac{v_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

- **Exemplo:**

EXEMPLO 1

- Uma enzima é usada para produzir um composto usado na fabricação de loção solar. A concentração inicial do substrato é 12 mM. Faça uma tabela e um gráfico com o tempo requerido [h] para a reação em batelada em função da conversão do substrato (0, 10, 25, 50, 75, 90, 99%)

- **Resposta:**

- Analisando:

$$\cdot S_0 = 12 \text{ mM}$$

$$\cdot V_{max} = 9 \text{ mM/h}$$

$$\cdot K_m = 8,8 \text{ mM}$$

$$\cdot X(t): 0, 10, 25, 50, 75, 90, 99\%$$

• Reator batelado.

- Determinando o tempo de conversão:

$$\cdot t = \frac{K_m}{V_{max}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{V_{max}} \quad \cdot S_f = (1 - X) S_0$$

$$\boxed{\cdot t = \frac{K_m}{V_{max}} \ln \left(\frac{1}{1-X} \right) + \frac{S_0 X}{V_{max}}}$$

X	t
0	0
50	1,35
90	3,48
99	5,87

Reator enzimático: Operação batelada (Com desativação)

Considerando a desativação de enzimas:

$$v_{MAX} = v_{MAX,0} \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

O balanço de massa de substrato para o reator batelada fica da forma:

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{v_{MAX,0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot [S]}{K_M + [S]};$$

Integrando a expressão chegamos em:

$$\begin{aligned} - \int_0^t e^{-k_d \cdot t} dt &= \int_{S_0}^{S_f} \frac{K_M + [S]}{v_{MAX,0} \cdot [S]} d[S] \rightarrow \frac{1}{k_d} [e^{-k_d \cdot t} - 1] = \frac{K_M}{v_{MAX,0}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{v_{MAX,0}} \\ [e^{-k_d \cdot t} - 1] &= -k_d \cdot \left[\frac{K_M}{v_{MAX,0}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{v_{MAX,0}} \right] \rightarrow e^{-k_d \cdot t} = 1 - k_d \cdot \left[\frac{K_M}{v_{MAX,0}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{v_{MAX,0}} \right] \\ -k_d \cdot t &= \ln \left\{ 1 - k_d \cdot \left[\frac{K_M}{v_{MAX,0}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{v_{MAX,0}} \right] \right\} \\ t_{BATCH_DES} &= \frac{-1}{k_d} \ln \left\{ 1 - k_d \cdot \left[\frac{K_M}{v_{MAX,0}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{v_{MAX,0}} \right] \right\} \end{aligned}$$

- Exemplo:**

EXEMPLO 2

- A enzima do EXEMPLO 1 desativa com um tempo de meia vida de 4,4 h. Compare com a Tabela do EXEMPLO 1 o tempo requerido para 90% de conversão para substrato.

- Resposta:**

- Analisando:

$$\cdot t_{1/2} = 4,4 \text{ h} = - \frac{\ln 0,5}{K_d} \quad \cdot K_d = 0,158 \text{ h}^{-1}$$

$$\cdot S_0 = 12 \text{ mM}$$

$$\cdot V_{max} = 9 \text{ mM/h}$$

$$\cdot K_d = 8,9 \text{ mM}$$

$$\cdot S_f = S_0(1-X) = 1,2 \text{ mM}$$

$$\cdot X = 0,9$$

- Determinando o tempo até a conversão:

$$\cdot t = - \frac{1}{K_d} \ln \left\{ 1 - K_d \left[\frac{K_m}{V_{max}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{V_{max}} \right] \right\}$$

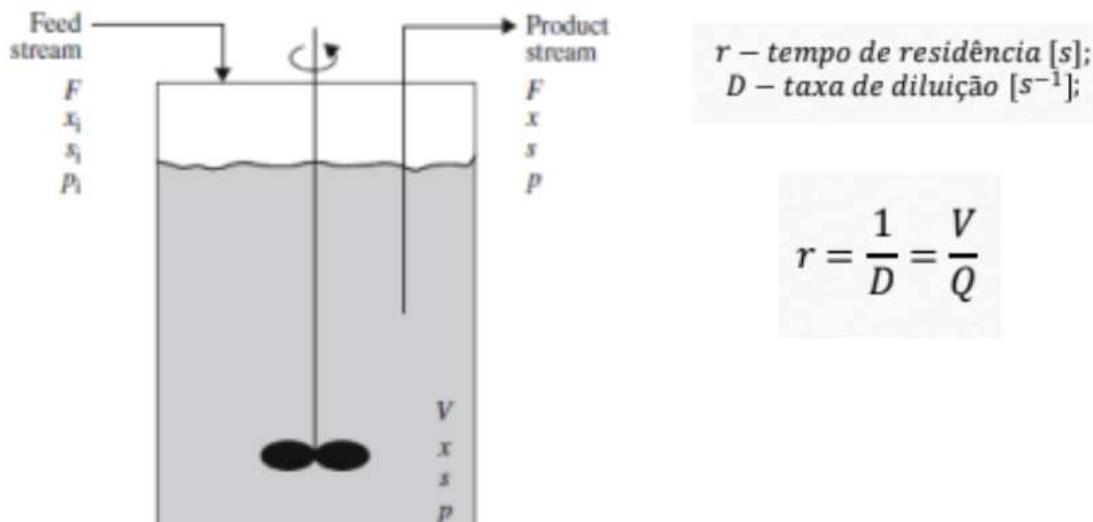
$$\boxed{\cdot t = 5 \text{ h}}$$

O tempo de reação para converter 90% inativização é 3,41 h.

Reator enzimático: Operação continua (CSTR)

No reator enzimático contínuo de mistura (CSTR) temos que o meio é adicionado de forma contínua e os produtos da fermentação também são continuamente removidos.

Desse modo, considere o volume de controle abaixo:



Realizando o **balanço de massa do substrato** temos:

$$\frac{dm}{dt} = \dot{m}_{in} + \dot{m}_{out} + R_G + R_C$$

~~$$\frac{dm}{dt} = \dot{m}_{in} + \dot{m}_{out} + R_G + R_C$$~~

$$0 = \dot{m}_{Si} - \dot{m}_S - \eta V \rightarrow \dot{m}_{Si} - \dot{m}_S - \frac{v_{max}[S] \cdot V}{K_m + [S]} = 0$$

$$\rightarrow \dot{m}_{in} \cdot S_0 - \dot{m}_{out} \cdot S - \frac{v_{max} \cdot S \cdot V}{K_m + S} = 0 \quad \therefore V$$

$$\rightarrow \frac{\dot{m}_{in}}{V} \cdot S_0 - \frac{\dot{m}_{out}}{V} \cdot S - \frac{v_{max} \cdot S}{K_m + S} = 0$$

$$\boxed{D \cdot (S_0 - S) = \frac{v_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]}}$$

Para reações com a enzima imobilizada:

$$\boxed{D \cdot (S_0 - S) = \frac{\eta_T \cdot v_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]}}$$

- **Exemplo:**

EXEMPLO 3

❑ Tirosinase é imobilizada em pellets esféricos para conversão de tirosina em dihidroxifenilalanina (DOPA) em operação contínua num reator de mistura coluna de bolhas. A constante de Michaelis-Menten para enzima imobilizada é 2 mol.m⁻³. Uma solução contendo 15 mol.m⁻³ de tirosina é alimentada no reator e deseja-se 99% de conversão de substrato. Toda enzima fica retida no reator e o valor de V_{max} é de 1,5x10⁻² mol.s⁻¹ por m³ de catalisador. Considerando o fator de efetividade com valor de 0,64 (efeitos de transferência de massa externa e desativação são negligenciáveis), determine o volume de reator necessário para converter 18 m³ de tirosina por dia.

- **Resposta:**

- Amaliranda:

- $K_m = 2 \text{ mol/m}^3$
- $S_0 = 15 \text{ mol/m}^3$
- $X_f = 0,99$

$$\cdot S_f = (1 - X_f) S_0 = 0,15 \text{ mol/m}^3$$

$$\cdot V_{max} = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/n. m}^3 \text{ cat}$$

$$\cdot n_T = 0,64$$

$$\cdot Q = 18 \text{ m}^3/d = 0,005 \text{ m}^3/n$$

- Balanço de substrato: (Reação de Michaelis - Menton)

$$\cdot Acumula = Entrada - Sai + reage$$

$$\cdot O = Q[S_0] - Q[S] + \frac{n_T V_{max} [S]}{K_m + [S]} \cdot V \quad \cdot D = \frac{Q}{V} : \text{Taxa de diluição}$$

$$\cdot D([S_0] - [S]) = \frac{n_T V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$\cdot V = \frac{Q(S_0 - S)(K_m + S)}{n_T V_{max} S} = 110,85 \text{ m}^3$$

Reator enzimático: Operação continua (PFR)

No reator enzimático contínuo tubular (PFR) temos que o meio é adicionado de forma contínua e os produtos da fermentação também são continuamente removidos.

Desse modo, considere o volume de controle abaixo e o balanço de massa:

Sistema geral:

$$\frac{dm}{dt} = m_{in} + m_{out} + R_s + R_c$$

Para o estado estacionário, temos:

$$0 = V_{in} - V_{out} + 0 = \frac{V_{in} \cdot \Delta z}{K_m + S} \cdot \frac{V}{A \cdot \Delta z}$$

$$\frac{Q (S_{in+\Delta z} - S_{in})}{A \cdot \Delta z} = - \frac{V_{in} \cdot \Delta S}{K_m + S}$$

$$\frac{\partial (S_{in+\Delta z} - S_{in})}{\Delta z} = - \frac{V_{in} \cdot \Delta S}{K_m + S} \quad \text{for } \Delta z \rightarrow 0$$

$$\frac{\partial S}{\partial z} = - \frac{V_{in} \cdot \Delta S}{K_m + S}$$

Condições de contorno:

$$z=0 \rightarrow S=S_0$$

$$z=L \rightarrow S=S_f$$

$$L = u \cdot \left[\frac{K_M}{V_{MAX}} \ln \left(\frac{S_0}{S_f} \right) + \frac{(S_0 - S_f)}{V_{MAX}} \right]$$

Enzimas imobilizadas: Efeito da transferência de massa

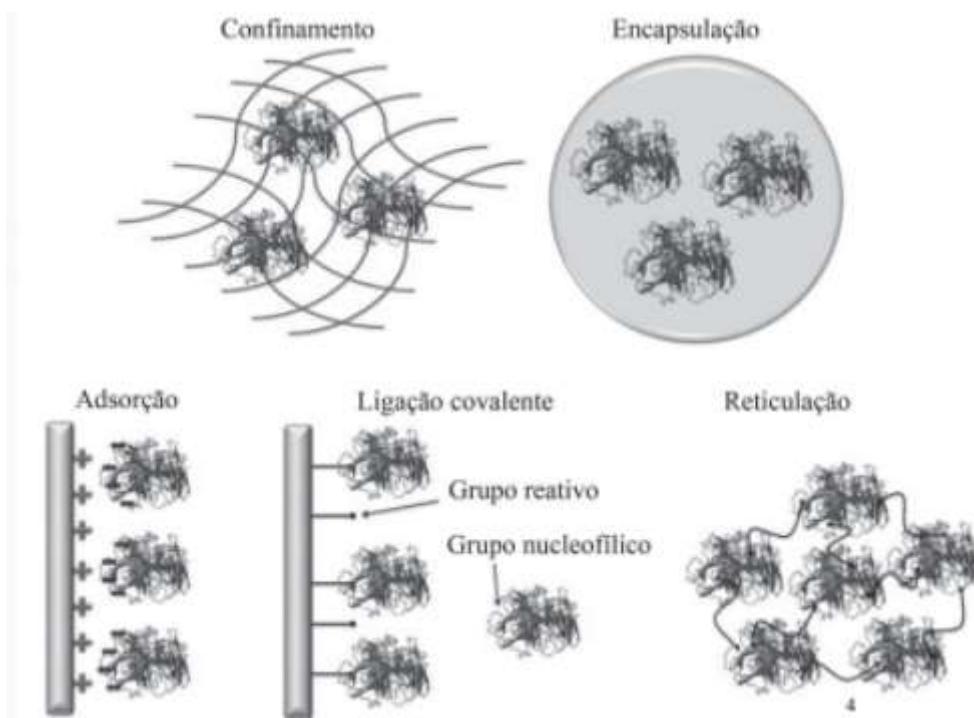
Enzimas imobilizadas

As reações enzimáticas com células imobilizadas referem-se ao uso de células vivas ou enzimas purificadas que são fixadas em uma matriz sólida para melhorar a estabilidade, seletividade e reutilização da enzima em processos biotecnológicos.

Ademais, a imobilização de enzimas ou células pode ser feita de várias maneiras, incluindo a adsorção, entrelaçamento, encapsulação e ligação covalente. Abaixo temos um resumo:



Abaixo temos as representações dos sistemas de imobilização:



Enzimas imobilizadas: Efeitos difusionais

Quando uma enzima é imobilizada, o substrato tem que difundir na solução através de um filme líquido estacionário presente nas superfícies do suporte e, se este é poroso, através dos poros até alcançar o sitio ativo das enzimas.

Esta transferência de massa pode afetar a velocidade da reação do substrato, diminuindo ela, em função da **difusibilidade externa** e **difusibilidade interna**.

- V_{\max} mais baixa;

Com isso chegamos em dois conceitos:

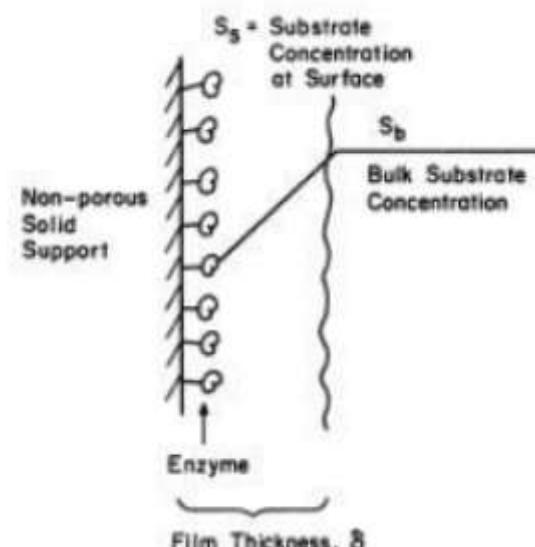
- **Resistência Difusional Externa:** Resistência da difusão convectiva ou difusão molecular do substrato pelo meio.
- **Resistência Difusional Interna:** Resistência a difusão devido à movimentação do substrato no interior do meio catalítico.

Desse modo, a **cinética de reação** para enzimas imobilizadas depende de:

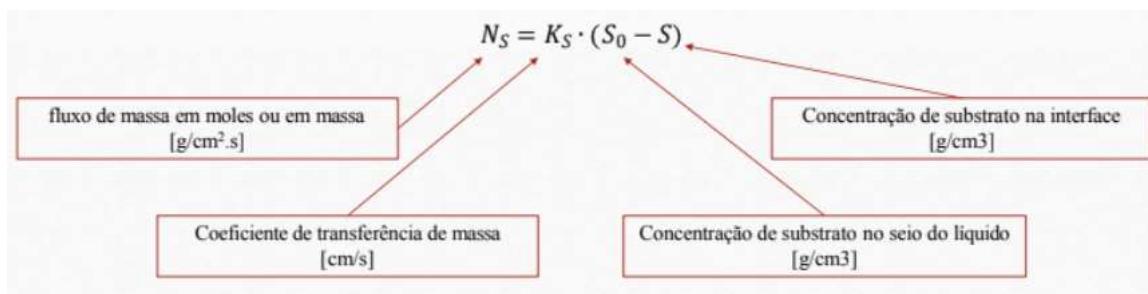
- Transporte do substrato (relacionados à transferência de massa);
- Atividade enzimática;

Transferência de massa externa

Considere o seguinte esquema, onde a enzima está localizada na superfície externa do suporte:



A transferência de massa até a superfície será dada por:



Onde o **coeficiente de transferência de massa** é dado por (adimensional de Sherwood):

$$Sh = \frac{K_S \cdot d}{D_{if}}$$

d – diâmetro da esfera
 Dif – difusão do substrato até a superfície da esfera.

Taxa de reação

A taxa de reação da enzima imobilizada é dada pela reação de **Michaelis-Menten**.

Desse modo, assumindo a hipótese que a transferência de massa é igual a taxa de reação:

Taxa de fornecimento de S por transferência de massa Taxa de consumo de S por reação

N_S \bar{v}

Então chegamos em:

$$K_S \cdot (S_0 - S) = \frac{v_{MAX} \cdot S}{K_M + S}$$

Adimensionalização

Para simplificar a equação anterior, iremos adimensionalizá-la pelos seguintes parâmetros:

$$x = \frac{S}{S_0}$$

$$Da(Damköhler) = \frac{v_{MAX}}{K_S \cdot S_0}$$

$$K = \frac{K_M}{S_0}$$

Onde Damkohler é a razão entre a **taxa máxima de reação** e a **taxa máxima de transferência de massa**:

$$Da = \frac{\text{máxima taxa de reação}}{\text{máxima taxa de transferência de massa}}$$

- **Da << 1:** Regime limitada pela reação.
- **Da >> 1:** Regime de limitação pela difusão.

Então:

$$\cdot K_s (S_0 - S) = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

$$\cdot \frac{(S_0 - S)}{S_0} = \frac{S}{K_m + S} \cdot Da$$

$$\cdot (1 - x) = \frac{S}{K_m + S} \cdot Da$$

$$\cdot K + x = \frac{x}{1-x} \cdot Da \rightarrow \boxed{\cdot \frac{1-x}{Da} = \frac{x}{K+x}}$$

Scanned with CamScanner

Fator de efetividade (n)

Ademais, é definida a grandeza **fator de efetividade (n)** que mede o quanto a a taxa de reação e transferência de massa se afastam da idealidade:

$$\eta = \frac{\text{taxa de reação observada}}{\text{taxa que seria obtida se não houvesse resistência à transferência de massa (ou seja, } S = S_0\text{)}}$$

$$\text{taxa de reação observada} = v = \frac{v_{MAX} \cdot S}{K_M + S}$$

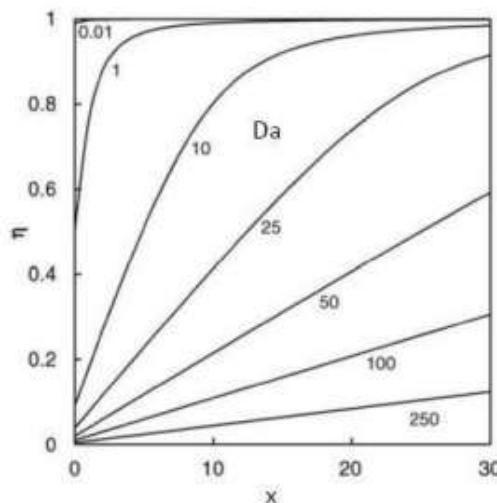
Chegamos em:

$$\eta = \frac{\frac{x}{K+x}}{\frac{1}{K+1}}$$

- **Observação:** $n_T = n$

Damkohler (D_a) e fator de efetividade (n)

Considerando o **Damkohler** e o **fator de efetividade** temos:



Fator de efetividade (η) de uma enzima sob limitações de difusão externa. x: S/S₀; Da: Damkohler number (V_{max}/K_s.S₀).

$$Da \approx 0, x \approx 1; \quad \eta = 1$$

$$Da \approx \infty, x \approx 0; \quad \eta = \frac{K+1}{Da}$$

Onde:

- Para baixos valores de **Da**, a reação é limitada pela taxa de reação e não pela transferência de massa e o **fator de efetividade**
- Para altos valores de **Da**, a reação é limitada pela transferência de massa.

Transferência de massa externa e taxa de reação (empírico)

Considerando o equacionamento já desenvolvido de transferência de massa até a superfície da enzima (levando em a área de catalisador), temos:

$$N_A = K_S \cdot a \cdot (C_{Ab} - C_{As}) \quad a - \text{área de superfície externa do catalisador [m}^{-1}\text{]} \quad a = \frac{S_X}{V_P}$$

Igualando a taxa de reação, temos:

$$r_{A,obs} = K_S \cdot \frac{S_X}{V_P} \cdot (C_{Ab} - C_{As})$$

- $C_{As}/C_{Ab} \approx 1$ indica nenhuma ou uma limitação negligenciável de transferência de massa externa, uma vez que a concentração de substrato na superfície é aproximadamente igual àquela na massa.
- $C_{As}/C_{Ab} << 1$ indica um gradiente de concentração muito acentuado na camada limite e graves efeitos de transferência de massa externa.

Considerando a reação obtida, definimos o adimensional a seguir como Ω , o qual depende da geometria do catalisador:

$$\Omega = \frac{r_{A,obs} \cdot V_P}{K_S \cdot S_X \cdot C_{Ab}}$$

Onde:

TABLE 13.6 Observable Moduli for External Mass Transfer

Sphere	$\Omega = \frac{R}{3k_S} \frac{r_{A,obs}}{C_{Ab}}$
Flat plate	$\Omega = b \frac{r_{A,obs}}{k_S C_{Ab}}$

TABLE 13.7 External Effectiveness Factors

First-order reaction: $r_A = k_1 C_A$	$\eta_{el} = \frac{C_{As}}{C_{Ab}}$
Zero-order reaction: $r_A = k_0$	$\eta_{eo} = 1$
Michaelis–Menten reaction: $r_A = \frac{v_{max} C_A}{K_m + C_A}$	$\eta_{em} = \frac{C_{As}(K_m + C_{Ab})}{C_{Ab}(K_m + C_{As})}$

Transferência de massa interna (emperico)

Para avaliarmos a influência da transferência de massa interna em uma enzima imobilizada iremos utilizar o parâmetro **Módulo de Thiele** descrito por:

$$\phi = \frac{V_P}{S_X} \frac{(r_A | C_{AS})}{\sqrt{2}} \left(\int_{C_{A,eq}}^{C_{AS}} \mathfrak{D}_{Ae} \cdot r_A \cdot dC_A \right)^{-1/2}$$

Onde:

onde V_p é o volume do catalisador, S_x é a área de superfície externa, C_A é concentração de substrato na superfície do catalisador, r_A é taxa de reação, r_A/C_{As} é a taxa de reação Quando $C_A = C_{As}$, Q_{Ae} é difusividade efetiva do substrato e $C_{A,eq}$ é a concentração de equilíbrio do substrato (muitas reações enzimáticas são irreversíveis, então $C_{A,eq}$ é zero para a maioria das aplicações biológicas).

Ademais temos as seguintes expressão para cada **ordem de reação** e cada **geometria de enzima**:

TABLE 13.2 Generalised Thiele Moduli

First-order reaction: $r_A = k_1 C_A$

$$\begin{aligned} \phi_1 &= \frac{V_p}{S_x} \sqrt{\frac{k_1}{D_{Ae}}} \\ \text{Sphere} &\quad \phi_1 = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k_1}{D_{Ae}}} \end{aligned}$$

$$\text{Flat plate} \quad \phi_1 = b \sqrt{\frac{k_1}{D_{Ae}}}$$

Zero-order reaction: $r_A = k_0$

$$\begin{aligned} \phi_0 &= \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{V_p}{S_x} \sqrt{\frac{k_0}{D_{Ae} C_{As}}} \\ \text{Sphere} &\quad \phi_0 = \frac{R}{3\sqrt{2}} \sqrt{\frac{k_0}{D_{Ae} C_{As}}} \\ \text{Flat plate} &\quad \phi_0 = \frac{b}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{k_0}{D_{Ae} C_{As}}} \end{aligned}$$

Michaelis-Menten reaction: $r_A = \frac{v_{max} C_A}{K_m + C_A}$

$$\begin{aligned} \phi_m &= \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{V_p}{S_x} \sqrt{\frac{v_{max}}{D_{Ae} C_{As}}} \left(\frac{1}{1+\beta} \right) \left[1 + \beta \ln \left(\frac{\beta}{1+\beta} \right) \right]^{-1/2} \\ \beta &= \frac{K_m}{C_{As}} \end{aligned}$$

$$\text{Sphere} \quad \phi_m = \frac{R}{3\sqrt{2}} \sqrt{\frac{v_{max}}{D_{Ae} C_{As}}} \left(\frac{1}{1+\beta} \right) \left[1 + \beta \ln \left(\frac{\beta}{1+\beta} \right) \right]^{-1/2}$$

$$\text{Flat plate} \quad \phi_m = \frac{b}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{v_{max}}{D_{Ae} C_{As}}} \left(\frac{1}{1+\beta} \right) \left[1 + \beta \ln \left(\frac{\beta}{1+\beta} \right) \right]^{-1/2}$$

TABLE 13.3 Effectiveness Factors (ϕ for each geometry and kinetic order is defined in Table 13.2)

First-order reaction: $r_A = k_1 C_A$

$$\begin{aligned} \text{Sphere}^a &\quad \eta_{h1} = \frac{1}{3\phi_1^2} (3\phi_1 \coth 3\phi_1 - 1) \\ \text{Flat plate}^b &\quad \eta_{h1} = \frac{\tanh \phi_1}{\phi_1} \end{aligned}$$

Zero-order reaction: $r_A = k_0$

$$\text{Sphere}^c \quad \eta_{h0} = 1 \quad \text{for } 0 < \phi_0 \leq 0.577$$

$$\eta_{h0} = 1 - \left[\frac{1}{2} + \cos \left(\frac{\psi + 4\pi}{3} \right) \right]^3 \quad \text{for } \phi_0 > 0.577$$

$$\text{where } \psi = \cos^{-1} \left(\frac{2}{3\phi_0^2} - 1 \right) \quad \text{for } \phi_0 > 1$$

$$\text{Flat plate} \quad \eta_{h0} = 1 \quad \text{for } 0 < \phi_0 \leq 1$$

$$\eta_{h0} = \frac{1}{\phi_0} \quad \text{for } \phi_0 > 1$$

32

Com isso, temos as seguintes interpretações:

- O valor do **Módulo de Thiele** indica se a taxa de reação diminui devido aos efeitos de difusão interna ou se o catalisador está operando em sua taxa máxima.

$$\phi (< 0.3), \eta_i \approx 1$$

$$\phi > 10, \eta_i \text{ para todas as geometrias pode ser estimado como: } \eta \approx \frac{1}{\phi_i}$$

Exemplo:

- Questão:

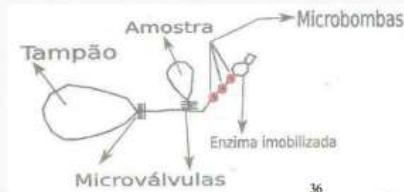
Considere que um BIOCHIP de detecção de determinado substrato consiste em dezenas de unidades interligadas a um reservatório de solução tampão.

Num compartimento, com enzima imobilizada na superfície de uma única partícula esférica, mostra como o BIOCHIP deve ser avaliado em termos de cinética reacional. Sabendo que a reação enzimática segue Michaelis-Menten ($K_m = 12 \text{ mg/L}$ e $V_m = k_{cat} [E]_t$) e a partícula catalítica pode ter diâmetro variável entre 0,05 mm e 2mm. Faça uma representação gráfica que mostra D_a em função do diâmetro de partícula. Mostre a região do gráfico para a qual a reação seja limitada pelo regime cinético ($D_a = 0,1$).

DADOS:

- $k_{cat} = 500 \text{ s}^{-1}$
- $[E]_t = 10^{-3} \text{ mg/cm}^2$ – conc. enzima por unidade de área catalítica;
- $Sh = 3$ (regime laminar)
- $Dif: 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$
- $[S] = 50 \text{ mg/L}$
- Sem difusão interna na partícula

$$Sh = \frac{k_S \cdot d}{Dif}$$



36

- Resposta:

Atividade celular

Introdução

A atividade celular é um termo que se refere à quantidade de metabolismo que está acontecendo dentro das células de um organismo. Em Engenharia Bioquímica, a atividade celular é medida como a velocidade da produção de ATP, que é a forma primária de energia das células.

A atividade celular pode ser afetada por muitos fatores, incluindo a disponibilidade de nutrientes, a presença de sais, a concentração de oxigênio, o pH e a temperatura.

Ademais existem algumas grandezas que são necessárias para se estimar a atividade celular:

r_s : velocidade global de consumo de substrato (g/Lh)

rs_x : velocidade de consumo de substrato para a produção de biomassa ou para o crescimento celular (g/Lh).

rsm : velocidade de consumo de substrato para a produção de energia de manutenção (g/Lh).

rsp : velocidade de consumo de substrato para a formação de produto (g/Lh).

rx : velocidade global de crescimento celular (g/Lh).

re : velocidade de consumo de material celular pela “respiração endógena” (g/Lh).

rp : velocidade global de formação de produto (g/Lh).

rd : velocidade de morte celular(g/Lh).

Grandezas

Considerando as grandezas definidas, temos:

r_s : velocidade de consumo de substrato (g/L.h) (**MEDIDA!**)

$$r_s = r_{sx} + r_{sp} + r_{sm}$$

r_{sm} : velocidade de consumo de substrato para a produção de energia de manutenção (g/L.h).

$$r_{sm} = m_s \cdot C_x$$

m_s : coeficiente de manutenção (h⁻¹)

r_x : velocidade global de crescimento celular (g/L.h)

$$r_x = \mu \cdot C_x$$

r_e : velocidade de consumo de material celular pela “respiração endógena (g/L.h).

$$r_e = k_e \cdot C_x$$

k_e : constante de velocidade (h⁻¹)

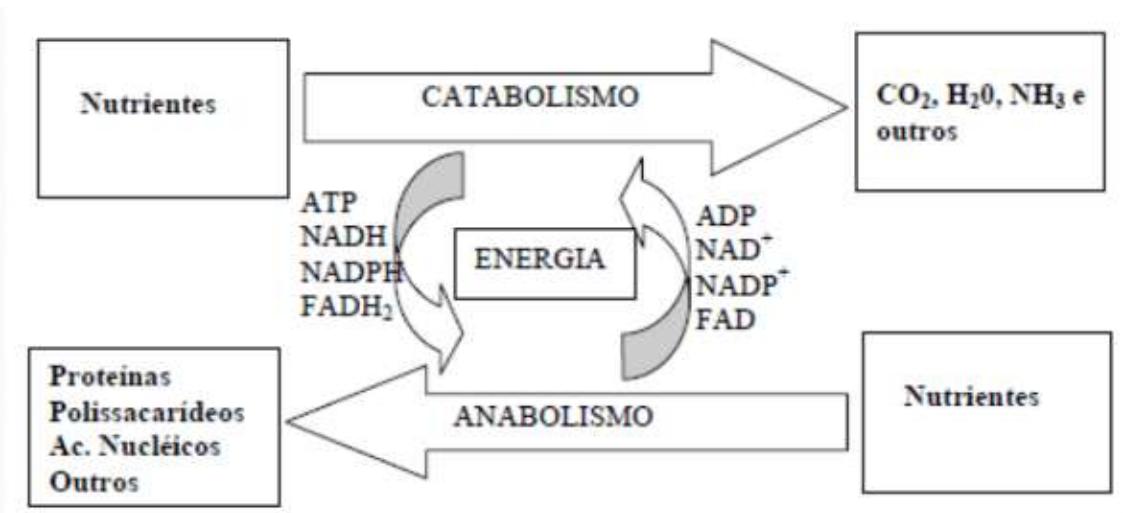
- **Observação:** ΔC_x é a variação da concentração de celulas (celulas produzidas)

Respiração celular: Metabolismo

Metabolismo celular é o conjunto de reações químicas que ocorrem dentro de uma célula para manter sua sobrevivência, crescimento e reprodução.

Ademais, o metabolismo envolve processos como a produção de energia a partir de nutrientes, a síntese de proteínas e outras moléculas importantes para a célula e a eliminação de resíduos.

Por ultimo, o metabolismo consite em duas etapas ou funções distintas, **catabolismo e anabolismo**:



Em resumo, o **catabolismo** é responsável pela quebra de moléculas e liberação de energia. Já o **anabolismo** é responsável pela síntese de moléculas complexas e gastando energias.

Respiração celular: Metabolismo da Glicose

Em resumo, o processo de metabolismo da glicose ocorre no citoplasma celular, onde a glicose é convertida duas moléculas de piruvato, liberando energia que é armazenada em forma de ATP.

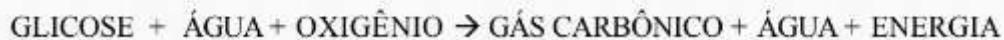
Desse modo temos:

- 4 ATP são produzidos - 2 ATP são utilizados = **Ganho de 2 ATP**

Ademais, o piruvato pode seguir duas vias: a via aeróbica e a via anaeróbica.

Na **via aeróbica**, o piruvato entra na mitocôndria e sofre a oxidação total a dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) através do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória. Essa via é altamente eficiente em produzir ATP, mas requer a presença de oxigênio:

FASE AERÓBICA

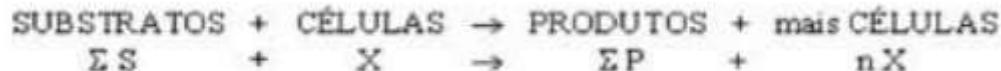


Na **via anaeróbica**, o piruvato é convertido em lactato ou em etanol, dependendo do tipo celular, em um processo conhecido como fermentação. Essa via é menos eficiente em produzir ATP e é utilizada em condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

Crescimento celular

Paralelamente a respiração celular, as células crescem e se dividem para formar novas células, o que é essencial para o desenvolvimento dos tecidos e órgãos, a reparação de lesões e a renovação celular. Processo este conhecido como **crescimento celular**.

Desse modo temos:



Neste contexto, para se possibilitar o crescimento celular são necessários meios de cultura com nutrientes para as celulas. Sendo assim, temos os seguintes meios de cultura:

- **Meio definido:** Os meios de cultura definidos são compostos por componentes químicos específicos e em quantidades definidas.
- **Meio complexo:** Os meios de cultura complexos são compostos por uma variedade de componentes, muitos dos quais são de origem desconhecida.

Coeficiente de rendimento

O **coeficiente de rendimento** é a grandeza utilizada para medir a eficiencia na produção de novas celulas, consumo de substrato ou produção de produto, em função de outra variavel:

Coeficiente de rendimento celulas/substrato

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa de células formadas}}{\text{massa de substrato consumido}} = g/g$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Coeficiente de rendimento produto/substrato

$$Y_{P/S} = \frac{\text{massa de produto formadas}}{\text{massa de substrato consumido}} = g/g$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Coeficiente de rendimento produto/celulas

$$Y_{P/X} = \frac{\text{massa de produto formadas}}{\text{massa de células formadas}} = g/g$$

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{P - P_0}{X_0 - X} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}$$

- **Observação:** **Coeficiente de rendimento** e **rendimento** são grandezas diferentes.

[1] Crescimento celular: Balanço por componente

A formulação de um meio de cultivo (definido ou complexo) deve levar em consideração o balanceamento estequiométrico e as necessidades nutricionais de cada microrganismo para se obter o maior rendimento.

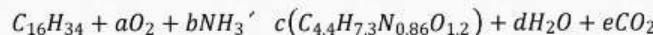
Desse modo, será necessário determinar as **proporções estequiométricas do meio de cultivo em função do número de mols do substrato**.

- **Exemplo:**

Cálculos Estequiométricos

Assuma que medidas experimentais para um certo organismo mostraram que as células podem converter dois terços (m/m) de substrato (alcano ou glicose) para biomassa.

- a) Calcule os coeficientes estequiométricos para a seguinte reação biológica:



Resolver!

- b) Calcule os coeficientes de rendimento; $\frac{Y_x(g_{cel}/g_{substrato})}{s}$ $\frac{Y_x(g_{cel}/g_O)}{O_2}$

- **Resposta:**

- Anotando:

• (Organismo pode converter dois terços da massa do substrato)

* Letra "a": (Alcano)

- Balanço por componentes:

$$\cdot C: 16 = 4,4c + e$$

$$\cdot H: 34 = 7,3c + 2d - 3b$$

$$\cdot O: 2a = 1,2c + d + 2e$$

$$\cdot N: b = 0,86c$$

$$\cdot Conversão carbono: \frac{2}{3}m^o\text{ carbono}_5 \cdot MM_c = 4,4c \cdot MM_c$$

- Resolvendo o sistema:

$$\boxed{c = 2,424}$$

$$\boxed{e = 5,333}$$

$$\boxed{b = 2,085}$$

$$\boxed{d = 11,28}$$

$$\boxed{a = 12,41}$$

* Letra "b": (Glicose: $C_6H_{12}O_6$)

- Balanço por componente:

$$\cdot C: 6 = 4,4c + e$$

$$\cdot \frac{2}{3}m^o\text{ carbono}_5 \cdot MM_c = 4,4c \cdot MM_c$$

$$\cdot H: 12 = 7,3c + 2d - 3b$$

$$\cdot O: 6 + 2a = 1,2c + d + 2e$$

$$\cdot N: b = 0,86c$$

- Resolvendo o sistema:

$$\boxed{c = 0,9191}$$

$$\boxed{e = 1,999}$$

$$\boxed{b = 0,7111}$$

$$\boxed{d = 3,855}$$

$$\boxed{a = 1,42196}$$

* Letra "c":

- Determinando os coeficientes de rendimento:

$$\cdot Y_{x/S} = g_{cel}/g_{substrato} \quad \cdot Y_{x/O_2} = g_{cel}/g_{O_2}$$

- Alcano:

$$MM_x = 92,2 \text{ g} \quad \cdot MM_S = 226 \text{ g}$$

$$\boxed{Y_{x/S} = \frac{c \cdot MM_x}{MM_S} = 0,989}$$

$$\boxed{Y_{x/O_2} = \frac{c \cdot MM_x}{a \cdot MM_{O_2}} = 0,563}$$

- Glicose:

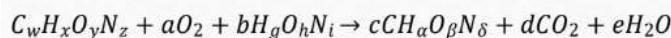
$$MM_x = 92,2 \text{ g} \quad \cdot MM_S = 180 \text{ g}$$

$$\boxed{Y_{x/S} = 0,4656}$$

$$\boxed{Y_{x/O_2} = 1,779}$$

[2] Crescimento celular: Balanço por componente

Para determinação da formação de produtos será necessário o balanço estequiométrico da reação e do meio, como realizado anteriormente. Considere a reação genérica abaixo:



Balanço C: $w = c + d$

Balanço H: $x + bg = c\alpha + 2e$

Balanço O: $y + 2a + bh = c\beta + 2d + e$

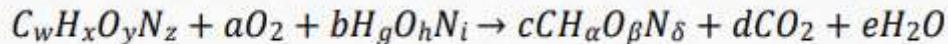
Balanço N: $z + bi = c\delta$

Ademais, para resolver o sistema será apresentado um novo conceito **Quociente respiratório (RQ)**:

$$RQ = \frac{\text{mols de } CO_2 \text{ produzidos}}{\text{mols de } O_2 \text{ consumidos}} = \frac{d}{a}$$

[1] Crescimento celular: Balanço de elétrons

O balanço de eletrons, assim como o balanço por componente, tem como finalidade determinar as proporções estequiométricas na reação de crescimento celular:



Ademais, o número de elétrons disponíveis varia de acordo com o número de oxidação de cada elemento, sendo os principais:

- **S:** +6
- **P:** +5
- **C:** +4
- **H:** +1
- **Cl:** -1
- **O:** -2
- **N:** -3

Para se simplificar alguns cálculos, define-se o **grau de redução** de uma substância como sendo:

$$Y_s = \frac{\text{Número de elétron disponíveis}}{\text{Número de carbonos}}$$

Então:

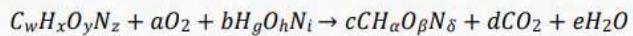
substrato $C_wH_xO_yN_z$

grau de redução do substrato

$$\gamma_S = \frac{4w+x-2y-3z}{w}$$

[2] Crescimento celular: Balanço de elétrons

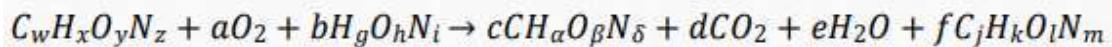
Sabe-se que em uma reação o **número de elétrons disponíveis são conservados**. Então o balanço de eletrons para uma reação genérica será:



Número de elétrons disponíveis no substrato + número de elétrons disponíveis no O_2 = número de elétrons disponíveis na biomassa

$$w \cdot \gamma_S - 4a = c \cdot \gamma_B$$

Caso haja formação de produtos, teremos:



$$w \cdot \gamma_S - 4a = c \cdot \gamma_B + f \cdot j \cdot \gamma_P$$

Onde:

- $\$Y_s\$$: Grau de redução do substrato
- $\$Y_B\$$: Grau de redução da biomassa
- $\$Y_P\$$: Grau de redução do produto

Máximo rendimento possível

Considere o balanço de elétrons geral:

$$w \cdot \gamma_S - 4a = c \cdot \gamma_B + f \cdot j \cdot \gamma_P$$

$$1 = \frac{4a}{w \cdot \gamma_S} + \frac{c \cdot \gamma_B}{w \cdot \gamma_S} + \frac{f \cdot j \cdot \gamma_P}{w \cdot \gamma_S}$$

O rendimento máximo será:

Na ausência de produtos

0

$$1 = \frac{4a}{w \cdot \gamma_S} + \frac{c \cdot \gamma_B}{w \cdot \gamma_S} + \frac{f \cdot j \cdot \gamma_P}{w \cdot \gamma_S}$$

Na ausência de formação de biomassa

≈ 0

$$1 = \frac{4a}{w \cdot \gamma_S} + \frac{c \cdot \gamma_B}{w \cdot \gamma_S} + \frac{f \cdot j \cdot \gamma_P}{w \cdot \gamma_S}$$

O rendimento máximo para formar biomassa é

$$c_{max} = \frac{w \cdot \gamma_S}{\gamma_B}$$

O rendimento máximo de produtos é

$$f_{max} = \frac{w \cdot \gamma_S}{j \cdot \gamma_P}$$

- Observação:** O rendimento máximo possível de algum elemento acontece quando todos os eletrons disponíveis vão para a formação do elemento

Quantificação celular

Para a quantificação celular existem diversos métodos, sendo eles divididos entre:

- Métodos diretos:** Massa seca, contagem em hemacitômetro, contagem em placas, contagem de partículas.
- Métodos indiretos:** Volume de células compactadas (VCC), turbimetria ou densidade ótica (DO), medidas de consumo de substrato, formação de produto e de componentes intracelulares DNA, RNA, ATP e NADH.

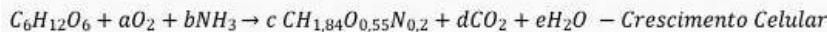
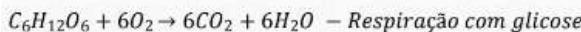
[1] Exemplo: Balanço de eletrons

- Questão:

EXEMPLO 01

A equação da reação química para a respiração da glicose é da abaixo. As células de uma bactéria convertem glicose em CO_2 e H_2O durante o crescimento. A composição celular é dada e deve-se saber que há mais 5% de cinzas. O rendimento de biomassa por substrato é de $0,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$.

A amônia é usada como fonte de nitrogênio.



- Qual é a demanda de oxigênio com crescimento em comparação com aquela sem crescimento?
- A bactéria também é capaz de crescer usando etanol como substrato, produzindo células com a mesma composição acima. Em uma base de massa, como o rendimento máximo possível de biomassa do etanol se compara com o rendimento máximo possível da glicose?

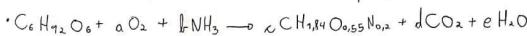
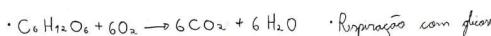
- Resposta:

Questão 1:

- Analisando:

$$\cdot Y_{B/S} = 0,5 \text{ g biomassa / g substrato}$$

$$\cdot MM_B = 0,05 \text{ MM}_S$$



- Crescimento celular

- Determinando a demanda de oxigênio: (com crescimento celular)

$$\cdot \text{Balanço de eletrons: } (6 \cdot 4 + 72 - (2 \cdot 6)) - (4 \cdot a) = (4 + 1,84 - 2 \cdot 0,55 - 3,92)c$$

$$\cdot 24 - 4a = 4,14c$$

- Coeficiente de rendimento: $\cdot Y_{B/S} = \frac{c \cdot MM_B}{MM_S}$

$$\cdot MM_B = MM_X + MM_C$$

$$\cdot MM_B = \frac{MM_X}{0,95}$$

$$\cdot c = \frac{0,95 \cdot MM_S \cdot Y_{B/S}}{MM_X} \quad \cdot MM_X = 25,44 \text{ g/mol}$$

$$\cdot 24 - 4a = 4,14c$$

- Resolvendo o sistema: $\cdot c = 3,36$ $\cdot a = 2,5224$

- Determinando o rendimento máximo para crescimento celular:

$$\cdot a = 0: \quad \cdot c = \frac{24}{4,14} = 5,7971$$

- Considerando o substrato etanol: ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

$$\cdot MM_S = 46 \text{ g/mol}$$

$$\cdot \text{Balanço de energia: } (12) + (-4a) = 4,14c$$

$$\cdot \text{Coeficiente de rendimento: } \cdot c = \frac{0,95 \cdot MM_S \cdot Y_{B/S}}{MM_X}$$

$$\cdot a = 1,076 \quad \cdot c = 1,858$$

- Determinando o rendimento máximo de crescimento celular:

$$\cdot a = 0: \quad \cdot c_{máx} = \frac{12}{4,14} = 2,89855$$

[2] Exemplo: Balanço de eletrons

- Questão:

EXEMPLO 02

- Uma bactéria é produzida a partir de glicerol em cultura aeróbia com amônia como fonte de nitrogênio. A biomassa contém 8% de cinzas, 0,40 g de biomassa são produzidos para cada g de glicerol consumido e nenhum produto metabólico importante é formado. Qual é a necessidade de oxigênio para esta cultura em termos de massa?



- Resposta:

Questão 2:

- Analisando:

- $MM_c = 0,08 MM_B$
- $MM_X = 23,71 \text{ g/mol}$
- $Y_{B/S} = 0,4 \text{ g Biomassa/g glicerol}$
- $MM_s = 92 \text{ g/mol}$

- Analisando (2):

$$\begin{aligned} Y_{B/S} &= \frac{\Delta M_B}{\Delta M_S} = \frac{c MM_B}{MM_S} & MM_B &= MM_X + MM_c \\ & & MM_B &= \frac{MM_X}{0,92} \\ \therefore c &= \frac{0,92 \cdot MM_S \cdot Y_{B/S}}{MM_X} & & \end{aligned}$$

Balanço de elétrons: $\frac{(14) + (-4x)}{2} = (4,23x)$

- A demanda de oxigênio é:

$$\therefore c = 1,4279$$

$$\therefore x = 1,9899$$

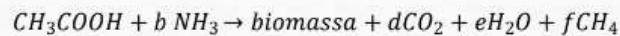
A demanda de oxigênio é 1,9899 mol por mol de substrato.

[3] Exemplo: Balanço de massa e eletrons

- Questão:

EXEMPLO 03

A digestão anaeróbica de ácidos voláteis por bactérias metanogênicas é representada pela equação:



A composição das bactérias metanogênicas é aproximada pela fórmula empírica $CH_{1,4}O_{0,40}N_{0,20}$. Para cada kg de ácido acético consumido, 0,67 kg de CO_2 são liberados.

Como o rendimento de metano nestas condições se compara com o rendimento máximo possível?

- Resposta:

Questão 3:

- Analisando:

$$\cdot M_{CO_2} = 0,67 M_S \quad \cdot d = \frac{0,67 M_M_S}{M_M_{CO_2}}$$

$$\cdot M_M_S = 60 \text{ g/mol}$$

$$\cdot M_M_X = 22,6 \text{ g/mol}$$

- Balanço por componente:

$$\cdot C: 2 = c + d + f$$

$$\cdot H: 4 + 3b = 2e + 4f + 1,4c$$

$$\cdot O: 2 = 0,4c + 2d + e$$

$$\cdot N: b = 0,2c$$

- Resolvendo o sistema:

$$\boxed{b = 0,0345}$$

$$\boxed{c = 0,172}$$

$$\boxed{d = 0,913}$$

$$\boxed{e = 0,103}$$

$$\boxed{f = 0,913}$$

- Nestas condições, o rendimento de metano é:

$$\boxed{f = 0,913}$$

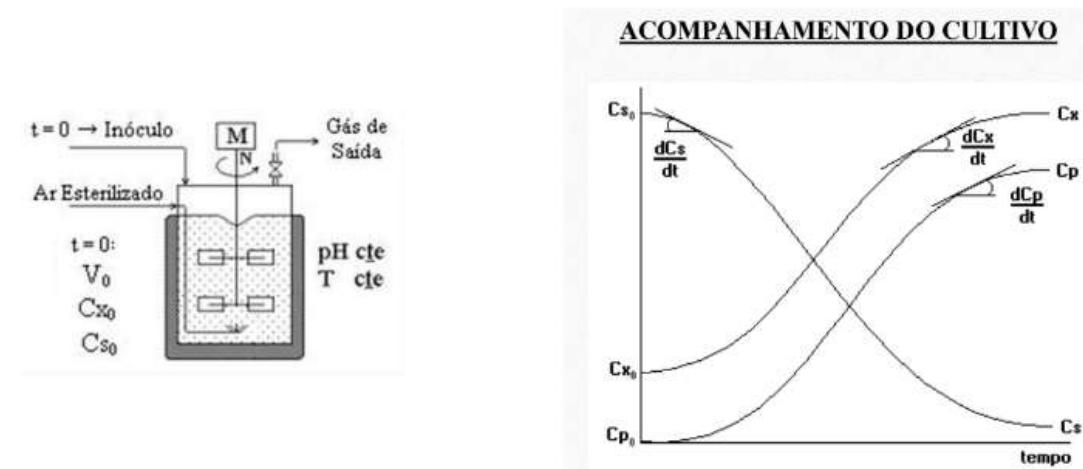
- Já o rendimento máximo seria: (Quando todos eletrônicos do substrato não para o produto)

$$(8) = (8f)$$

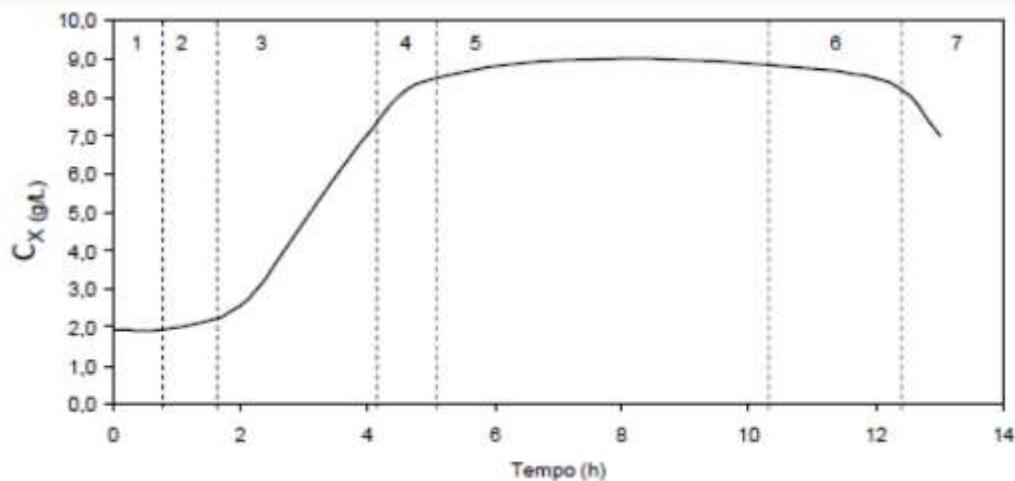
$$\boxed{f_{máx} = 1}$$

Introdução:

O cultivo de células pode ser realizado de diversas maneiras, sendo uma das mais comuns o **cultivo em batelada**, desse modo iremos utilizá-lo para estudo do crescimento celular:



Ademais, abaixo temos o crescimento celular do reator batelada em maiores detalhes:



Onde:

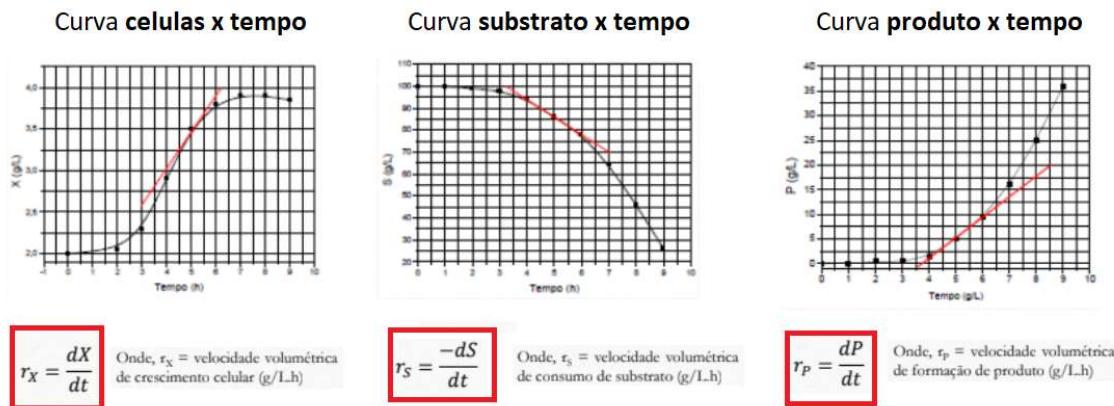
- **1. Fase lag (partida):** Período de adaptação requerido pelas células após a inoculação, para que possam se ajustar ao novo "meio".
- **2. Fase de aceleração:** Parte da população celular já adaptada ao novo "meio" e começa a propagação. Crescimento exponencial tem início.
- **3. Fase de crescimento exponencial:** Curva representando C_x (massa celular/volume) tem o comportamento exponencial típico dos processos de crescimento.
- **4. Fase de desaceleração:** Crescimento limitado devido a exaustão de algum nutriente ou acúmulo de metabólitos que causam inibição.

- **5. Fase de Crescimento Estacionário:** Velocidades de propagação e de morte se equilibram. Cx atinge valor máximo.
- **6. Início da fase de morte:** Velocidade de morte ultrapassa velocidade de propagação. Cx começa a cair lentamente.
- **7. Fase de morte celular:** O número de células vivas diminui exponencialmente quando o crescimento celular praticamente cessa. Células morrem por falta de nutrientes ou devido à presença de toxinas no meio.

Velocidade instantânea ou volumétrica (r_i):

Para estudarmos o crescimento celular e como as concentrações de reagentes e produtos variam dentro do reator, precisamos definir algumas grandezas.

Sendo a primeira **velocidade instantânea ou volumétrica** como a grandeza que define a velocidade no instante de tempo (t) em operação. Ela pode ser representada para cada componente na mistura:



- **Observação:** A velocidade instantânea pode ser calculada de forma discreta ($\Delta X / \Delta t$)

Produtividade volumétrica (Q_i):

A produtividade volumétrica, às vezes chamada de velocidade média do processo (mas não é propriamente ela), é um parâmetro de velocidade cujo objetivo está na avaliação do desempenho do processo.

Ela pode ser expressa tanto para as células, como para o produto:

$$Q_X = \frac{X_m - X_0}{t_{final}}$$

$$Q_P = \frac{P_m - P_0}{t_{final}}$$

Onde:

X_m e P_m = concentração máxima de células e produto respectivamente (g/L);

X_0 e P_0 = concentração inicial de células e produto respectivamente (g/L);

t_f = tempo final da fermentação (h).

Velocidades específicas de transformação (μ_i):

A velocidade específica de transformação consiste no cálculo das velocidades instantâneas divididas pela concentração de células em um momento (t):

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left(\frac{-dS}{dt} \right)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

Onde:

μ_X = velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

μ_S = velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g}_S/\text{g}_X \cdot \text{h}$)

μ_P = velocidade específica de formação de produto ($\text{g}_S/\text{g}_X \cdot \text{h}$)

Coeficiente de rendimento ($Y = \frac{i}{j}$):

O **coeficiente de rendimento** é a grandeza utilizada para medir a eficiência na produção de novas células, consumo de substrato ou produção de produto, em função de outra variável:

**Coeficiente de rendimento
celulas/substrato**

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa de células formadas}}{\text{massa de substrato consumido}} = g/g$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

**Coeficiente de rendimento
produto/substrato**

$$Y_{P/S} = \frac{\text{massa de produto formadas}}{\text{massa de substrato consumido}} = g/g$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

**Coeficiente de rendimento
produto/celulas**

$$Y_{P/X} = \frac{\text{massa de produto formadas}}{\text{massa de células formadas}} = g/g$$

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{P - P_0}{X_0 - X} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}}$$

- **Observação:** Coeficiente de rendimento e rendimento são grandezas diferentes.

Ademais, também podemos obter o coeficiente de rendimento considerando a velocidade instantânea de reação:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu_X}{\mu_S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{-dS} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\mu_P}{\mu_S}$$

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} = \frac{r_P}{r_X} = \frac{\mu_P}{\mu_X}$$

- **Observação:** Coeficientes de rendimento podem ser chamados de fatores de conversão.

Coeficiente de rendimento: Obtenção empírica

Considerando o **coeficiente de rendimento** constante ($S_f = S = 0$) podemos estimar os seus valores por: (X_m : valor máximo de x)

$$Y_{X/S} = \frac{X_m - X_0}{S_0}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_m - P_0}{S_0}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_m - P_0}{X_m - X_0}$$

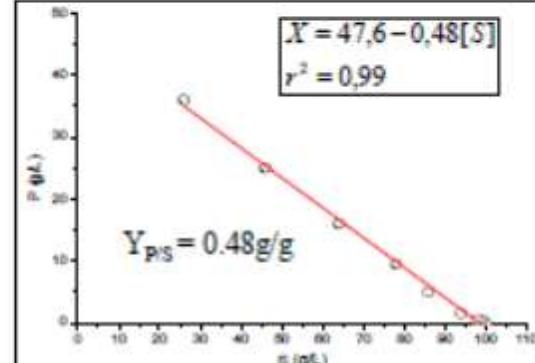
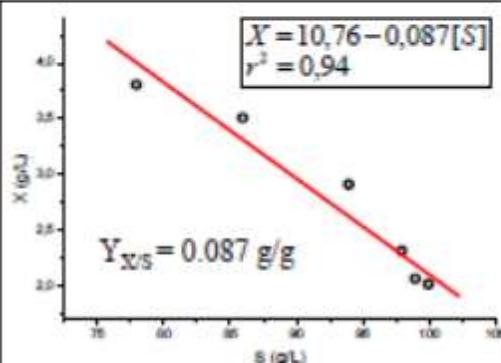
Considerando ($P_0 = P$: variável) podemos ajustar as curvas em função da concentração de substrato pelas seguintes equações lineares:

$$Y_{X/S} = \frac{X_m - X}{S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_m - P}{S}$$

$$X = X_m - Y_{X/S}[S]$$

$$P = P_m - Y_{P/S}[S]$$



Por fim, obtemos o coeficiente de rendimento pelo coeficiente angular.

Eficiência do processo (\$\eta\$):

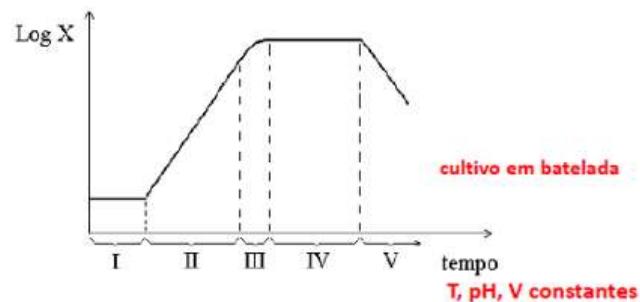
A eficiência de um bioprocesso é uma das grandezas fundamentais para entendermos o quão próximo do ideal nosso processo está. Ela é definida por:

$$\eta(\%) = \frac{(Y_{P/S})_{observado}}{(Y_{P/S})_{máximo\ possível}} \cdot 100$$

Crescimento celular: Modelagem simples

Considerando os conceitos e definições anteriores, podemos simplificar o modelo de crescimento celular da seguinte forma:

- I. Fase "lag" ou fase de adaptação
- II. Fase "log" ou fase de crescimento exponencial
- III. Fase de desaceleração
- IV. Fase estacionária
- V. Fase de declínio ou fase de morte celular

Fases do crescimento celular

Onde, a velocidade de crescimento celular é dada por:

$$r_X = \mu \cdot C_X$$

$$\mu = \frac{1}{C_X} \frac{dC_X}{dt}$$

Fase log

$$\ln \frac{C_X}{C_{X_0}} = \mu_{\max} \cdot t$$

Fase de morte celular

$$r_X = \mu \cdot C_X$$

$$r_d = \left(\frac{dC_X}{dt} \right)_{mort} = -k_d \cdot C_X$$

k_d : constante de morte (h^{-1}).

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu - k_d) \cdot C_X$$

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

C_X : concentração celular (em g/L ou kg/m³)

E define-se o tempo de geração, como o tempo até dobrar o número de células (t_g):

Hipótese

$$\frac{C_X}{C_{X_0}} = 2$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} = \frac{0,693}{\mu_{\max}}$$

Exemplo:

- Questão:

As células de levedura crescem em fase exponencial. As concentrações de massa celular são apresentadas na Tabela. Calcule a taxa de crescimento específica, μ_{\max} e a taxa de geração (tg).

Tempo (h)	0	5	10	15	20	25
Concentração celular, C_x	0,5	1,3	4,0	10,2	24,0	52,5

- Resposta:

- Analisando:

$$\Delta \frac{t(h)}{C_x(g/L)} \begin{matrix} 0 \\ 5 \\ 10 \\ 15 \\ 20 \\ 25 \end{matrix} \begin{matrix} 0,5 \\ 1,3 \\ 4,0 \\ 10,2 \\ 24,0 \\ 52,5 \end{matrix}$$

- Determinando a taxa de crescimento específico máxima (μ_{\max}) e a taxa de geração (tg):

$$\cdot C_x = C_{x_0} \cdot e^{\mu_{\max} t} \quad \cdot \ln\left(\frac{C_x}{C_{x_0}}\right) = \mu_{\max} t$$

$$\cdot \ln(C_x) = \mu_{\max} t + \ln(C_{x_0})$$

$$\boxed{\cdot \mu_{\max} = 0,1883 \text{ h}^{-1}}$$

- Determinando a taxa de geração: ($C_x = 2C_{x_0}$)

$$\boxed{\cdot t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} = 3,681 \text{ h}}$$

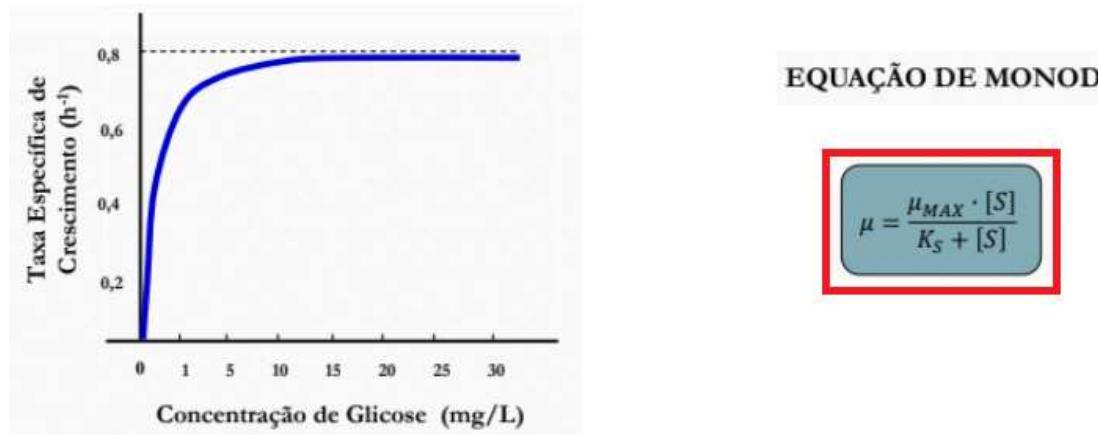
Estudo cinético em reações enzimáticas (2)

Introdução:

Considerando os conceitos já aprendidos e a modelagem para crescimento celular descrita, na sequência veremos mais definições e outros conceitos importantes

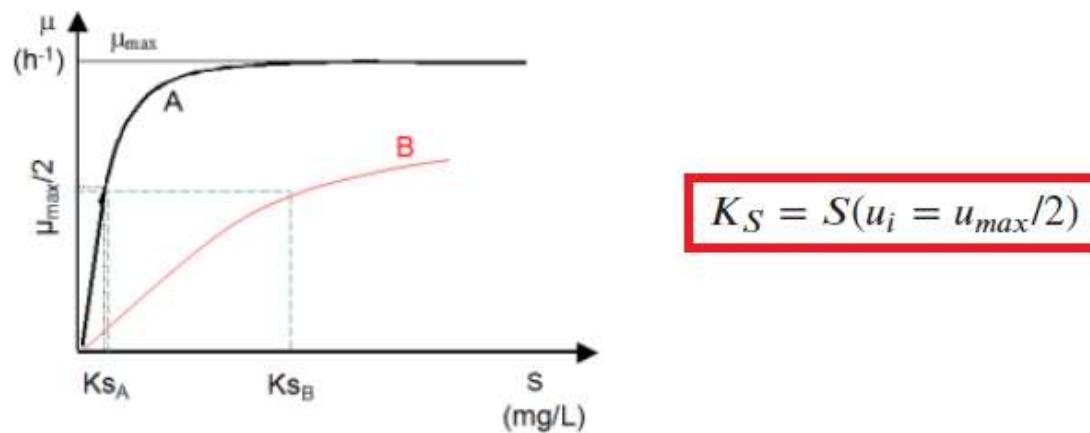
Taxa específica de crescimento (μ_X): Relação com substrato

Considerando o gráfico da **taxa específica de crescimento (μ_X)** pela **concentração de substrato (S)**, podemos expressar taxa específica de crescimento pela **Equação de Monod**:



Constante de saturação (K_S):

Define-se a **constante de saturação (K_S)** como sendo a concentração de substrato quando a taxa específica de crescimento é metade da máxima:

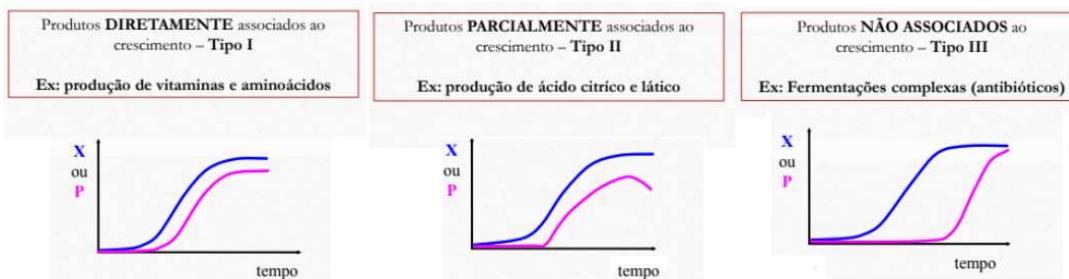


- **Observação:** Quanto menor K_S maior a duração da fase exponencial

Clasificação de Garden:

Tratando-se da relação crescimento celular e produção do produto, tem-se que em alguns casos essa relação não é direta, ou seja, quanto mais cresce mais produto é produzido. Pelo contrário, em alguns casos a produção de produtos se tem inicio apenas ao fim do crescimento.

Desse modo, utiliza-se a **classificação de Garden** para diferenciar os diferentes tipos de reações enzimáticas e microbiológicas:



Exemplo: Equação de Monod

- Questão:

O crescimento de um dado microrganismo em meio contendo glicose como fonte de carbono apresentou os seguintes parâmetros $\mu_{MAX} = 0,65 \text{ h}^{-1}$ e $K_S = 0,05 \text{ gL}^{-1}$.

Calcular a taxa de crescimento específica (μ) para as concentrações de glicose abaixo:

glicose [g.L ⁻¹]
0,01
0,1
0,5
1,0
20
90

- Resposta:

- Analisando:

$$\cdot \mu_{\max} = 0,65 \text{ h}^{-1}$$

$$\cdot K_S = 0,05 \text{ g/L}$$

- Determinando a taxa específica de crescimento para as concentrações de glicose abaixo:

$$\cdot \mu_x = \frac{\mu_{\max}[S]}{K_S + [S]}$$

- Então:

A	glicose [g/L]	$\mu_x [\text{h}^{-1}]$
	0,01	0,108
	0,1	0,433
	0,5	0,591
	1,0	0,619
	2,0	0,648
	9,0	0,649

Equação de Monod: Linearização

Considerando a equação de Monod apresentada, podemos linearizar para descobrir seus parâmetros a partir de dados experimentais a parte do seguinte método:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{K_S + [S]}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_S}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$$

Exemplo: Linearização da Equação de Monod

- Questão:

Com os dados do Exemplo 1 calcular os parâmetros da equação de Monod.

[glicose] (g/L)	μ (h ⁻¹)
0,01	0,1083
0,1	0,4333
0,5	0,5909
1	0,6190
20	0,6484
90	0,6496

- Resposta:

- Analisando:

$$\cdot \mu_x = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

$$\cdot \frac{1}{\mu_x} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{\mu_{max}} \frac{1}{S}$$

- Fazendo a regressão: ($a = 0,07695$; $b = 1,5385$)

$$\cdot b = \frac{1}{\mu_{max}}$$

$$\cdot \mu_{max} = 0,64998 \text{ h}^{-1}$$

$$\cdot a = \frac{K_s}{\mu_{max}}$$

$$\cdot K_s = 0,05 \text{ g/L}$$

Equação de Monod: Inibição

A inibição da taxa de especificar de crescimento (μ_{max}) não é o foco desta matéria, porém ela será representada pelas seguintes equações:

Inibição pelo produto

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S} \frac{k_p}{k_p + P}$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n$$

Levenspiel

$k_p \rightarrow$ constante de inibição pelo produto

Inibição pelo substrato

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S} \frac{k_{i,S}}{k_{i,S} + S}$$

$$\mu_X = \mu_{max} \frac{S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_{i,S}}}$$

Andrews

$k_{i,S} \rightarrow$ constante de inibição pelo substrato

Exemplo: Determinação de velocidade específica e coeficiente de rendimento empiricamente

- Questão:

Uma cultura cresce em um meio contendo 0,3% (m/v) de glicose. No tempo $t = 0$ ela é inoculada em um grande volume esterilizado de um meio idêntico. A densidade ótica (OD) a 420 nm em função do tempo é apresentado na coluna 1 da Tabela a seguir. A mesma espécie cultivada em um meio complexo é inoculada em uma mistura de 0,15% (m/v) de glicose e 0,15% (m/v) de lactose; A densidade ótica em função do tempo deste processo é apresentado na coluna 2 da Tabela a seguir. Se a densidade ótica a 420 nm é linear em relação a densidade celular sendo 0,175 OD igual a 0,1mg (massa seca)/mL, determine a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}), a fase lag (t_{lag}) e o rendimento total Y (gramas de células por grama de substrato), assumindo que o substrato é esgotado em cada caso.

Explique o comportamento da curva de crescimento em cada caso.

- Resposta:

- Analisando:

$$\text{OD}_1 = 0,3\% \text{ m/V} = 3 \text{ g/L}$$

$$\text{OD}_2 = 4,20 \text{ m/m}$$

$$\cdot S_{1,1} = 0,15\% \text{ m/V} = 1,5 \text{ g/L}$$

$$\cdot S_{2,1} = 0,15\% \text{ m/V} = 1,5 \text{ g/L}$$

- Analisando a relação densidade seiva e densidade celular:

densidade celular densidade seiva

$$\gamma = \alpha x + b \quad b=0 \quad 0,775 = 0,1 \alpha \quad \alpha = 7,75$$

- Então:

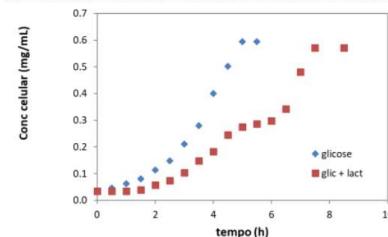
$$\cdot X = \frac{1}{7,75} \text{ OD} = 0,5714 \text{ OD}$$

- Determinando o concentração de células:

- Excel

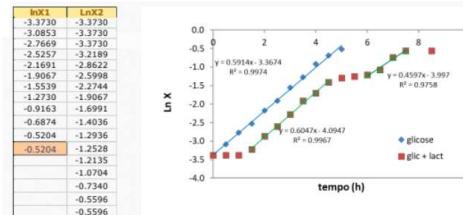
Tempo (h)	OD (1)	OD (2)	X1 (mg/mL)	X2 (mg/mL)
0	0.06	0.06	0.0343	0.0343
0.5	0.09	0.09	0.0517	0.0517
1	0.11	0.06	0.0629	0.0343
1.5	0.14	0.07	0.0800	0.0400
2	0.2	0.1	0.1143	0.0571
2.5	0.25	0.13	0.1486	0.0729
3	0.32	0.18	0.2114	0.1029
3.5	0.49	0.26	0.2800	0.1486
4	0.35	0.32	0.4000	0.1829
4.5	0.44	0.43	0.5029	0.2457
5	0.52	0.48	0.5943	0.2743
5.5	0.52	0.5	0.5943	0.2743
6	0.52	0.52	0.5950	0.2757
6.5	0.3	0.0000	0.3429	
7	0.42	0.0000	0.4800	
7.5	0.5	0.0000	0.5714	
8.5	0.5	0.0000	0.5714	

Amostras diluídas 1:2 antes da leitura de OD. Ou seja, $X \times 2$



Aplicando a equação de linearização do crescimento celular na fase log:

$$\cdot \ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = \mu_{max} t$$



a) máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}) para meio contendo somente glicose ($S_0 = 3 \text{ g/L}$)

$$\mu_{max} = 0.591 \text{ 1/h}$$

c) rendimento total Y (gramas de células por grama de substrato), assumindo que o substrato é esgotado em cada c para meio contendo somente glicose ($S_0 = 3 \text{ g/L}$)

$$Y/X = 0.1867 \text{ mg célula/g glicose consumida}$$

d) produtividade

para meio contendo somente glicose ($S_0 = 3 \text{ g/L}$)

$$\text{Prod} = 0.10 \text{ mg célula/mLh}$$