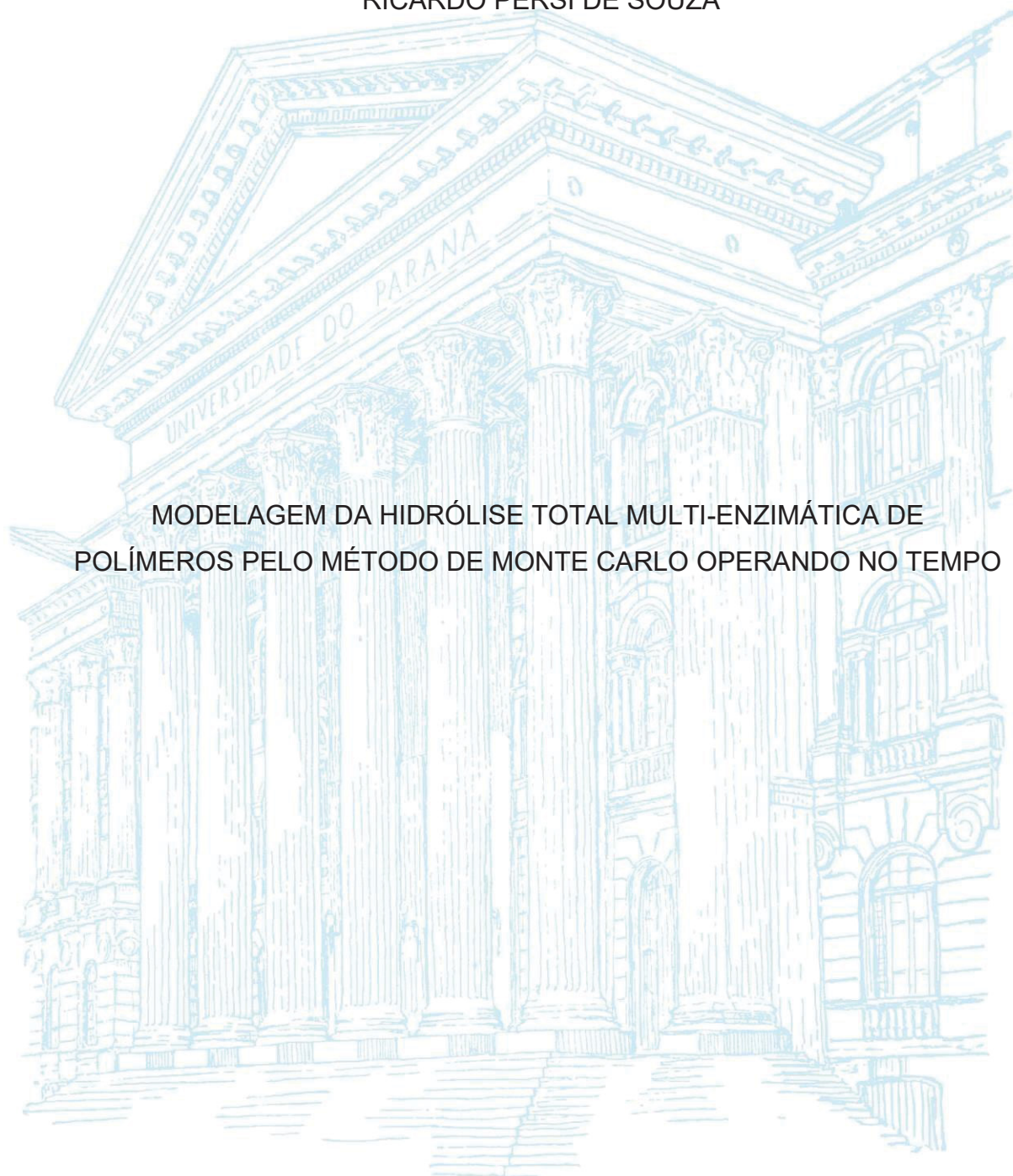


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO PERSI DE SOUZA



MODELAGEM DA HIDRÓLISE TOTAL MULTI-ENZIMÁTICA DE
POLÍMEROS PELO MÉTODO DE MONTE CARLO OPERANDO NO TEMPO

CURITIBA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO PERSI DE SOUZA

MODELAGEM DA HIDRÓLISE TOTAL MULTI-ENZIMÁTICA DE
POLÍMEROS PELO MÉTODO DE MONTE CARLO OPERANDO NO TEMPO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química, no setor de Tecnologia,
na Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química

Orientador: Prof.Dr. Éliton Fontana

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Souza, Ricardo Persi de

Modelagem da hidrólise total multi-enzimática de polímeros pelo método de Monte Carlo operando no tempo / Ricardo Persi de Souza. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Éliton Fontana

1. Enzimas. 2. Polímeros. 3. Hidrólise. 4. Processo estocástico. 5. Modelos matemáticos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Fontana, Éliton. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA
- 40001016056P9

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RICARDO PERSI DE SOUZA** intitulada: **MODELAGEM DA HIDRÓLISE TOTAL MULTI-ENZIMÁTICA DE POLÍMEROS PELO MÉTODO DE MONTE CARLO OPERANDO NO TEMPO**, sob orientação do Prof. Dr. ELITON FONTANA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

21/03/2023 08:17:33.0

ELITON FONTANA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

21/03/2023 08:33:58.0

CALIANE BASTOS BORBA COSTA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

20/03/2023 19:55:03.0

MARCOS LÚCIO CORAZZA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/03/2023 13:15:48.0

ADRIANO DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

22/03/2023 15:56:51.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho à minha família e minha esposa,
pessoas especiais que fizeram toda diferença para que eu
obtivesse sucesso em meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu agradecimento eterno, por colocar em meu caminho tantas pessoas preciosas.

À minha família querida, minha mãe Silvania, meu pai Carlos Eduardo, meu irmão Lucas, minhas avós Irene e Vanda, meu avô Ricardo e Clemenceau, minha tia Susi, meus tios Alexandre, Carlos e Paulo, meus sogros Denise e Paolo, pelo apoio, compreensão e carinho, minha sincera gratidão.

À minha esposa Giulietta, pelo seu amor incondicional, meu agradecimento carinhoso.

Especialmente ao Prof. Dr. Éliton Fontana pela sua orientação, competência, compreensão e confiança, minha gratidão

Aos membros da banca, meus agradecimentos por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

Ao meu chefe Wellington, pelo apoio e incentivo para que eu pudesse concluir esse projeto.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram e que estiveram do meu lado ao longo dessa trajetória.

Uma vez eliminado o impossível, o que restar, não importa o
quão improvável, deve ser a verdade.

Sherlock Holmes

RESUMO

O interesse em modelos matemáticos de ações enzimáticas em polímeros tem aumentado nos últimos anos, porém os trabalhos encontrados na literatura modelam reações e situações muito específicas, inaplicáveis em condições reais. Sendo assim é relevante desenvolver uma metodologia com uma abordagem geral para modelar reações enzimáticas de polímeros em solução e também para otimizar esse tipo de reação. Devido à necessidade de se ter uma reação como base para esse tipo de modelagem, buscou-se na literatura uma reação de hidrólise polimérica que tem estado em destaque. Com isso em mente, a reação escolhida foi a de hidrólise da pectina em ácido D-galacturônico, pois, não só essa é uma reação que tem estado em destaque, um modelo matemático capaz de descrever precisamente a ação de um sistema multi-enzimático nos substratos da biorrefinaria de polpa cítrica (onde é feita a hidrólise da pectina) permitiria a otimização das unidades dessa biorrefinaria, o que tornaria o processo mais economicamente viável. O presente trabalho buscou criar um modelo estocástico baseado no método de Monte Carlo, para descrever a ação de um sistema multi-enzimático, contendo endopoligalacturonase e exopoligalacturonases, na hidrólise total dos ácidos poligalacturônico e oligogalacturônico visando produzir o ácido D-galacturônico, com enfoque em determinar o tempo de reação do sistema. Também foi analisado o efeito que diferentes proporções das enzimas causam nos perfis de hidrólise e foi feita a otimização do sistema a partir do método de Otimização por Enxame de Partículas. O modelo da hidrólise foi capaz de descrever os dados experimentais para a ação da enzima endopoligalacturonase na hidrólise do ácido heptagalacturônico avançando no tempo e mostrou-se computacionalmente leve e capaz de caracterizar o sistema de forma mais precisa do que os trabalhos encontrados atualmente na literatura. Ele também se mostrou possivelmente adaptável a outras reações de polímeros em soluções, podendo ser testado em uma gama de indústrias, pois utiliza de parâmetros da literatura clássica para descrever as reações. O método de otimização proposto, sendo esse o primeiro método proposto para esse tipo de modelo encontrado na literatura, provou encontrar, de forma confiável, pontos ótimos correspondentes com os resultados esperados. Obtendo percentuais ótimos de razões enzimáticas para diferentes tempos de reação e diferentes substratos hidrolisados visando uma maior produção do componente de interesse no tempo estipulado.

Palavras-chave: sistema multi-enzimático; modelo estocástico; otimização;

Otimização por enxame de partículas; polímeros.

ABSTRACT

The interest in mathematical models of enzyme actions in polymers has increased in recent years, however the works found in the literature model very specific reactions and situations that are not applicable in real conditions. Therefore, it is relevant to develop a methodology with a general approach to model enzyme reactions of polymers in solution and also to optimize this type of reaction. Due to the need to have a reaction as a basis for this type of modeling, a polymeric hydrolysis reaction that has been in the spotlight was searched. With this in mind, the chosen reaction was the hydrolysis of pectin into D-galacturonic acid, since, not only this reaction has been in the spotlight, a mathematical model capable of precisely describing the action of a multi-enzyme system on the substrates of the citrus waste biorefineries (where the pectin hydrolysis happens) would allow optimization of these units, making the process more economically feasible. The present work aimed to create a stochastic model based on the Monte Carlo method to describe the action of a multi-enzyme system, containing endopolygalacturonases and exopolygalacturonases, in the total hydrolysis of polygalacturonic and oligogalacturonic acids aiming to produce D-galacturonic acid, with a focus on determining the reaction time of the system. The effect of different enzyme ratios on the hydrolysis profiles was also analyzed, and the optimization of the system was performed using the Particle Swarm Optimization method. The hydrolysis model was able to describe the experimental data for the endopolygalacturonase enzyme action in the hydrolysis of heptagalacturonic acid over time and was shown to be computationally light and capable of characterizing the system more accurately than the current works found in literature. It also showed to be possibly adaptable to other polymeric reactions in solutions and can be tested in a range of industries, as it uses classic literature parameters to describe the reactions. The proposed optimization method, being the first method proposed for this type of model found in the literature, proved to reliably find optimal points corresponding with the expected results. Obtaining optimal percentages of enzymatic ratios for different reaction times and different hydrolyzed substrates aimed at a higher production of the component of interest within a specified time.

Keywords: multi-enzyme system; stochastic model; optimization; D-galacturonic acid; polymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - NÚMERO TOTAL DE PESQUISAS QUE PROPÕEM MODELOS MATEMÁTICOS DE AÇÕES ENZIMÁTICAS EM POLÍMEROS AO LONGO DOS ANOS	17
Figura 2.1 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE UMA BIORREFINARIA DE POLPA CÍTRICA.	22
Figura 2.2 - ESTRUTURA GERAL DA PECTINA	24
Figura 2.3 - ESQUEMA DA AÇÃO ENZIMÁTICA SOBRE A HOMOGALACTURANA	27
Figura 3.1 - ALGORITIMO DO SISTEMA	44
Figura 3.2 - VALIDAÇÃO DO MODELO	53
Figura 4.1 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DAS HIDRÓLISES MULTI-ENZIMÁTICAS	59
Figura 4.2 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO.....	61
Figura 4.3 - RESULTADOS DA ANÁLISE BOX PLOT PARA O PONTO ÓTIMO ENCONTRADO NAS SIMULAÇÕES DO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR COM ENXAME DE PARTÍCULAS	62
Figura 4.4 - RESULTADOS DA SIMULAÇÃO DA HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA PROPORÇÃO ÓTIMA.....	63
Figura 4.5 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO NO TEMPO DE 15 MINUTOS.....	64
Figura 4.6 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO	

NO TEMPO DE 30 MINUTOS.....	65
Figura 4.7 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE CADEIA 14 NO TEMPO DE 1 HORA.....	67
Figura 4.8 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE CADEIA 21 NO TEMPO DE 1 HORA.....	68
Figura 4.9 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE CADEIA 26 NO TEMPO DE 1 HORA.....	70
Figura 4.10 - PORCENTAGEM ÓTIMA DE ENDOPOLIGALACTURONASES NA MISTURA CATALÍTICA COMPOSTA POR ENDOPOLIGALACTURONASES E EXOPOLIGALACTURONASES NA HIDRÓLISE DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE DIFERENTES TAMANHOS.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - COMPOSIÇÃO EM MASSA SECA DA POLPA CÍTRICA.....	23
Tabela 3.1 - CONSTANTES DE ESPECIFICIDADE E DE SATURAÇÃO DAS ENZIMAS ENDOPOLIGALACTURONASES E EXOPOLIGALACTURONASES PARA REAÇÕES ENVOLVENDO O ÁCIDO OLIGOLACTURÔNICO... ..	45
Tabela 3.2 - CONSTANTES DE ESPECIFICIDADE E DE SATURAÇÃO DAS ENZIMAS ENDOPOLIGALACTURONASES E EXOPOLIGALACTURONASES PARA REAÇÕES ENVOLVENDO O ÁCIDO POLIGOLACTURÔNICO... ..	47

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ENDO	Endopoligalacturonase
EXO	Exopoligalacturonase
OGA _n	Cadeias do ácido poligalacturônico de tamanho n
pH	Potencial hidrogênio
PSO	Otimização por Enxame de Partículas

LISTA DE SÍMBOLOS

a	aceleração
C	Concentração [mol/L]
I	Inércia
k	Constante de especificidade [mM ⁻¹ s ⁻¹]
k _{break}	Constante de quebra das ligações de hidrogênio
K _M	Constante de saturação [mM]
k _{off}	Constante de dissociação
k _{on}	Constante de ligação
P _E	Probabilidade da ação da enzima E
p	posição
r	número aleatório
r _i	Taxa de reação envolvendo uma ligação i [mol ¹ s ⁻¹ l ⁻¹]
v	Velocidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	17
1.1	INTRODUÇÃO	17
1.2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	19
1.2.1	OBJETIVO GERAL,	19
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
1.2.3	JUSTIFICATIVAS	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	BIORREFINARIA DE POLPA CÍTRICA	22
2.2	PECTINA E ÁCIDO D-GALACTURÔNICO	23
2.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA TOTAL PARA OBTENÇÃO DO ÁCIDO D- GALACTURÔNICO.	25
2.4	MODELAGEM MATEMÁTICA DETERMINÍSTICA DA HIDRÓLISE DE PECTINA E DE SEUS DERIVADOS.....	27
2.5	MODELAGEM DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS PELO MÉTODO ESTOCÁSTICO COM UMA ENZIMA.....	29
2.6	MODELAGEM DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS PELO MÉTODO ESTOCÁSTICO COM MÚLTIPLAS ENZIMAS.....	32
2.7	OTIMIZAÇÃO ESTOCÁSTICA DE REAÇÕES	37
3	METODOLOGIA	39
3.1	DESCRIÇÃO DO SISTEMA E HIPÓTESES ADOTADAS.....	39
3.2	DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE REAÇÃO	40
3.3	DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE AÇÃO DO MODELO E DETERMINAÇÃO DAS PROBABILIDADES DE REAÇÃO	41
3.4	DESCRIÇÃO DO ALGORITMO DO MODELO ESTOCÁSTICO BASEADO NO MÉTODO DE MONTE CARLO	42
3.5	VALORES DOS PARÂMETROS USADOS NAS SIMULAÇÕES	44
3.6	COMPARAÇÃO COM OUTROS MODELOS DE HIDRÓLISES ESTOCÁSTICOS	50
3.7	VALIDAÇÃO DO MODELO	52
3.8	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS USANDO O MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS	53
3.9	MÉTODO DE REGRESSÃO QUADRÁTICA.....	56

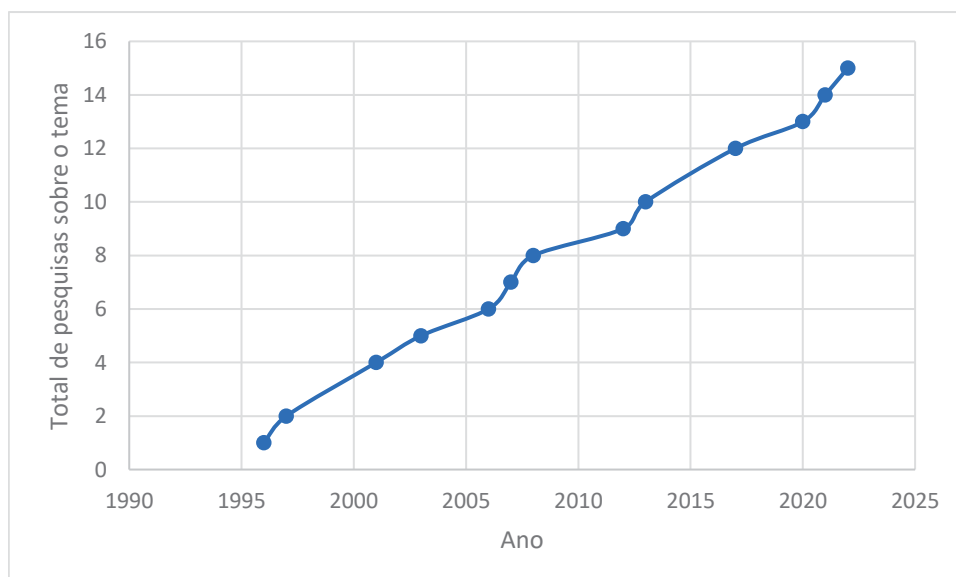
3.10	ANÁLISE BOX PLOT DA RAZÃO ENZIMÁTICA ÓTIMA	57
4	RESULTADOS	59
4.1	RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DE HIDRÓLISE DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO	59
4.2	RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO	60
5	DISCUSSÃO	72
5.1	DISCUSSÃO DAS SIMULAÇÕES DA HIDRÓLISE DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO	72
5.2	DISCUSSÃO SOBRE OS RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO	73
6	CONCLUSÃO	76
7	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

1.1 INTRODUÇÃO

O interesse em modelos matemáticos de ações enzimáticas em polímeros, como a pectina, o amido e a celulose, tem crescido recentemente (WILLIAMS et al., 2001; HUNT; CAMERON; WILLIAMS, 2006; PEREIRA et al., 2017; NAKATANI, 1996; NAKATANI, 1997; ISHIKAWA et al., 2007; MARCHAL et al., 2003; BESSELINK et al., 2008; KUMAR; MURTY, 2013; WOJCIECHOWSKI; KOZIOL; NOWORYTA, 2001; ASZTALOS et al., 2012; KUMAR; MURTY, 2017; PERSI DE SOUZA, 2020; MOREIRA et al., 2021; PERSI DE SOUZA; FONATNA, 2022), com alguns estudos inclusive propondo seu próprio modelo assim como pode ser observado na Figura 1.1, porém os trabalhos encontrados na literatura não são capazes de abranger uma gama de reações diferentes, geralmente se focando em apenas um tipo de reação, ou apresentam considerações que os impedem de serem utilizados no projeto de equipamentos (WILLIAMS et al., 2001; WOJCIECHOWSKI et al., 2001; HUNT; CAMERON; WILLIAMS, 2006; AZTALOS et al., 2012; KUMAR; MURTHY, 2013; PEREIRA et al., 2017; PERSI DE SOUZA, 2020; MOREIRA et al., 2021), gerando a necessidade de se desenvolver uma metodologia com uma abordagem geral para modelar reações enzimáticas de polímeros em solução.

FIGURA 1.1- NÚMERO TOTAL DE PESQUISAS QUE PROPÕEM MODELOS MATEMÁTICOS DE AÇÕES ENZIMÁTICAS EM POLÍMEROS AO LONGO DOS ANOS



FONTE: O autor

Para se criar esse tipo de modelo, é necessário encontrar uma reação que possua todas as complexidades comumente encontradas em reações poliméricas para servir como base. De preferência, esse modelo base também deve beneficiar a indústria que utiliza esse tipo de reação.

Levando esses fatores em consideração, a hidrólise da pectina em ácido D-galacturônico é uma reação promissora para servir de base para o modelo. Essa hidrólise traz todas as complexidades que um modelo de hidrólise de polímeros deve ser capaz de processar, sendo esses o tamanho do polímero, a presença de subprodutos e ser uma reação multi-enzimática (JOLIE et al., 2012). Não apenas isso, mas o Brasil é capaz de produzir oito vezes a demanda mundial de pectina apenas com o resíduo da indústria de suco de laranja (USDA, 2021) e uma grande parcela dessa pectina acaba sendo descartada como bagaço (CIRIMINNA et al., 2015). Caso essa pectina seja hidrolisada, ela se torna o ácido D-galacturônico que é um reagente base de diversos produtos de interesse como o ácido múcico, o ácido L-galactônico e o ácido L-ascórbico (RICHARD; HILDITCH, 2009). Um modelo dessa reação permitiria a otimização desse processo, o que tornaria o processo mais economicamente viável.

Atualmente existem duas rotas para a hidrólise da pectina. A rota ácida, que apresenta alguns problemas graves como a necessidade de ser realizada em altas temperaturas, requer grandes concentrações de ácidos e possui um elevado tempo de reação, o que acaba levando à degradação do produto final (GARNA et al., 2006). E a rota enzimática que, além de possuir um custo inicial elevado, é um processo extremamente complexo catalisado por uma mistura enzimática que atua simultaneamente e gera uma quantidade grande de intermediários de reação, o que dificulta sua modelagem e otimização (BIZ et al., 2014).

Conforme apontado por Pereira et al. (2017), um modelo da rota enzimática permitiria a otimização desse processo, tornando-a mais economicamente viável. Porém, como dito anteriormente, o esquema de reações da hidrólise da pectina é extremamente complexo, devido ao grande número de reações, enzimas e intermediários diferentes e, por conta disso, ao tentar descrever matematicamente essa rota, acaba-se gerando muitas equações diferenciais com uma quantidade muito

grande de termos. Esses fatores tornam a modelagem determinística praticamente impossível, sendo necessário simplificar muito o modelo, perdendo precisão na descrição dessa rota.

Para esse tipo de reação em que a modelagem determinística é inviável é possível utilizar o método de Monte Carlo. Esse método é um tipo de modelagem estocástica que opera de maneira iterativa para diminuir a complexidade do sistema. Por exemplo, para reações enzimáticas são atribuídas probabilidades para cada ação que uma enzima pode realizar e são gerados números aleatórios em cada iteração para prever qual ação acontecerá em determinado passo (PEREIRA et al., 2017).

A modelagem estocástica apresenta diversas vantagens na modelagem da hidrólise de polímeros em solução: é possível representar com precisão substratos complexos e descrever mudanças de fatores durante a reação, como alterações de temperatura e pH. Nesse tipo de modelagem é até possível gerar perfis de formação e consumo de intermediários de formação e prever mudanças nas características das enzimas ao longo do processo, como sua desnaturação, por exemplo (KUMAR; MURTHY, 2013; PERSI DE SOUZA, 2020).

É possível encontrar na literatura alguns modelos estocásticos da hidrólise de substratos pécticos (WILLIAMS et al., 2001; HUNT; CAMERON; WILLIAMS, 2006; PEREIRA et al., 2017; PERSI DE SOUZA, 2020; MOREIRA et al., 2021), porém esses modelos utilizam uma única enzima, ou não operam em função do tempo. E existem modelos estocásticos para a hidrólise de outros polímeros que utilizam misturas enzimáticas (WOJCIECHOWSKI et al., 2001; AZTALOS et al., 2012; KUMAR; MURTHY, 2013), porém esses modelos são incapazes de determinar as atividades enzimáticas de maneira correta, ou são inaplicáveis para situações fora do modelo proposto. Devido à falta de um modelo preciso, existe a necessidade de se criar um modelo multi-enzimático para a hidrólise da pectina capaz de obter corretamente os tempos de reações e que possibilite a otimização das condições de reação para posterior aplicação na indústria.

No presente trabalho, foi desenvolvido um modelo estocástico baseado no método de Monte Carlo, capaz de modelar a hidrólise dos ácidos oligogalacturônico e poligalacturônico por uma combinação das enzimas endopoligalacturonase e

exopoligalacturonase e a hidrólise da pectina por uma combinação das enzimas endopoligalacturonase e exopoligalacturonase. O modelo usa constantes de especificidade de cada enzima, em conjunto com as constantes de saturação, para descrever as reações no tempo. Também foi feita a otimização das condições do modelo visando encontrar o tempo mínimo de reação através da concentração ótima de catalisadores, sendo a otimização desse tipo de reação algo inédito na literatura.

1.2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver ferramentas para viabilizar a obtenção de um modelo matemático da hidrólise total no tempo de polímeros utilizando misturas enzimáticas e otimização das condições de reação.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Descrever a ação de uma mistura de enzimas composta por diferentes proporções de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases nos ácidos poligalacturônico e oligogalacturônico através do Método de Monte Carlo adaptado, avançando no tempo;
- 2 Analisar o comportamento da reação de hidrólise nos ácidos poligalacturônico e oligogalacturônico com diferentes frações da mistura das enzimas endopoligalacturonase e exopoligalacturonase.
- 3 Otimizar a proporção enzimática na reação de hidrólise dos ácidos poligalacturônico e oligogalacturônico.

1.2.3 JUSTIFICATIVAS

A necessidade de um modelo estocástico capaz de simular a hidrólise enzimática de polímeros, com enfoque na pectina, existe pois os modelos encontrados na literatura apresentam problemas que os impedem de serem aplicados diretamente à indústria, sendo os modelos determinísticos atuais da hidrólise de derivados da pectina muito simplificados (TODISCO; CALABRÒ; IORIO, 1994; BACIU; JÖRDENING, 2004; KHAMSEH; MICCIO; FERRARI, 2013) e os modelos estocásticos trabalham com uma única enzima e substrato (NAKATANI et al., 2001; HUNT; CAMERON; WILLIAMS, 2006), um único tipo de enzima (PEREIRA et al., 2017;

MOREIRA et al., 2021), ou trabalham em função do grau de avanço da reação (PERSI DE SOUZA, 2020). Já os modelos de hidrólise enzimática de polímeros usando como catalisador uma mistura enzimática só podem ser aplicados em um substrato específico (KUMAR; MURTHY, 2013), só podem simular uma única condição (WOJCIECHOWSKI et al., 2001), ou não podem ser reproduzidos (AZSTALOS, 2012).

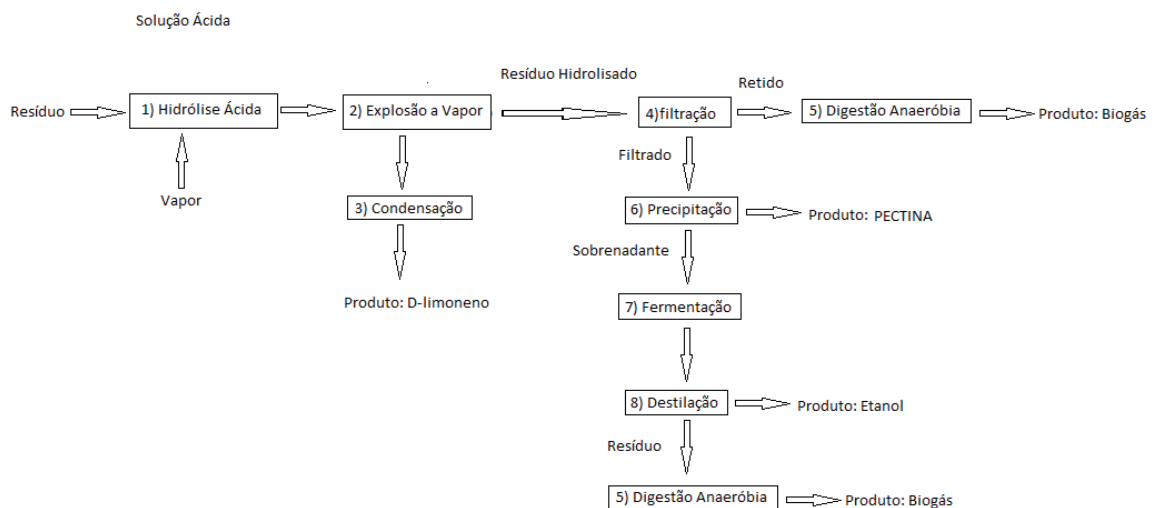
A escolha da homogalacturonana como substrato para a modelagem, ao invés da pectina, foi feita pois a maior parte das ramificações desse substrato tem suas ligações quebradas durante o processo industrial da produção do suco de laranja, restando praticamente a cadeia linear de unidades de ácido D-galacturônico e alguns grupamentos metil ligados à estrutura (CIRIMINNA et al., 2015), sendo que a pequena quantidade de ramificações diferente dos grupamentos metil é reduzida ainda mais durante o processo de extração da pectina (RICHARD; HILDITCH, 2009). Dessa maneira, julgou-se que a homogalacturonana seria uma representação mais próxima do substrato que sofreria a hidrólise em uma biorrefinaria de polpa cítrica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIORREFINARIA DE POLPA CÍTRICA

Biorrefinarias de polpa cítrica são um novo conceito que foi proposto pela primeira vez em 2010 para tentar agregar valor a esse resíduo, visando integrar diversas operações unitárias para transformar a polpa da laranja em energia e produtos químicos de interesse, como pode ser observado na Figura 1.1 (POURBAFRANI et al., 2010; LOPEZ; LI; THOMPSON, 2010; BIZ, 2015).

FIGURA 2.1 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE UMA BIORREFINARIA DE POLPA CÍTRICA



FONTE: PERSI DE SOUZA (2020).

Atualmente, quase todo o resíduo da produção do suco de laranja é descartado, gerando gastos para todos os envolvidos na produção (POURBAFRANI et al., 2010; RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013). Do pouco que é aproveitado, a maior parte é processada para se tornar ração para gado, um destino economicamente inviável, visto que a polpa da laranja possui pelo menos 75% de umidade sendo necessário que ela passe por um processo de secagem para se tornar ração, aumentando muito o custo do processo como um todo (POURBAFRANI et al., 2010; RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013; BIZ, 2015).

O Brasil atingiu uma produção de 1,2 milhões de toneladas de suco de laranja

a 65 °Bx na safra de 2020/2021, sendo o maior produtor de suco de laranja do mundo, com 67% da produção mundial de 1,8 milhões de toneladas (USDA, 2021). A polpa cítrica, em massa seca, constitui 10% da massa de um laranja em média e é composta da polpa, casca e sementes (LOHRASBI et al., 2010). Essa polpa é constituída majoritariamente de pectina, celulose e açúcares (POURBAFRANI et al., 2010; BIZ, 2015). Conforme pode ser observado na Tabela 1.1, a pectina é o principal componente desse resíduo, constituindo 25% de sua composição (Pourbafrani et al., 2010).

TABELA 2.1 – COMPOSIÇÃO EM MASSA SECA DA POLPA CÍTRICA

Componente	Porcentagem
Pectina	25,00%
Celulose	22,00%
Frutose	12,00%
Hemicelulose	11,09%
Glucose	8,10%
Proteína	6,07%
Limoneno	3,78%
Cinzas	3,73%
Sacarose	2,80%
Lignina	2,19%
Outros	3,24%

FONTE: Adaptado de POURBAFRANI et al. (2010).

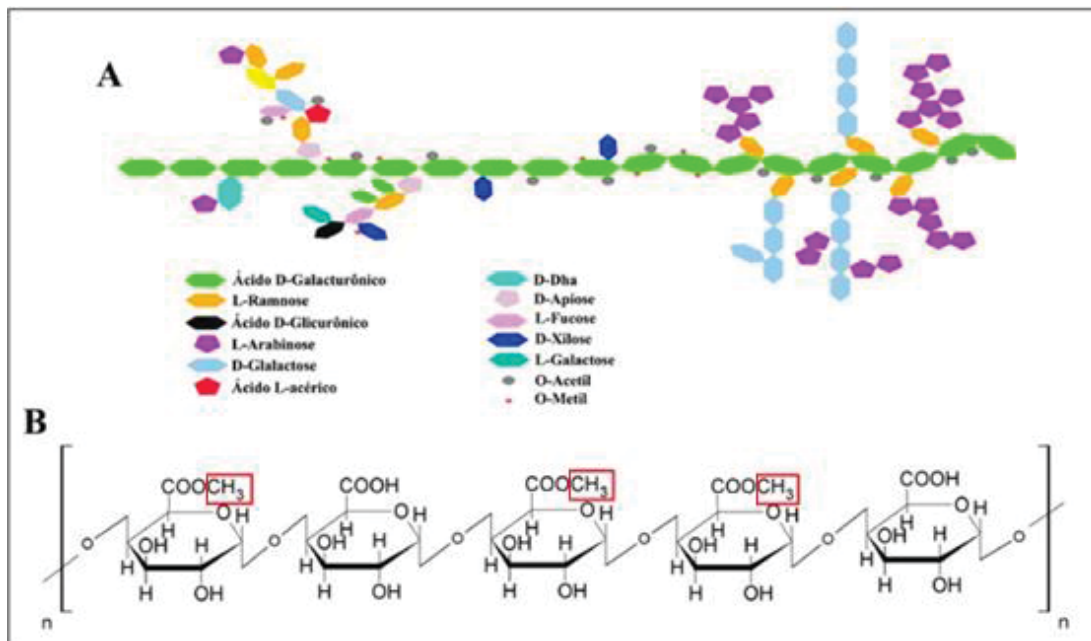
Essa polpa da laranja produzida em território brasileiro poderia ser processada nas biorrefinarias para gerar produtos de interesse, tais como: o D-limoneno, que pode ser utilizado, por exemplo, como flavorizante (LOPEZ; LI; THOMPSON, 2010) e os biocombustíveis, o biogás e o etanol que podem tanto ser comercializados como fonte de energia quanto reaproveitados na própria planta (POURBAFRANI et al., 2010).

2.2 PECTINA E ÁCIDO D-GALACTURÔNICO

A pectina é um heteropolissacarídeo (sacarídeo composto por mais de um tipo

de açúcar) composto pelo ácido D-glicurônico, ácido L-acérico e majoritariamente pelo ácido D-galacturônico, conforme pode ser observado na Figura 1.2 (SANTI et al., 2014; VORAGEN et al., 2009). Ela foi documentada pela primeira vez em 1825 por Henri Braconnot (BROCONNOT, 1825). Atualmente a pectina é comercializada em forma de pó e é primariamente utilizada na indústria de alimentos e farmacêutica como agente espessante (SANTI et al., 2014; PERSI DE SOUZA, 2020).

FIGURA 2.2 – ESTRUTURA GERAL DA PECTINA. A Figura A mostra os diferentes polissacarídeos encontrados na pectina e a Figura B mostra a estrutura principal da pectina (conhecida como homogalacturonana) que é composta pelo ácido poligalacturônico com grupamentos metil ligados aleatoriamente em sua estrutura (realçados em vermelho na figura).



FONTE: SANTI et al. (2014).

Segundo Pourbafrani et al. (POURBAFRANI et al., 2010), em média, 25% da massa em base seca da polpa da laranja é pectina, sendo que as primeiras concepções das biorrefinarias de polpa cítrica visavam como produto final o etanol e a pectina (RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013). Porém, atualmente, estima-se que o Brasil é capaz de produzir oito vezes a demanda mundial de pectina se processasse os resíduos da indústria do suco de laranja (USDA, 2021), sendo boa parte desses resíduos descartados sem nenhum tipo de tratamento que agregue valor (CIRIMINNA

et al., 2015).

É previsto um aumento na demanda da pectina nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e de polímeros, porém essa nova demanda não deve ser capaz de utilizar toda a pectina que o Brasil é capaz de produzir (CIRIMINNA et al., 2015; CHAN et al., 2017). Sendo assim, a produção e comercialização da pectina bruta não seria de interesse.

Conforme foi apontado por Pereira et al. (PEREIRA et al., 2016), a pectina é constituída majoritariamente pelo ácido D-Galacturônico, que representa cerca de 70% de sua composição (MOHNEN, 2008). Levando isso em consideração, a produção do ácido D-galacturônico pode ser uma ferramenta para a viabilização das biorrefinarias de polpa cítrica.

O ácido D-galacturônico é constituído por um grupamento ácido e um monossacarídeo do tipo aldose, sendo classificado como um ácido urônico. Em uma molécula de pectina, ele compõe a cadeia principal da estrutura na forma de homogalacturonana. A homogalacturonana nada mais é do que uma cadeia de monômeros do ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -1,4, com grupamentos metil distribuídos aleatoriamente ao longo da estrutura (RICHARD; HILDITCH, 2009).

A comercialização do ácido D-galacturônico puro não é muito atraente economicamente pois ele é apenas utilizado como agente quelante (WIEBE et al., 2010). Porém o ácido D-galacturônico é utilizado como base para a produção de diversos produtos de interesse como o ácido L-ascórbico (KUIVANEN; PENTTILÄ; RICHARD, 2015), o ácido *meso*-galactárico (MOJZITA et al., 2010) e o ácido L-galactônico (KUIVANEN et al., 2012; KUIVANEN et al., 2014). O ácido D-galacturônico pode até ser processado em etanol alterando a via metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BIZ et al., 2016).

2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO

A reação à qual a cadeia principal da pectina composta por monômeros do

ácido D-galacturônico, também conhecida como ácido poligalacturônico, é submetida para se transformar em ácido D-galacturônico é chamada de reação de hidrólise total (GARNA et al., 2006).

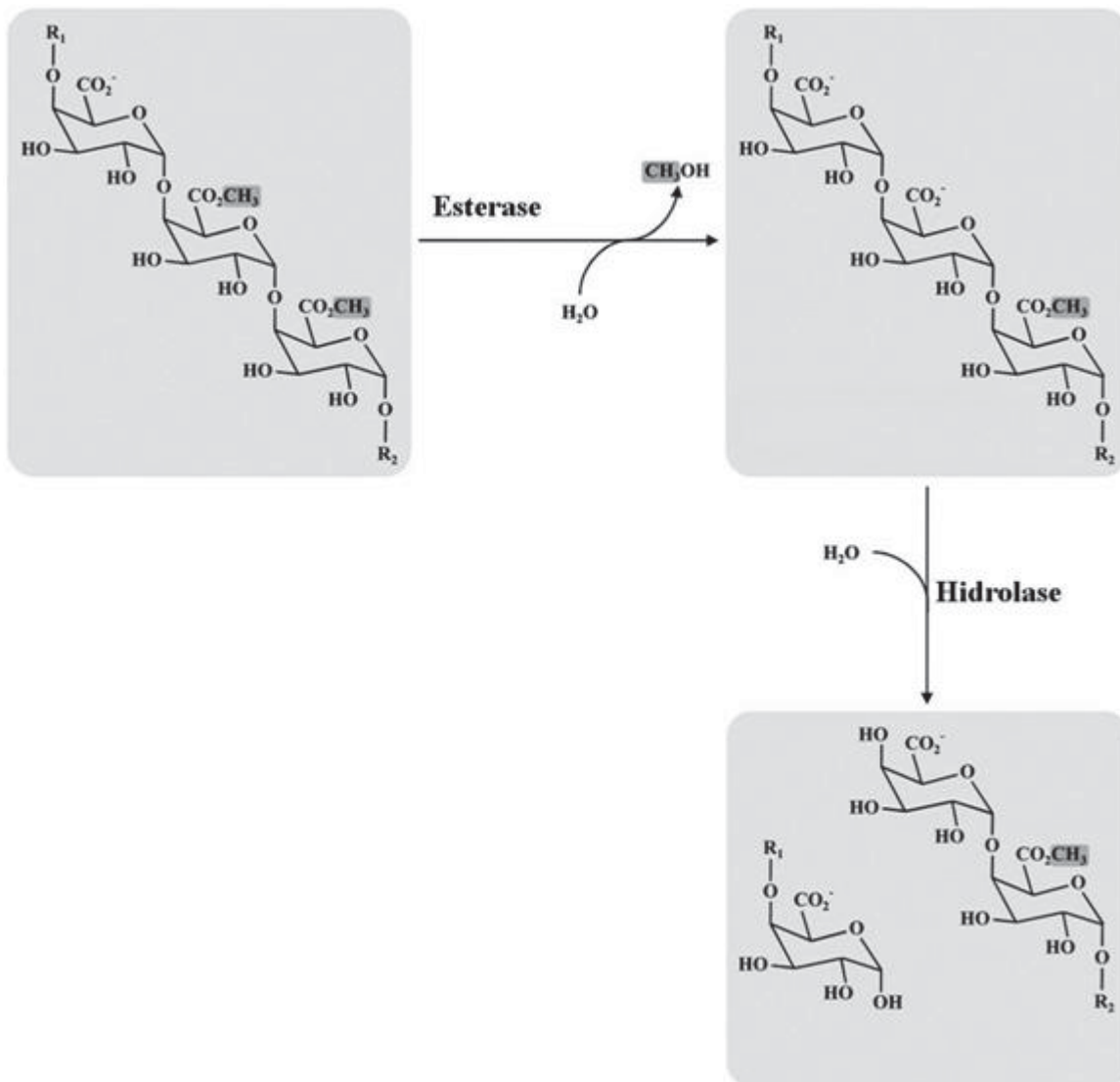
A reação de hidrólise total do ácido poligalacturônico pode ser feita através de duas rotas: ácida e enzimática, sendo que cada rota traz consigo complicações em sua aplicação. A via ácida precisa de altas concentrações de ácido, podendo chegar a 2 mol/Litro do catalisador, e altas temperaturas, de até 373 K. Essas condições de operação levam a uma significativa degradação do ácido D-galacturônico (GARNA et al., 2006). Já a rota enzimática possui um custo inicial maior e é extremamente complexa, porém opera em condições mais amenas, sem correr o risco de degradar o produto final (GARNA et al., 2006).

As enzimas responsáveis por catalisar reações que envolvem a pectina são chamadas de enzimas pectinolíticas e são divididas em dois grupos: esterases e depolimerases. As esterases removem os grupos metil das regiões esterificadas da homogalacturonana, transformando-a em ácido poligalacturônico. Enquanto as depolimerases diminuem o grau de polimerização da cadeia principal da pectina (RICHARD; HILDITCH, 2009).

As depolimerases são classificadas em exo-enzimas quando rompem ligações na extremidade do polímero, ou endo-enzimas quando rompem ligações no interior da cadeia. As depolimerases são ainda divididas em dois grupos dependendo do tipo de reação que elas promovem. Se a enzima romper a ligação glicosídica α -1,4 que une duas unidades do ácido D-galacturônico, liberando uma molécula de água e deixando uma molécula do ácido D-galacturônico insaturado, ela é classificada como uma liase. Caso a enzima rompa a mesma ligação α -1,4 inserindo uma molécula de água no substrato durante o processo, assim mantendo as moléculas de ácido D-galacturônicos saturadas, ela é classificada como hidrolase (RICHARD; HILDITCH, 2009).

A Figura 1.3 apresenta um esquema da ação das enzimas do tipo hidrolase e esterase, que foram o foco deste estudo, agindo sobre a homogalacturonana.

FIGURA 2.3 – ESQUEMA DA AÇÃO ENZIMÁTICA SOBRE A HOMOGALACTURONANA. A homogalacturonana é um ácido poligalacturônico com grupamentos metil ligados aleatoriamente em sua estrutura (grifados em cinza na figura).



FONTE: PERSI DE SOUZA (2020).

2.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DETERMINÍSTICA DA HIDRÓLISE DE PECTINA E DE SEUS DERIVADOS

A criação de modelos matemáticos pode ser uma das peças-chaves na viabilização da indústria de refinamento do bagaço da laranja. Eles podem ser utilizados em diversas áreas como no projeto de reatores visando o tempo ótimo de

reações, na determinação da cinética das reações e no balanço de massa e energia. Esses modelos podem ser a ferramenta que tornará todo o processo economicamente viável (RIVAS-CANTU; JONES; MILLS, 2013).

Atualmente, existem dois tipos de modelos matemáticos que descrevem reações: o modelo determinístico, que utiliza equações diferenciais para descrever fenômenos, e o estocástico, que utiliza de probabilidades para descrever um sistema (PERSI DE SOUZA, 2020).

Conforme apontado por Pereira et al. (2016) e Persi de Souza (2020), na literatura, há três modelos determinísticos que tentam descrever a hidrólise enzimática do ácido poligalacturônico, com abordagens que variam de descrever a hidrólise em uma única etapa, utilizando também uma enzima aparente para descrever a mistura enzimática (BACIU; JÖRDENING, 2004; KHAMSEH; MICCIO; FERRARI, 2013), até tentativas de descrever as reações com geração e consumo de intermediários, porém utilizando uma única enzima no processo (TODISCO; CALABRÒ; IORIO, 1994).

Os modelos propostos por Baciú e Jördening (2004) e por Khamseh, Miccio e Ferrari (2013) são muito semelhantes. Ambos os modelos simulam a hidrólise da pectina em ácido D-galacturônico em uma única etapa, sem a formação e consumo de intermediários. Além disso, apesar de se tratar de uma reação com um catalisador multi-enzimático, as enzimas são tratadas como uma única enzima para descrever as reações.

Esses dois modelos apresentam os mesmos problemas. Por não levarem em conta a presença de intermediários, eles são incapazes de descrever o impacto que eles causam nas reações durante o processo. Outra limitação grave desses modelos é a necessidade de se refazer todos os experimentos caso seja necessário alterar as condições iniciais do sistema, pois uma alteração nas proporções enzimáticas pode gerar cinéticas de reação completamente diferentes, por exemplo (PERSI DE SOUZA, 2020).

O modelo proposto por Todisco, Calabrò e Iorio (1994) é o único que é capaz de simular a geração e consumo de produtos intermediários, apesar de fazê-lo

utilizando uma única enzima como catalisador (PEREIRA et al., 2016). Esse modelo simula a ação da endopoligalacturonase no ácido poligalacturônico prevendo a formação de oligômeros ao longo do processo. Porém, para o modelo ser viável, foi necessário fazer simplificações. Todisco, Calabrò e Iorio (1994) dividiram os intermediários de reação em quatro intervalos de peso e propuseram um esquema de reação em que cada intervalo é capaz de ser hidrolisado e ser convertido em substratos de qualquer intervalo mais leve do que ele.

O modelo proposto por Todisco, Calabrò e Iorio (1994) é o mais completo em termos de capacidade de descrever as reações e é capaz de simular a formação dos produtos em termos de massas molares. Porém ele não é capaz de ser aplicado na indústria pois, por não descrever todos os intermediários de reação, ele não consegue descrever precisamente a cinética enzimática, além disso, ele apenas simula a ação de uma única enzima, um fator detrimental para a elaboração de um modelo aplicável da reação de hidrolisação da pectina.

Devido à alta complexidade das reações de hidrólise enzimática da pectina e seus derivados, decorrente da dificuldade em determinar a posição de ação da enzima, da formação de uma quantidade muito grande de intermediários de reação e da necessidade de se usar diversas enzimas simultaneamente como catalisadores, os modelos matemáticos determinísticos atuais não são capazes de descrever precisamente a reação. Os modelos encontrados na literatura foram criados usando diversas aproximações e simplificações, sendo ferramentas inviáveis de serem aplicadas como meio de otimização em uma biorrefinaria (PERSI DE SOUZA, 2020).

2.5 MODELAGEM DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS PELO MÉTODO ESTOCÁSTICO COM UMA ENZIMA

Diferente do método determinístico, que usa equações diferenciais, o método estocástico se baseia em eventos aleatórios e probabilidade para poder descrever sistemas complexos de maneira viável. Na modelagem de reações enzimáticas, por exemplo, é possível utilizar o método de Monte Carlo (um tipo de modelagem estocástica). Nesse método, as ações que podem acontecer durante a reação são

definidas como passos e a modelagem avança em termo de iterações, que são os conjuntos de todos os possíveis passos que descrevem o que está acontecendo com o sistema naquele período de tempo. Dentro das iterações, cada passo tem uma probabilidade associada que representa a chance desse passo acontecer em determinada iteração. Então uma variável aleatória é gerada para determinar quais passos acontecerão na determinada iteração, os passos são então realizados e uma nova iteração começa (NAKATANI, 1997; PERSI DE SOUZA, 2020).

Na modelagem de reações enzimáticas, os passos são as possíveis ações que uma enzima pode tomar em determinada iteração (NAKATANI, 1997). A probabilidade de cada ação ocorrer deverá depender, majoritariamente, da concentração do substrato em interação com a enzima e da tendência inata da enzima de realizar a determinada ação (como catalisar uma reação específica) (JOHNSON, 2008). Com todas as ações definidas, suas probabilidades são atribuídas e um número aleatório é gerado para ditar quais ações serão tomadas em determinada iteração.

Atualmente existem quatro modelos estocásticos que descrevem a ação da endopoligacturonase em substratos derivados da pectina. O modelo de Williams et al. (2001) simula a hidrólise da homogalacturonana. Hunt, Cameron e Williams (2006) simularam a hidrólise do ácido oligogalacturônico com 17 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia, o modelo de Pereira et al. (2017) simulou as hidrólises dos ácidos oligogalacturônico e poligalacturônico (contendo 7 e 200 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia principal respectivamente) e o modelo de Moreira et al. (2021) simulou a hidrólise do ácido oligogalacturônico com 17 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia.

O modelo de Williams et al. (2001) foi proposto originalmente como uma ferramenta de exploração dos sítios ativos da endopoligalacturonase. Cada iteração do modelo se baseava em duas etapas, primeiro a enzima se ligava em um substrato e na segunda etapa era feita a quebra de ligação. Williams et al. (2001) utilizou um parâmetro denominado por ele como “Cleavage Frequency” para definir a tendência inata da endopoligalacturonase. Esse parâmetro é capaz de fornecer apenas as especificidades relativas das ações de uma enzima em um único tipo de substrato, pois ele é determinado a partir de experimentos com o substrato puro, sem qualquer

interferência de outros substratos no meio. Porém a reação de hidrólise da homogalacturonana gera e consome diversos intermediários de reação, logo o parâmetro “Cleavage Frequency” é incapaz de descrever com precisão as tendências inatas da enzima.

De maneira análoga ao modelo de Williams et al. (2001), modelo proposto por Hunt, Cameron e Williams (2006) utilizou o parâmetro “Cleavage Frequency” para tentar descrever o padrão de comportamento da endopoligalacturonase. O modelo apresenta os mesmos problemas de seu contemporâneo, pois a reação de hidrólise do ácido oligogalacturônico também gera diversos intermediários de reação tornando o parâmetro “Cleavage Frequency” ineficiente nessa modelagem.

O modelo de Pereira et al. (2017) usa uma única etapa em suas iterações e usa constantes de especificidade relativa entre todas as reações possíveis para descrever as ações possíveis de uma enzima em cada iteração da hidrólise, sendo essas constantes obtidas a partir do método de “fingerprinting” proposto por Pereira et al. (2016). Esse modelo apresenta algumas vantagens, por possuir uma única etapa por iteração, o gasto computacional das simulações diminui e seus parâmetros são capazes de descrever as interações entre a enzima e os diferentes substratos presentes no meio. Porém o modelo opera com o grau de avanço da reação, ao invés do tempo, tornando-o inviável de ser aplicado na indústria.

O modelo proposto por Moreira et al. (2021) simulou duas reações, a hidrólise de oligômeros da β -1,6-N-acetilglucosamina tendo como catalisador a enzima DispersinB e a hidrólise de oligômeros do ácido galacturônico tendo como catalisador a enzima endopoligalacturonase. Moreira et al. (2021) também propôs uma demonstração de como transformar o modelo para operar em um sistema multi-enzimático tendo como base a reação de hidrólise do ácido oligogalacturônico metil-esterificado tendo como catalisador as enzimas endopoligalacturonase e esterase.

Durante as modelagens, Moreira et al. (2021) utilizou parâmetros condizentes com a cinética enzimática clássica, como constantes de saturação e constantes de especificidade relativa, em conjunto com o número total de moléculas da enzima e do substrato para simular a reação.

O modelo de Moreira et al. (2021) ocorre através dos seguintes passos: primeiro são definidos os valores das constantes e das condições iniciais, então as concentrações são convertidas em número de moléculas. Após as etapas iniciais, um número aleatório é gerado para definir qual reação irá ocorrer. Com a reação definida, o tempo da reação é calculado e o sistema é atualizado com as novas condições, encerrando a iteração. Caso haja ligações atacáveis pela enzima, é selecionada uma nova reação para a iteração atual, caso não haja, o sistema é convertido de número de moléculas para concentração e a simulação se encerra. Para a situação com mais de uma enzima, o autor propôs a adição de mais um passo em que é selecionado qual enzima agirá em dada iteração.

Mesmo que o modelo de Moreira et al. (2021) use parâmetros condizentes com a cinética enzimática clássica e seja capaz de modelar com precisão sistemas aquosos com uma única enzima, a proposta do autor não é ideal para modelos multi-enzimáticos. O problema de definir qual enzima agirá em uma iteração é que, durante as reações, as enzimas estão agindo simultaneamente no sistema. Não apenas isso, mas evoluir o sistema no tempo de acordo com a velocidade dos ataques enzimáticos, gerará um grau de complexidade desnecessário quando se for operar com mais de uma enzima, pois as velocidades de ataque serão diferentes. Nessas situações, é melhor definir um intervalo de tempo e deixar as enzimas agirem de maneira independente no sistema.

2.6 MODELAGEM DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS PELO MÉTODO ESTOCÁSTICO COM MÚLTIPLAS ENZIMAS

No momento, existe apenas um modelo proposto para a hidrólise multi-enzimática de substratos pécticos utilizando uma abordagem estocástica (PERSI DE SOUZA, 2020), porém existem três modelos propostos para outros polímeros com essa abordagem. Desses modelos, dois são para a hidrólise multi-enzimática da celulose (AZTALOS et al., 2012; KUMAR; MURTHY, 2013) e um modelo foi proposto para a hidrólise multi-enzimática do amido (WOJCIECHOWSKI et al., 2001).

O modelo de Kumar e Murthy (2013) visou simular a hidrólise multi-enzimática da celulose, com enfoque na representação da molécula da celulose. Essa molécula foi representada como um conjunto de microfibras, essas por sua vez eram formadas por fibras elementares. Por fim, essas fibras foram representadas computacionalmente como matrizes tridimensionais de moléculas de glucose (6-(hidroximetil)oxano-2,3,4,5-tetrol).

Durante as simulações, foi utilizada como catalisador uma mistura enzimática de 8 tipos diferentes de enzimas. Essas enzimas foram separadas de acordo com os seguintes fatores: o tipo da enzima (endocelulase, exocelulase, ou β -glucosidase), a processividade da enzima e a presença de um módulo de ligação a carboidratos (CBM). Além disso, Kumar e Murthy (2013) determinaram que os fatores que determinam a velocidade das reações podiam ser subdivididos em três: os fatores intrínsecos que são exclusivos das características das enzimas (atividade e estabilidade, por exemplo), os fatores extrínsecos que são exclusivos do substrato (cristalinidade e quantidade de espaços vazios, por exemplo) e fatores externos que são capazes de alterar a atividade enzimática (pH e temperatura, por exemplo). Utilizando esses fatores, a quantidade de enzimas de um determinado tipo presente e a quantidade de ligações hidrolisáveis em uma microfibra, os autores determinaram a quantidade máxima de reações que uma determinada enzima pode realizar por minuto e a quantidade máxima de reações que uma determinada enzima pode realizar por minuto em uma determinada microfibra.

O modelo proposto por Kumar e Murthy (2013) procedeu da seguinte maneira: a primeira enzima é selecionada e tem seu número máximo de ligações que podem ser hidrolisados em todas as microfibras presentes calculado. Os possíveis locais de ataque da enzima recebem uma probabilidade distribuída uniformemente, então um número aleatório é gerado e comparado com o valor dos possíveis locais de ataque para se determinar onde o ataque irá ocorrer. Com a posição definida, é feita a checagem da capacidade da enzima de catalisar a reação naquele ponto. Caso a enzima seja capaz de catalisar, a reação acontece e é checado se o tempo proposto de 1 minuto foi atingido. Caso a enzima não seja capaz de catalisar, ou após a reação, um novo número aleatório é gerado. Ao atingir o tempo proposto, ou todas as reações catalisáveis pela enzima se esgotarem, a iteração se encerra e uma nova iteração

começa com uma nova enzima. Esse procedimento se repete até que todas as enzimas tenham agido.

Apesar dessa simulação usar uma mistura multi-enzimática, ela apresenta alguns problemas que a impossibilitam de serem aplicadas em outras situações. As enzimas são representadas como grupos, divididas por suas funções, logo qualquer alteração no catalisador requer que sejam feitos novos experimentos para determinar seus parâmetros. Esse modelo também não leva em conta possíveis interações entre enzimas, como interações competitivas, ou uma enzima tornando um sítio, catalisável previamente, inacessível (o que é uma suposição razoável considerando o tamanho de uma molécula de celulose e o curto tempo proposto). O intervalo escolhido pelos autores é tão pequeno que eles também optaram por ignorar problemas que podem surgir em reações mais longas, como a desativação da enzima. Por causa desses problemas, é pelo fato de a molécula de celulose ser tão grande que a simulação não considera o sistema em solução aquosa, esse modelo se torna inviável de ser aplicado em outras reações.

O modelo proposto por Asztalos et al. (2012) para a hidrólise multi-enzimática da celulose apresenta uma vantagem significativa em relação ao modelo de Kumar e Murthy (2013): ele usa parâmetros da cinética clássica para determinar a atividade enzimática, o que significa que eles são mais facilmente encontrados na literatura, eliminando a necessidade de obtê-los experimentalmente a cada alteração das condições do modelo. Os parâmetros utilizados são k_{on} e k_{off} para modelar a ligação e dissociação da enzima-substrato, k_{cat} para modelar a hidrólise das ligações durante a reação e k_{break} para modelar a quebra das ligações de hidrogênio. O maior problema do modelo de Asztalos et al. (2012) é que não foi descrito de maneira explícita como os parâmetros são utilizados para descrever a reação, a única menção sobre a descrição da reação é que o modelo foi criado a partir de um processo de Poisson usando uma versão direta do algoritmo de Gillespie (GILLESPIE, 1976; PERSI DE SOUZA, 2020). Sendo assim é impossível replicar o modelo, ou tentar aplicá-lo a outro tipo de reação.

O modelo proposto por Wojciechowski et al. (2001) simulou a hidrólise total do amido usando como catalisador uma mistura multi-enzimática composta por α -

amilases, β -amilases e glucoamilases. Seu modelo usava um único parâmetro para descrever a ação das enzimas denominado “enzyme working times”.

No modelo, cada molécula de amido foi descrita separadamente, com cada monômero de glucose tendo dois números atrelados a ele. O primeiro número indicava se ele é a ponta do polímero, variando entre zero e um. Caso o monômero recebesse o número zero, significava que ele é a ponta da cadeia principal e caso o monômero recebesse o número um, significava que ele estava ligado a dois outros monômeros de glucose. O segundo número atrelado aos monômeros indicava o tamanho da ramificação ligada a ele, podendo ser qualquer número pertencente aos naturais, incluindo o zero. Por fim, foi determinado o parâmetro “enzyme working times” para cada enzima que representa o tempo total de reação que a enzima catalisou desde o início da simulação, sendo esse parâmetro zerado para todas as enzimas no tempo $t = 0$ (WOJCIECHOWSKI et al., 2001).

Com os substratos descritos e os parâmetros definidos, a iteração da simulação começa com a seleção da enzima que agirá. Essa seleção é feita a partir dos valores de “enzyme working time”, sendo a enzima com o menor valor selecionada. Caso haja enzimas com o mesmo valor, a enzima com a menor média aritmética simples das suas velocidades de reação é a selecionada. Após a seleção da enzima, o local de ataque é escolhido através de uma distribuição aleatória. Esse local é avaliado para definir se uma reação pode ocorrer ali, ou se existe algum tipo de inibição. Caso a reação seja possível, ela é simulada e o tempo total da reação é acrescentado ao valor do “enzyme working time” daquela enzima, caso contrário, a reação não acontece e o tempo de um ciclo não produtivo é acrescentado ao valor do “enzyme working time”. O sistema então recebe os novos valores dos parâmetros e a nova condição dos substratos e a próxima iteração se inicia com a seleção da nova enzima com o menor “enzyme working time”.

Como o método de determinação do parâmetro “enzyme working time” não foi descrito por Wojciechowski et al. (2001), é possível replicar o modelo, porém não há como aplicá-lo a outras reações com condições diferentes.

O modelo proposto por Persi de Souza (2020) simulou as reações de hidrólise

total do ácido poligalacturônico e da homogalacturonana tendo como catalisador da reação uma mistura enzimática com diferentes proporções das enzimas endopoligalacturonase, exopoligalacturonase e esterase. O modelo operou em função do grau de avanço da reação e teve como objetivo principal descrever as velocidades relativas entre as enzimas ao longo da simulação.

Na modelagem Persi de Souza (2020) usou parâmetros condizentes com a cinética de Michaelis-Menten para descrever o comportamento enzimático, tais como: K_M que representa a constante de saturação de uma enzima sobre uma determinada molécula, k_x que representa a constante de especificidade relativa de uma enzima sobre uma determinada molécula e K_I que representa a constante de inibição do produto final em uma enzima. Esses parâmetros foram utilizados em conjunto com a quantidade dos substratos e enzimas em uma determinada fração de reação para descrever a velocidade relativa entre as enzimas e para efetuar as reações.

A simulação do modelo de Persi de Souza (2020) ocorre da seguinte maneira: primeiro são definidas as condições iniciais do sistema (quantidades de enzimas e substratos), depois são definidas as velocidades de reação para todas as reações possíveis de ocorrer na simulação. Com as condições iniciais calculadas, é então calculado a probabilidade de ação de cada enzima presente na mistura, um número aleatório entre 0 e 1 é gerado para definir qual enzima agiria na iteração atual. Com a definição de qual enzima agirá na iteração, é calculado a probabilidade de todas as reações que essa enzima é capaz de realizar, um número aleatório entre 0 e 1 é então gerado para definir qual reação irá ocorrer. O modelo simula então a reação e atualiza as condições iniciais da próxima iteração. Como o modelo atua em função de grau de avanço da reação, o único critério de parada é a hidrólise total do substrato inicial.

Apesar do modelo de Persi de Souza (2020) descrever precisamente a interação entre enzimas e utilizar parâmetros condizentes com a cinética enzimática clássica, o fato dele operar em função do grau de avanço da reação impossibilita o modelo de ser aplicado como ferramenta de design de equipamentos da indústria.

2.7 OTIMIZAÇÃO ESTOCÁSTICA DE REAÇÕES

Modelos estocásticos apresentam algumas peculiaridades que impedem as ferramentas de otimização mais conhecidas de serem boas opções para otimização de reações que usam como função objetivo esse tipo de modelo, fazendo com que esse estudo foque em uma ferramenta de otimização mais especializada para esse caso. O método de Otimização por Enxame de Partícula (PSO) é um algoritmo de otimização potente que já foi aplicado com sucesso em uma ampla variedade de problemas em diversos campos do conhecimento, incluindo engenharia, economia e biologia (KENNEDY; EBERHART, 1995; SHI; EBERHART, 1998; CLERC; KENNEDY, 2002). Sua simplicidade e eficiência tornam esse método uma escolha popular para tentar resolver problemas de otimização em diversos contextos.

A principal razão pela qual o método PSO é uma boa ferramenta para otimização de simulações que tem como função objetivo algoritmos estocásticos é que ele não usa gradientes e derivadas em sua aplicação (CLERC; KENNEDY, 2002). Isso torna o método adequado para problemas em que essas variáveis são difíceis, ou impossíveis, de se calcular. No caso de simulações que usam o Monte Carlo, essa característica é relevante pois a natureza estocástica das simulações pode tornar difícil estimar os gradientes do modelo.

Outra razão que torna o método PSO uma boa ferramenta de otimização para que tem como função objetivo modelos estocásticos baseado no método de Monte Carlo é que o PSO é um algoritmo baseado em comportamento de populações. Isso significa que o método pode explorar a diversidade do comportamento populacional para melhorar a busca da solução ótima (SHI; EBERHART, 1998). No contexto das simulações de Monte Carlo, essa característica pode ser particularmente útil porque a natureza estocástica das simulações pode gerar uma elevada gama de possíveis resultados. Ao usar uma população de partículas para fazer uma busca no espaço de solução, o método PSO pode se aproveitar da diversidade dos possíveis resultados para explorar o espaço de solução em busca da solução ótima com mais eficiência.

Por fim, o método PSO é um algoritmo de fácil implementação (SHI; EBERHART, 1998). Essa característica acaba se destacando no contexto de

simulações que usam o método de Monte Carlo pois o processo de otimização muitas vezes requer diversas iterações para poder alcançar resultados confiáveis. A simplicidade do método PSO o torna fácil de implementar e executar repetidamente, o que pode salvar tempo e recursos quando comparado com métodos de otimização mais complexos.

Levando esses fatores em consideração, esse estudo propôs a otimização de proporções enzimáticas através do método PSO, usando como função objetivo um modelo estocástico baseado no método de Monte Carlo para a hidrólise enzimática de polímeros. O método de otimização foi criado visando obter a máxima formação de produtos alterando a razão enzimática dos catalisadores em um intervalo fixo. Sendo a primeira vez que em que é tentado aplicar um processo de otimização nesse tipo de modelo.

3 METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO DO SISTEMA E HIPÓTESES ADOTADAS

O modelo foi baseado na hidrólise do ácido oligogalacturônico descrito como cadeias lineares do ácido D-galacturônico, catalisado por uma mistura enzimática composta por diferentes proporções de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases.

Os oligômeros do ácido oligogalacturônico foram representados como OGA_n , onde n representa o número de unidades de ácido D-galacturônico contido na molécula

A exopoligalacturonase só pode catalisar um único tipo de reação das moléculas de ácido oligogalacturônico, sendo essa a remoção de uma única unidade do ácido D-galacturônico (OGA_1) da ponta não redutora da cadeia ($OGA_n \rightarrow OGA_{n-1} + OGA_1$) (KLUSKENS et al., 2005).

A endopoligalacturonase pode catalisar qualquer ligação entre unidades de ácido D-galacturônico na molécula. Como as extremidades redutoras das moléculas não foram marcadas nos dados experimentais usados para descrever a ação da endopoligalacturonase, é impossível diferenciar reações que geram as mesmas combinações de produtos. Assim, a hidrólise da ligação glicosídica na posição p , partindo da extremidade redutora e da extremidade não redutora de uma molécula de OGA_n gerará produtos OGA_p e OGA_{n-p} . Para incorporar este comportamento no modelo, as reações catalisadas por esta enzima são definidas pelos produtos gerados e não pela ligação atacada (PEREIRA et al., 2017).

Como condições iniciais, assume-se que o sistema consiste em uma certa concentração do substrato original (C_{OGAn}), uma certa concentração de endopoligalacturonases (C_{ENDO}), uma certa concentração de exopoligalacturonases (C_{EXO}) e excesso de água.

As reações de hidrólise são consideradas irreversíveis e envolvem apenas a enzima e o substrato a ser hidrolisado, o que é uma suposição razoável para reações de hidrólise enzimática em sistemas aquosos.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE REAÇÃO

Em qualquer momento da simulação, a taxa de reação da hidrólise do substrato OGA_n catalisada pela exopoligalacturonase é definida como:

$$r_{EXO_n} = \frac{k_{EXO_n} C_{EXO} C_{OGA_n}}{1 + \sum_{a=1}^x \left(\frac{C_{OGA_a}}{K_{MEXO_a}} \right)} \quad (1)$$

Da mesma forma, a taxa de reação de hidrólise da ligação i em um substrato OGA_n é definida como:

$$r_{ENDO_{n,i}} = \frac{k_{ENDO_{n,i}} C_{ENDO} C_{OGA_n}}{1 + \sum_{a=1}^x \left(\frac{C_{OGA_a}}{K_{MENDO_a}} \right)} \quad (2)$$

Nessas equações, C_{EXO} , C_{ENDO} e C_{OGA_n} são as concentrações totais de exopoligalacturonase, endopoligalacturonase e do substrato de tamanho n , respectivamente, presentes na solução em qualquer instante t . x representa o número de unidades de ácido D-galacturônico que compõem o maior substrato presente em um dado tempo. K_{MEXO_n} e K_{MENDO_n} são as constantes de saturação da exopoligalacturonase e da endopoligalacturonase para reações em um substrato de tamanho n . k_{EXO_n} é a constante de especificidade para a única reação que uma exopoligalacturonase pode realizar em um substrato de tamanho n e $k_{ENDO_{n,i}}$ é a constante de especificidade para a reação que uma endopoligalacturonase pode realizar na ligação i de um substrato de tamanho n . Essas equações são derivadas das abordagens propostas por Mitchell et al. (2008) e Persi de Souza (2020).

3.3 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE AÇÃO DO MODELO E DETERMINAÇÃO DAS PROBABILIDADES DE REAÇÃO

Cada iteração do modelo corresponde à ação de todas as enzimas presentes no sistema em um segundo. Inicialmente, são determinadas todas as possíveis reações que cada enzima pode catalisar. Depois disso, é determinada a probabilidade da enzima catalisar cada uma das reações. Em seguida, um número aleatório é gerado para determinar qual reação ocorrerá naquele intervalo. Por fim, adiciona-se a quantidade de produtos do sistema que foram formados na reação e retira-se a quantidade equivalente de substratos consumidos. Esses valores são calculados considerando a taxa de reação do produto/substrato para cada reação vezes o tempo de iteração.

O intervalo de tempo de um segundo foi escolhido para garantir que as taxas de reação permaneçam relativamente constantes durante a iteração. Recomenda-se ajustar este intervalo de acordo com a quantidade de substratos e catalisadores presentes, bem como os parâmetros das reações que se deseja modelar. Intervalos menores aumentarão significativamente o custo computacional, enquanto intervalos maiores podem levar a grandes mudanças nas taxas de reações durante cada iteração, reduzindo a precisão do modelo.

Para determinar a probabilidade de uma enzima realizar uma determinada reação em um determinado tempo, é necessário levar em consideração a taxa de reação e a quantidade de substratos para aquela reação específica, bem como a taxa de reação e a quantidade de substratos de todas as reações que essa enzima em particular pode realizar. Para o caso da exopoligalacturonase, em que a enzima só pode catalisar uma única reação por substrato, a probabilidade da enzima atacar o substrato de tamanho n (P_{EXOn}) é dada por:

$$P_{EXOn} = \frac{r_{EXOn} C_{OGAn}}{\sum_{a=1}^x (r_{EXOa} C_{OGAa})} \quad (3)$$

Para o caso da endopoligalacturonase, em que a enzima pode catalisar diversas reações em um substrato, a probabilidade da enzima atacar o substrato de tamanho n na ligação i ($P_{ENDOn,i}$) é dada por:

$$P_{ENDOn,i} = \frac{r_{ENDOn,i} C_{OGAn}}{\sum_{a=1}^x (C_{OGAa} \sum_{b=1}^y (r_{ENDOa,b}))} \quad (4)$$

Nesta equação, y é o número de ligações que a endopoligalacturonase pode atacar no substrato de tamanho x .

3.4 DESCRIÇÃO DO ALGORITMO DO MODELO ESTOCÁSTICO BASEADO NO MÉTODO DE MONTE CARLO

Foram realizadas 3 simulações com diferentes concentrações iniciais dos catalisadores enzimáticos. Em cada caso, a simulação começou com uma mistura de enzimas com concentrações variando de $3,4 \times 10^{-10}$ mol/L a $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L para exopoligalacturonase e de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L a $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L para endopoligalacturonase. A concentração do substrato inicial (o ácido oligogalacturônico com 7 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia principal, ou o ácido poligalacturônico com 26 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia principal) foi mantida constante e igual a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Os substratos derivados do ácido oligogalacturônico foram representados como um vetor, em que a posição indica o tamanho do substrato e o valor do elemento indica a quantidade de substratos daquele tamanho particular presentes na reação em um determinado momento.

Para cada iteração, foi calculada a probabilidade de ação de todos os ataques que as enzimas podem realizar em cada substrato presente na mistura (P_E), conforme a Equação (3) para a hidrólise de um ácido oligogalacturônico tendo como catalisador a exopoligalacturonase e conforme a Equação (4) para a hidrólise de um ácido

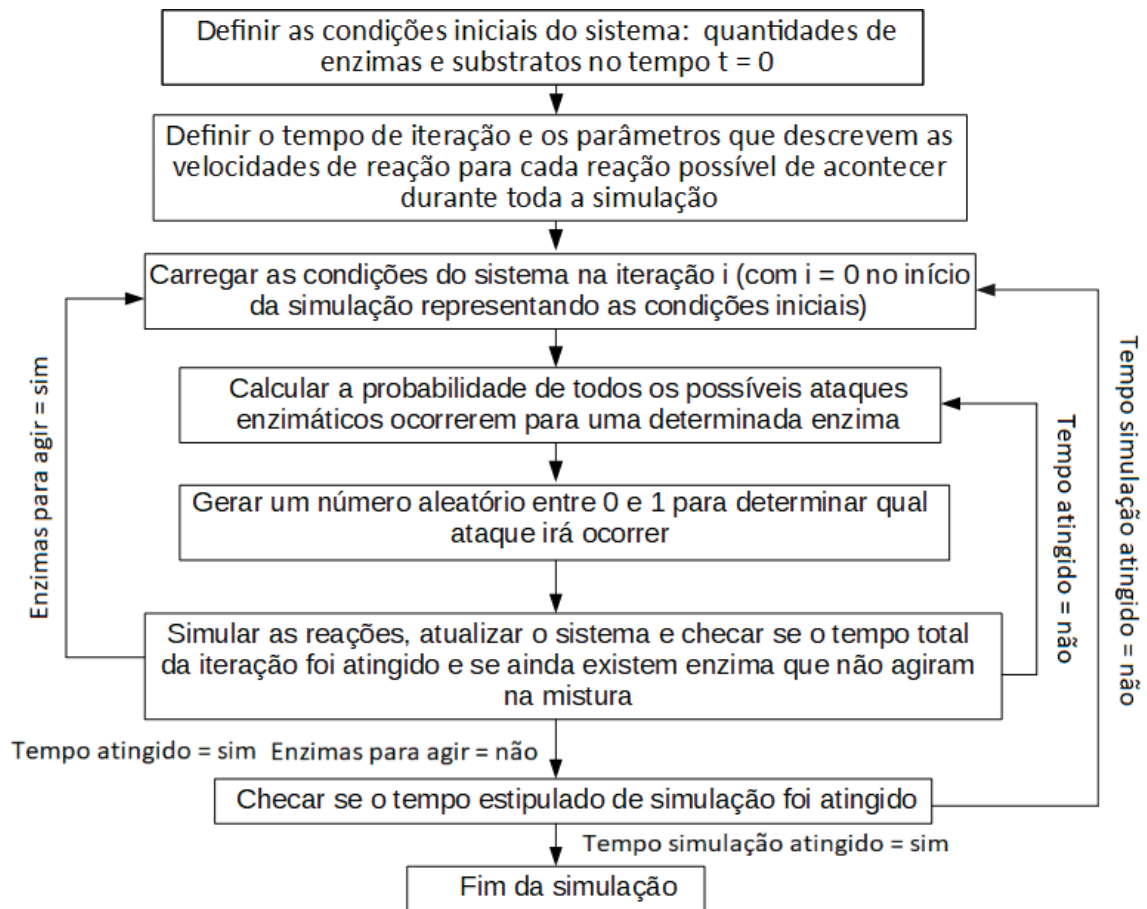
oligogalacturônico tendo como catalisador a endopoligalacturonase. Em seguida, um número aleatório foi gerado para determinar qual ataque a primeira enzima realizou.

Um vetor numérico de probabilidade foi gerado recebendo como posição um dos tipos de reação a ser catalisada e como valor a probabilidade daquela reação ocorrer mais o valor da soma de todas as posições anteriores (iniciando com o valor 0 e finalizando com o valor 1). Os números aleatórios foram gerados usando a função “rand” implementada no software Scilab, que fornece uma distribuição uniforme entre 0 e 1. Com os valores P_E das enzimas calculados (ou seja, com os valores P_{EXO} ou os valores P_{ENDO}) e o número aleatório gerado, ambos foram comparados. O valor correspondente desse número aleatório no vetor numérico de probabilidade determina qual reação foi escolhida para ocorrer na iteração.

Realizado o ataque, foi adicionado o tempo necessário para a reação e, caso ainda não seja atingido o tempo estipulado para a iteração, o ataque seria simulado novamente, repetindo o looping até que o tempo da iteração fosse alcançado, passando para a próxima enzima. Com um intervalo suficientemente curto, a ordem das enzimas torna-se irrelevante. Quando todas as enzimas terminaram de agir, o tempo de iteração foi adicionado ao tempo total de reação e uma nova iteração foi iniciada, conforme pode ser observado na Figura 3.1.

Todas as etapas do algoritmo foram implementadas usando o software de código aberto Scilab 6.0.1.

FIGURA 3.1 – ALGORITMO DO SISTEMA



FONTE: O autor

3.5 VALORES DOS PARÂMETROS USADOS NAS SIMULAÇÕES

A Tabela 3.1 mostra as constantes de saturação e especificidade para as reações que a exopoligalacturonase e a endopoligalacturonase podem catalisar nos vários oligômeros presentes no modelo (PEREIRA et al., 2017; KLUSKENS et al., 2005; BONNIN et al., 2001).

TABELA 3.1 – CONSTANTES DE ESPECIFICIDADE E DE SATURAÇÃO DAS ENZIMAS ENDOPOLIGALACTURONASES E EXOPOLIGALACTURONASES PARA REAÇÕES ENVOLVENDO O ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO.

Substrato	Produto da reação	Constantes de saturação da enzima para os substratos (K_M) (mM)		Constante de especificidade para a reação (k) ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
		Endo (Bonnin et al., 2001)	Exo (Kluskens et al., 2005)	Endo (Bonnin et al., 2001; Pereira et al., 2016)	Exo (Kluskens et al., 2005)
OGA ₂		-	0,34		
	OGA ₁ + OGA ₁			0	534
OGA ₃		$0,071 \times 10^{-3}$	0,34		
	OGA ₂ + OGA ₁			2,4	2016
OGA ₄		$0,064 \times 10^{-3}$	0,29		
	OGA ₃ + OGA ₁			320	2859
	OGA ₂ + OGA ₂			64	
OGA ₅		$0,052 \times 10^{-3}$	0,24		
	OGA ₄ + OGA ₁			1152	3892
	OGA ₃ + OGA ₂			1088	
OGA ₆		$0,023 \times 10^{-3}$	0,11		
	OGA ₅ + OGA ₁			992	7461
	OGA ₄ + OGA ₂			1760	
	OGA ₃ + OGA ₃			844.8	
OGA ₇		$0,016 \times 10^{-3}$	0,07		
	OGA ₆ + OGA ₁			1120	12288
	OGA ₅ + OGA ₂			1536	
	OGA ₄ + OGA ₃			1760	

FONTE: O autor.

As constantes de especificidade e saturação para exopoligalacturonase foram reportadas por Kluskens et al. (2005) para uma exopoligalacturonase obtida a partir da espécie *Termotoga maritima*.

Para a endopoligalacturonase, as constantes de especificidade foram calculadas usando os valores fornecidos por Bonnin et al. (2001) para oligômeros inteiros e as constantes de especificidade relativa obtidas por Pereira et al. (2017) através do “Fingerprinting Method”, que relaciona as proporções entre as constantes de especificidade de todas as reações que a endopoligalacturonase pode realizar. As constantes de saturação da endopoligalacturonase foram obtidas a partir dos valores fornecidos por Bonnin et al. (2001). Em seu estudo, esses autores utilizaram uma endopoligalacturonase obtida a partir da espécie *Fusarium moniliforme*.

A Tabela 3.2 mostra as constantes de saturação e especificidade para as reações que a exopoligalacturonase e a endopoligalacturonase podem catalisar nos vários polímeros presentes no modelo. Os valores foram obtidos a partir da abordagem proposta por Persi de Souza (2020) para determinação das constantes das reações envolvendo polímeros do ácido poligalacturônico.

TABELA 3.2 – CONSTANTES DE ESPECIFICIDADE E DE SATURAÇÃO DAS ENZIMAS ENDOPOLIGALACTURONASES E EXOPOLIGALACTURONASES PARA REAÇÕES ENVOLVENDO O ÁCIDO POLIGALACTURONICO.

Substrato	Produto da reação	Constantes de saturação da enzima para os substratos (K_M) (mM)		Constante de especificidade para a reação (k) ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
		Endo (Bonnin et al., 2001)	Exo (Kluszens et al., 2005)	Endo (Bonnin et al., 2001; Pereira et al., 2016)	Exo (Kluszens et al., 2005)
OGA ₈		0,0394	0,06		
	OGA _{n-1} + OGA ₁			1120	14042
	OGA _{n-2} + OGA ₂			1536	
	OGA _{n-3} + OGA ₃			1760	
	OGA _{n-i} + OGA _i			414	
OGA ₉		0,0629	0,06		
	OGA _{n-1} + OGA ₁			1120	15600
	OGA _{n-2} + OGA ₂			1536	
	OGA _{n-3} + OGA ₃			1760	
	OGA _{n-i} + OGA _i			414	
OGA ₁₀		0,0863	0,06		
	OGA _{n-1} + OGA ₁			1120	15600
	OGA _{n-2} + OGA ₂			1536	
	OGA _{n-3} + OGA ₃			1760	
	OGA _{n-i} + OGA _i			414	
OGA ₁₁		0,101	0,06		
	OGA _{n-1} + OGA ₁			1120	15600
	OGA _{n-2} + OGA ₂			1536	
	OGA _{n-3} + OGA ₃			1760	
	OGA _{n-i} + OGA _i			414	
OGA ₁₂		0,133	0,06		
	OGA _{n-1} + OGA ₁			1120	15600

	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{13}		0,157	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{14}		0,180	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{15}		0,204	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{16}		0,227	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{17}		0,251	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	

	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{18}		0,274	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{19}		0,297	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{20}		0,321	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{21}		0,344	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{22}		0,368	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	

	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{23}		0,391	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{24}		0,415	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{25}		0,438	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	
OGA_{26}		0,462	0,06		
	$OGA_{n-1} + OGA_1$			1120	15600
	$OGA_{n-2} + OGA_2$			1536	
	$OGA_{n-3} + OGA_3$			1760	
	$OGA_{n-i} + OGA_i$			414	

FONTE: O autor.

3.6 COMPARAÇÃO COM OUTRAS MODELAGENS DE HIDRÓLISES

Nesta seção, será apresentada uma comparação entre quatro modelos encontrados na literatura para hidrólise enzimática de polímeros com múltiplas enzimas (KUMAR; MURTY, 2013; WOJCIECHOWSKI; KOZIOL; NOWORYTA, 2001;

ASZTALOS et al. 2017) e o modelo proposto no presente estudo. Em particular, serão discutidas as principais limitações do modelo encontradas na literatura que podem ser superadas com o modelo proposto.

O modelo proposto por Wojciechowski et al. (2001) para a hidrólise de amido utilizando como catalisador uma mistura enzimática composta por α -amilases, β -amilases e glicoamilases, utiliza parâmetros empíricos não vinculados aos estudos de cinética enzimática clássica. Além disso, Wojciechowski et al. (2001) não descreveu como determinar esses parâmetros experimentalmente, portanto seu modelo não pode ser aplicado diretamente a outros sistemas, ao contrário do modelo apresentado neste trabalho que usa parâmetros condizentes com a cinética enzimática clássica e define de maneira clara e concisa como determinar esses parâmetros.

Kumar e Murthy (2017) propuseram dois modelos estocásticos para hidrólise de celulose usando uma mistura de enzimas como catalisador. Esta mistura de enzimas foi composta por 8 grupos diferentes de enzimas. Em seus modelos, os autores usaram vários fatores para determinar a velocidade de ação das enzimas. Alguns desses fatores estão ligados à cinética enzimática clássica, mas muitos deles são empíricos. Além disso, esse modelo define primeiro o local que será atacado e depois é verificado se a enzima é capaz de hidrolisar a ligação desse local, o que pode gerar iterações nulas, aumentando o custo computacional do modelo. Diferente do modelo proposto nesse estudo que utiliza apenas parâmetros encontrados na cinética enzimática clássica e garante que não ocorrerá iterações nulas (iteraões em que é selecionado uma ação que uma enzima é incapaz de realizar), reduzindo o custo computacional do modelo.

O modelo proposto por Asztalos et al. (2012) para a hidrólise da celulose tendo como catalisador uma mistura enzimática composta por endoglucanases, β -glucosidases e exoglucanases utiliza parâmetros relacionados à cinética enzimática clássica, conhecidos como constantes fundamentais de reação. No entanto, esses parâmetros são mais difíceis de determinar quando comparados com os parâmetros adotados no presente estudo (especificidade e constantes de reação). Além disso, Asztalos et al. (2012) não descreveu como as constantes fundamentais da reação são usadas para determinar o padrão de ataque das enzimas, portanto, as informações

fornecidas são insuficientes para reconstruir seu modelo. Já o modelo proposto nesse estudo define de maneira clara como foi modelado o padrão de ataque das enzimas, permitindo que o modelo seja replicado e possivelmente aplicado a outros sistemas.

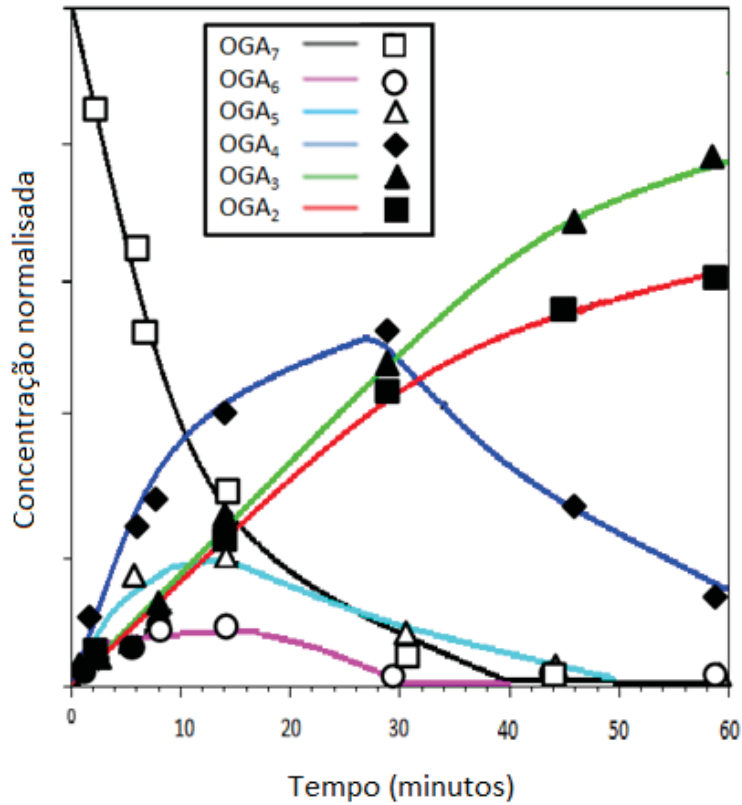
3.7 VALIDAÇÃO DO MODELO

Devido à falta de dados experimentais para sistemas multi-enzimáticos, os dados de Bonnin et al. (2001) para hidrólise com endopoligalacturonase como catalisador foram utilizados para validar o modelo matemático. Nesse estudo os autores analisaram a hidrólise total do ácido oligogalacturônico com sete unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia principal.

As condições iniciais foram estabelecidas de acordo com os dados experimentais fornecidos por Bonnin et al. (2001), com concentração inicial de ácido oligogalacturônico de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, concentração inicial de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L de endopoligalacturonase, pH 4, temperatura de 30°C e tempo de reação de uma hora.

A Figura 3.2 mostra a hidrólise prevista pelo modelo (linhas coloridas) e os dados experimentais de Bonnin et al. (2001) (pontos). Como pode ser observado, o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais.

FIGURA 3.2 – VALIDAÇÃO DO MODELO



FONTE: O autor

3.8 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS USANDO O MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS

Para encontrar a proporção ótima de catalisadores para a reação de hidrólise do ácido galacturônico em ácido D-galacturônico usando PSO, primeiro foi definido um número de partículas no enxame considerando o número de dimensões do problema, geralmente sendo ele 10 vezes o número de dimensões (EBERHART; KENNEDY, 1995), neste caso o número de partículas determinado foi 20. Em seguida, a função objetivo foi definida como uma função que recebe como parâmetros de entrada as proporções enzimáticas do catalisador, realiza a simulação de hidrólise usando o modelo desenvolvido nas seções 3.1 à 3.5 deste estudo e retorna a concentração do produto final formado. Quaisquer outros parâmetros iniciais, necessários para a simulação da hidrólise, foram mantidos fixos (concentração inicial dos substratos, concentração total enzimática e tempo de reação).

Foram feitas quatro otimizações de parâmetros, três para a hidrólise do ácido heptagalacturônico com tempos de hidrólise de 1 hora, 30 minutos e 15 minutos e três para a hidrólise do ácido poligalacturônico (com 14, 21 e 26 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia principal) com tempo de hidrólise de 1 hora

O algoritmo PSO buscou maximizar a formação do ácido D-galacturônico alterando as proporções enzimáticas dos catalizadores, sem alterar a concentração enzimática total. Durante o processo de otimização, o ponto de máximo foi encontrado partindo das alterações de velocidades e posições de cada indivíduo da população.

Para este estudo, a velocidade de um indivíduo para uma iteração $k+1$ (v_{k+1}) foi definida como:

$$v_{k+1} = I v_k + a_1 r_1 (p_{bestik} - p_k) + a_2 r_2 (g_{bestk} - p_k) \quad (5)$$

sendo I o coeficiente de inércia, v_k a velocidade do indivíduo na iteração anterior (começando como 0 na primeira iteração), a_1 e a_2 sendo a constante de aceleração local e constante de aceleração global, respectivamente, r_1 e r_2 sendo números gerados aleatoriamente para a iteração atual, p_{bestki} sendo a melhor posição conhecida para o indivíduo i , e g_{best} sendo a melhor posição conhecida dentre todos os indivíduos em todas as iterações.

De maneira semelhante, a posição de um indivíduo para uma iteração $k+1$ (p_{k+1}) foi definida como:

$$p_{k+1} = p_k + v_{k+1} \quad (6)$$

com p_k sendo a posição do indivíduo na iteração anterior

A posição de cada indivíduo pode ser representada em um gráfico bidimensional, com o valor do eixo x da posição de cada indivíduo representando a proporção de endopoligalacturonases na mistura de enzimas usadas como catalisadores e o valor do eixo y representando a quantidade de produtos formados no período de 1 hora, 30 minutos e 15 minutos considerando a proporção acima, logo

o valor do eixo y na posição de um indivíduo também representa a função objetivo a ser maximizada.

Os limites do espaço de busca foram definidos como 0 e 1 na escala do eixo x. A velocidade inicial de todos os indivíduos foi definida como 0, enquanto o valor da primeira posição do eixo x de cada um dos 20 indivíduos foi determinado a partir de uma distribuição uniforme entre 0 e 1, começando com 0 e crescendo em incrementos de 0.05. Nas situações em que a posição de um indivíduo escapasse dos limites da função, inverteu-se o sentido da velocidade da iteração atual e recalculou-se a posição. Por fim, o critério de parada do algoritmo foi a distância na escala do eixo x dos dois indivíduos mais afastados, que não poderia ser maior que 0.01.

Ao aplicar este método de otimização, os valores do coeficiente de inércia, constante de aceleração local e constante de aceleração global são determinados empiricamente. Optou-se por usar os parâmetros definidos no trabalho original que propôs o método PSO, pois como a função objetivo utiliza do método de Monte Carlo, ficaria muito custoso otimizar os parâmetros com testes preliminares para este estudo em específico. Logo, os valores do coeficiente de inércia, constante de aceleração local e constante de aceleração global foram definidos como 0,5, 2,05 e 2,05, respectivamente (EBERHART; KENNEDY, 1995).

As etapas do algoritmo do método de otimização por Enxame de Partículas foram as seguintes (KENNEDY; EBERHART, 1995):

1. Definir a função objetivo que precisa ser otimizada e os critérios de parada
2. Inicializar as posições e velocidades dos indivíduos do enxame.
3. Avaliar a função objetivo para cada indivíduo no enxame (p_{k+1}).
4. Atualizar a melhor posição conhecida de cada indivíduo com base em sua posição atual e sua melhor posição conhecida anterior.
5. Atualizar a melhor posição global com base nas melhores posições pessoais de todos os indivíduos do enxame.
6. Atualizar as velocidades e posições dos indivíduos e verificar se os critérios de parada foram atendidos.
7. Repetir as etapas 3 a 6 até que os critérios de parada da otimização sejam

atendidos.

Quando o algoritmo parou, o indivíduo com o maior valor do eixo y foi escolhido como a proporção ideal entre endopoligalacturonases e exopoligalacturonases para os casos deste estudo.

3.9 MÉTODO DE REGRESSÃO QUADRÁTICA

Como esses processos de otimização envolvem uma grande quantidade de simulações e os modelos estocásticos são conhecidos por apresentar ruído em seus dados (PERSI DE SOUZA, 2020), para evitar a poluição visual, este estudo realizou uma regressão quadrática nos dados gerados a partir do comportamento das partículas com o único intuito de facilitar a visualização do leitor, sendo a curva gerada usada para representar o comportamento das partículas do método de Otimização por Enxame de Partículas. Ao realizar a regressão quadrática foram seguidos os seguintes passos de acordo com Golub e Van Loan (2013):

1. Todos os valores individuais de todas as iterações do Método de Otimização por Enxame de Partículas foram reunidos e foram chamados de data-point, ou variáveis dependentes.
2. A média dos data-points foi calculada. Para fazer isso, todos os valores para cada data-point foram adicionados e divididos pelo número total de data-points.
3. A variância e o desvio padrão dos data-points foram calculados. A variância foi calculada tomando a soma das diferenças ao quadrado entre cada valor e a média e dividindo pelo número de observações. O desvio padrão foi calculado tirando a raiz quadrada da variância.
4. O valor R^2 foi calculado. Este valor representa a porcentagem da variância na variável dependente que é explicada pelas variáveis independentes. Para calcular o R^2 , primeiro foi calculada a soma das diferenças quadradas entre os valores observados dos pontos de dados e o valor médio dos pontos de dados, o resultado é conhecido como a soma total dos quadrados. Em seguida, foi calculada a soma das diferenças quadradas entre os valores preditos dos pontos de dados e o valor médio dos pontos de dados, sendo o resultado

denominado soma dos quadrados dos resíduos. O valor R^2 foi então definido como sendo $1 - (\text{soma residual de quadrados}/\text{soma de quadrados})$.

5. Foram calculados os coeficientes das variáveis independentes. Primeiro calculando a soma do produto cruzado para cada variável multiplicando o valor de cada variável independente pelo valor do ponto de dados e somando os produtos e calculando a soma dos valores ao quadrado para cada variável independente.

6. As equações foram resolvidas para os coeficientes das variáveis independentes. Para fazer isso, um sistema de equações foi montado usando as somas dos produtos cruzados e as somas dos valores ao quadrado para cada variável independente. Em seguida, as equações foram resolvidas para os coeficientes usando o método de inversão de matrizes (GOLUB; VAN LOAN, 2013).

7. A curva foi então construída usando os novos valores encontrados.

3.10 ANÁLISE BOX PLOT DA RAZÃO ENZIMÁTICA ÓTIMA

Como a função objetiva da otimização é descrita por um modelo estocástico, logo apresenta dispersividade nos resultados, viu-se necessário avaliar estatisticamente o ponto ótimo encontrado. Com a otimização concluída, foram feitas 100 simulações usando a razão ótima para estudar o comportamento do modelo nesta situação, para isso foi aplicada a análise box plot. A análise box plot é uma representação gráfica da distribuição de um conjunto de dados, comumente usada em análises estatísticas para visualizar a dispersão e assimetria dos dados e para identificar outliers (TURKEY, 1977).

Para criar o box plot, os dados foram primeiro divididos em quartis. Os quartis inferior e superior, também conhecidos como primeiro e terceiro quartis, foram usados para criar a parte da caixa do gráfico. A caixa vai do quartil inferior ao quartil superior, com uma linha desenhada na mediana dos dados. Os limites do gráfico se estendem da caixa até os valores mínimo e máximo dos dados, a menos que existam outliers presentes. Outliers são pontos de dados que ficam fora do intervalo dos quartis inferior

e superior e são normalmente representados como pontos individuais no gráfico (TURKEY, 1977).

Os seguintes passos foram seguidos para aplicar o método box plot (TURKEY, 1977):

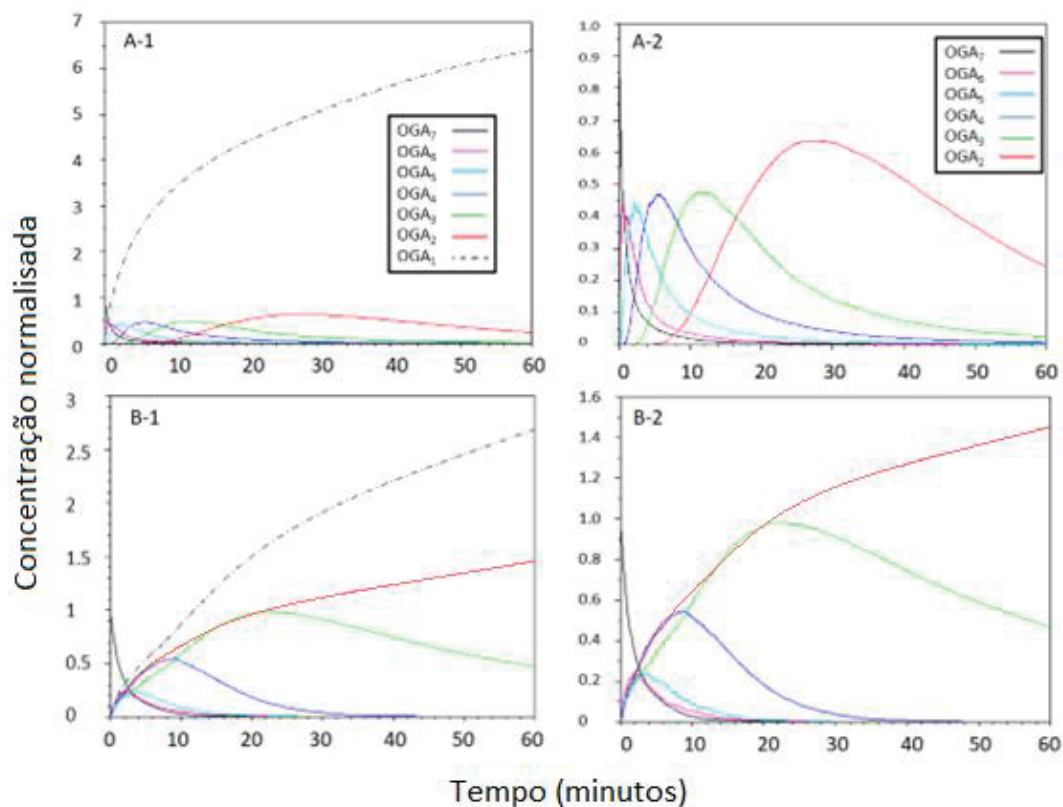
1. Foram feitas as simulações e coletas do conjunto de dados.
2. Foram calculados os quartis e a mediana dos dados. Os quartis inferior e superior foram calculados encontrando-se os percentis 25 e 75 dos dados, respectivamente. A mediana foi calculada encontrando o percentil 50 dos dados.
3. O box plot foi então criado. A caixa do gráfico estendeu-se do quartil inferior ao quartil superior, com uma linha traçada na mediana. Os limites do gráfico estenderam-se da caixa até os valores mínimo e máximo dos dados, excluindo quaisquer outliers. Os Outliers foram identificados usando o método Z-score modificado (ROSNER, 1983).

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DE HIDRÓLISE DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO

A Figura 4.1 mostra os resultados obtidos com o modelo proposto para duas condições distintas. As curvas mostram os perfis de formação e consumo dos produtos nas simulações, incluindo o produto final (A-1 e B-1) e excluindo o produto final (A-2 e B-2) para facilitar a visualização.

FIGURA 4.1 – RESULTADO DAS SIMULAÇÕES DAS HIDRÓLISES MULTI-ENZIMÁTICAS. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original



FONTE: O autor

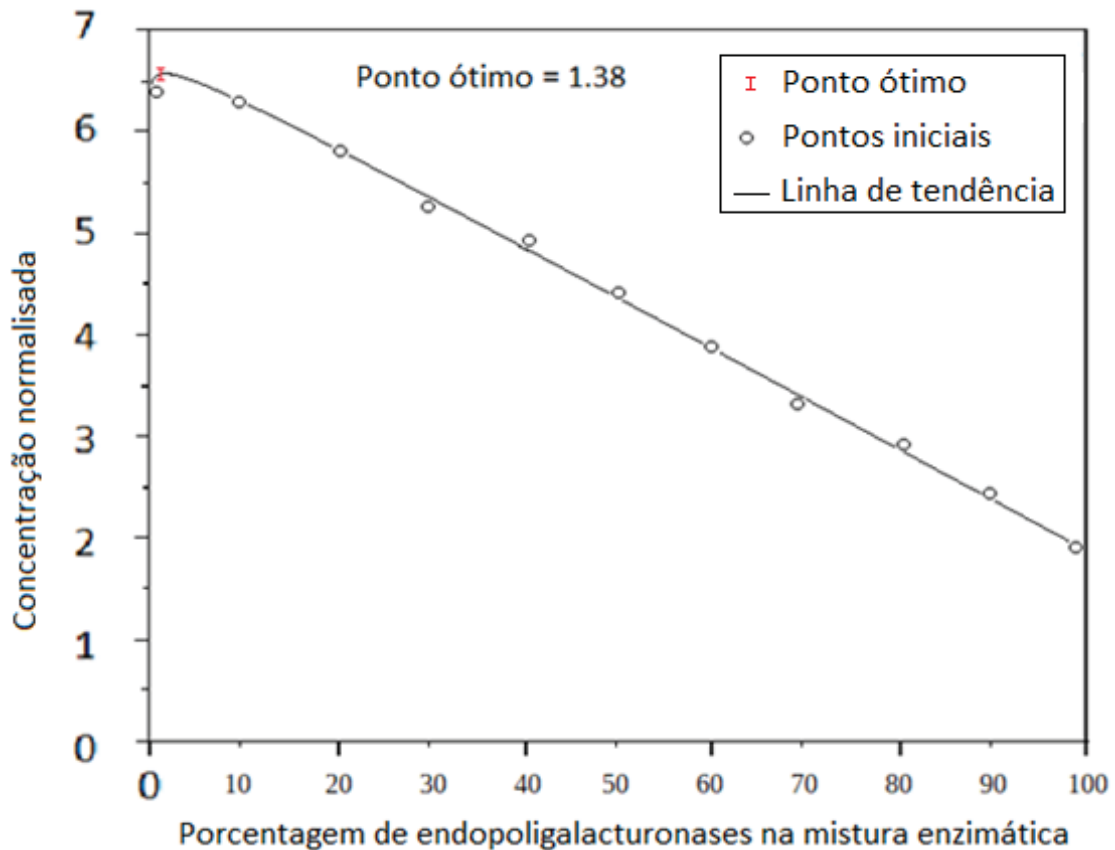
A primeira simulação (A-1 e A-2) foi realizada com o objetivo de simular um sistema apenas com traços da endopoligalacturonase, a fim de observar o comportamento da hidrólise promovida pela exopoligalacturonase. Para tanto, a simulação utilizou uma concentração inicial de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L de ácido heptagalacturônico, uma concentração inicial de $3,4 \times 10^{-10}$ mol/L de endopoligalacturonases, uma concentração inicial de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L de exopoligalacturonases e um tempo de reação de 1 hora. A segunda simulação (B-1 e B-2) foi feita considerando uma concentração inicial de ácido heptagalacturônico de $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, uma concentração inicial de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L de endopoligalacturonases, uma concentração inicial de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L de exopoligalacturonases e tempo de reação de 1 hora.

As reações promovidas pela exopoligalacturonase são significativamente mais rápidas do que as reações promovidas pela endopoligalacturonase quando se trata de polímeros de cadeia curta. Por esse motivo, foi necessário usar uma quantidade de exopoligalacturonase uma ordem de grandeza menor que a quantidade de endopoligalacturonase para observar a influência da endopoligalacturonase no segundo caso (B-1 e B-2), mantendo o tempo de reação de 1 hora em ambas as simulações.

4.2 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO

A Figura 4.2 mostra como pontos os resultados da simulação das partículas na primeira iteração da otimização do método Particle Swarm Optimization para a hidrólise do ácido oligogalacturônico usando um catalisador multienzimático, o restante dos dados está sendo representado pela equação de segundo grau originada do método de regressão quadrática que engloba todos os valores das partículas em todas as iterações como dados. O número total de iterações necessárias para atender aos critérios de parada, sendo uma distância não superior a 0,01 no eixo x entre os indivíduos mais distantes, foi de 136. O ponto de dados ótimo encontrado foi marcado em vermelho e mostra uma proporção ótima de endopoligalacturonase na mistura enzimática de 1,38%.

FIGURA 4.2 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original e a linha de tendência existe apenas para facilitar a visualização do leitor.

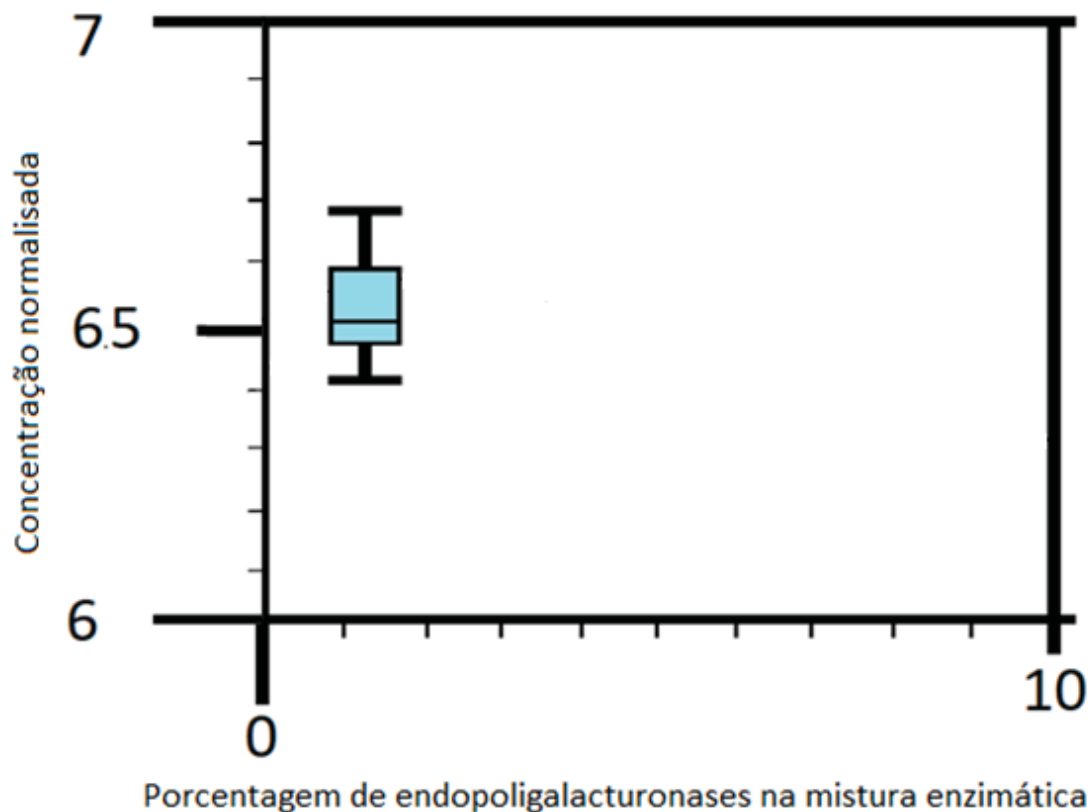


FONTE: O autor

Todas as simulações utilizadas no método de Otimização por Enxame de Partículas para a Figura 4.2 foram feitas considerando uma concentração total da mistura enzimática de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo constituída de diferentes quantidades de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, com o valor do eixo x representando a porcentagem da endopoligalacturonase no total da enzima concentração e tempo total de reação de 1 hora. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L).

A Figura 4.3 mostra os resultados de uma análise de box plot realizada de acordo com a seção 2.8 deste estudo para o ponto ótimo encontrado nas simulações de Otimização por Enxame de Partículas. Foram feitas 100 simulações considerando uma concentração inicial de $3,35 \times 10^{-6}$ mol/L de exopoligalacturonases, $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L de endopoligalacturonases e $1,0 \times 10^{-3}$ g/L do substrato inicial (ácido heptagalacturônico), com um tempo de iteração de 1 segundo e tempo total de simulação de 1 hora. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L).

FIGURA 4.3 - RESULTADOS DA ANÁLISE BOX PLOT PARA O PONTO ÓTIMO ENCONTRADO NAS SIMULAÇÕES DO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original.

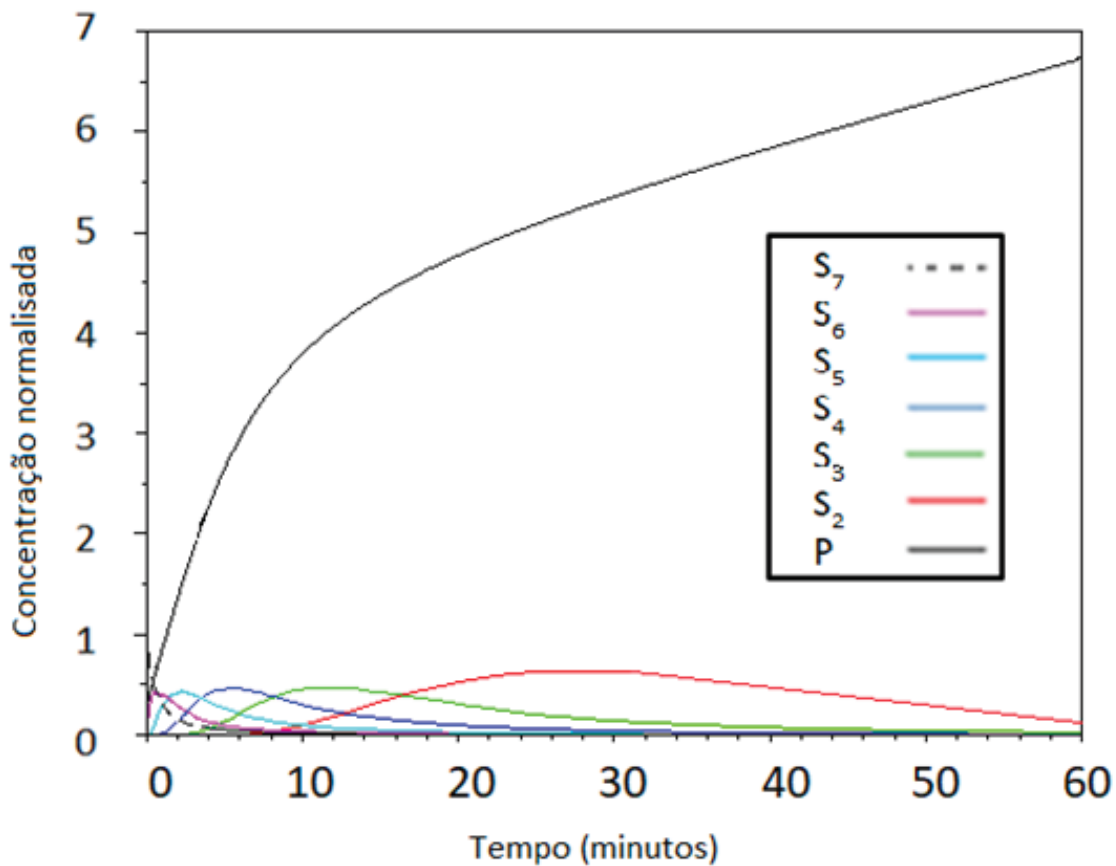


FONTE: O autor

A Figura 4.4 mostra uma simulação completa do modelo de Persi de Souza e Fontana (PERSI DE SOUZA; FONATNA, 2022) usando a razão ótima de enzima encontrada neste estudo. A simulação foi realizada nas seguintes condições: concentração inicial de $3,35 \times 10^{-6}$ mol/L de exopoligalacturonases, $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L

de endopoligalacturonases e $1,0 \times 10^{-3}$ g/L do substrato inicial, tempo de iteração de 1 segundo e tempo total de simulação de 1 hora. O valor do eixo x representa o tempo de simulação, e o valor do eixo y representa as concentrações do substrato inicial, substrato intermediário e produto final normalizado pela concentração total do substrato inicial no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L).

FIGURA 4.4 - RESULTADOS DA SIMULAÇÃO DA HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA COM PROPORÇÃO ÓTIMA. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original.

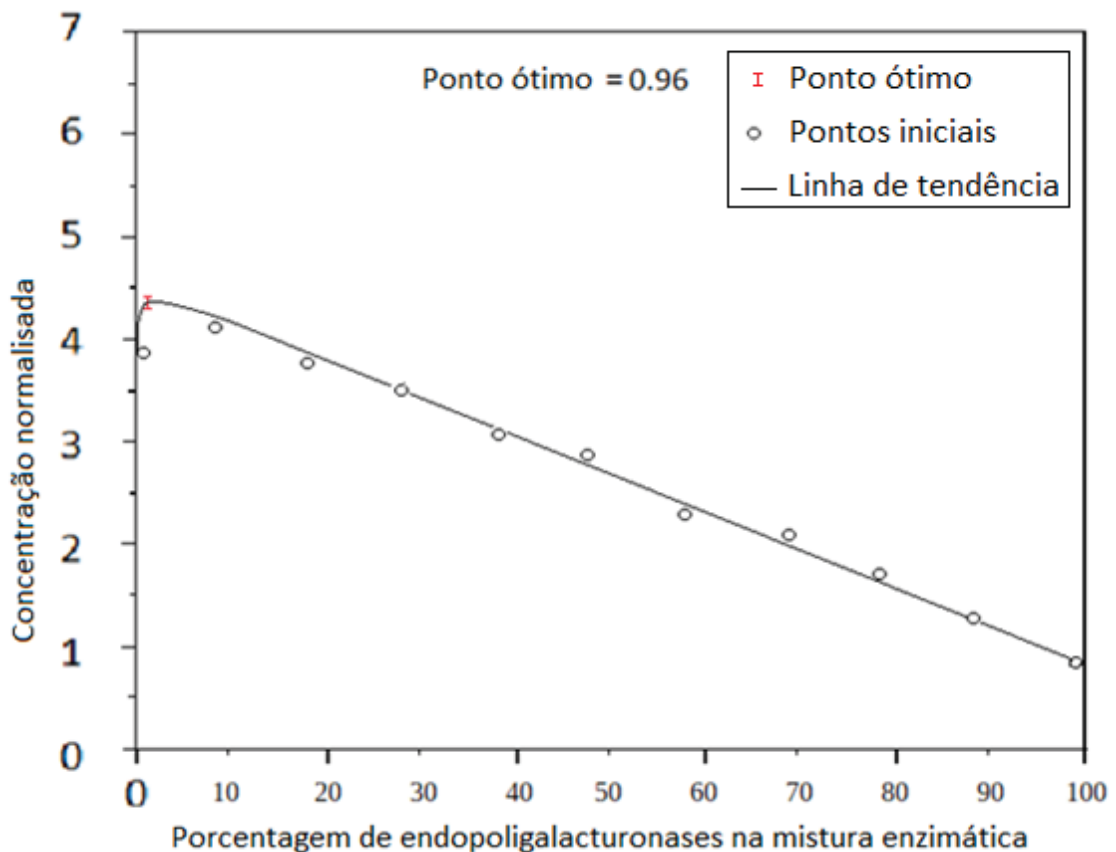


FONTE: O autor

A Figura 4.5 mostra como pontos os resultados da simulação dos indivíduos na primeira iteração da otimização do método Particle Swarm Optimization para a hidrólise do ácido oligogalacturônico usando um catalisador multienzimático no tempo de 15 minutos, juntamente com a equação de segundo grau originada do método de regressão quadrática englobando todos os indivíduos em todas as otimizações

iterações como dados e o ponto ótimo encontrado. O número total de iterações necessárias para atender aos critérios de parada, sendo uma distância não superior a 0,01 no eixo x entre os indivíduos mais distantes, foi de 167. O ponto de dados ótimo encontrado foi marcado em vermelho e mostra uma proporção ótima de endopoligalacturonase na mistura enzimática de 0,96%.

FIGURA 4.5 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO NO TEMPO DE 15 MINUTOS. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original e a linha de tendência existe apenas para facilitar a visualização do leitor.



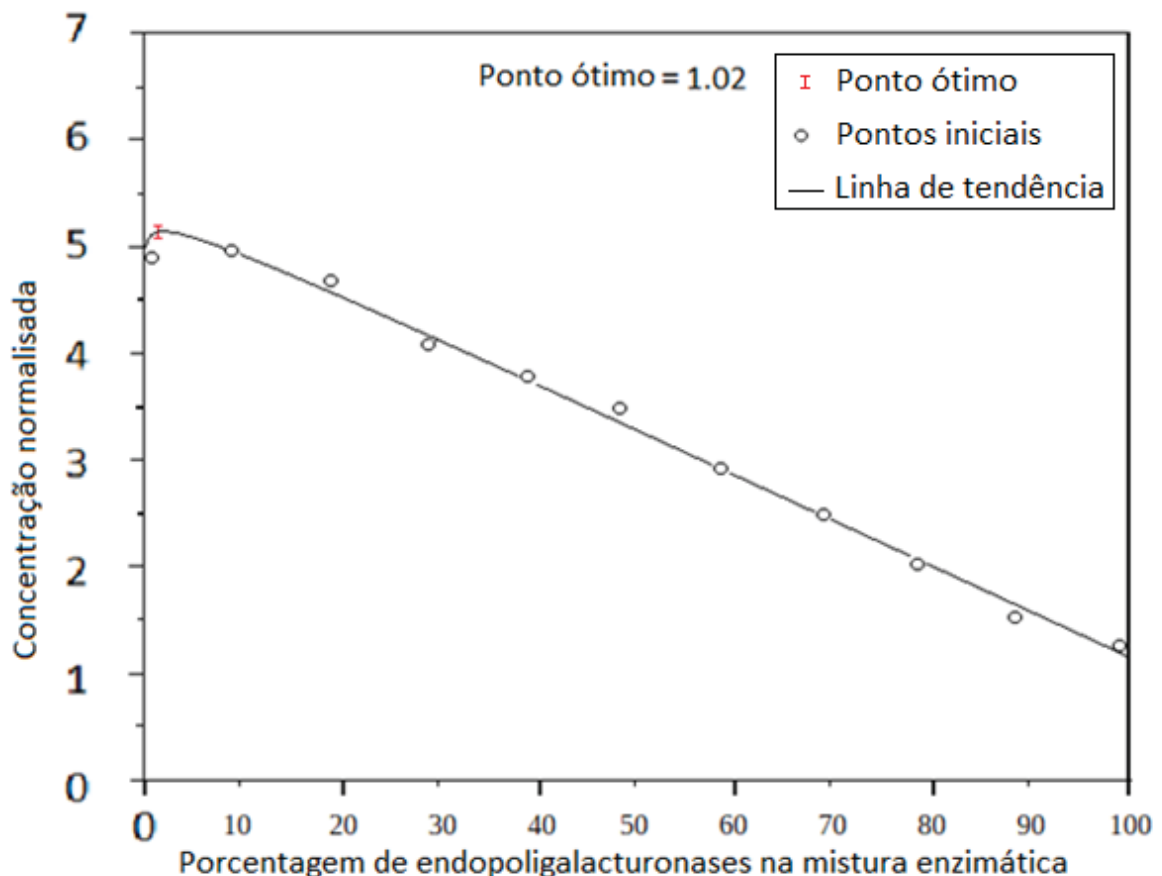
FONTE: O autor

Todas as simulações utilizadas no método de Otimização por Enxame de Partículas para a Figura 4.5 foram feitas considerando uma concentração total da mistura enzimática de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo constituída de diferentes quantidades de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, com o valor do eixo x representando a porcentagem da endopoligalacturonase no total da enzima

concentração e tempo total de reação de 15 minutos. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L).

A Figura 4.6 mostra como pontos os resultados da simulação dos indivíduos na primeira iteração da otimização do método Particle Swarm Optimization para a hidrólise do ácido oligogalacturônico usando um catalisador multienzimático no tempo de 30 minutos, juntamente com a equação de segundo grau originada do método de regressão quadrática englobando todos os indivíduos em todas as otimizações iterações como dados e o ponto ótimo encontrado. O número total de iterações necessárias para atender aos critérios de parada, sendo uma distância não superior a 0,01 no eixo x entre os indivíduos mais distantes, foi de 159. O ponto de dados ótimo encontrado foi marcado em vermelho e mostra uma proporção ótima de endopoligalacturonase na mistura enzimática de 1,02%.

FIGURA 4.6 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO NO TEMPO DE 30 MINUTOS. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original.

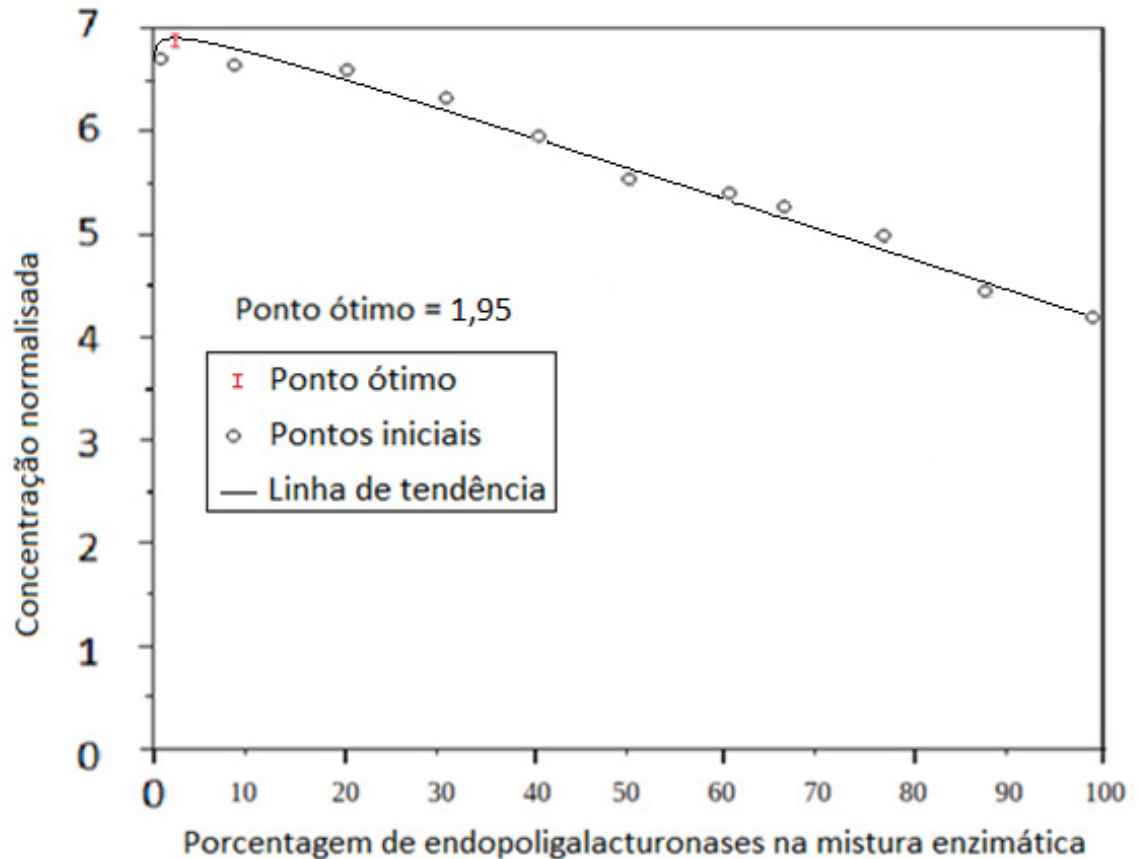


Todas as simulações utilizadas no método de Otimização por Enxame de Partículas para a Figura 4.6 foram feitas considerando uma concentração total da mistura enzimática de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo constituída de diferentes quantidades de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, com o valor do eixo x representando a porcentagem da endopoligalacturonase no total da enzima concentração e tempo total de reação de 30 minutos. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L).

A Figura 4.7 mostra como pontos os resultados da simulação dos indivíduos na primeira iteração da otimização do método Particle Swarm Optimization para a hidrólise do ácido poligalacturônico (composto por 14 unidades do ácido D-galacturônico) usando um catalisador multienzimático no tempo de 1 hora, juntamente com a equação de segundo grau originada do método de regressão quadrática englobando todos os indivíduos em todas as otimizações iterações como dados e o ponto ótimo encontrado. O número total de iterações necessárias para atender aos critérios de parada, sendo uma distância não superior a 0,01 no eixo x entre os indivíduos mais distantes, foi de 138. O ponto de dados ótimo encontrado foi marcado em vermelho e mostra uma proporção ótima de endopoligalacturonase na mistura enzimática de 1,95%.

Todas as simulações utilizadas no método de Otimização por Enxame de Partículas para a Figura 4.7 foram feitas considerando uma concentração total da mistura enzimática de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo constituída de diferentes quantidades de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, com o valor do eixo x representando a porcentagem da endopoligalacturonase no total da enzima concentração e tempo total de reação de 1 hora. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L)

FIGURA 4.7 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO NO TEMPO DE 1 HORA. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original e a linha de tendência existe apenas para facilitar a visualização do leitor.

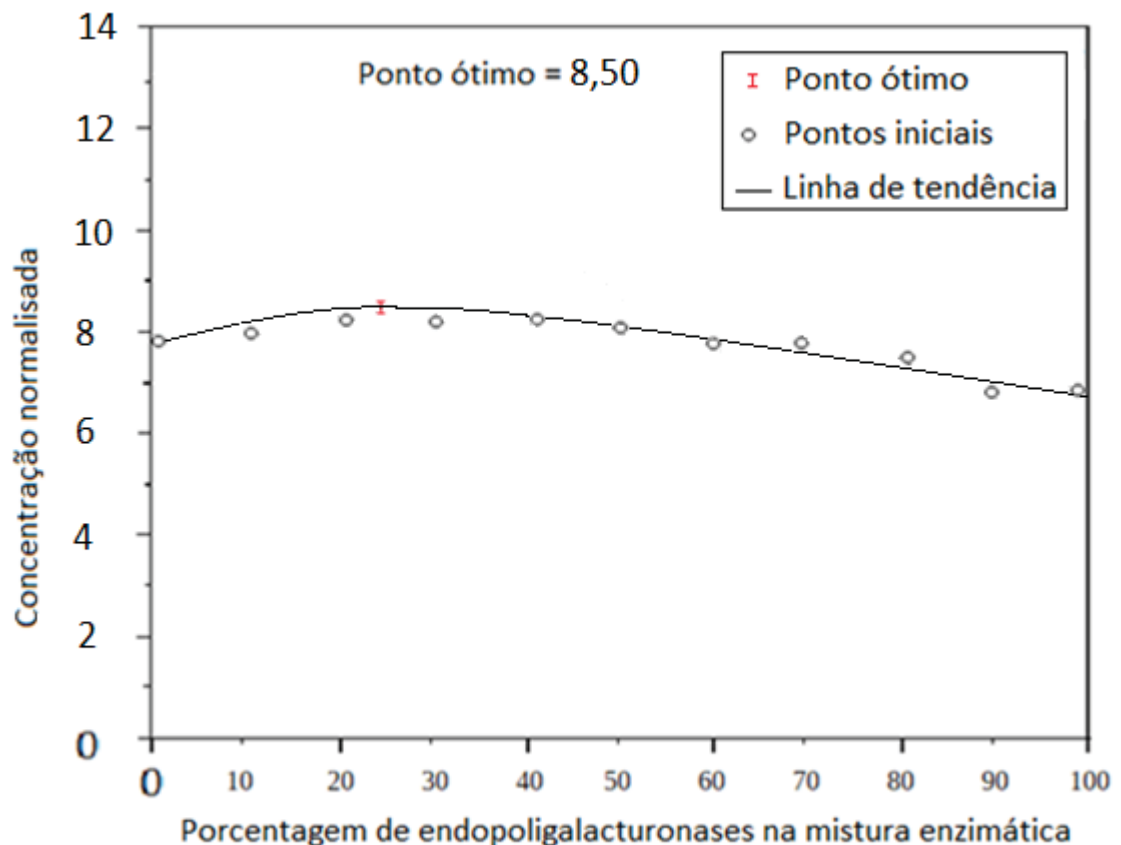


FONTE: O autor

A Figura 4.8 mostra como pontos os resultados da simulação dos indivíduos na primeira iteração da otimização do método Particle Swarm Optimization para a hidrólise do ácido poligalacturônico (composto por 21 unidades do ácido D-galacturônico) usando um catalisador multienzimático no tempo de 1 hora, juntamente com a equação de segundo grau originada do método de regressão quadrática englobando todos os indivíduos em todas as otimizações iterações como dados e o ponto ótimo encontrado. O número total de iterações necessárias para atender aos critérios de parada, sendo uma distância não superior a 0,01 no eixo x entre os indivíduos mais distantes, foi de 140. O ponto de dados ótimo encontrado foi marcado em vermelho e mostra uma proporção ótima de endopoligalacturonase na mistura enzimática de 24,2%.

Todas as simulações utilizadas no método de Otimização por Enxame de Partículas para a Figura 4.8 foram feitas considerando uma concentração total da mistura enzimática de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo constituída de diferentes quantidades de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, com o valor do eixo x representando a porcentagem da endopoligalacturonase no total da enzima concentração e tempo total de reação de 1 hora. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L)

FIGURA 4.8 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE CADEIA 21 NO TEMPO DE 1 HORA. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original e a linha de tendência existe apenas para facilitar a visualização do leitor.

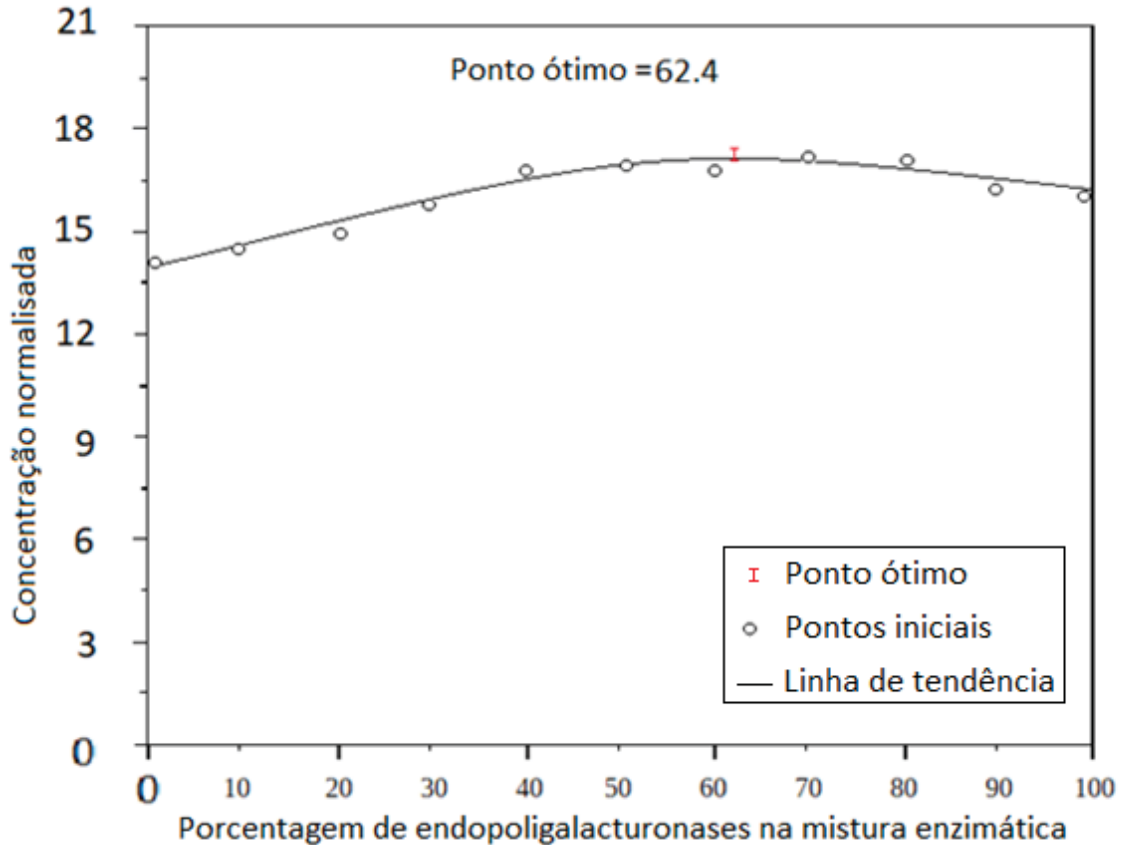


FONTE: O autor

A Figura 4.9 mostra como pontos os resultados da simulação dos indivíduos na primeira iteração da otimização do método Particle Swarm Optimization para a hidrólise do ácido poligalacturônico (composto por 26 unidades do ácido D-galacturônico) usando um catalisador multienzimático no tempo de 1 hora, juntamente com a equação de segundo grau originada do método de regressão quadrática englobando todos os indivíduos em todas as otimizações iterações como dados e o ponto ótimo encontrado. O número total de iterações necessárias para atender aos critérios de parada, sendo uma distância não superior a 0,01 no eixo x entre os indivíduos mais distantes, foi de 142. O ponto de dados ótimo encontrado foi marcado em vermelho e mostra uma proporção ótima de endopoligalacturonase na mistura enzimática de 62,4%.

Todas as simulações utilizadas no método de Otimização por Enxame de Partículas para a Figura 4.9 foram feitas considerando uma concentração total da mistura enzimática de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L, sendo constituída de diferentes quantidades de endopoligalacturonases e exopoligalacturonases, com o valor do eixo x representando a porcentagem da endopoligalacturonase no total da enzima concentração e tempo total de reação de 1 hora. A concentração do produto final, representada pelo valor do eixo y, foi normalizada pela concentração total de substratos no tempo $t = 0$ ($1,0 \times 10^{-3}$ g/L)

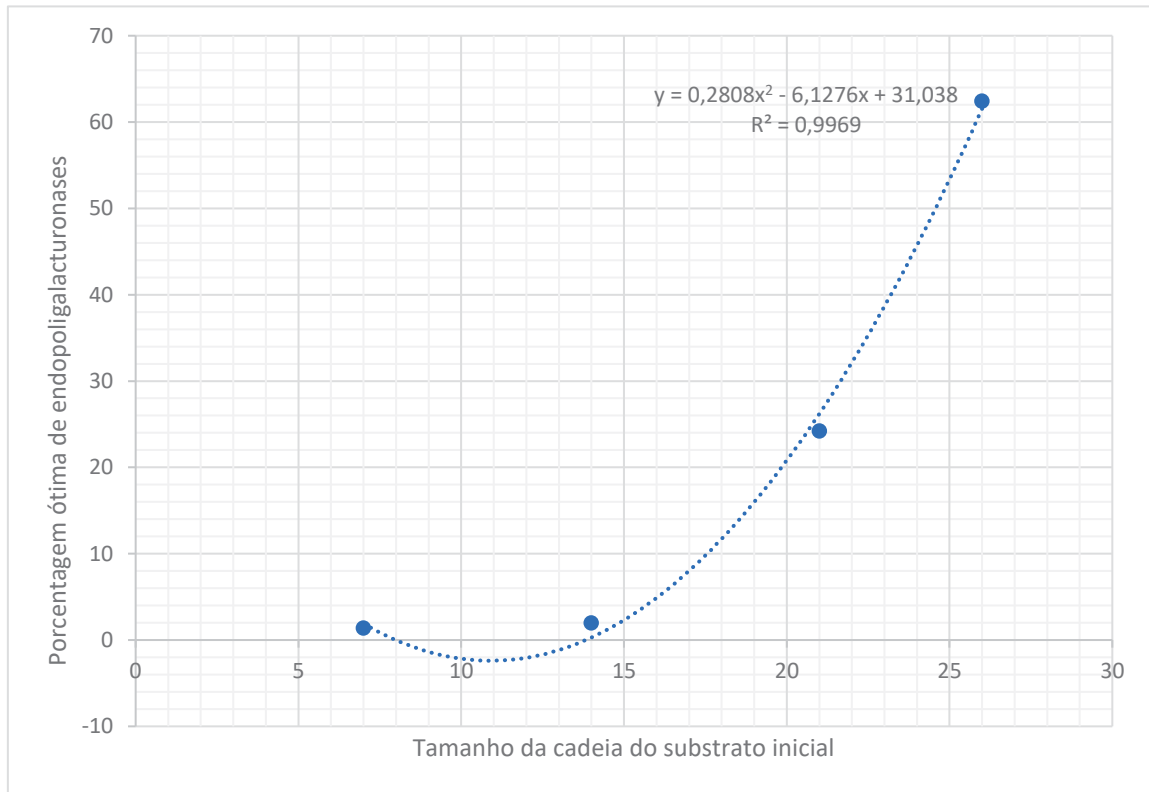
FIGURA 4.9 - RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES DA OTIMIZAÇÃO PELO MÉTODO DE OTIMIZAÇÃO POR ENXAME DE PARTÍCULAS PARA OS MODELOS DE HIDRÓLISE MULTI-ENZIMÁTICA DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE CADEIA 26 NO TEMPO DE 1 HORA. As concentrações foram normalizadas considerando a concentração inicial do substrato original e a linha de tendência existe apenas para facilitar a visualização do leitor.



FONTE: O autor

A Figura 4.10 mostra a curva e equação de porcentagem ótima de endopoligalacturonases na hidrólise do ácido poligalacturônico gerada a partir das Figuras 4.3, 4.7, 4.8 e 4.9 nas seguintes condições: concentração do substrato inicial de $1,0 \times 10^{-3}$ g/L, concentração da mistura catalítica de $3,4 \times 10^{-6}$ mol/L e tempo de reação de 1 hora. Com x representando o tamanho do substrato inicial que sofrerá a hidrólise e y representando a porcentagem ótima de endopoligalacturonases na mistura catalítica para a hidrólise deste substrato nas condições deste estudo.

FIGURA 4.10 – PORCENTAGEM ÓTIMA DE ENDOPOLIGALACTURONASES NA MISTURA CATALÍTICA COMPOSTA POR ENDOPOLIGALACTURONASES E EXOPOLIGALACTURONASES NA HIDRÓLISE DO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO DE DIFERENTES TAMANHOS.



FONTE: O autor

5 DISCUSSÃO

5.1 DISCUSSÃO DAS SIMULAÇÕES DA HIDRÓLISE DO ÁCIDO OLIGOGALACTURÔNICO

Em todas as simulações, a mistura enzimática apresenta tendência a hidrolisar primeiro substratos maiores (mostrando preferência por hidrolisar substratos maiores em situações em que substratos de diferentes tamanhos se encontram em igual concentração no meio), o que está de acordo com os resultados apresentados por Pereira et al. (2017) e Bonnin et al. (2001).

Ao comparar os resultados apresentados na Figura 4.1 com os resultados apresentados anteriormente na Figura 3.2 para um sistema reacional sem exopoligalacturonase, é possível notar uma tendência no padrão de ação característico dessas enzimas, que gera um único pico de concentração bem definido para cada substrato intermediário para todos os casos. Esse padrão é o mesmo descrito por Ishikawa et al. (2007), que independe das proporções de enzimas e substratos presentes na reação, mostrando que o modelo segue esse comportamento enzimático. Também é possível observar que à medida que aumenta a diferença entre as proporções das enzimas, mais os comportamentos de hidrólise se assemelham aos dados experimentais de Bonnin et al. (2001) e os modelos estocásticos propostos por Pereira et al. (2017).

Por fim, ao analisar os gráficos em conjunto, é possível concluir que uma maior proporção de exopoligalacturonase na mistura reflete em uma distribuição mais uniforme dos substratos ao longo da hidrólise. Também é possível notar o aparecimento de todos os intermediários e produtos da reação desde o início da reação em todos os três casos estudados. Sendo assim, embora seja possível definir picos de concentrações de intermediários que possam ser de interesse, não é possível encontrar intervalos onde exista um intermediário OGA_n isolado, o que pode limitar as opções de separação.

5.2 DISCUSSÃO SOBRE OS RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO

O resultado da otimização da Figura 4.2 mostra que uma porcentagem maior de exopoligacturonases na enzima é preferível nas condições deste estudo, o que condiz com os dados encontrados na literatura que dizem que a hidrólise de polímeros menores do ácido galaturônico promovida por exopoligalacturonases tem uma taxa de reação mais elevada do que as promovidas pelas endopoligalacturonases (PEREIRA et al., 2017; PERSI DE SOUZA; FONTANA, 2022; KLUSKENS et al., 2005; BONNIN et al., 2001).

Ao analisar o box plot do ponto de ótimo da otimização encontrado na Figura 4.3 é possível chegar a algumas conclusões. Primeiro, o fato de o box plot não ter outliers significa que todos os pontos de dados no conjunto de dados estão dentro do intervalo dos limites do gráfico. Isso indica que os dados são relativamente homogêneos, sem valores extremos significativamente maiores ou menores que o restante dos dados. Segundo, a distribuição dos dados é assimétrica, pois tanto os limites quanto as metades da caixa têm tamanhos diferentes, o que significa que os dados não são simétricos. Neste caso particular, as simulações mostram que a maioria dos dados tende a se reunir no limite inferior e no primeiro quartil.

O ponto ótimo encontrado ao aplicar o método de Otimização por Enxame de Partículas, sendo uma proporção de 1,38% de endopoligalacturonases na mistura enzimática, apresentou uma concentração do produto final superior à média da análise box plot feita na mesma condição ótima. Isso pode ser explicado considerando os critérios de parada aplicados na seção 3.7 que, quando atendidos, atingiriam o pico do melhor indivíduo entre os 20 utilizados na otimização como ponto de dados ótimo. Como o critério era relativamente estreito, 0,01 de distância na escala do eixo x dos dois indivíduos mais afastados, era provável o surgimento de um ponto ótimo acima da média.

Outro ponto interessante mostrado na Figura 4.3 é o quão próximo está a solução ótima do modelo quando comparada com a solução de uma mistura contendo apenas exopoligalacturonases, de fato, o valor da concentração normalizada resultante da reação apenas com exopoligalacturonases cai dentro do box plot para a

solução ótima. Isso significa que o intervalo entre esses pontos não pode ser descartado na busca pela melhor relação enzimática nessa condição. Ao analisar o método, a decisão de inverter a direção da velocidade de um indivíduo quando o primeiro escaparia dos limites da função poderia desviar o algoritmo para longe extremos da função.

Ao analisar a Figura 4.4 que representa uma simulação completa usando a proporção enzimática ótima encontrada na seção 4.2, nota-se que os resultados da simulação da hidrólise usando a mistura otimizada de enzimas foram superiores a qualquer uma das simulações e dados experimentais encontrados na literatura para qualquer combinação de concentração de enzima entre endopoligalacturonases e exopoligalacturonases (PERSI DE SOUZA; FONTANA, 2022; BONNIN et al., 2001). A simulação também apresentou todos os comportamentos esperados na literatura para esse tipo de reação: tendência de catalisar substratos maiores primeiro (PERSI DE SOUZA; FONTANA, 2022; BONNIN et al., 2001), pico de concentração único para o intermediário de cada reação (ISHIKAWA et al., 2007), e o aparecimento de todos os possíveis intermediários da reação durante a simulação (PERSI DE SOUZA; FONTANA, 2022).

As Figuras 4.5, 4.6 e 4.7 mostram resultados de otimizações para situações diferentes da observada na Figura 4.2, com as Figuras 4.5 e 4.6 mostrando o comportamento da simulação com tempos diferentes, 15 e 30 minutos respectivamente, e a Figura 4.7 mostrando o comportamento da simulação com substratos maiores, com 27 unidades do ácido D-galacturônico na sua cadeia principal.

A partir das Figuras 4.2, 4.5 e 4.6 percebe-se que, quanto menor o tempo de simulação, mais próximos são os resultados das hidrólises nos extremos (mais próximos são os resultados das hidrólises com endopoligalacturonases puras e exopoligalacturonases puras). Isso pode ser explicado pela maior concentração de substratos maiores no início da reação, como a endopoligalacturonase tem uma tendência maior de catalisar substratos grandes quando comparados com substratos menores (BONNIN et al., 2001; PEREIRA et al., 2017; PERSI DE SOUZA; FONTANA,

2022), sua taxa de reação ao longo da hidrólise acaba se aproximando mais da taxa de reação da exopoligalacturonase nas mesmas condições.

Ao analisar as figuras 4.2, 4.5 e 4.6 também é possível notar que um menor tempo de reação levou a um maior número de iterações necessárias para se encontrar o tempo ótimo na otimização, isso pode ter ocorrido devido ao menor número de reações acontecendo em cada simulação de hidrólise, o que pode levar a uma maior instabilidade nos resultados e conseqüentemente requerer um maior número de iterações para se atingir o ponto ótimo ao se aplicar o método de Otimização por Enxame de Partículas.

As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 mostra uma tendência de inversão nas proporções enzimáticas para substratos maiores, com proporções enzimáticas ótimas de 1,95%, 24,2% e 62,4% de endopoligalacturonases em sua composição para a hidrólise de substratos de cadeia com tamanho 14, 21 e 26 respectivamente. Um resultado condizente com a literatura, que diz que as taxas de catálise da endopoligalacturonase para substratos grandes é maior do que as taxas de catálise da exopoligalacturonase para os mesmos substratos (PEREIRA et al., 2017; PERSI DE SOUZA, 2020).

Finalmente, a Figura 4.10 mostra uma curva e equação de porcentagens ótimas de endopoligalacturonases na mistura catalítica composta por exopoligalacturonases e endopoligalacturonases na hidrólise do ácido poligalacturônico com diferentes tamanhos de cadeia, obtidas a partir das Figuras 4.2, 4.7, 4.8 e 4.9. Apesar de mostrar alguns valores negativos próximos de zero para cadeias pequenas (que pode ser desprezado considerando uma margem de erro de 2%, podendo esse erro ser atribuído a aleatoriedade do sistema), a equação de segundo grau foi a que melhor se ajustou aos dados, obtendo um R^2 de 0,9969, mostrando que essa equação de ajusta bem aos valores encontrados na simulação e pode ser usada para determinar a porcentagem ótima de endopoligalacturonases em outros substratos nas condições deste estudo.

6 CONCLUSÃO

O modelo estocástico para hidrólise multi-enzimática de polímeros desenvolvido neste estudo apresenta claras vantagens em relação aos modelos de hidrólise enzimática de polímeros existentes na literatura, principalmente considerando polímeros lineares. A determinação das ações de múltiplas enzimas operando em um único sistema é feita de forma clara, simples e fácil de aplicar a outros modelos através da fixação dos tempos de iteração para ação enzimática, e a determinação das taxas de reação é feita utilizando parâmetros da cinética enzimática clássica comumente encontrados na literatura.

O modelo foi capaz de descrever os dados experimentais para a ação da enzima endopoligalacturonase na hidrólise do ácido heptagalacturônico e obteve valores de formação do produto de interesse (o ácido D-galacturônico) de 1,92 vezes, 6,44 vezes e 2,71 vezes a concentração do substrato inicial no tempo $t=0$ para a hidrólise do ácido heptagalacturônico usando como catalisador respectivamente a enzima endopoligalactunase, a enzima exopoligalactunase e uma mistura enzimática contendo endopoligalactunases e exopoligalacturonases em proporção de 9:1, mantendo um tempo de reação de 1 hora para todos os casos.

O método de otimização proposto, sendo esse o primeiro método proposto para esse tipo de modelo encontrado na literatura, provou encontrar de forma confiável pontos ótimos correspondentes com o esperado, considerando as informações do modelo otimizado encontradas na literatura (PEREIRA et al., 2017; PERSI DE SOUZA; FONTANA, 2022; KLUSKENS et al., 2005; BONNIN et al., 2001). Obtendo percentuais ótimos de mistura catalítica entre endopoligalacturonases e exopoligalacturonases de 1,38%:98,62%, 1,02%:98,98% e 0,96%:99,04% para reações de hidrólise do ácido heptagalacturônico como substrato inicial com tempos de reação de 1 hora, 30 minutos e 15 minutos respectivamente. E um percentual ótimo de mistura catalítica entre endopoligalacturonases e exopoligalacturonases de 1,95:98,05, 24,2:75,8 e 62,4%:37,6% para reações de hidrólise do ácido poligalacturônico (com 14, 21 e 26 unidades do ácido D-galacturônico em sua cadeia principal respectivamente) como substrato inicial e tempo de reação de 1 hora.

O algoritmo de otimização do sistema foi feito de forma genérica, permitindo que seja testado em outras reações enzimáticas e possivelmente pode ser aplicado no projeto de equipamentos da indústria mais eficientes.

7 REFERÊNCIAS

AZTALOS, A. DANIELS, M. SETHI, A. SHEN, T. LANGAN, P. REDONDO, A. GANANAKARAN, S. **A coarsed-grained model for synergistic action of multiple enzymes on cellulose.** *Biotechnol. Biofuels* 5 (2012) 55.

BACIU, I.E. JÖRDENING, H.J. **Kinetics of galacturonic acid release from sugarbeet pulp.** *Enzyme Microb. Technol.* 34 (2004) 505-512.

BESSELINK, T. BAKS, T. JANSSEN, A.E.M. BOOM, R.M. **A stochastic model for predicting dextrose equivalent and saccharide composition during hydrolysis of starch by α -amylase.** *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 684-697.

BIZ, A. FARIAS, F.C. MOTTER, F.A. PAULA, D.H. RICHARD, P. KRIEGER, N. MITCHELL, D.A. **Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works!** *PLoS ONE* 9 (2014) e109529.

BIZ, A. Soluções para biorrefinarias de polpa cítrica. 2015. **Tese (Doutorado em Ciências Bioquímicas)** – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2015.

BONNIN, E. GOFF, A.L. KÖRNER, R. VAN ALEBEEK, G.-J.W.M. CHRISTENSEN, T.M.I.E. VORAGEN, A.G.J. ROEPSTORFF, P. CAPRARI, C. THIBAUT, J.-F. **Study of the mode of action of endopolygalacturonase from *Fusarium moniliforme*.** *Biochim. Biophys. Acta* 1526 (2001) 301-309.

BRACONNOT, H. **Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les vegetaux.** *Ann. Chim. Phys.* 28 (1825) 173-183

CIRIMINNA, R. CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N. HERNÁNDEZ, A.I.R. PAGLIARO, **M. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint.** *Biofuels Bioprod. Bior.* 9 (2015) 368-377.

CLERC, M., & KENNEDY, J. **The particle swarm-explosion, stability, and convergence in a multidimensional complex space.** *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, 6(1) (2002) 58-73.

EBERHART, R. C. AND KENNEDY, J. **A new optimizer using particle swarm theory** (1995).

GARNA, H. MABON, N. NOTT, K. WATHELET, B. PAQUOT, M. **Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography.** *Food Chem.* 96 (2006) 477-484.

GILLESPIE, D.T. **A general Method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions.** *J. Comput. Phys.* 22 (1976) 403-434.

GLASSERMAN, P. **Monte Carlo methods in financial engineering** (2004).

GOLUB, G. H., & VAN LOAN, C. F. **Matrix computations (4th ed.)**. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press (2013).

HUNT, J.J. CAMERON, R. WILLIAMS, M.A.K. **On the simulation of enzymatic digest patterns: The fragmentation of oligomeric and polymeric galacturonides by endo-polygalacturonase II.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1760 (2006) 1696-1703.

ISHIKAWA, K. NAKATANI, H. KATSUYA, Y. FUKAZAWA, C. **Kinetic and structural analysis of enzyme sliding on a substrate: multiple attack in β -amylase.**

Biochemistry-US 46 (2007) 792-798.

ISLAM, M. S., HAQUE, M. E., & LEE, J. **Modelling of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews 61 (2016) 1092-1107.

JOHNSON, K.A. **Role of induced fit in enzyme specificity: A molecular forward/reverse switch.** J. Biol. Chem. 283 (2008) 26297-26301.

KENNEDY, J., & EBERHART, R. **Particle swarm optimization.** In **Proceedings of the IEEE.** International Conference on Neural Networks (1995) 1942-1948.

KHAMSEH, A.A.G. MICCIO, M. FERRARI, G. **Optimal kinetic parameters and batch modeling for pectin hydrolysis to galacturonic acid with Pectinex Ultra SP-L enzyme.** Chem. Eng. Comm. 200 (2013) 1334-1346.

KLUSKENS, L.D. VAN ALEBEEK, G.-J.W.M. WALTHER, J. VORAGEN, A.G.J. DE VOS, W.M. VAN DER OOST, J. **Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotogamaritime*.** FEBS J. 272 (2005) 5464-5473.

KUIVANEN, J. MOJZITA, D. WANG, Y. HILDITCH, S. PENTTILÄ, M. RICHARD, P. WIEBE, M.G. **Engineering filamentous fungi for conversion of D-galacturonic acid to L-galactonic acid.** Appl. Environ. Microb. 78 (2012) 8676-8683.

KUIVANEN, J. DANTAS, H. MOJZITA, D. MALLMANN, E. BIZ, A. KRIEGER, N. MITCHELL, D. RICHARD, P. **Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *Aspergillus niger*.** AMB Express 4 (2014) 33.

KUIVANEN, J. PENTTILÄ, M. RICHARD, P. **Metabolic engineering of the fungal D- galacturonate pathway for L-ascorbic acid production.** *Microb. Cell Fact.* 14 (2015) 2.

KUMAR, D. MURTHY, G.S. **Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production.** *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013) 63.

KUMAR, D. MURTHY, G.S. **Development and validation of a stochastic molecular model of cellulose hydrolysis by action of multiple cellulase enzymes.** *Bioresour. Bioprocess* 4 (2017) 54.

LEIJDEKKERS, A.G.M. BINK, P.M. GEUTJES, S. SCHOLS, H.A. GRUPPEN, H. **Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose; a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides.** *Biores. Technol.* 128 (2013) 518-525.

LOHRASBI, M. POURBAFRANI, M. NIKLASSON, C. TAHERZADEH, M.J. **Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products.** *Biores. Technol.* 101 (2010) 7382-7388.

LOPEZ, J.A.S. THOMPSON, Q. LI, I.P. **Biorefinery of waste orange peel.** *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 63-69.

MARCHAL, L. ULIJN, R. GOOIJER, C.D. FRANKE, G. TRAMPER, J. **Monte Carlo simulation of the α -amylolysis of amylopectin potato starch. 2. α -amylolysis of amylopectin.** *Bioprocess Biosyst. Eng.* 26 (2003) 123-132.

MITCHELL, D.A. CARRIÈRE, F. KRIEGER, N. **An analytical method for determining relative specificities for sequential reactions catalyzed by the same enzyme: General formulation.** *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 705-715.

MOHNEN, D. **Pectin structure and biosynthesis.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (2008) 266-277.

MOREIRA, I. KRIEGER, N. MITCHELL, D.A. **Time is of the essence: A new strategy for time-stepping in stochastic models describing the enzymatic hydrolysis of colloidal suspensions of polysaccharides.** *Chem. Eng. J.* 405 (2021) 126672.

NAKATANI, H. **Monte Carlo simulation of multiple attack mechanism of α -amylase.** *Biopolymers* 39 (1996) 665-669.

NAKATANI, H. **Monte Carlo simulation of multiple attack mechanism of α -amylase-catalyzed reaction.** *Biopolymers* 42 (1997) 831-836.

NGUYEN, T. T., & O'CONNOR, K. M. **Modelling of enzymatic hydrolysis of cellulose for bioethanol production.** *Biotechnology For Biofuels*, 11(1) (2018), 1-14.

PEREIRA, A.B. KRIEGER, N. MITCHELL, D.A. **Fingerprinting of oligosaccharide-hydrolyzing enzymes that catalyze branched reaction schemes.** *Biochem. Eng. J.* 113 (2016) 93-101.

PEREIRA, A.B. ESPÍRITO SANTO, L.M.P. BALMANT, W. NIETZEL, I. KRIEGER, N. MITCHELL, D.A. **Stochastic models based on the Monte Carlo method for the hydrolysis of oligogalacturonates and polygalacturonates by endopolygalacturonases and exopolygalacturonases.** Chem. Eng. J. 322 (2017) 417-427.

PERSI DE SOUZA, R. **Modelagem da hidrólise total multi-enzimática de substratos pécticos pelo método de Monte Carlo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2020.

PERSI DE SOUZA, R. Fontana E. **Developing a stochastic model based in the monte carlo method to describe the total hydrolysis of polymers.** A sociedade do conhecimento e suas tecnologias: estudos em Ciências Exatas e Engenharias 2022; Volume 1.

POURBAFRANI, M. FORGÁCS, G. HORVÁTH, I.S. NIKLASSON, C. TAHERZADEH, M.J. **Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes.** Bioresource Technol. 101 (2010) 4246-4250.

POURBAFRANI, M. MCKECHNIE, J. MACLEAN, H.L. SAVILLE, B.A. **Life cycle greenhouse gas impacts of ethanol, biomethane and limonene production from citrus waste.** Environ. Res. Lett. 8 (2013) e015007.

RADVA, D. KNUTSEN, S.H. KOSÁRY, J. BALLANCE, S. **Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection to compare the kinetic properties of β -glucosidase on oligosaccharides from lichenase digested barley β -glucan.** Carbohydr. Res. 358 (2012) 56-60.

RICHARD, P. HILDITCH, S. **D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82 (2009) 597-604.

RIDLEY, B.L. O'NEILL, M.A. MOHNEN, D. **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling**. Phytochemistry 57-6 (2001) 929-967.

RIVAS-CANTU, R.C. JONES, K.D. MILLS, P.L. **A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges**. Waste Manage. Res. 31 (2013) 413-420.

ROSNER, B. **Percentage points for a generalized ESD many-outlier procedure**. Technometrics, 25(2) (1983) 165-172.

SANTI, L. BERGER, M. SILVA, W.O.B. **Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico**. Cadernopedagógico, Lajeado 11 (2014) 130-139.

SHI, Y., & EBERHART, R. **A modified particle swarm optimizer**. In Proceedings of the IEEE International Conference on Evolutionary Computation (1998) 69-73.

THIBAUT, J.-F. RENARD, C.M.G.C. AXELOS, M.A.V. ROGER, P. CRÉPEAU, M.-J. **Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis**. Carbohydr. Res. 238 (1993) 271-286.

TODISCO, S. CALABRÒ, V. IORIO, G. **A kinetic model for the pectin hydrolysis using an endo-acting pectinase from *Rhizopus***. J. Mol. Catal. 92 (1994) 333-346.

TUKEY, J. W. **Exploratory data analysis**. Reading, MA: Addison-Wesley (1977).

USDA – United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade. 2021**. Disponível em:

<<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2021.

WIEBE, M.G. MOJZITA, D. HILDTCH, S. RUOHONEN, L. PENTTILÄ, M. **Bioconversion of D-galacturonate to keto-deoxy-L-galactonate (3-deoxy-L-threo-hex-2-ulosonate) using filamentous fungi. BMC Biotechnology 10 (2010) 63.**

VORAGEN, A.G.J. COENEN, G.-J. VERHOEF, R.P. SCHOLS, H.A. **Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. Struct. Chem. 20 (2009) 263-275.**

WILLIAMS, M.A.K. BUFFET, G.M.C. FOSTER, T.J. NORTON, I.T. **Simulation of endo-PG digest patterns and implications for the determination of pectin fine structure. Carbohydr.Res. 334 (2001) 243-250.**

WHITE, G.W. KATONA, T. ZODDA, J.P. **The use of high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) as a molecular weight screening technique for polygalacturonic acid for use in pharmaceutical applications. J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 905-912.**

WOJCIECHOWSKI, P.M. KOZIOL, A. NOWORYTA, A. **Iteration model of starch hydrolysis by amylolytic enzymes. Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 530-539.**