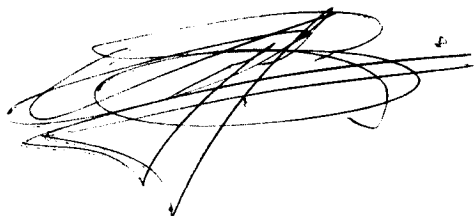


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA  
Departamento de Engenharia - DEA

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE UM REATOR CONTÍNUO COM RECICLO DA ENZIMA  
Parecer PARA PRODUÇÃO "in vitro" DE DEXTRANA.**

*Este exemplar corresponde a redação final  
da Tese defendida por Eliane Aparecida  
Souza e aprovada pela Comissão Julgadora  
em 18.06.93*

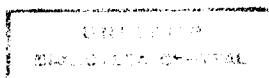


Eliane Aparecida (Souza) <sup>n.º 89</sup>  
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Francisco (Maugeri) Filho

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de  
Alimentos, UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em  
Engenharia de Alimentos.

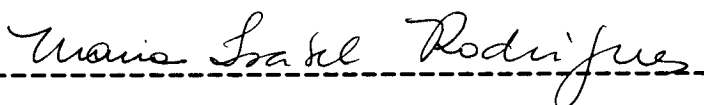
CAMPINAS  
1993



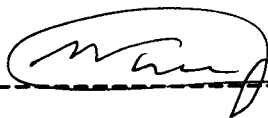
**BANCA EXAMINADORA**



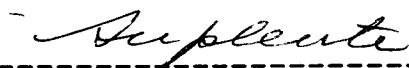
Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho  
ORIENTADOR



Prof.ª. Dr.ª. Maria Isabel Rodrigues  
MEMBRO



Prof. Dr. Satoshi Tobinaga  
MEMBRO



Prof. Dr. Rubens Maciel  
MEMBRO

Campinas, 18 de Junho de 1993

Dedico este trabalho, com todo carinho, aos meus pais e aos grandes companheiros: Banditi, Ameixa, Capitu e Taboa (in memoriam).

"Ama o teu caminho, curto ou comprido, fácil ou difícil, simples ou complicado, é teu caminho, o único que podes realizar e dar de ti todo teu amor."

(autor desconhecido)

## AGRADECIMENTOS

- A DEUS.
- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri pela orientação, incentivo e apoio durante a execução deste trabalho.
- Aos membros da Banca Examinadora e aos demais professores que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel pela paciência e intensa colaboração durante todas as etapas.
- À Fifa pela super força e carinho.
- Ao Costa pelas fotos.
- Ao Miro e ao Vinilton pelas figuras. Grande Mirão! Muito lhe agradeço, valeu companheiro!
- Ao Aparecido, Maria e Isaura pela convivência diária com muita alegria.
- Ao Jayme, Vivien, Vera, Ary, Márcio, Fátima (microcentro), Ivana, Jane, Cristiane (secr. pós-graduação) e demais funcionários da FEA pela colaboração.
- Ao Jonas (xerox) pela ajuda constante.
- A toda minha família, em especial aos meus pais, Joaquim e Lia, à minha irmã, Viviane e ao tio Zé, pelo grande incentivo e super força em todos os momentos. Amo vocês!
- À Vila, Doce Vila São João! AOS SUSSEGADOS! Junto as altas "corrupagens", a alegria reina! Taí: a Lili ama 'oceis tudo desse Reino Encantado...
- Ao Cnpq, Capes e Faep, pelo auxílio financeiro.
- À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos (ABIA) pelas cópias xerográficas desta tese.
- Enfim, a esse povo maravilhoso que pinta na vida da gente e nos faz sonhar realidades, acreditar no amor e na amizade...Valeu

galerona! ou melhor, tá valendo!!!, muita LUZ nos nossos  
caminhos.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABELAS.....	vii
NOMENCLATURA.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. ASPECTOS GERAIS.....	4
2. DEXTRANA.....	6
2.1. APLICAÇÕES.....	6
2.2. PROCESSOS DE OBTENÇÃO DA DEXTRANA.....	7
3. DEXTRANA-SACARASE.....	9
3.1. PRODUÇÃO.....	9
3.2. PROPRIEDADES.....	10
3.3. MECANISMOS DE AÇÃO.....	11
3.4. MECANISMO DE AÇÃO NA PRESENÇA DE RECEPTORES.....	13
4. CROMATOGRAFIA.....	14
4.1. CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	15
4.2. CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA.....	15
4.2.1. INTRODUÇÃO.....	15
4.2.2. MATRIZ.....	16
4.2.3. TIPOS DE TROCADORES IÔNICOS.....	19
4.2.4. GRUPOS TROCADORES.....	21
4.2.5. PROPRIEDADES DE TROCADORES IÔNICOS.....	22
4.2.6. ELUIÇÃO.....	23
4.2.7. APLICAÇÕES.....	24
4.3. CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE.....	25
4.3.1. MATRIZ.....	27
4.3.2. ELUIÇÃO.....	28
4.3.3. APLICAÇÕES.....	29
4.4. OUTRAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	29
4.4.1. CROMATOGRAFIA POR HIDROFOBICIDADE.....	29
4.4.2. CROMATOGRAFIA EM GEL.....	33

5. PROCESSO "CARE".....	35
5.1. INTRODUÇÃO.....	35
5.2. MODELO MATEMÁTICO.....	37
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
1. OBTENÇÃO DA ENZIMA.....	42
2. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA ENZIMA.....	44
3. SELEÇÃO DA RESINA E DAS CONDIÇÕES DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA ENZIMA.....	44
4. SEPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE DEAE-CELULOSE.....	49
5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO PARA ESTABELECIMENTO DO EQUILÍBRIO NA ADSORÇÃO DA ENZIMA.....	51
6. CONSTRUÇÃO DA CURVA DE EQUILÍBRIO NA ADSORÇÃO DA ENZIMA.....	52
7. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA ENZIMA...	52
8. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DA RESINA.....	53
9. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	54
9.1. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	54
9.2. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES PELO MÉTODO DNS.....	54
9.2.1. AÇÚCARES REDUTORES.....	54
9.2.2. AÇÚCARES TOTAIS.....	55
9.2.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	55
9.3. CURVA PADRÃO PARA PROTEÍNA UTILIZANDO ALBUMINABOVINA.....	56
9.4. CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE DE DEXTRANA-SACARASE.....	56
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
1. OBTENÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DA ENZIMA.....	57
1.1. ESCOLHA DA RESINA.....	57
1.1.1. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA ENZIMA.....	57
1.1.2. ESTUDO DA ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA ENZIMA EM DIFERENTES RESINAS.....	58
1.2. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO NA ADSORÇÃO.....	62
1.3. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA ADSORÇÃO.....	64

1.3.1. CURVA DE EQUILÍBRIO E CONSTANTES	
$K_d$ E $Q_m$ .....	64
1.3.2. CONSTANTES CINÉTICAS $K_1$ E $K_2$ .....	68
2. MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO REATOR DUPLO ESTÁGIO	
PARA PRODUÇÃO DE DEXTRANA.....	70
2.1. DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE REATORES.....	70
2.2. MODELAGEM DO REATOR.....	71
2.3. SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA.....	77
2.3.1. DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS OPERACIONAIS...	78
2.3.2. ANÁLISE DAS SIMULAÇÕES.....	78
<b>V. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>VI. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>106</b>
A (Fluxograma do programa para determinação das	
constantes cinéticas $K_1$ e $K_2$ ).....	106
B (Fluxograma do programa utilizado para simulação do	
reator).....	110
C (Gráficos dos resultados obtidos nas simulações).....	115



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA II.1.a - Esquema de um trocador aniônico.....	18
FIGURA II.1.b - Esquema de um trocador catiônico.....	18
FIGURA II.2 - A carga de uma proteína como função do pH.....	18
FIGURA II.3 - Aparelhos simples para a formação de gradientes.	24
FIGURA II.4 - Princípio básico da cromatografia por afinidade.	26
FIGURA II.5 - Princípio da cromatografia em gel.....	34
FIGURA II.6 - Esquema do processo "CARE".....	37
FIGURA III.1 - Esquema da montagem utilizada para eluição com gradientesalino.....	46
FIGURA III.2 - Esquema do sistema de vaso comunicante utilizado para formação do gradiente salino.....	47
FIGURA III.3 - Montagem utilizada para determinação do tempo de equilíbrio na adsorção da enzima.....	51
FIGURA IV.1 - Determinação do P.I. da dextrana-sacarase através de análise eletroforética.....	58
FIGURA IV.2 - Dessorção da dextrana-sacarase adsorvida em DEAE- celulose, utilizando NaCl como eluente.....	60
FIGURA IV.3 - Variação da absorvância com o tempo, durante a adsorção da enzima (30 UDS) pela resina.....	63
FIGURA IV.4 - Isoterma de adsorção.....	66
FIGURA IV.5 - Gráfico de $1/q^*$ em função de $1/c^*$ para obtenção de $K_d$ e $q_m$ .....	67

FIGURA IV.6 - Resolução numérica de melhor ajuste aos resultados experimentais para determinação de $k_1$ e $k_2$ .....	68
FIGURA IV.7 - Sistema duplo estágio para produção de dextrana com reciclo da enzima.....	70
FIGURA IV.8.a - Curva padrão da concentração de albumina bovina(g/l).....	73
FIGURA IV.8.b - Curva padrão da atividade de dextrana-sacarase(UDS/ml).....	74
FIGURA IV.9 - Reator proposto indicando os fluxos.....	75
FIGURA IV.10 - Resultados obtidos na simulação 1.....	80
FIGURA IV.11.a - Gráfico de $CT/C_0$ em função de $\epsilon$ e $C_0$ (g/l)...	81
FIGURA IV.11.b - Gráfico de $S_2/S_0$ em função de $\epsilon$ e $C_0$ (g/l)...	81
FIGURA IV.12.a - Gráfico de $CT/C_0$ em função de $\phi$ e $S_0$ (g/l)...	82
FIGURA IV.12.b - Gráfico de $S_2/S_0$ em função de $\phi$ e $S_0$ (g/l)...	83
FIGURA IV.13.a - Gráfico de $K_c$ em função de $\epsilon$ e $C_0$ (g/l).....	86
FIGURA IV.13.b - Gráfico de $K_c$ em função de $\phi$ e $S_0$ (g/l).....	86
FIGURA IV.14.a - Gráfico de $K_s$ em função de $\epsilon$ e $C_0$ (g/l).....	88
FIGURA IV.14.b - Gráfico de $K_s$ em função de $\phi$ e $S_0$ (g/l).....	88
FIGURA IV.15 - Gráfico de $\ln(K_c \cdot \epsilon^{0,3})$ em função de $\ln(\tau_{s/h} \cdot \epsilon \cdot (C_0/K_d)^{0,09})$ .....	90
FIGURA IV.16 - Gráfico de $\ln(K_s^{0,1} \cdot \epsilon \cdot \phi^{0,9})$ em função de $-\ln((K_c \cdot K_m^2)/(V_{max} \cdot S_0))$ .....	92

FIGURA IV.17 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 1.....	93
FIGURA IV.18 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 2.....	93
FIGURA IV.19 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 6.....	94
FIGURA IV.20 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 15.....	94

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA II.1 - Grupos funcionais usados para troca iônica.....	21
TABELA III.1 - Meio de cultura para fermentação de <u>Leuconostoc mesenteroides</u> .....	43
TABELA III.2 - Descrição das peneiras utilizadas para separação da DEAE-celulose em partículas homogêneas.....	50
TABELA IV.1 - Estabilidade da dextrana-sacarase em NaCl e CaCl <sub>2</sub> .....	59
TABELA IV.2 - Dessorção da dextrana-sacarase nas resinas de DEAE-celulose em função da granulometria.....	61
TABELA IV.3 - Tempo para estabelecimento do equilíbrio na adsorção da enzima.....	62
TABELA IV.4 - Resultados obtidos (UV*) para determinação da curva de equilíbrio.....	64
TABELA IV.5 - Resultados obtidos para c* e q*.....	65
TABELA IV.6 - Condições dos parâmetros $\phi$ , $\epsilon$ , C <sub>0</sub> e S <sub>0</sub> usados nas 16 simulações.....	79
TABELA IV.7 - Valores obtidos para K <sub>c</sub> .....	85
TABELA IV.8 - Valores obtidos para K <sub>s</sub> .....	87

## NOMENCLATURA

$c_1$	Concentração de enzima livre no estágio I ( $g.l^{-1}$ )
$c_2$	Concentração de enzima livre no estágio II ( $g.l^{-1}$ )
$q_1$	Conc. de enzima adsorvida no estágio I ( $g.l^{-1}$ res.)
$q_2$	Conc. de enzima adsorvida no estágio II ( $g.l^{-1}$ res.)
$S_1$	Concentração de substrato no estágio I ( $g.l^{-1}$ )
$S_2$	Concentração de substrato no estágio II ( $g.l^{-1}$ )
$S_0$	Conc. de substrato na alimentação do estágio I ( $g.l^{-1}$ )
$F_r$	Vazão de reciclo ( $l.h^{-1}$ )
$F_1$	Vazão de alimentação no estágio I ( $l.h^{-1}$ )
$F_2$	Vazão de tampão para adsorção no estágio II ( $l.h^{-1}$ )
$V_1$	Volume líquido no estágio I (l)
$V_2$	Volume líquido no estágio II (l)
$VT$	Volume total em cada reator (l)
$V_l$	Volume de líquido em cada reator (l)
$V_s$	Volume de sólidos em cada reator (l)
$CT$	Concentração total de enzima em cada reator ( $g.l^{-1}$ )
$t$	Tempo (h)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida (h)
$\tau_h$	Tempo de residência hidráulico (h)
$\tau_s$	Tempo de residência de sólidos (h)
$k_1$	Constante cinética - adsorção ( $l.g^{-1}.h^{-1}$ )
$k_2$	Constante cinética - adsorção ( $h^{-1}$ )
$k_3$	Constante cinética - dessorção ( $h^{-1}$ )
$q_m$	Capacidade máxima de adsorção da resina ( $g.l^{-1}$ )
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten ( $g.l^{-1}$ )
$V_{máx}$	Velocidade máxima que a reação pode atingir ( $g.l^{-1}.h^{-1}$ )
$K$	Constante da reação ( $h^{-1}$ )
$K_d$	Constante de dissociação ( $g.l^{-1}$ )
$KD$	Constante de inativação térmica ( $min.^{-1}$ )
$K_c$	Taxa de perda atividade da enzima ( $h^{-1}$ )
$K_s$	Perda de substrato no estágio II ( $h^{-1}$ )
$\epsilon$	Porosidade (vol. liq./vol. total)
$\phi$	Diâmetro ( $\mu$ )

## ADIMENSIONAIS

- . Relação entre o tempo de residência de sólidos e tempo de residência hidráulico do reator:

$$\tau_{s/h} = \frac{\tau_s}{\tau_h}$$

- . Relação entre a vazão de reciclo e as vazões de alimentação:

$$\phi = \frac{F_r}{(F_1 + F_2)}$$

## RESUMO

Neste trabalho foi proposta uma nova técnica para produção de dextrana, que consiste de um processo contínuo duplo estágio onde a enzima (dextrana-sacarase) é constantemente reciclada por intermédio de resina de troca iônica e o produto é obtido na saída do segundo estágio.

O estudo da viabilidade técnica e do comportamento global do reator foi realizado, baseando-se primeiramente no estudo da cinética de adsorção da enzima e posteriormente simulando o processo em computador, variando as concentrações de substrato e enzima, fração de sólidos representada pela massa de resina e as vazões de alimentação e reciclo.

De acordo com o modelo proposto para o processo de adsorção, foram obtidos os seguintes valores para as constantes cinéticas:

$$K_d = 4,975 \cdot 10^{-1} \text{ g.l}^{-1},$$

$$q_m = 519,751 \text{ g.l}^{-1},$$

$$k_1 = 426,6 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1} \text{ e}$$

$$k_2 = 212,22 \text{ h}^{-1}.$$

A partir dos dados cinéticos de adsorção levantados em experiências de laboratório, do modelo matemático de velocidade de reação segundo a equação de Michaelis-Menten e de balanços de massa foi feita a modelagem do sistema. As simulações foram realizadas dentro das limitações operacionais do processo e os resultados mostraram que o sistema não atinge o estado estacionário pleno devido à perda de enzima no efluente, sendo esta função de diferentes parâmetros de processo, como teor de sólidos nos reatores, tempos de residência hidráulico e de sólidos e concentração de enzima.

Mediante os resultados obtidos nas simulações, visando critérios para estudos de otimização do processo em trabalhos futuros, duas constantes cinéticas foram definidas, uma delas,  $K_c$ , relacionada com a perda de enzima e a outra,  $K_s$ , relacionada

com a perda de substrato. As seguintes correlações foram determinadas:

$$K_c = 1,6768 \cdot 10^{-4} \cdot \tau_{s/h}^{0,834} \cdot e^{0,534} \cdot \left( \frac{C_o}{K_d} \right)^{0,075}$$

$$K_s = \frac{3,7948 \cdot 10^{-28}}{e^{10} \cdot \phi^9} \left( \frac{V_{\max} \cdot S_o}{K_c \cdot K_m^2} \right)^{2,7}$$



## SUMMARY

In this work a new approach for dextran production was presented. It consists of a continuous-two-staged reactor in which the enzyme is continuously recycled between stages by means of an ion exchange resin, whereas the product is obtained practically enzyme-free in the outlet of the 2<sup>nd</sup> stage.

Both the technical viability and the overall behaviour of the system were evaluated by studying firstly the adsorption of the enzyme on the resin and after simulating the process in a computer. Substrate and enzyme concentrations were changed in the simulations, as well as the solid (resin) fraction in the reactor, feed flow and recycling rate.

According to the mathematical model for adsorption of dextran-sucrase the following kinetics constants were obtained:

$$K_d = 4,975 \cdot 10^{-1} \text{ g.l}^{-1},$$

$$q_m = 519,751 \text{ g.l}^{-1},$$

$$k_1 = 426,6 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1} \text{ e}$$

$$k_2 = 212,22 \text{ h}^{-1}.$$

The mathematical modeling of the reaction was performed taking into account the mass balance and the kinetic equations for adsorption and enzymatic reaction (Michaelis-Menten type). The simulations were carried out within the operational limitations of the process and it has been shown that there is no true steady state, due to the lost of enzyme in the effluent. This lost of enzyme was shown to be function of several process parameters like the solid fraction in the reactors, the hydraulic residence time, the solid residence time and the enzyme concentration.

From the results obtained in the simulations, two kinetics constants were defined, one of them,  $K_c$ , related to the waste of the enzyme and the other one,  $K_s$ , related to the waste of the substrate. They can be useful for optimization studies in future works. The following correlations for  $K_c$  and  $K_s$  were

determined:

$$K_c = 1,6768 \cdot 10^{-4} \cdot \tau_{s/h}^{0,834} \cdot e^{0,534} \cdot \left( \frac{C_o}{K_d} \right)^{0,075}$$

$$K_s = \frac{3,7948 \cdot 10^{-28}}{e^{10} \cdot \phi^9} \left( \frac{V_{\max} \cdot S_o}{K_c \cdot K_m^2} \right)^{2,7}$$

## I. INTRODUÇÃO

Dextrana é o termo dado à um grupo de polissacarídeos de origem bacteriológica, consistindo de uma cadeia principal de D-glucose unida por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6. O grau de ramificações, peso molecular e outras propriedades da dextrana são muito específicas, variando conforme o microrganismo usado para produção da dextrana-sacarase. Entre eles tem-se as bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*, mas somente *Leuconostoc mesenteroides* (principal) e *Leuconostoc dextranicum* têm sido usados comercialmente. A maioria dos trabalhos recentes com dextranas têm sido conduzidos com várias linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e em particular o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F.

As aplicações da dextrana estão diretamente relacionadas com seu peso molecular, se este for superior a 25 milhões de daltons, pode ser empregada na extração de petróleo como agente de impermeabilização, ou ainda na recuperação secundária de petróleo com alta viscosidade. A dextrana de peso molecular médio é usada na indústria de alimentos como agente de textura, estabilizante e gelificante. Na indústria farmacêutica como substância de encapsulação e vetor de medicamentos, na indústria química tem seu uso na purificação de produtos biológicos (géis para enchimento de colunas cromatográficas). A dextrana de baixo peso molecular é usada na indústria farmacêutica como substituta do plasma sanguíneo ou com a finalidade de melhorar a fluidez do sangue prevenindo a obstrução dos capilares. Existem ainda alguns derivados da dextrana com importantes aplicações, como a dextrana-sulfato com propriedades anticoagulantes e a dextrana-ferro, usada no tratamento de anemias em animais e humanos. Vários outros usos têm sido propostos, entre eles no tratamento contra AIDS, sendo objeto de grande número de patentes.

Quanto à produção industrial de dextrana, atualmente existem dois processos distintos:

1.º polissacarídeo é produzido diretamente no meio de cultura

contendo o microrganismo e sacarose em excesso;

2. primeiro se produz a enzima (dextrana-sacarase), e após uma etapa de purificação sintetiza-se a dextrana "in vitro", utilizando sacarose como substrato.

No primeiro caso tem-se a produção de dextrana de alto peso molecular, sendo necessário posteriormente as etapas de hidrólise e fracionamento para sua utilização, além disso é o processo que apresenta menor rendimento e perdas consideráveis de enzima. Na produção via enzimática torna-se possível um melhor controle da produção de dextrana com relação ao seu peso molecular e maiores rendimentos são obtidos, no entanto ainda ocorrem perdas consideráveis de enzima. Com o objetivo de minimizar essas perdas e superar algumas das limitações operacionais dos sistemas convencionais, propôs-se através deste trabalho um novo método de produção de dextrana visando alcançar um produto final purificado de custo mínimo, mantendo alto rendimento na recuperação.

Devido ao elevado custo associado à produção da enzima, torna-se economicamente interessante a sua reutilização, visto que possui ótima estabilidade em condições normais de operação (AURIOL, 1984). Neste sentido, algumas alternativas foram tentadas sem grande sucesso, tais como a imobilização em suportes sólidos porosos proposto por (LOPES, 1979) e o reator cromatográfico de BARKER et al (1987). Portanto a reutilização deve ser tentada por outros meios como ultrafiltração ou separação por resinas de troca iônica. A ultrafiltração é um processo interessante, mas muito dispendioso podendo ser adotado como última alternativa. Por outro lado troca iônica é um processo bastante conhecido e de baixo custo, que deve ser levado em consideração e testado como solução para o problema. Representando uma nova estratégia para os processos de purificação PUNGOR et al (1987) desenvolveram uma técnica de purificação de enzimas usando um sistema contínuo duplo estágio, com adsorção e dessorção em estágios separados. O objetivo deste trabalho é portanto adaptar este processo para a produção de dextrana com reciclo de enzima.

Neste sentido, foi feito o estudo de um processo contínuo misto de adsorção, dessorção e reação química em reator duplo estágio com síntese de dextrana pela ação da enzima dextrana-sacarase, utilizando-se sacarose como substrato. A partir de dados cinéticos de adsorção levantados em experiências de laboratório e modelos matemáticos de velocidade de reação, já existentes na literatura, foram feitas a modelagem e simulação deste reator com o objetivo principal de estudar a exequibilidade do reciclo da enzima e o comportamento geral do sistema.

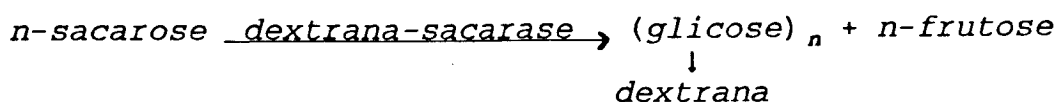
## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. ASPECTOS GERAIS

O termo dextrana foi utilizado pela primeira vez por SCHEIBLER quando ele encontrou em 1874, um misterioso espessamento nos xaropes de beterraba e cana-de-acúcar. Anteriormente PASTEUR em 1861 demonstrou que estas substâncias viscosas eram originadas por ação microbiológica e VAN TIWGHM chamou a bactéria de Leuconostoc mesenteroides. Mais tarde pesquisadores mostraram que "dextrana" pode ser produzida por muitos microrganismos e não tem suas características e propriedades bem definidas. As principais bactérias sintetizadoras de dextrana pertencem ao gênero Leuconostoc; espécie mesenteroides e dextranicum; grupo Streptococceae e família Lactobacillaceae. No entanto todas as espécies têm uma característica comum: a sacarose é, em geral, a única fonte de carboidrato aceitável para a produção do polissacarídeo. A maioria dos trabalhos publicados recentemente conduzem seus experimentos com várias linhagens de Leuconostoc mesenteroides, e em particular a NRRL B-512F (SANDFORD, 1979).

Segundo ASPINALL (1983), a dextrana é classificada como um homopolissacarídeo de origem bacteriana, formado por uma cadeia principal linear, com ligações  $\alpha$ -(1,6) podendo apresentar outras ligações glicosídicas e graus de ramificações variáveis. Atualmente dextrana é o termo usado na literatura para descrever uma classe de polissacarídeos, formados por unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosil, contendo em proporções variáveis ligações  $\alpha$ -(1,6),  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4). A maioria das dextranas conhecidas têm uma cadeia principal linear, formada por ligações  $\alpha$ -(1,6) apresentando diversidades quanto à proporção das outras ligações e das ramificações.

A síntese de dextrana se dá pela ação da enzima extracelular dextrana-sacarase ou  $\alpha$ (1,6)-D-glucan-D-frutose-2-D-glucosiltransferase (E.C.2.4.1.5) de acordo com a seguinte reação:



As características da dextrana quanto ao tipo de ligação existente e o grau de ramificação, dependem muito do microrganismo produtor. Até o momento toda a dextrana comercial é sintetizada por via enzimática, na presença ou ausência de células, usando a sacarose como substrato. Uma característica bastante útil no processo de produção é que tanto a dextrana como a dextrana-sacarase são exocelulares, facilitando os processos de extração (SANDFORD, 1989). Já que o mecanismo envolve apenas uma enzima, sem intermediários, a síntese "in vitro" é conduzida com relativa facilidade, bastando isolar a enzima e colocá-la em contato com a sacarose em condições controladas de temperatura e pH.

A unidade de dextrana-sacarase (UDS) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana, em uma hora, liberando 0,52 mg de frutose nas condições de teste: temperatura 30°C e pH 5,2 com tampão acetato (HEHRE, 1955). ROBYT & WALSETH (1978), definiram a unidade dextrana-sacarase, como sendo a quantidade de enzima que incorpora 1 micromole de D-glucose na cadeia do polissacarídeo em 1 minuto a pH 5,0 e temperatura de 25°C. LAW FORD et al (1979), expressam a atividade enzimática em microgramas de açúcar redutor produzidos por minuto por mililitro a pH 5,5 e temperatura de 30°C. KABOLI & REILLY (1980) definiram uma unidade (UI), como sendo a quantidade de enzima que libera 1 micromole de açúcar redutor em 1 minuto a pH 5, e temperatura de 30°C. Assim 1UI=20,27 UDS. A comparação dos resultados obtidos por diferentes autores é muito difícil devido à diversidade das condições (teste) para medir a atividade da enzima, entretanto na maioria dos trabalhos publicados a unidade enzimática é normalmente expressa em UDS, sendo que recentemente a definição dada por KABOLI & REILLY (1980) vem sendo utilizada.

## 2. DEXTRANA

### 2.1- APLICAÇÕES

A dextrana é um polissacarídeo exaustivamente estudado devido à sua grande aplicabilidade na indústria farmacêutica, química, petroquímica e de alimentos, promovendo um grande impulso na sua comercialização, surgindo inúmeras patentes e propondo diferentes aplicações, algumas com enorme sucesso comercial (NEELY, 1960).

Devido às suas particularidades, que dificultam sua substituição por polissacarídeos semelhantes, em alguns casos ela vem sendo usada há vários anos garantindo seu espaço nas aplicações industriais, que variam de acordo com seu peso molecular:

Peso molecular superior a 25 milhões de daltons - é utilizada na extração de petróleo com alta viscosidade (compõe a lama de perfuração) e também na recuperação secundária de petróleo.

Peso molecular médio - na indústria de alimentos (agente gelificante em geléias e chicletes, mantém o volume e inibe a formação de cristais em sorvetes, inibe a cristalização além de promover a homogeneização e espessamento em doces e xaropes, agente estabilizante em composição de coberturas, agente espessante em pudins); indústria química (obtenção de redes moleculares, gel de dextrana com ligações cruzadas usadas para enchimento de colunas em cromatografia por exclusão molecular onde o produto mais conhecido é DEAE-SEPHADEX, produção de soda: precipitação de impurezas através de complexos e produção de alumínio: agente de sedimentação).

Peso molecular baixo - na indústria farmacêutica é seu maior uso, tendo sido introduzida há mais de trinta anos. Conforme seu peso molecular ela pode ser usada como expansor do plasma sanguíneo (70 000 daltons) ou com a finalidade de aumentar a fluidez do sangue (40 000). Ela é completamente metabolizada no organismo



e não apresenta efeitos tóxicos ou alérgicos, no entanto estes efeitos aparecem com a dextrana de alto peso molecular (SANDFORD, 1983).

Outros derivados da dextrana úteis na medicina são:

- . dextrana-sulfato que apresenta propriedades anticoagulantes (MURPHY et al, 1973) e vem sendo proposta como medicamento anti-AIDS (BUSSO & RESNICK, 1990).
- . dextrana-ferro onde o complexo formado da dextrana com o íon  $Fe^{++}$  é estável e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de anemias em animais e humanos (ALSOP, 1983).

## 2.2- PROCESSOS DE OBTENÇÃO DA DEXTRANA

Várias linhagens diferentes de Leuconostoc mesenteroides produtores de dextrana foram testadas (JEANES, 1974) mostrando que além das condições de cultura, as características do produto final dependem do microrganismo. Apesar de se conhecer inúmeros microrganismos produtores de dextrana, a maioria dos processos industriais utilizam o Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F. Segundo (ALSOP, 1983) atualmente a produção com esta linhagem é conduzida por dois processos distintos, o método convencional e a síntese enzimática utilizando enzima purificada, sendo que as etapas principais são:

- . fermentação
  - crescimento celular
  - produção da enzima
  - produção da dextrana
- . hidrólise
- . fracionamento
- . secagem.

### a) Processo convencional de produção de dextrana

Tradicionalmente a dextrana é produzida durante o crescimento de Leuconostoc mesenteroides em meio de cultura contendo sacarose e enriquecido com outros nutrientes. É um processo simples exigindo poucos controles além da temperatura. As condições industriais utilizadas atualmente para produzir

dextrana são descritas por (ALSOP, 1983). A concentração de sacarose igual a 17% é a que proporciona maior rendimento. A temperatura varia durante a fermentação de 25 a 30°C. Nesse caso não é usada a adição de outros açúcares e o produto final é a dextrana nativa. Este trabalho confirma a citação de outros autores (MURPHY et al, 1973), nas quais os processos de produção de dextrana não têm sofrido modificações significativas. Apesar de inúmeras patentes terem sido registradas, propondo refinamentos e mudanças no processo, a maioria da dextrana comercial ainda hoje é produzida pelo processo convencional.

#### b) Produção de dextrana "in vitro"

Este processo consiste em duas etapas: a produção da enzima e a síntese da dextrana. A síntese da dextrana "in vitro" tem a vantagem de proporcionar um controle mais rigoroso durante a fase de fermentação e síntese de dextrana, resultando num meio mais aperfeiçoado, rentável e racional de obtenção do polissacarídeo. Dentre outras vantagens, a simplificação do processo de purificação e maiores rendimentos foram apontadas por (JEANES, 1974). Um detalhe importante é que mesmo na ausência de células, a dextrana produzida é de alto peso molecular exigindo as etapas de hidrólise e fracionamento para os usos farmacêuticos (ALSOP, 1983). A produção de dextrana por esta via permite ainda obter simultaneamente a frutose, açúcar de grande valor comercial.

É muito interessante controlar a síntese de dextrana em termos do seu peso molecular já que as suas diversas utilizações estão diretamente relacionadas aos diferentes pesos moleculares. Isso exige um controle de uma série de fatores como: concentração do substrato, tempo de reação, força iônica, tipo e concentração dos receptores, atividade enzimática, temperatura e pH.

O segundo processo descrito embora exija uma tecnologia mais sofisticada e investimento inicial maior, é aquele que torna possível o controle dos diversos parâmetros citados.

### 3. DEXTRANA-SACARASE

#### 3.1- PRODUÇÃO

A dextrana-sacarase produzida por Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F é uma enzima indutiva, e o único indutor conhecido é a sacarose (NEELY, 1962), utilizada também como fonte de carbono. A utilização de outros açúcares como glicose, frutose, manose e lactose promovem um crescimento vegetativo normal, no entanto não há produção de enzima (LOPES, 1979).

Diversos fatores influenciam a produção de dextrana-sacarase:

- . concentração de sacarose - vários pesquisadores consideram que a concentração ótima é de 2% (TSUCHIYA et al, 1952).
- . nutrientes essenciais - utilização da água de maceração de milho ou extrato de levedura (2%) que servem como fonte de nitrogênio, vitaminas e demais fatores de crescimento. A substituição parcial da fonte de nitrogênio por fosfato de amônia resultou numa queda acentuada da atividade enzimática, pelo aumento na concentração de íons amônio (SIDEBOTHAM, 1974). O meio de cultura deve ser suplementado com solução de sais contendo: sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de sódio, sulfato de manganês e sulfato ferroso (ALSOP, 1983).
- . adição de cálcio - foi verificado (LOPES, 1979) que a adição de cloreto de cálcio a 0,05% promove uma melhor estabilidade da enzima purificada.
- . pH - a produção de dextrana-sacarase é bastante sensível a este parâmetro. O valor ótimo está em torno de 6,7 sendo controlado pela adição de hidróxido de sódio durante a fermentação. Alguns pesquisadores estudando o efeito do pH, verificaram que a adição de fosfato (1-2%) ao meio de cultura, atuando como tamponante, evita queda bruscas de pH, mesmo quando o controle é automático (LOPES, 1979).
- . temperatura - a faixa de temperatura é de 23 a 27°C, sendo que na maioria dos trabalhos publicados a temperatura foi mantida em 25°C.

- . agitação - deve ser suficiente para manter a homogeneidade, evitando a sedimentação (100 - 200 rpm).
- . aeração - o Leuconostoc mesenteroides é uma bactéria aeróbica facultativa, desenvolvendo-se bem em anaerobiose. A injeção de oxigênio puro ou dióxido de carbono inibe o crescimento. Quando uma pequena quantidade de ar é injetada, a produção de dextrana aumenta e sem aeração a produção de enzima é diminuída (ALSOP, 1983).

Os primeiros estudos realizados sobre a produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua foram bastante desanimadores. Trabalhando com taxas de diluição abaixo de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , LAWFORD et al (1979) não conseguiram nenhuma atividade enzimática no efluente. Acima deste valor a concentração máxima atingida foi de aproximadamente  $9,0 \text{ UDS/ml}$  com  $0,53 \text{ h}^{-1}$  de taxa de diluição. Usando a mesma linhagem, Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F, PAUL et al (1984a) atingiram uma concentração máxima de  $70 \text{ UDS/ml}$  à uma taxa de diluição de  $0,4 \text{ h}^{-1}$ .

### 3.2- PROPRIEDADES

A dextrana-sacarase dentre as várias enzimas que catalisam a síntese de polissacarídeos é uma das raras exceções que não exige a presença de cofatores e intermediários fosforilados de alta energia. A energia necessária à condensação das unidades glicosídicas é obtida da hidrólise da sacarose. Os parâmetros de temperatura e pH visando a otimização da enzima foram bastante estudados. Verificou-se que a enzima é mais ativa na faixa de temperatura em torno de  $30^\circ\text{C}$  e pH ótimo em torno de 5,2 (citado por RODRIGUES, 1989).

A energia de ativação da reação ainda não está bem definida, encontrando-se na literatura valores bastante diversos, variando de 5,0 a  $11,0 \text{ Kcal/mol}$ , na faixa de temperatura de  $15$  a  $30^\circ\text{C}$  (KABOLI & REILLY, 1980).

Quanto à estocagem da enzima, quando liofilizada mantém atividade por vários anos à temperaturas abaixo de  $5^\circ\text{C}$  (CHEN &

KABOLI, 1976). Em solução, vários fatores influenciam na estabilidade da enzima, sendo a temperatura e o pH parâmetros fundamentais. Mesmo à temperaturas de -15 e 4°C, (ROBYT & WALSETH, 1974) mostram que em solução, a enzima é instável podendo perder 50% da atividade em 2 dias. Entretanto a temperaturas abaixo de 4°C, outros pesquisadores relatam que a enzima apresenta maior estabilidade, mesmo estando em solução (LOPES, 1979).

Estudando a inibição da dextrana-sacarase pelos íons de metais pesados, MILLER & ROBYT (1984) demonstraram que o zinco possui um forte efeito inibidor mesmo em baixas concentrações (10mM).

Segundo ROBYT (1980) a enzima é uma glicoproteína. Em seu experimento, a enzima purificada foi submetida a hidrólise ácida e a fração de carboidratos constituiu-se principalmente de manose. Com a adição de concavalina A, a enzima foi totalmente inativada. Este fato levou os autores a concluir que a enzima era uma glicoproteína, pois a concavalina tem a capacidade de complexar com glicoproteínas que contenham resíduos de D-manose. Usando apuradas técnicas de purificação, MILLER et al (1986) conseguiram obter uma enzima com teores de carboidratos abaixo de 1% e peso molecular ao redor de 180000. Devido aos baixos teores de carboidratos obtidos neste processo, os autores colocaram em dúvida o fato da enzima ser uma glicoproteína, portanto ainda permanecem dúvidas quanto à composição química da enzima bem como seu peso molecular.

### 3.3- MECANISMOS DE AÇÃO

O mecanismo de ação da dextrana-sacarase ainda vem sendo assunto de várias discussões, tendo iniciado por volta de 1950, quando alguns pesquisadores estudavam a síntese do amido e glicogênio (ALSOP, 1983).

A atividade catalítica da dextrana-sacarase é uma combinação de reações envolvendo: os sítios ativos da enzima, o

substrato e o "acceptor". Duas atividades distintas podem ser consideradas na síntese de dextrana à partir de sacarose, a atividade hidrolítica e a glicosiltransferase. A primeira, responsável pela quebra da ligação entre a frutose e glicose (formadoras da sacarose), originando o grupo D-glicosil e a segunda corresponde a transferência do grupo glicosil para a cadeia do polissacarídeo em formação.

Em 1960 NEELY propôs um mecanismo que explica a formação da cadeia principal, mas não as ramificações. A enzima teria dois sítios ativos, doador (d) e receptor (M). O crescimento do polissacarídeo se daria à partir da extremidade não redutora, envolvendo as seguintes etapas: 1) Ligação simultânea de duas moléculas de sacarose aos dois sítios ativos d e M. Nesse caso, a molécula ligada ao sítio d seria doadora de resíduos D-glucopiranosil e a outra molécula receptora iniciaria a cadeia. 2) Transferência do grupo D-glucopiranosil da sacarose, ligada ao sítio d para a sacarose ligada ao sítio M. Nesta etapa uma molécula de frutose seria liberada ao meio. 3) Sucessivas transferências de grupos D-glucopiranosil do substrato (sacarose) para o final não redutor da cadeia em crescimento, ligado ao sítio M, com a formação das ligações  $\alpha$ -(1,6). 4) Dissociação ou inativação do complexo enzima-dextranosil, terminando a síntese da molécula de dextrana .

EBERT & SCHENK (1968) propuseram outro mecanismo. Eles admitiram a hipótese dos dois sítios ativos da enzima, porém assumiram que o crescimento da cadeia se efetuava pela extremidade redutora da glicose. Também concluíram que não é necessário "ativadores" para iniciar o crescimento do polímero.

Existem várias teorias a respeito da direção de crescimento da cadeia e as teorias mais recentes sugerem o mecanismo de crescimento pela extremidade não redutora da molécula. No entanto, EBERT & SCHENK (1968) propuseram um mecanismo de crescimento pela extremidade redutora. SIDEBOTHAM por volta de 1974 concluiu que os mecanismos até então propostos não apresentavam bases suficientes para definir a

direção das cadeias formadas pela dextrana-sacarase. ROBYT et al em uma série de trabalhos publicados entre 1974 e 1980, utilizando técnicas de carbono marcado e análises cromatográficas esclareceram diversos pontos do mecanismo de ação catalítica da dextrana-sacarase, foi proposto um mecanismo para a síntese de dextrana envolvendo a formação de um complexo covalente enzimaticamente ativo no qual a glicose é inserida entre a enzima e a dextrana por um ataque nucleofílico da hidroxila do carbono 6 de uma das unidades de glicose ao carbono 1 da dextrana, formando uma ligação glicosídica  $\alpha$ -(1,6). Segundo (ALSOP, 1983) este processo libera um grupo nucleofílico do sítio ativo da enzima e permite a hidrólise da sacarose com a formação de um complexo glicosil-enzima.

A biossíntese das ligações  $\alpha$ -(1,3), que são as ramificações foram também estudadas (ROBYT, 1980). Ele demonstrou que este tipo de ligação se dá quando um grupo hidroxila do carbono 3 da dextrana livre em solução, produz um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 na extremidade redutora do complexo dextranosil-enzima, liberando a dextrana do complexo.

### 3.4- MECANISMO DE AÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE NA PRESENÇA DE RECEPTORES

Foi notado por KOEPEL et al (citado por QUEIRÓZ, 1989) que a adição de certos açúcares mudam as características dos produtos formados pela reação da sacarose com a dextrana-sacarase. Em particular quando  $\alpha$ -metilglicosidase, maltose ou isomaltose foram adicionados ocorreu a formação de oligossacarídeos de cadeia curta no lugar de dextrana de alto peso molecular. A adição de dextrana de baixo peso molecular também muda o peso molecular do produto da reação, e esta tem sido proposta como uma base para o controle da fermentação de dextrana a fim de obter um produto comercial com peso molecular de 40 000 a 70 000 daltons.

Mais tarde EBERT (citado por ALSOP, 1983) mostrou experimentalmente que uma série de receptores

( $\alpha$ -metilglicosidase, glicose, frutose, etc.) os quais foram marcados radioativamente (carbono-14) incorporavam-se à dextrana nativa e estudando o peso molecular dos produtos da reação juntamente com a cinética da reação, classificou os receptores em fracos, moderadamente fortes e fortes, de acordo com a sua capacidade de ativar a enzima. EBERT & SCHENK (1968) argumentaram que no tipo de crescimento em cadeia por inserção de receptores, a terminação da cadeia se dá pela quebra da ligação entre a enzima e a cadeia em crescimento devido à ação do receptor que desfaz o complexo enzima-cadeia, impedindo que este se refaça. A formação de dextrana de baixo peso molecular na presença do receptor é explicada pela sua competição com o substrato. Neste mesmo trabalho propuseram um mecanismo para explicar a formação de ramificações onde estas eram obtidas pela ação da dextrana como receptor.

Vários açúcares de baixo peso molecular ou derivados, dos quais a maltose é mais eficiente, tem um efeito receptor. De acordo com as condições de reação estes dissacarídeos permitem a produção de uma série de oligossacarídeos, os quais agem como receptores (PAUL et al, 1984).

#### 4. CROMATOGRAFIA

Cromatografia é o nome dado a uma família particular de técnicas de separação com grande eficácia. O método original foi descrito por TSWEET (1872-1919), que usou-o na separação de substâncias coloridas em plantas, e o nome cromatografia vem das palavras gregas chroma (cor) e graphein (escrever). Contudo, a limitação em ser compostos coloridos nunca foi seguida, e a maioria das separações cromatográficas são atualmente realizadas em misturas de substâncias incolores, incluindo gases.

Recentemente a União Internacional de Química Pura e Aplicada definiu cromatografia como: " Um método usado principalmente para a separação de componentes de uma amostra, na qual seus componentes estão distribuídos entre duas fases, uma estacionária e a outra móvel. A fase estacionária pode ser um



sólido ou um líquido sustentado em um sólido ou um gel. A fase estacionária pode ser empacotada em uma coluna, difundida em um leito ou distribuída como um filme, etc; nestas definições "leito cromatográfico" é usado como um termo geral para denotar uma das diferentes formas nas quais a fase estacionária pode ser usada. A fase móvel pode ser gasosa ou líquida " (BRAITHWAITE, 1985).

#### 4.1- CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com a natureza da fase móvel e de acordo com a natureza da fase estacionária. O sistema é chamado cromatografia de adsorção se a fase estacionária é um sólido e cromatografia de partição se é um líquido. Considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos (adsorção, partição, troca iônica, bioafinidade, exclusão).

Durante 1930 e 1940 a cromatografia se desenvolveu rapidamente com vários trabalhos paralelos que resultaram em diversas técnicas cromatográficas utilizadas atualmente. As principais técnicas são: cromatografia em papel, em camada delgada, por troca iônica, por adsorção, por permeação em gel, gasosa, por exclusão molecular, líquida de alta eficiência. Continuamente vem sendo desenvolvidas técnicas e práticas particulares, materiais e instrumentação refinadas, os quais têm resultado na eficiência, segurança e sensibilidade dos métodos cromatográficos atuais.

#### 4.2- CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

##### 4.2.1- INTRODUÇÃO

Na cromatografia por troca iônica a fase estacionária é altamente carregada sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos por deslocamento com outros solutos com o mesmo tipo de carga, porém

com maior força de interação com a fase estacionária (COLLINS & BRAGA, 1990). A maioria dos íons presentes na fase móvel tem cargas opostas àqueles íons fixos e são chamados "counterions" (HEFTMANN, 1983).

A separação de materiais utilizando cromatografia por troca iônica é obtida por adsorção reversível. A maioria dos experimentos de troca iônica são executados em dois estágios principais. O primeiro estágio é a aplicação da amostra e adsorção. No segundo estágio, substâncias são eluídas da coluna. A separação é obtida desde que substâncias diferentes tenham afinidades diferentes pelo trocador iônico devido a diferenças em suas cargas. Estas afinidades podem ser controladas variando condições como força iônica e pH. As diferenças nas cargas de compostos biológicos são frequentemente observadas e como a cromatografia por troca iônica permite a separação de espécies com muito pouca diferença nas propriedades tais como duas proteínas diferindo somente por um aminoácido, esta é uma técnica de separação muito eficiente.

A troca iônica é executada em estágios definidos, a saber: equilíbrio do trocador iônico, adição e ligação das substâncias teste, troca das condições para produzir dessorção seletiva e regeneração do trocador iônico.

#### 4.2.2- MATRIZ

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes nos grupos trocadores iônicos. As matrizes são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas. A natureza da matriz determina suas propriedades físicas, como sua força mecânica e características de fluxo.

Os primeiros trocadores iônicos projetados para uso com materiais biológicos foram os trocadores à base de celulose desenvolvidos por PETERSON e SOBER (1956). Por serem em geral,

mais eficientes, as resinas orgânicas altamente polimerizadas, com ligações cruzadas são amplamente utilizadas como matriz.

Adsorventes para proteínas têm exigências diferentes dos utilizados para compostos de baixo peso molecular. O adsorvente deve ter uma estrutura aberta para que a proteína possa penetrar nas partículas e alcançar o sítio ligante, se não, somente poucos sítios na superfície da partícula ficam disponíveis e a capacidade do adsorvente é muito baixa. A natureza do adsorvente não deve ser prejudicial às proteínas e nem deve o material do suporte principal da matriz interagir fortemente com a proteína.

Muitos trocadores iônicos têm sido usados para técnicas em batelada, mas poucos são aceitáveis para trabalhos em colunas devido à pobres características de fluxo. Os adsorventes mais importantes utilizados, à base de biopolímeros são dextrana e agarose, além de polímeros sintéticos que também estão se tornando populares (SCOPES, 1987). Trocadores iônicos baseados em SEPHAROSE e subsequentemente aqueles baseados em SEPHAROSE CL-6B e DEAE-SEPHACEL foram as primeiras matrizes a combinar correta forma esférica com alta porosidade melhorando assim as propriedades de fluxo e alta capacidade para macromoléculas (PHARMACIA, 1991).

Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos. Os trocadores aniônicos como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz (FIGURA II.1-a). Os trocadores catiônicos, inversamente, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz (FIGURA II.1-b).

A escolha da matriz para troca iônica depende de três fatores:

1. estabilidade dos componentes da amostra.
2. peso molecular dos componentes da amostra.
3. requerimentos específicos da aplicação.

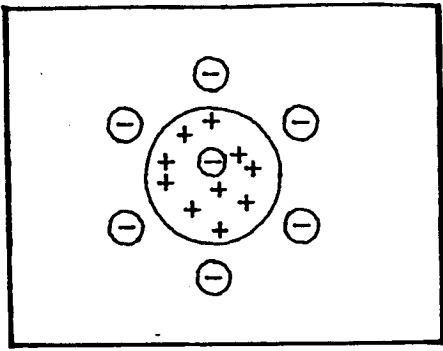


FIGURA II.1.a - Esquema de um trocador aniônico. O sinal + representa o grupo trocador ligado à matriz; o sinal -, os ânions que são adsorvidos.

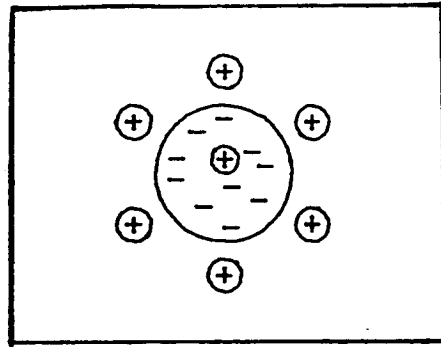


FIGURA II.1.b - Esquema de um trocador catiônico. O sinal - representa o grupo trocador ligado à matriz; o sinal +, os cátions que são adsorvidos.

As substâncias são ligadas aos trocadores iônicos quando elas têm carga oposta à do trocador iônico. Esta ligação é eletrostática e reversível. Algumas substâncias possuem somente um tipo de grupo trocador, nestes casos a escolha é clara, mas para algumas importantes macromoléculas (tais como as proteínas) de origem biológica, que são carregadas positivamente e negativamente, possuindo ambos os tipos de grupo trocador, sua carga é dependente do pH (FIGURA II.2).

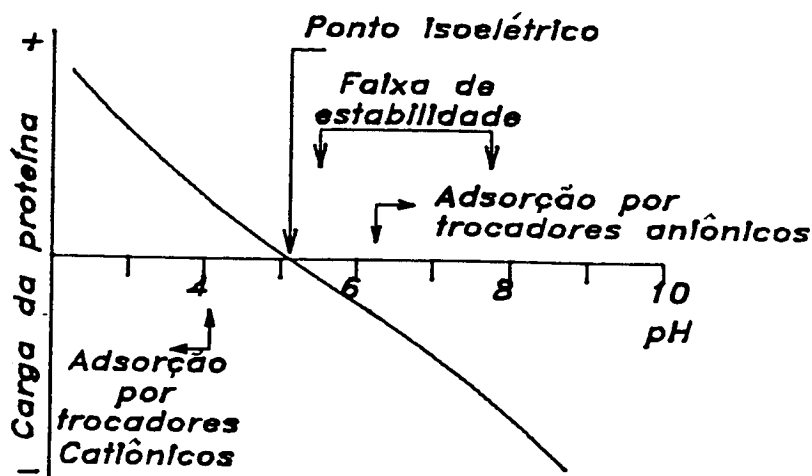


FIGURA II.2 - A carga de uma proteína como uma função do pH.

Em um certo valor do pH a substância terá carga zero, este valor é denominado ponto isoelétrico (P.I.) e neste ponto substâncias não se ligam a nenhum tipo de trocador iônico.

Abaixo do P.I., a proteína possui uma carga positiva e portanto pode ser adsorvida por trocadores catiônicos. Acima do P.I., a proteína possui uma carga negativa e pode ser adsorvida por trocadores aniônicos. O pH do tampão é escolhido de acordo com a natureza das substâncias a serem separadas, e este então dita o tipo de matriz a ser utilizada (BRAITHWAITE, 1985).

#### 4.2.3- TIPOS DE TROCADORES IÔNICOS

4.2.3.1. Trocadores inorgânicos naturais (minerais do solo), em geral apresentam pequena capacidade de troca.

4.2.3.2. Trocadores inorgânicos sintéticos tais como o fosfato de zircônio, apresentam a vantagem de serem muito estáveis à temperatura e à radiação nuclear.

4.2.3.3. Trocadores com matriz orgânica natural

4.2.3.3.1- Trocadores com matriz de celulose

O primeiro trocador iônico projetado para a separação de moléculas biológicas utilizou uma matriz de celulose, embora a celulose devido às suas propriedades hidrofílicas tenha pouca tendência a desnaturar proteínas, os trocadores possuem baixa capacidade e características pobres de vazão, devido à forma irregular das partículas. Ainda na década de 70, géis de celulose foram produzidos na forma ótima e o único material disponível comercialmente é o DEAE (dietilaminoetil)-SEPHACEL. Estes trocadores têm a vantagem de apresentar poros largos, facilitando assim o acesso das substâncias aos grupos trocadores e permitindo boa qualidade de vazão da fase móvel.

4.2.3.3.2- Trocadores com matriz de dextrana

Trocadores iônicos à base de dextrana são fisicamente muito similares à dextrana comum e possuem estabilidade química similar (BRAITHWAITE, 1985). Sob o nome comercial de SEPHADEX

(Pharmacia) é produzido um polímero modificado de dextrana, onde as macromoléculas apresentam ligações cruzadas de ponte de hidrogênio entre as suas cadeias, obtendo assim uma estrutura porosa tridimensional. Devido ao seu alto conteúdo de grupos hidroxílicos, o SEPHADEX é fortemente hidrofílico e as partículas esféricas produzidas deste material são capazes de inchar consideravelmente em contato com água, sendo possível formar vários tipos de poros conforme a sua capacidade de adsorver água. O pH e a força iônica dos eluentes são fatores que influenciam no grau de intumescimento destes trocadores que, sendo esféricos e altamente porosos, permitem boas condições de vazão da fase móvel.

#### 4.2.3.3.3- Trocadores com matriz de agarose

Como exemplos de trocadores que utilizam a agarose como matriz, podemos citar a DEAE-Sepharose CL-6B (aniônica) e a CM-Sepharose CL-6B (catiônica). A capacidade de troca iônica é conferida pela introdução dos grupos carboximetil e dietilaminoetil, resultando uma matriz de grande rigidez com porosidade similar àquelas de dextrana modificada, mas com melhor força mecânica e capacidade de adsorção. Benefícios adicionais como resultado da estrutura rígida são: consistência do volume de resina, o qual é relativamente não afetado por mudanças da força iônica e pH do eluente; e a melhoria das propriedades de fluxo, podendo suportar altas taxas de fluxo.

#### 4.2.3.4. Trocadores orgânicos sintéticos

As resinas trocadoras deste tipo são muito resistentes, têm grande estabilidade química e alta capacidade de troca em toda faixa de pH.

#### 4.2.3.5. Trocadores iônicos líquidos

A separação por troca iônica pode também ser realizada por trocadores líquidos, que revestem suportes peliculares ou porosos. Eles são constituídos, em geral, por líquidos orgânicos, imiscíveis em água, que apresentam grupos iônicos ou ionizáveis. Assim, o suporte inerte fica revestido por um filme líquido. Para os trocadores catiônicos são usados alquilésteres do ácido

fosfórico e/ou alquilésteres do ácido alcano-fosfônico. Os trocadores líquidos aniônicos utilizam aminas de alta massa molecular ou compostos de amônio quaternário (por ex., trioctilmetilamônio).

#### 4.2.4- GRUPOS TROCADORES

A presença de grupos trocadores é uma propriedade fundamental de um trocador iônico. O tipo de grupo determina o tipo do trocador iônico e conseqüentemente sua força, seu número e disponibilidade total determinam a capacidade. Há uma variedade de grupos que podem ser utilizados em trocadores iônicos (HIMMELHOCH, 1971). Alguns exemplos são mostrados na TABELA II.1.

TABELA II.1 - Grupos funcionais usados para troca iônica

Trocadores anionicos	Grupo funcional
Aminoetil (AE-)	$-OCH_2CH_2NH_3^+$
Dietaminoetil (DEAE-)	$-OCH_2CH_2NH(CH_2CH_3)_2$
Aminoetil quaternário (QAE-)	$-OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$
Trocadores catiônicos	
Carboximetil (CM-)	$-OCH_2COO^-$
Fosfo	$-PO_4H_2^-$
Sulfopropil (SP-)	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$

Os tipos de grupos ligados à matriz classificam os trocadores iônicos em fortes, médios e fracos. Grupos sulfônicos e amino-quaternários são utilizados para formar fortes trocadores iônicos; grupos fosfo formam trocadores de força intermediária e os outros grupos formam trocadores iônicos fracos. Os trocadores iônicos fortes são aqueles completamente ionizados em uma ampla faixa de pH. Os fracos e médios são aqueles em que o grau de dissociação é influenciado pelo pH, portanto a capacidade destes trocadores varia em função do mesmo (COLLINS & BRAGA, 1990).

## 4.2.5- PROPRIEDADES DOS TROCADORES IÔNICOS

### 4.2.5.1. Capacidade

De uma maneira geral, a capacidade de um trocador é uma medida da quantidade de troca de íons que pode ocorrer entre a matriz e os íons presentes na fase móvel. A capacidade pode ser expressa como a capacidade total ou capacidade disponível. A capacidade total é a quantidade de grupos carregados ou potencialmente carregados e que podem ser trocados, por grama de peso seco do trocador. A capacidade disponível é a capacidade real do trocador sob determinadas condições. Ela é dependente de vários fatores, entre os quais a força iônica, o pH e a temperatura do efluente (COLLINS & BRAGA, 1990).

### 4.2.5.2. Seletividade

O conhecimento da seletividade de um trocador é muito importante para o seu emprego. Embora este fator dependa muito das condições de operação, pode-se destacar que:

- a. a seletividade de um trocador aumenta com o incremento do grau das ligações cruzadas da matriz.
- b. íons com carga elevada são ligados mais fortemente ao trocador que íons de baixa carga, nas mesmas concentrações.
- c. íons com a mesma carga, porém com diferentes tamanhos em solução, têm grau de afinidade diferentes. Este efeito se relaciona melhor com o poder de polarização do íon e seu grau de hidratação, sendo que a afinidade diminui com o aumento do raio do íon hidratado.

### 4.2.5.3. Tamanho da partícula

Em operações de grande escala (planta industrial) é desejável uma alta taxa de fluxo, o que requer o uso de partículas consideravelmente grandes. Para propósitos analíticos o tamanho padrão é aproximadamente 50 mesh BSS. A classificação das resinas analíticas difere da classificação industrial padrão pois normalmente são lavadas para eliminação das partículas finas



e traços de polimerização intermediária solúvel em água (BRAITHWAITE, 1985).

#### 4.2.6- ELUIÇÃO

Uma possibilidade de eluição em cromatografia por troca iônica é por mudanças em fases discretas de pH ou de força iônica, ou ainda, de combinação destes fatores. A mudança de pH do tampão eluente em direção ao ponto isoelétrico de uma das substâncias-amostra causa a diminuição da carga-líquida, sendo mais facilmente eluída do trocador. A força iônica pode ser variada para se obter a eluição mais lenta ou mais rápida de substâncias. Abaixando-se a força iônica, a competição pelos grupos carregados do trocador é mínima e as substâncias são ligadas fortemente a ele. Aumentando-se a força iônica, aumenta-se a competição e reduz-se a interação entre o grupo trocador e as substâncias-amostra que são assim eluídas. Tanto o pH como a força iônica podem ser variados de uma maneira contínua e constante com o uso de gradientes. Estes podem ser lineares, côncavos e convexos. Outros gradientes mais complexos podem ser obtidos com o uso de sistemas de bombeamento para gradientes ou pelo uso de bombas peristálticas adaptadas para esta finalidade.

Durante o processo de eluição em uma coluna, a concentração de proteína na fase estacionária (proteína adsorvida) depende da concentração de proteína, força iônica e pH da fase móvel. Em procedimentos cromatográficos usuais, eluição é realizada introduzindo um gradiente linear de força iônica crescente (gradiente linear de eluição) ou um leve aumento da força iônica na coluna utilizando sais como NaCl e KCl (YAMAMOTO, 1983). Gradientes (de força iônica ou pH) podem ser formados usando um simples aparelho comercialmente disponível, no qual dois recipientes são conectados na parte inferior e um eficiente agitador está no recipiente do qual sai o tampão. Mais simples ainda é a utilização de dois beakers, um contendo solução de sal e outro com tampão para diluição contínua do eluente a ser enviado para a coluna e um agitador magnético (FIGURA II.3) (SCOPES, 1987).

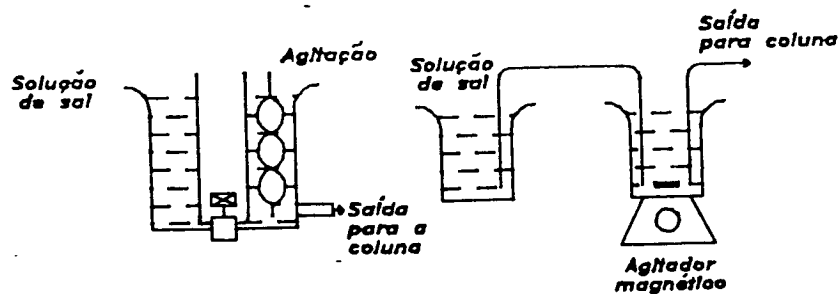


FIGURA II.3 - Aparelhos simples para formação de gradientes

#### 4.2.7- APLICAÇÕES

A cromatografia por troca iônica apresenta muitas aplicações analíticas e preparativas, tanto em pesquisa, como nas indústrias. A desionização da água e de muitos licores açucarados de frutos, bem como a despigmentação destes são as aplicações mais rotineiras, sendo produzidas resinas específicas para tais finalidades. Em química analítica este tipo de cromatografia é usado na análise de elementos, geralmente complexados, na análise de íons ou na sua eliminação quando estes interferem na dosagem de uma determinada substância. Na preparação e purificação de macromoléculas, a cromatografia por troca iônica tem um destaque especial, sendo raros os processos de purificação que não a utilizam. Uma interessante aplicação da cromatografia por troca iônica é na separação de isoenzimas. As isoenzimas têm massas moleculares próximas, sendo portanto a separação baseada em processos de diferença de carga elétrica que são, às vezes, pequenas (COLLINS & BRAGA, 1990). Um método cromatográfico por troca iônica é descrito para a separação e detecção de ânions (nitrito, nitrato, amônio) em amostras de salmoura (SUBOSA et al, 1989). Esta técnica é usada extensivamente no National Institute of Standards and Technology (U.S.A.) para a análise de materiais padrão de referência. No momento a ênfase é para determinação de não metais, especialmente enxofre e cloro (KOCH, 1989). Cromatografia iônica é uma técnica analítica que tem revolucionado a maneira na qual íons, especialmente íons

orgânicos, são medidos em laboratório. Uma área da cromatografia iônica que tem particular promessa para aperfeiçoamento em análises iônicas é o advento da determinação simultânea de cátions e ânions, sendo que diferentes métodos têm sido estudados para execução deste procedimento analítico (TARTER, 1989). Pode-se verificar através de inúmeras publicações que esta técnica tem grande potencial na separação de proteínas e peptídeos, purificação de enzima, separação de carboidratos e lipídeos, preparação de hormônios, estudos de ácidos nucleicos e nucleotídeos, entre outros.

#### 4.3- CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE

Avanços recentes nas áreas de microbiologia, biologia molecular, engenharia genética e bioquímica têm proporcionado uma série de diferentes produtos bioquímicos que são ou podem tornar-se de grande valor comercial. Proteínas e substâncias relacionadas são frequentemente os principais constituintes da maioria destes produtos, os quais podem ser usados como produtos farmacêuticos e reagentes de diagnósticos médicos (CHASE, 1984a). Muitos destes compostos bioquímicos são produzidos em reatores bioquímicos e frequentemente a solução no reator é uma mistura bioquímica complexa com as substâncias de interesse presentes somente em pequenas concentrações. Muitos dos processos de separação convencionais (por exemplo: filtração em gel, troca iônica, precipitação, ultrafiltração, eletroforese) e suas combinações podem não ser aplicáveis para a purificação de proteínas em misturas bioquímicas complexas (CHASE, 1984a). No entanto, adsorção biospecífica (cromatografia por afinidade) parece ter o maior potencial de sucesso em muitos casos difíceis de purificação para homogeneizar muitas substâncias bioquímicas de misturas diluídas contendo um grande número de proteínas com pequenas diferenças na solubilidade, cargas e pesos moleculares. Esta técnica de separação utiliza pequenas diferenças nas atividades biológicas das moléculas com o propósito de realizar a purificação de proteínas. Frequentemente, alto grau de pureza assim como alto rendimento do produto podem ser obtidos em um único passo de purificação (ARVE & LIAPIS, 1987).

Cromatografia por afinidade, desenvolvida durante 1960 e 1970, refere-se à imobilização de um ligante específico pela interação com a proteína desejada em partículas apropriadas que podem estar empacotadas na coluna. Uma amostra é passada pela coluna e a interação específica retém a proteína desejada, enquanto outros componentes da amostra simplesmente passam através da coluna (FIGURA II.4) (SCOPES, 1987).

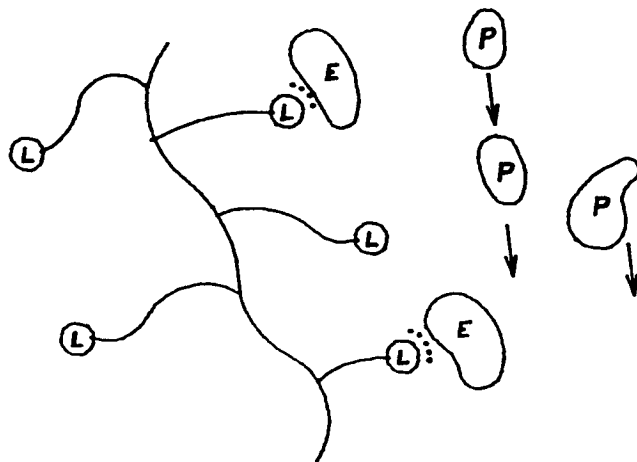


FIGURA II.4 - Princípio básico da cromatografia por afinidade. Um ligante L está covalentemente ligado ao suporte principal da matriz. Somente enzimas E com afinidade específica pelo ligante L são adsorvidas. Proteínas P passam sem serem afetadas.

O processo de adsorção bioespecífica é caracterizado pela imobilização de um composto químico ou bioquímico selecionado (ligante) na superfície interna de um poro, inerte, presente no suporte sólido (matriz). O ligante tem uma especificidade alta por um composto particular ou uma classe de componentes que são purificados de uma mistura envolvendo várias espécies (ARVE & LIAPIS, 1987). Segundo (LIAPIS, 1989), nas separações utilizando cromatografia por afinidade são considerados o envolvimento de quatro estágios:

- (a) o estágio de adsorção durante o qual a solução contendo o material a ser adsorvido é colocado em contato com o adsorvente para permitir que as interações de adsorção ocorram;
- (b) o estágio de lavagem no qual componentes adsorvidos livremente ou não especificamente são removidos;
- (c) o estágio de eluição durante o qual a substância adsorvida

é liberada do complexo adsorvido-ligante; e  
(d) o re-equilíbrio ou estágio de regeneração, no qual prepara-se o adsorvente para reutilização em outro ciclo de operação.

No estágio de adsorção a mistura bruta contendo a substância de interesse entra em contato com o adsorvente e a proteína desejada se liga reversivelmente ao ligante imobilizado. O material biológico bruto que é utilizado na solução de alimentação do estágio de adsorção na maioria dos casos contém outros componentes não desejados, chamados contaminantes os quais estão frequentemente presentes em quantidades maiores que as substâncias desejadas. Durante o estágio de adsorção alguns ou todos os contaminantes podem difundir dentro dos poros das partículas, e dependendo do tipo de matriz e ligante, pode ser possível que um ou mais contaminantes sejam adsorvidos bioespecificamente pelos ligantes ou não especificamente na superfície da matriz (CHASE, 1984a). No estágio de lavagem a concentração dos contaminantes presentes dentro das partículas porosas do adsorvente são reduzidas para um baixo nível. Em seguida o adsorvido é recuperado através da dissociação do complexo adsorvido-ligante (estágio de eluição), e finalmente o adsorvente é regenerado pelo contato com a solução tampão inicial (estágio de regeneração) (ARVE & LIAPIS, 1987).

#### 4.3.1- MATRIZ

Os critérios de seleção para uma matriz utilizada em cromatografia por afinidade são similares àqueles aplicados na cromatografia por troca iônica, isto é, deve ser um polímero poroso, hidrofílico, que possa ser produzido de forma adequada permitindo livre acesso de macromoléculas para fixação dos ligantes, e um fluxo adequado. Embora outros adsorventes usados em casos individuais tenham certas vantagens, resinas esféricas de agarose estão sendo as mais utilizadas na separação de proteínas devido a sua estabilidade dimensional a baixas pressões ou mudanças nas condições sal-solvente. Produtos como Sepharose-4B e -CL6B (Pharmacia) e agaroses (Bio-Rad) são normalmente utilizados. Também estão se tornando populares as variedades

sintéticas e outras resinas de polímeros porosos que são usados nos processos de troca iônica e filtração em gel (SCOPES, 1987).

#### 4.3.2- ELUIÇÃO

A eluição do material ligado à fase estacionária seletiva em cromatografia por afinidade é realizada pelo emprego de agentes específicos ou não. Esta etapa é de fundamental importância para que ocorra uma boa separação da substância alvo.

Dois métodos de eluição têm sido desenvolvidos:

- . seletivo - usando por exemplo um substrato ou cofator;
- . não seletivo - usando por exemplo um sal ou mudança no pH.

O método mais utilizado normalmente é o de eluição não seletiva. Este método altera, através do uso de um eluente apropriado, as propriedades físicas e químicas da solução em contato com as partículas do adsorvente de forma que a intensidade da ligação entre ligante e substância adsorvida é reduzida e a dissociação do complexo adsorvido-ligante é promovida. O segundo método de eluição chamado eluição seletiva envolve exposição do complexo adsorvido-ligante em uma solução contendo alta concentração de ligante livre. Este eluente seletivo (ligante) tem também uma afinidade significativa pela substância adsorvida e pode ser o mesmo ligante que está fixo na superfície interna dos poros presentes na matriz ou pode ser diferente do ligante imobilizado. Há uma competição entre os ligantes solúveis e os imobilizados, e se o ligante solúvel está em excesso, o adsorvido deslocará quase que exclusivamente para a fase solúvel, sendo então separado das partículas de adsorvente. A substância alvo é separada do ligante solúvel explorando a diferença no peso molecular das duas espécies.

Embora o passo de eluição seja de grande importância, muito poucos trabalhos têm considerado a análise quantitativa teórica do estágio de eluição. Um método de eluição não seletiva foi usado para eluir a tripsina, e assumiu-se que toda tripsina ligada era eluída instantaneamente para o líquido existente entre

as partículas. Em outros trabalhos foram apresentados modelos para eluição em coluna e sistema batelada, entretanto não tem sido claramente estabelecido para a maioria dos sistemas apresentados na literatura qual mecanismo de transferência de massa e dissociação é o passo limitante do processo (ARVE & LIAPIS, 1988).

#### 4.3.3- APLICAÇÕES

Adsorção bioespecífica tem sido amplamente reconhecida como um método eficiente para análise quantitativa e identificação de macromoléculas biológicas bem como para separação em escala industrial e purificação de biopolímeros naturais como plasma sanguíneo e matéria-prima de reatores bioquímicos (ARVE & LIAPIS, 1988). Na purificação de macromoléculas sabe-se que um grande número de proteínas foram purificadas, e as enzimas sem dúvida alguma são a maior categoria dessas macromoléculas, podendo ainda ser citado: purificação de anticorpos, antígenos e glicoproteínas. Também é de grande importância para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis e de novos tipos de biosensores (LIAPIS, 1989).

#### 4.4- OUTRAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Considerando as diversas técnicas existentes ainda podemos citar duas de grande importância em processos de purificação de macromoléculas: cromatografia por interações hidrofóbicas e cromatografia em gel.

##### 4.4.1- CROMATOGRAFIA POR INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS OU POR HIDROFOBICIDADE (HIC - Hidrofobic Interaction Chromatography)

Embora seja menos seletiva que a cromatografia por afinidade, é uma técnica simples com aplicabilidade muito ampla, não sendo limitada somente à separação de biomoléculas. É uma excelente complementação para cromatografia por troca iônica e permeação em gel. Considerando que relativamente poucas proteínas

se ligam a cadeias alifáticas curtas imobilizadas em baixas concentrações de sal, cromatografia por hidrofobicidade pode ser estendida para cobrir todas as proteínas, uma vez que as interações hidrofóbicas aumentam sua intensidade com aumento na concentração de sal. A adsorção requer frequentemente a presença de íons "salting-out" tais como cloreto de sódio e sulfato de amônio. A influência de certos íons na estrutura da proteína foi primeiro descrita por HOFMEISTER (citado por HARRIS & ANGAL, 1989). Íons "salting-out" diminuem a disponibilidade de moléculas de água na solução, aumentam a tensão superficial e aumentam as interações hidrofóbicas. Ao contrário, íons "salting-in" ou caotrópicos como tiocianato impedem a interação não-iônica (HARRIS & ANGAL, 1989). Consequentemente em alta concentração de sal a maioria das proteínas podem ser adsorvidas por grupos hidrofóbicos fixos na matriz.

O modelo simplista da estrutura terciária de uma proteína confere uma envoltura externa essencialmente hidrofílica em volta de um núcleo hidrofóbico. No entanto a hidrofobicidade da superfície ocorre devido a presença na superfície de cadeias de aminoácidos não polares como alanina, metionina, triptofano e fenilalanina. Provavelmente a hidrofobicidade da superfície não só ajuda estabilizar a conformação da proteína, mas forma a base das interações específicas relacionadas com a função biológica da proteína. Estas incluem: antígeno-anticorpo, hormônio-receptor e enzima-substrato, interações típicas que são de significativa importância biológica. Os aminoácidos da superfície hidrofóbica são usualmente organizados em blocos, intercalados com maior domínio hidrofílico. O número, tamanho e distribuição destas regiões não iônicas é uma característica de cada proteína e pode portanto ser usada como uma base para sua separação. A chance de se ter uma boa separação em uma coluna hidrofóbica é grande devido: primeiro, a capacidade para proteínas é muito alta, na mesma faixa que os trocadores iônicos (10-100 mg/cm<sup>3</sup>). Segundo, a adsorção é realizada em alta concentração de sal, não sendo necessário trocar o tampão de uma amostra antes de sua aplicação, necessitando somente acrescentar sal o suficiente para garantir a ligação do componente requerido. As recuperações são



frequentemente excelentes (SCOPES, 1987).

- Matriz

Adsorventes hidrofóbicos típicos disponíveis comercialmente incluem compostos com cadeias alifáticas lineares com 4, 6, 8 e 10 átomos de carbono, e esta mesma cadeia contém um grupo amino terminal. Como em outros ligantes adsorventes, o potencial de variação da natureza do substituinte é infinita, mas o comportamento de cada um é similar. Os grupos mais utilizados são phenyl-, octyl- ou hexyl-, e aminohexyl- dando origem a matrizes (géis) diversas, entre elas Phenyl Sepharose CL-4B e Octil Sepharose CL-4B, designadas especialmente para separação de macromoléculas biológicas em cromatografia por hidrofobicidade.

- Eluição

Segundo HARRIS & ANGAL (1989), uma variedade de condições que podem ser utilizadas para eluição em matrizes hidrofóbicas, confere à HIC um método potencialmente forte para a separação de misturas complexas de proteínas. Dentre estas incluem-se as seguintes:

- (a) Redução da força iônica usando um gradiente de eluição.
- (b) Aumentando o pH: a maioria das proteínas ganham carga negativa e tornam-se mais hidrofílicas sob condições levemente alcalinas.
- (c) Reduzindo a temperatura teoricamente promoveria a eluição, entretanto o efeito da temperatura é muito pequeno para ser usado como um agente de eluição.
- (d) Métodos de deslocamento: adição de um componente o qual tenha uma atração mais forte pelo ligante ou torna a proteína mais hidrofílica.

1. Álcoois alifáticos - ex: propanol, butanol e etileno glicol. Eles reduzem a polaridade da solução e promovem ruptura das interações hidrofóbicas.

2. Aminas alifáticas - ex: butilamina. Têm o efeito de reduzir a polaridade da solução causando dessorção. As aminas

podem ligar à proteína ou aos grupos da matriz hidrofóbica.

3. Detergentes - detergentes não iônicos, ex: Tween 20, Triton X-100. Provavelmente deslocam as proteínas ligadas. Detergentes iônicos, ex: sulfato duodecil de sódio. São mais facilmente removidos da coluna após dessorção da proteína. Eles tendem, contudo, a causar desnaturação da proteína. Detergentes não iônicos são mais suaves e podem ser usados em concentração de 1-3% sem causar perda de atividade.

#### - Aplicações

Cromatografia por hidrofobicidade está sendo mais amplamente usada, especialmente no processamento em grande escala. Apesar da falta de seletividade entre componentes, comparada com cromatografia por troca iônica, é muito útil como um primeiro passo, como uma alternativa à precipitação por sulfato de amônio. Colunas hidrofóbicas têm sua aplicação na purificação de peptídeos e algumas proteínas pequenas, sendo que recentemente obteve-se sucesso na purificação de álcool desidrogenase (SCOPES, 1987).

#### - Vantagens e desvantagens da cromatografia por hidrofobicidade

HIC possui um forte significado em separação aplicada à purificação de muitas proteínas. O emprego desta técnica é ideal quando a mesma é utilizada imediatamente após a precipitação com sal, onde a força iônica da amostra aumentará as interações hidrofóbicas. No processo de purificação onde a proteína alvo é eluída em um gradiente de força iônica decrescente, ela pode ser seguida por uma troca iônica com pouca necessidade de mudança no tampão. A diversidade das condições de eluição pode permitir a separação de misturas complexas de proteínas que seriam difíceis de separar por outras técnicas cromatográficas. Predizer a melhor condição para separação é, contudo, difícil e o método elementar de tentativa e erro é ainda o utilizado no processo de otimização. A eficácia da HIC é geralmente reduzida pela presença de contaminantes hidrofóbicos na alimentação. Um problema adicional encontrado na HIC são as

fortes condições que normalmente são requeridas para eluição, podendo ser utilizados detergentes não iônicos ou etileno glicol, os quais podem aumentar a probabilidade de desnaturação de proteínas (HARRIS & ANGAL, 1989).

#### 4.4.2- CROMATOGRAFIA EM GEL

Estudos de adsorção em sílica gel e carbono ativo têm mostrado resultado interessante para separar materiais com massa molecular relativamente alta. Segundo BRAITHWAITE (1985), SYNGE mostrou que separações baseadas no tamanho molecular podem ser executadas com substâncias não carregadas durante migração eletro-osmótica através de géis. Este princípio foi a base da metodologia de separação conduzida de acordo com tamanhos relativos das moléculas. PORATH e FLODIN usaram o termo filtração em gel descrevendo um método para separação de macromoléculas biológicas em sistemas aquosos por meio de géis de polissacarídeo. Em um artigo pioneiro com uso não bioquímico MOORE usou o termo "gel permeation chromatography". Ambos os termos são ainda usados em seus respectivos campos.

##### - Matriz

A matriz, fase estacionária, é um polímero poroso. Os poros são completamente preenchidos com o solvente que será usado como a fase móvel. O tamanho do poro é altamente crítico desde que a base da separação é o fato das moléculas acima de um certo tamanho serem totalmente excluídas dos poros e o interior dos poros serem acessíveis em parte, ou totalmente, pelas moléculas menores.

##### - Descrição do processo

O fluxo da fase móvel fará com que as moléculas maiores passem através da coluna sem penetrar no gel (matriz), enquanto que as moléculas menores serão retardadas de acordo com sua penetração no gel. O princípio é ilustrado na FIGURA II.5.

Os componentes da mistura saem da coluna de acordo com a massa molecular relativa, o maior sai primeiro. Compostos que são completamente excluídos do gel não são separados entre si, e da mesma forma moléculas pequenas que penetram completamente não são separadas. Moléculas de tamanho intermediário serão retardadas de acordo com o grau de penetração na matriz. Se as substâncias são de um tipo químico similar elas são eluídas por ordem da massa molecular relativa. Este modelo sugere que a exclusão diferencial das moléculas seja alcançada com base em seus volumes hidrodinâmicos, isto é: tamanho e forma.

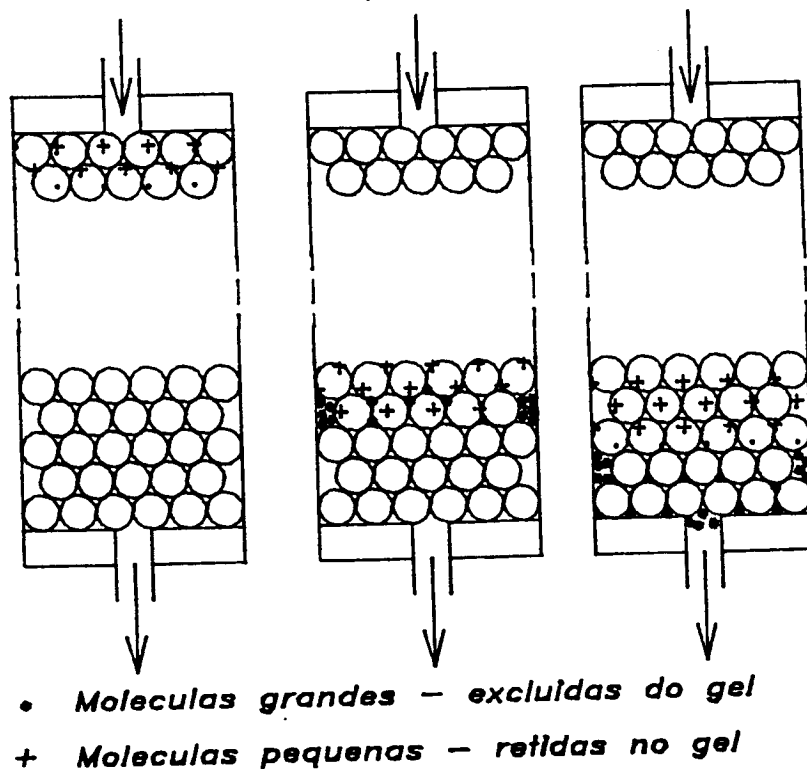


FIGURA II.5 - Princípio da cromatografia em gel: (1) mistura é aplicada no topo da coluna; (2) separação parcial; (3) separação completa, substâncias excluídas saem da coluna.

#### - Aplicação

A cromatografia em gel foi originalmente usada para separação de materiais biológicos. Devido aos primeiros géis serem formados de ligações cruzadas de dextrana, seu uso foi aceitável somente com sistemas aquosos. Em 1964 géis de poliestireno com ligações cruzadas para uso com solventes orgânicos foram produzidos, tornando possível a extensão da

cromatografia em gel na separação e caracterização de polímeros sintéticos. A aplicação do método não é somente para uma variedade de separações, mas também para determinação da massa molecular relativa por um procedimento rápido. Na separação de grupos utilizando cromatografia em gel um exemplo típico é a separação da hemoglobina e cloreto de sódio em um gel sephadex. Fracionamento de misturas de biopolímeros é a mais comum aplicação da cromatografia em gel e pode ser conduzida em escala analítica e preparativa. Quando o peso e tamanho molecular dos componentes da amostra não diferem muito, um gel com faixa de fracionamento apropriada deve ser escolhido. A escolha conveniente dos géis permite a separação e purificação de várias misturas (peptídeos, ácido nucleico, enzima e polissacarídeo).

## 5. PROCESSO "CARE" ("Continuous Affinity-Recycle Extraction")

Este processo contínuo com reciclo, baseado na cromatografia por afinidade e desenvolvido por PUNGOR et al (1987) será descrito a seguir por ter sido a base para o desenvolvimento deste trabalho.

### 5.1- INTRODUÇÃO

Processos cromatográficos em alta escala para purificação de proteínas requerem uma série de projetos e critérios de otimização onde a pureza final é uma obrigação e não um objetivo, com obtenção de um produto final purificado de custo mínimo que encontra especificações as quais, por sua vez, implicam em máxima recuperação. Em processos típicos de fermentação ou crescimento celular, devido às similaridades encontradas nas propriedades físico-químicas de proteínas, alto nível de pureza (requerido para a maioria das aplicações comerciais) pode somente ser alcançado usando uma série de etapas, aumentando a purificação do produto por diferentes mecanismos de separação. Toda esta sequência de etapas é frequentemente denominado "Downstream Processing" (DSP) (AFEYAN et al, 1989).

Segundo AFEYAN et al (1989), a purificação de proteínas é mais frequentemente efetuada por técnicas cromatográficas. Cromatografia adsortiva, a qual inclui troca iônica, afinidade, fase reversa e cromatografia por interação hidrofóbica, justifica uma grande parte das aplicações cromatográficas. Entre as técnicas adsortivas, cromatografia por afinidade, a qual usa interações bioespecíficas para a pureza da proteína de uma mistura, tem sido denominada processo "on-off", e é um pouco mais que uma extração sólido-líquido, operação unitária comum nas indústrias de processos químicos. Com o objetivo de superar algumas das limitações operacionais da cromatografia por afinidade em leito fixo, uma alternativa foi recentemente proposta: "Continuous affinity-recycle extraction". Esquemas de purificação incluindo o sistema "CARE" (GORDON et al, 1990) proporcionam a oportunidade para a integração de processos através da introdução de uma adsorção altamente específica como primeiro passo na sequência de purificação. Sendo possível alcançar simultaneamente, purificação, concentração e clarificação (separação sólido/líquido), enquanto mantém alto rendimento na recuperação, eliminando etapas de pré-purificação. Consequentemente, um ou mais passos do processo "downstream" pode ser eliminado, resultando em maior rendimento na recuperação e menor custo de purificação. A exequibilidade deste esquema de purificação foi estabelecida com a recuperação e isolamento da enzima  $\beta$ -galactosidase produzida por E. Coli, usando PABTG-agarose como suporte. Um esquema do sistema "CARE" é mostrado na FIGURA II.6.

O processo "CARE", estudado por vários pesquisadores (PUNGOR et al 1987, AFEYAN et al 1989, GORDON et al 1990) consiste em um estágio de adsorção que ocorre no primeiro reator, onde o líquido de alimentação entra em contato com o adsorvente e um estágio de dessorção da proteína alvo que é obtida no segundo reator mantendo condições apropriadas através da ação de um solvente adequado para eluição (tampão para dessorção). A resina é reciclada continuamente ao estágio de adsorção enquanto o produto é removido através de um filtro existente no segundo reator. Ambos os reatores são bem agitados e operados sob

condições de estado estacionário.

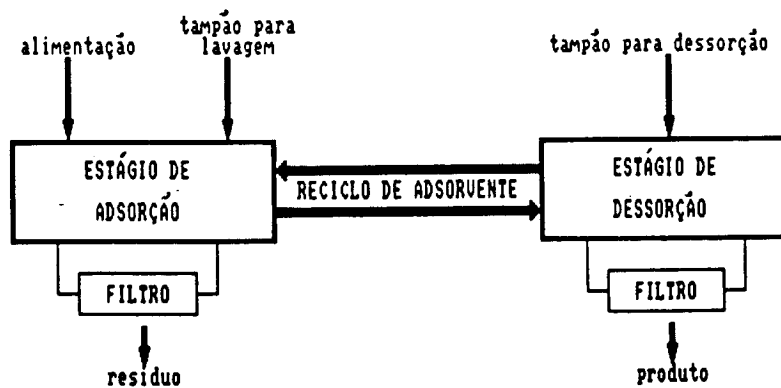


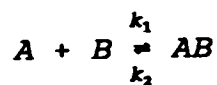
FIGURA II.6 - Esquema do processo "CARE".

O sistema "CARE" é matematicamente descrito por um processo simultâneo de adsorção e dessorção com um balanço de massa, onde os parâmetros cinéticos da adsorção e dessorção são estimados em experimentos batelada independente do sistema de purificação pelo processo "CARE" (AFEYAN, 1989).

### 5.2- MODELO MATEMÁTICO

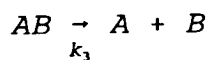
Um modelo matemático baseado em um balanço de massa tem sido desenvolvido e usado para estudar o relacionamento entre as variáveis do processo. Como uma primeira aproximação, assume-se que os dois reatores são perfeitamente agitados (PUNGOR et al, 1987). O processo de adsorção é considerado como uma reação reversível de segunda ordem enquanto o estágio de dessorção é modelado como uma reação irreversível de primeira ordem (CHASE, 1984b):

adsorção



II. (1)

dessorção



II.(2)

Onde A, B e AB são a proteína a ser adsorvida, o adsorvente e o complexo proteína-adsorvente, respectivamente. As constantes,  $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$  representam não somente a cinética de adsorção e dessorção intrínseca, mas também inclui contribuições da resistência à transferência de massa. Estas resistências são: difusão do soluto através de uma película estagnada em volta das partículas do adsorvente, difusão dentro dos poros do suporte sólido e a própria adsorção bioquímica. Portanto, estes efeitos são englobados em um único coeficiente que pode ser determinado experimentalmente (CHASE, 1984a). Esta aproximação faz a formulação matemática mais tratável utilizando uma descrição física menos rigorosa. Por outro lado, dados experimentais sugerem que em tal sistema as limitações da transferência de massa externa podem ser desprezadas sem perda na precisão (PUNGOR et al, 1987) e, no caso de proteínas com alto peso molecular estas são adsorvidas principalmente nos sítios localizados na, ou próximo à superfície do gel. Dessa forma as moléculas fixadas nestes sítios bloqueiam o caminho para difusão dentro do gel (HARSA et al, 1990). Resistência à difusão dentro do líquido (leito, filme) pode ser significativa dentro de uma coluna, mas não em um sistema de tanque agitado, devido à agitação (COWAN & COSLING, 1987). A operação é conduzida sob condições isotérmicas, desprezando então algum efeito térmico associado com adsorção e dessorção. As constantes  $k_1$  e  $k_2$  governam a direção da reação, e a razão das constantes ( $k_2/k_1$ ) é igual à constante de dissociação ( $K_d$ ) que descreve a relação de equilíbrio ou seja, a medida da força de interação entre a proteína e o adsorvente (SKIDMORE, 1990).

A taxa de transferência de massa para a fase imobilizada descrita pela equação II.(1) é dada por:



$$\frac{dq}{dt} = k_1 c (q_m - q) - k_2 q \quad \text{II. (3)}$$

onde  $c$  é a concentração de material que pode ser adsorvido, em solução,  $q$  é a concentração na fase sólida de material adsorvido por unidade de volume de adsorvente e  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente. Da mesma forma, em equilíbrio a interação é descrita por:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c^* (q_m - q^*) - k_2 q^* = 0 \quad \text{II. (4)}$$

onde o (\*) representa o valor no equilíbrio. Da equação II.(4) pode ser visto que em equilíbrio a concentração na fase sólida de material adsorvido ( $q^*$ ) varia com a concentração de material que pode ser adsorvido ( $c^*$ ) da seguinte forma:

$$q^* = \frac{q_m c^*}{k_d + c^*} \quad \text{II. (5)}$$

A equação II.(5) prediz que a isoterma de adsorção deve ser não linear e do tipo descrito por Langmuir, frequentemente referida como uma isoterma "favorável" (CHASE, 1984a).

Como dito anteriormente a partir de experimentos em batelada as constantes cinéticas do processo podem ser determinadas e um modelo do processo CARE foi formulado de acordo com uma série de balanços de massa envolvendo dois reatores bem agitados operando com reciclo segundo a metodologia descrita por RODRIGUES et al (1992). A cinética de ambos, adsorção e dessorção, foi incorporada nos balanços de massa e simulações de purificação de um sistema CARE simples com dois estágios (adsorção/dessorção) foram executadas. Uma solução analítica para o estado estacionário foi desenvolvida, e a aproximação dinâmica para o estado estacionário encontrado no início do sistema foi

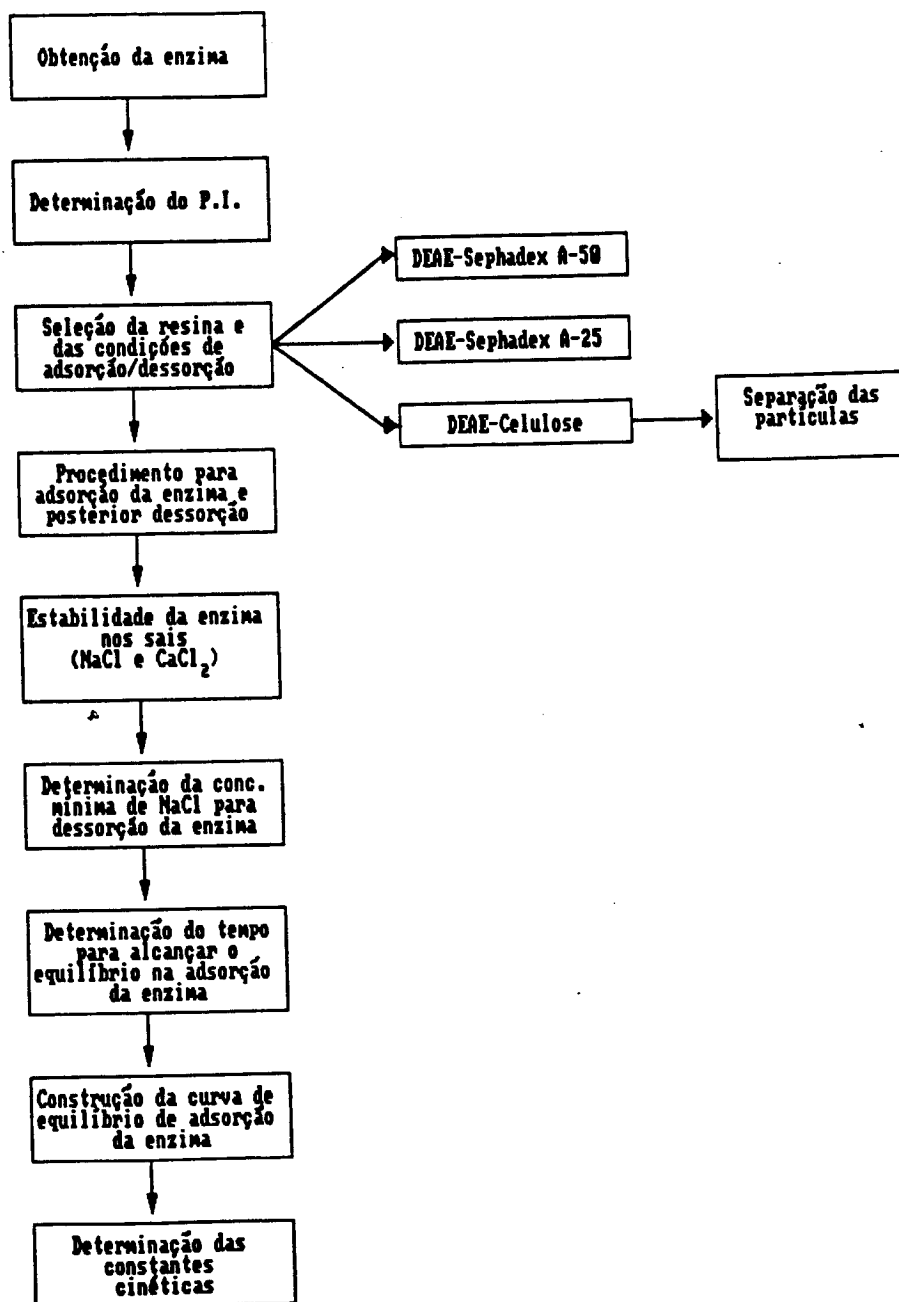
resolvida numericamente utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª ordem. Este modelo desenvolvido é aplicável para qualquer sistema, o qual seja possível descrever matematicamente as cinéticas de adsorção/dessorção (GORDON et al, 1990).

Com relação ao estágio de dessorção, resultados de AFEYAN em 1989 indicam que a dessorção da proteína é muito mais rápida que o processo de adsorção. Durante a adsorção a força de deslocamento, que é a diferença entre a concentração no leito e a concentração líquida no poro em equilíbrio com a proteína adsorvida, é tipicamente baixa. Como a proteína é adsorvida pelo adsorvente, a concentração de enzima no leito diminui e a concentração líquida no poro em equilíbrio aumenta. Como resultado disso, a força de deslocamento para adsorção diminui e permanece pequena até acabado o tempo completo do processo de adsorção. Em contraste, durante a dessorção, a força de deslocamento inicial é proporcional à concentração de enzima adsorvida que é normalmente alta. Ambos, experimentos e teoria, confirmam que a dessorção é rápida, portanto sendo descrita como instantânea e completa (AFEYAN, 1989).

A capacidade de otimizar a operação do sistema CARE, bem como sua localização em uma sequência de operações unitárias num processo downstream faz dele uma opção atrativa para purificação de proteína em grande escala, além disso oferece uma alternativa de suspensão bem agitada, proporcionando a oportunidade de adsorção direta de soluções altamente viscosas, contendo sólidos contaminantes (GORDON et al, 1990).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

Para determinação das constantes cinéticas de adsorção da enzima (dextrana-sacarase) foram necessárias uma série de etapas, conforme FLUXOGRAMA III.1, que são descritas a seguir.



FLUXOGRAMA III.1 - Etapas realizadas para determinação das constantes cinéticas da enzima.

## 1. OBTENÇÃO DA ENZIMA

A enzima dextrana-sacarase, produzida por fermentação de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F, é uma enzima indutiva e o único indutor conhecido é a sacarose. Outros açúcares como glicose, frutose, manose promovem crescimento vegetativo normal, mas sem produção de enzima (LOPES, 1979). Neste caso foi utilizado o processo de produção de dextrana-sacarase por batelada alimentada, onde as culturas liofilizadas de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F estavam estocadas. Para ativar o microorganismo foram feitas novas culturas em erlenmeyers e incubadas em uma câmara com agitação e controle de temperatura automáticos da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC a 27°C por 8 horas com repiques sucessivos até obtenção de uma boa atividade da enzima (em torno de 40 UDS), em seguida foram preparadas culturas com 5 ml do caldo e 5 ml de glicerol 20%, sendo então congeladas para posterior utilização à cada fermentação.

Os componentes do meio de cultura (TABELA III.1) citado por (ALSOP, 1983) foram diluídos em água destilada (com exceção do fosfato) para 750 ml e o pH ajustado a 6,7 com HCl concentrado. O fosfato foi diluído separadamente para 250 ml. e o pH ajustado a 6,7. Ambos foram esterilizados separadamente a 121°C/15 min., e depois de frias, as soluções foram misturadas obtendo um meio de cultura com volume total de 1000 ml.

Preparou-se 400 ml de sacarose 200 g/l e 100 ml de NaOH 5N que foram esterilizados separadamente e misturados depois de frios. Esta solução serviu de alimentação no processo de fermentação.

-Inóculo (pré-fermentação):

Esterilizou-se 80 ml de solução com a mesma composição do meio de cultura a 121°C/15 min. em erlenmeyer de 250 ml. Após resfriamento adicionou-se 20 ml de tampão fosfato esterilizado da mesma forma, obtendo então um volume de 100 ml (10% do volume de fermentação). Inoculou-se o meio com um tubo de cultura estoque e incubou-se a 27°C/12h a 200 rpm.

TABELA III.1 - Meio de cultura para fermentação de Leuconostoc mesenteroides.

Componentes	Concentração (g/l)
sacarose	20-40
extrato de levedura	20
sulfato de magnésio	0.2
cloreto de sódio	0.01
sulfato ferroso	0.01
sulfato de manganês	0.01
cloreto de cálcio	0.02
fosfato de potássio-di-básico	20

-Fermentação:

Foram utilizados 2 fermentadores BIOFLOW III da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC (batch/continuous fermentor) com controle automático de pH, temperatura, agitação, nutrientes e aeração. Cada fermentador de 3 litros contendo 1 litro do meio padrão previamente esterilizado foi inoculado com a pré-fermentação. Incubou-se a 27°C, com aeração de 0,5 l/min e agitação moderada, controlou-se o pH numa faixa de 6,64 a 6,74 pela adição da solução de alimentação. Como o NaOH e a sacarose foram colocados num mesmo frasco, a adição de sacarose foi feita de forma combinada juntamente com a soda pela ação de um controlador de pH. Durante a fermentação retirou-se amostras de 10 ml. Uma alíquota foi diluída com água destilada para determinação do crescimento celular. O restante da amostra, depois de acertar o pH a 5,2 com HCl concentrado, foi centrifugado a 10.000 rpm, 4°C/15min e determinou-se açúcares totais, açúcares redutores e atividade enzimática.

-Purificação e estocagem da enzima:

O caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. a 4°C (centrífuga VAC 25 com controle de temperatura automático e rotações até 30.000 rpm). O sobrenadante foi

submetido a um processo de ultrafiltração a baixa temperatura para concentrar a enzima e eliminar impurezas. Em banho de gelo, adicionou-se lentamente ao concentrado uma solução de polietileno glicol 1500 50% (PEG 1500) até que a solução tornasse turva, com o aparecimento de partículas esbranquiçadas. Centrifugou-se então a solução e o precipitado rico em enzima (dextrana-sacarase) foi diluído numa solução tampão de acetato de sódio 0,05M pH 5,2 contendo 0,05 g/l de cloreto de cálcio. Repetiu-se o processo de precipitação com PEG mais 2 vezes. Estocou-se a enzima em frascos à -15°C para posterior utilização.

## **2. DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO (P.I.) DA DEXTRANA-SACARASE**

Uma vez que este dado deve ser bastante preciso e exige equipamentos muito sofisticados, foi enviada uma amostra da enzima para o laboratório de análises da PHARMACIA, que gentilmente fez a determinação do P.I., utilizando análise eletroforética nas seguintes condições:

- Phast Cel IEF 3-9

1) Pré corrida 2000V, 2,5mA, 3,5w, 15°C.

2) Aplicação das amostras 200V, 2,5mA, 3,5w, 15°C.

3) Corrida 2000V, 2,5mA, 3,5w, 15°C.

## **3. SELEÇÃO DA RESINA E DAS CONDIÇÕES DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO**

Como primeiro passo foi escolhido o pH de operação, que neste caso foi o pH de estabilidade máxima da dextrana-sacarase, ou seja, pH 5,2 segundo ALSOP (1983). A escolha do tipo de resina foi feita baseando-se no resultado dos estudos de determinação do P.I. da enzima.

### **a) PREPARO DA RESINA DEAE-SEPHADEX A-50.**

Pesou-se 0,1g de resina em tubo ensaio, que foi umedecida em 10 ml de NaCl 0,2M por 5 minutos. Para completar o processo de intumescimento e promover a eliminação de bolhas de ar, a solução foi colocada em banho-maria em ebulição por 2h,

fazendo a renovação do tampão à medida que a resina decantava. A resina ficou armazenada no tampão à baixa temperatura até o uso. Para o empacotamento, a resina foi lavada com tampão fresco (pH 5,2) para que o equilíbrio fosse atingido.

b) PREPARO DA RESINA DEAE-SEPHADEX A-25.

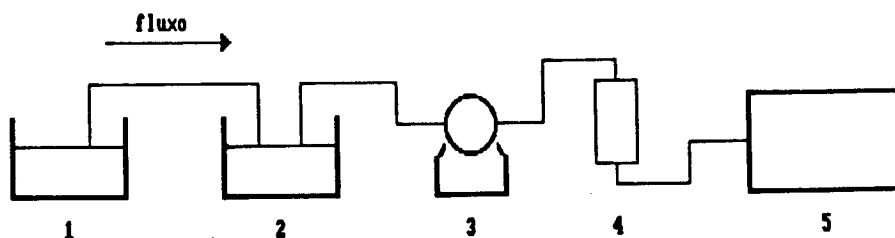
A Resina DEAE-Sephadex A-25 apresenta menor porosidade que a A-50, mas seu preparo é similar à DEAE-Sephadex A-50.

c) PREPARO DA RESINA DEAE-CELULOSE.

A resina foi tratada com NaOH 0,5N durante 2h e, posteriormente lavada com água destilada até a neutralidade. Em seguida tratada com HCl 0,5N durante 2h e da mesma forma, lavada com água destilada até a neutralidade, o que foi verificado determinando-se o pH nos líquidos de lavagem. Para o empacotamento, a resina foi lavada com tampão acetato (pH 5,2) até que o equilíbrio fosse atingido. A resina permaneceu no tampão, à baixa temperatura até seu uso.

d) PROCEDIMENTO PARA ADSORÇÃO DA ENZIMA E POSTERIOR  
DESSORÇÃO

A enzima foi descongelada, diluída em tampão e em seguida centrifugada a 6.000 rpm por 10 min a 4°C (centrífuga refrigerada SPIN VI da INCIBRÁS com controle de temperatura e rotação até 6.000 rpm). O precipitado foi rediluído em tampão e foi feita a determinação da atividade enzimática. A adsorção da enzima foi feita utilizando-se a resina equilibrada, numa proporção de 1:1 (v/v) em banho de gelo com agitação por 40 minutos. Após a adsorção fez-se a determinação da atividade enzimática do sobrenadante para verificar se a enzima foi totalmente adsorvida. O empacotamento da resina contendo a enzima adsorvida foi feito em uma coluna cromatográfica C10/20 da Pharmacia, passando em seguida tampão correspondente a 5 vezes o volume da coluna. A eluição com gradiente salino foi feita como ilustrado na FIGURA III.1.



- 1 - becker com solução salina de concentração conhecida
- 2 - becker com tampão
- 3 - bomba peristáltica
- 4 - coluna cromatográfica
- 5 - espectrofotômetro

FIGURA III.1 - Esquema da montagem utilizada para eluição com gradiente salino.

As amostras foram recolhidas de 2 em 2 ml num coletor de amostras automático com calibrador de tempo Fracsil-100 da INCIBRÁS e fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro digital B382 da MICRONAL, UV 280 nm. As amostras que apresentaram leitura foram misturadas e fez-se a determinação da atividade enzimática.

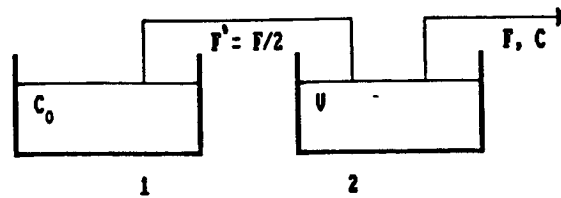
e) ESTABILIDADE DA RESINA NOS SAIS ( $\text{NaCl}$  e  $\text{CaCl}_2$ )

Foi adicionado 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  em 5 tubos e 1 ml de  $\text{NaCl}$  em outros 5, com diferentes concentrações molar (0,2 ; 0,5 ; 0,75; 1,0 e 2,0) em seguida colocado 1 ml da enzima nesses tubos. Os tubos foram agitados por 10 min. em banho de gelo e a atividade enzimática de cada tubo foi determinada.

f) DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE  $\text{NaCl}$  PARA DESSORÇÃO DA ENZIMA

Para determinar a concentração mínima de cloreto de sódio para eluição da enzima, foi necessário fazer um balanço de massa no sistema ilustrado pela FIGURA III.2.





$C_0$  - concentração da solução salina  
 $F$  - fluxo no tubo ( $m^3/h$ )  
 $V$  - volume de tanque

**FIGURA III.2 - Esquema do sistema de vaso comunicante utilizado para formação do gradiente salino.**

Para o sistema ilustrado na FIGURA III.2, tem-se o seguinte balanço global de massa:

Recipiente (1):

$$- F' \rho_1 = \frac{d(V_1 \rho_1)}{dt} \quad \text{III. (1)}$$

Onde  $\rho_1$  = densidade da solução salina no recipiente (1)

$$\frac{dV_1}{dt} = -F' \quad \text{III. (2)}$$

Recipiente (2):

$$F' \rho_1 - F \rho_2 = \frac{d(V_2 \rho_2)}{dt} \quad \text{III. (3)}$$

Onde  $\rho_2$  = densidade da solução salina no recipiente (2)

Considerando  $\rho_1 = \rho_2$  :

$$\frac{dV_2}{dt} = F' - F \quad \text{III. (4)}$$

Como, em um sistema vaso comunicante com reservatórios idênticos:

$$\frac{dV_1}{dt} = \frac{dV_2}{dt} \quad \text{III. (5)}$$

tem-se:

$$F' = \frac{F}{2} \quad \text{III. (6)}$$

O Balanço de massa de sal (entra-sai = acúmulo) no 2º recipiente fornece:

$$\frac{F}{2} C_o - FC = \frac{d(CV_2)}{dt} \quad \text{III. (7)}$$

e aplicando-se a equação III.(6) em III.(4) tem-se:

$$\frac{dV_2}{dt} = \frac{F}{2} - F = - \frac{F}{2} \quad \text{III. (8)}$$

Integrando a equação III.(8):

$$\int_{V_2(0)}^{V_2(t)} dV_2 = \int_0^t -\frac{F}{2} dt \quad \text{III. (9)}$$

$$V_2(t) = V_o - \left(\frac{F}{2}\right)t \quad \text{III. (10)}$$

Onde  $V_o = V_2(0)$

Tem-se também que:

$$\frac{d(CV_2)}{dt} = C\left(\frac{dV_2}{dt}\right) + V_2\left(\frac{dC}{dt}\right) \quad \text{III. (11)}$$

Substituindo-se os valores de  $d(CV_2)/dt$ ,  $dV_2/dt$  e  $V_2$ , dados respectivamente pelas equações III.(7), III.(8) e III.(10)

na equação III.(11) obtém-se:

$$\frac{F}{2}C_o - FC = C\left(-\frac{F}{2}\right) + \left(V_o - \left(\frac{F}{2}\right)t\right) \frac{dC}{dt} \quad \text{III. (12)}$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\left(\frac{F}{2}\right)(C_o - C)}{\left(V_o - \left(\frac{F}{2}\right)t\right)} \quad \text{III. (13)}$$

$$\frac{1}{(C_o - C)} dC = \frac{F}{(2V_o - Ft)} dt \quad \text{III. (14)}$$

$$\int_{C(0)}^{C(t)} \frac{1}{(C_o - C)} dC = \int_0^t \frac{1}{\left(2\frac{V_o}{F} - t\right)} dt \quad \text{III. (15)}$$

$$\ln \frac{(C_o - C(t))}{(C_o - C(0))} = \ln \frac{\left(\frac{2V_o}{F} - t\right)}{2\frac{V_o}{F}} \quad \text{III. (16)}$$

Assim,  $C(t)$  é a concentração salina na saída do 2º recipiente em função do tempo:

$$C(t) = C_o - \left(1 - \frac{Ft}{2V_o}\right) (C_o - C(0)) \quad \text{III. (17)}$$

#### 4. SEPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE DEAE-CELULOSE

A resina DEAE-Celulose da Sigma, utilizada neste trabalho apresenta uma porosidade média, com partículas de

diversos tamanhos. Para a obtenção do perfil de concentração com o tempo durante a etapa de adsorção foi necessário a utilização de um método que permitisse a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro UV 280 nm, sem interferência das partículas de resina. Com esse objetivo foi feita a separação da resina em diversos tamanhos. As seguintes peneiras foram escolhidas (TABELA III.2).

TABELA III.2 - Descrição das peneiras utilizadas para separação da DEAE-Celulose em partículas homogêneas.

tyler	abertura (mm)
60	0,250
100	0,149
150	0,105
200	0,074

A resina foi colocada sobre a última peneira (tyler 60) e em seguida lavada com água (BRAITHWAITE, 1985) possibilitando a separação da mesma em 4 tamanhos diferentes e eliminação dos finos (pó). Após a separação, as resinas foram secas em estufa a 60°C e guardadas em frascos. Com as resinas separadas foi feito um teste, em batelada, de adsorção e dessorção da enzima utilizando o seguinte procedimento:

A enzima foi descongelada, diluída em tampão e foi feita a determinação da atividade enzimática. Na resina já equilibrada em tubos de ensaio fez-se a adsorção da enzima utilizando uma proporção de 1:1 (v/v) em banho de gelo com agitação por 40 min., após a adsorção foi feita a determinação da atividade enzimática do sobrenadante para verificar se a enzima foi totalmente adsorvida. O sobrenadante foi retirado dos tubos e adicionado NaCl 0,5M na mesma proporção anterior com agitação por 10 min., em seguida fez-se determinação da atividade enzimática em cada tubo.

## 5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO PARA ESTABELECIMENTO DO EQUILÍBRIO NA ADSORÇÃO DA ENZIMA

Foi montado um sistema contínuo (FIGURA III.3) onde a enzima é inicialmente colocada em um reator contendo a resina já equilibrada e tampão. Utilizando uma bomba peristáltica da INCIBRÁS modelo BP-100, a fase solúvel é continuamente removida do reator, passando por um filtro e seguindo para um espectrofotômetro (UV, 280 nm). Na saída do espectrofotômetro foi conectado um registrador potenciométrico B 292 da MICRONAL que marcou permanentemente a redução da concentração de enzima na fase solúvel. O fluxo líquido é continuamente retornado ao reator e o volume total do sistema permanece constante. O volume morto foi o menor possível e igual a 2,5 ml em relação ao volume total (15 ml).

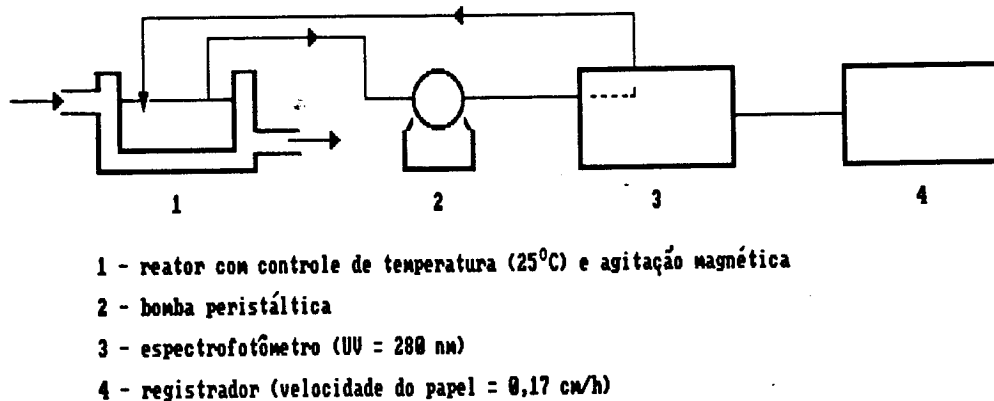


FIGURA III.3 - Montagem utilizada para determinação do tempo de equilíbrio na adsorção da enzima.

Foi colocado 0,005 g da resina DEAE-Celulose (tyler 60) juntamente com tampão acetato 0,2 mM (de forma a completar 15 ml totais após a adição da enzima) no reator termostaticado (25°C) com agitação magnética e foram calibrados, espectrofotômetro e registrador. Em seguida foi adicionada a enzima (concentração

desejada) no instante  $t=0$ . No espectrofotômetro (UV, 280 nm) foi acompanhada a leitura da absorvância de minuto em minuto e no registrador foi obtido um gráfico da absorvância (280 nm) em função do tempo, podendo ser observado o tempo necessário para se atingir o equilíbrio.

## 6. CONSTRUÇÃO DA CURVA DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO DA ENZIMA

Foram colocadas 0,005g de resina DEAE-Celulose (tyler 60) equilibrada em vários tubos de ensaio, obtendo um volume final de 1 ml (resina + tampão). Em cada tubo foi adicionado determinada quantidade de UDS totais (30, 40, 50, ..., 250) e em seguida o volume foi completado com tampão para 10 ml. Os tubos foram mantidos sob agitação à 25°C e quando completado 30 min. foi feita a leitura de absorvância (UV 280 nm) da fase solúvel em cada tubo. Para que não houvesse interferência de partículas da resina na leitura, a amostra foi filtrada utilizando uma seringa acoplada em um filtro Millipore ( $\phi=0,22\mu$ ). A partir dos resultados obtidos foi calculado  $c^*$ . O valor de  $q^*$  também foi calculado de acordo com a seguinte expressão :

$$q^* = \frac{(C_o - c^*)}{0,005 \text{ g de resina}} \quad \text{III. (18)}$$

Com os dados obtidos foi traçado um gráfico de  $q^*$  versus  $c^*$  (isoterma de adsorção).

## 7. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS

O sistema de reatores proposto é matematicamente descrito por um processo simultâneo de adsorção, dessorção e reação química, onde os parâmetros cinéticos da adsorção e dessorção foram determinados através de experimentos em batelada, de acordo com o modelo proposto por CHASE (1984a), no qual para a adsorção, sítios ligantes imobilizados (B) do adsorvente têm afinidade somente por uma espécie a ser adsorvida (A) onde a interação pode ser descrita por uma relação de equilíbrio citada

anteriormente na equação II.(1) e o processo é descrito matematicamente pelas equações II.(3), II.(4) e II.(5).

a) DETERMINAÇÃO DE  $k_d$  e  $q_m$

Rearranjando a equação II.(5) obtém-se:

$$\frac{1}{q^*} = \frac{k_d}{q_m c^*} + \frac{1}{q_m} \quad \text{III. (19)}$$

Portanto, à partir dos resultados obtidos para  $c^*$  e  $q^*$  foi construído um gráfico de  $1/q^*$  versus  $1/c^*$ , onde a declividade da reta é  $k_d/q_m$  e a interseção da reta com o eixo ( $1/q^*$ ) é  $1/q_m$ , sendo então determinados os valores de  $k_d$  e  $q_m$ .

b) DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES  $k_1$  E  $k_2$

Para a determinação das constantes  $k_1$  e  $k_2$  foi utilizado o método numérico de Runge-Kutta de 4ª ordem para resolução da equação II.(3) simulando uma curva de adsorção do tempo zero até o estabelecimento do equilíbrio. Foi dado um valor inicial para  $k_1$  (consequentemente  $k_2$  uma vez que  $k_d$  é conhecido) e através de um método iterativo foi determinado o valor de  $k_1$  e  $k_2$ , impondo o ajuste, pelo método de mínimos quadrados, da solução da equação II.(3) aos pontos experimentais.

## 8. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DA RESINA

Primeiramente foi determinada a densidade do tampão acetato 0,2 mM utilizado nos experimentos. A seguinte técnica foi empregada: a temperatura foi mantida a 25°C e utilizando dois picnômetros diferentes de massa conhecida foi feita a aferição dos mesmos com água, pesando-os por quatro vezes. Conhecendo a densidade da água a 25°C, e com a média das massas obtidas foi determinado o volume dos picnômetros. O mesmo procedimento foi feito utilizando tampão acetato 0,2 mM e com os volumes já conhecidos foi determinada sua densidade.

Utilizando o procedimento descrito anteriormente e agora conhecendo-se os volumes dos picnômetros e a densidade do tampão acetato, foi pesado 0,01 g de resina em balança analítica para cada picnômetro e foi feita aferição com o tampão, determinando-se assim a densidade da resina.

## 9. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 9.1- DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular do microrganismo foi determinado através da leitura em espectrofotômetro de absorvância do caldo fermentado a 650 nm, utilizando água destilada para calibração do aparelho. Para a conversão de absorvância em massa seca utilizou-se uma curva padrão.

### 9.2- DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES PELO MÉTODO DO DNS (MILLER, 1959)

#### Reagente DNS

- Misturar:

- 1416 ml de água destilada
- 10,16 g de 3,3 ácido dinitrosalicílico
- 19,8 g de hidróxido de sódio

- Dissolver a quente e adicionar

- 7,6 ml de fenol (fundido a 50°C)
- 8,3 g de metabissulfito de sódio

- Guardar o reagente DNS em frasco protegido de luz.

#### 9.2.1- AÇÚCARES REDUTORES

O método consiste em misturar 1 ml de amostra convenientemente diluída com 1 ml de reagente DNS e levar em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em banho de gelo e adiciona-se 16 ml de tartarato duplo de sódio e potássio 11,25 g/l. A reação de DNS com açúcares redutores produz



uma coloração que vai de amarelo claro a marrom escuro, proporcional à concentração de açúcares redutores contidos na amostra. Quanto maior a concentração de açúcares redutores mais intensa é a coloração marrom. O branco foi feito substituindo a amostra por 1 ml de água destilada e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Para conversão da absorbância em açúcares redutores foi necessário construir uma curva padrão de absorbância versus concentração de açúcares redutores para cada preparação de reagente.

#### 9.2.2- AÇÚCARES TOTAIS

Para determinar açúcares totais foi necessário fazer a conversão da sacarose em açúcares redutores. Esta etapa foi feita por hidrólise ácida, misturando-se 1 ml de amostra com 1 ml de HCl 2N, seguido de aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 min. Após resfriamento, adicionou-se 1 ml de NaOH 2N para neutralizar a amostra e em seguida determinou-se os açúcares redutores totais pelo método do DNS. A curva padrão foi feita graficando-se absorbância versus açúcares hidrolisados. A avaliação da concentração de sacarose durante a fermentação foi determinada pela diferença entre açúcares totais e açúcares redutores.

#### 9.2.3- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada medindo-se a velocidade inicial de produção de frutose (dosada pelo método DNS), quando a enzima foi colocada em contato com sacarose sob condições controladas (reator de vidro de 25 ml encamisado, termostatizado a 30°C e com agitação magnética). Na cela de vidro colocou-se 1,0 ml de tampão atividade (pH 5,2), 8 ml de água destilada, 2 ml solução de sacarose 600 g/l e 1 ml de solução enzimática. À partir do momento de adição da amostra retirou-se 1 ml da solução à cada intervalo de tempo (por exemplo: 1, 3, 7, 10 min.) para dosagem de frutose pelo método do DNS. Foi construída uma curva padrão de absorbância versus tempo e a atividade foi determinada pela equação:

Onde:

ATIV. = atividade (UDS/ml)

$\alpha$  = coef. angular da curva de absorvância x tempo

$\beta$  = coef. angular da curva padrão de aç. redutores

d = diluição da amostra no reator (volume total/volume amostra)

### 9.3- CURVA PADRÃO PARA PROTEÍNA UTILIZANDO ALBUMINA BOVINA

Esta curva foi construída para correlacionar resultados de atividade enzimática (UDS/ml) obtidos, com valores correspondentes para a concentração de albumina bovina que serviram de base para cálculos deste trabalho. Foram pesadas 0,1g de albumina bovina que foi diluída em 100 ml (1g/l) com água destilada. A partir desta solução foram feitas diluições sucessivas e posteriormente leu-se a absorvância em espectrofotômetro (UV, 280 nm). Construiu-se um gráfico da concentração de albumina (g/l) x absorvância (UV 280 nm).

### 9.4- CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE DE DEXTRANA-SACARASE

Esta curva foi construída para facilitar o trabalho e determinar a concentração de dextrana-sacarase com base nos dados obtidos para concentração de albumina bovina. Para a construção da curva padrão, a partir de uma amostra da enzima, através de diferentes diluições, foram preparadas cotas de diferentes concentrações das quais foram determinadas a atividade enzimática e a leitura de absorvância no espectrofotômetro (UV 280 nm). Com os resultados obtidos foi construído um gráfico de ativ. dextrana-sacarase (UDS/ml) versus absorvância (UV 280 nm).

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi dividido em duas etapas principais, uma primeira etapa onde foram determinadas as constantes cinéticas do processo de adsorção da enzima por troca iônica, desenvolvida no Laboratório de Bioengenharia da FEA e uma segunda etapa de modelagem e simulação do reator para produção de dextrana. As simulações foram feitas utilizando uma Work Station (Modelo: Sparc Station 1+) no Microcentro/FEA.

##### 1. OBTENÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS DO PROCESSO DE ADSORÇÃO

###### 1.1- ESCOLHA DA RESINA DE TROCA IÔNICA

###### a) Determinação do ponto isoelétrico da enzima

A enzima foi analisada por eletroforese para determinação do ponto isoelétrico (P.I.). Pela FIGURA IV.1 pode-se observar que o P.I. da dextrana-sacarase está próximo ao pH 4,5. Este dado é extremamente relevante pois indica o tipo de resina que deve ser utilizada no processo de troca iônica.

Desta forma, sabendo-se que o pH de máxima estabilidade da enzima está ao redor de 5,2 ou seja, acima do ponto isoelétrico, deve-se utilizar uma resina trocadora de ânions (resina aniônica). De acordo com as propriedades destas resinas escolheu-se a resina DAE-sephadex da Pharmacia para realizar os primeiros experimentos visto ser indicada para adsorção de proteínas com alto peso molecular e apresentar-se na forma de esferas uniformes.

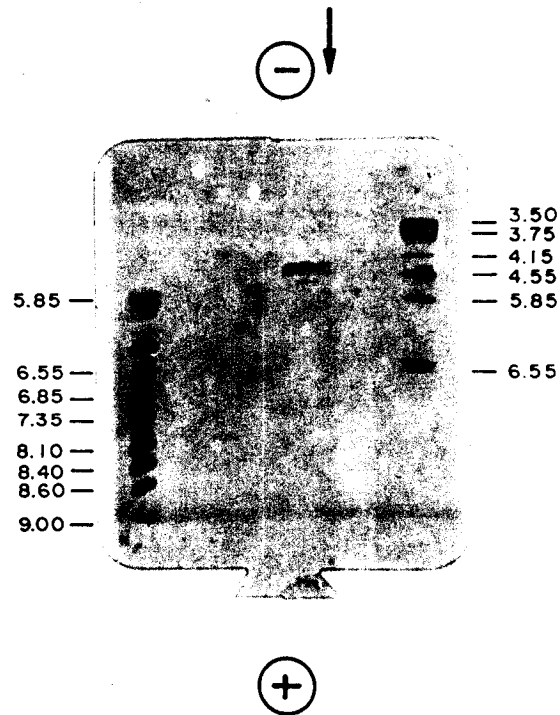


FIGURA IV.1 - Determinação do P.I. da dextrana-sacarase através de análise eletroforética.

b) Estudo da adsorção e dessorção da enzima em diferentes resinas.

Nos experimentos realizados com DEAE-Sephadex A-50 foi verificado a adsorção da enzima, porém não conseguiu-se a dessorção da enzima utilizando gradientes salino ( $\text{NaCl}$  e  $\text{CaCl}_2$ ). Testou-se então DEAE-Sephadex A-25 (menor porosidade que a A-50) e foi observado que novamente a enzima era adsorvida pela resina, mas também não ocorria a dessorção.

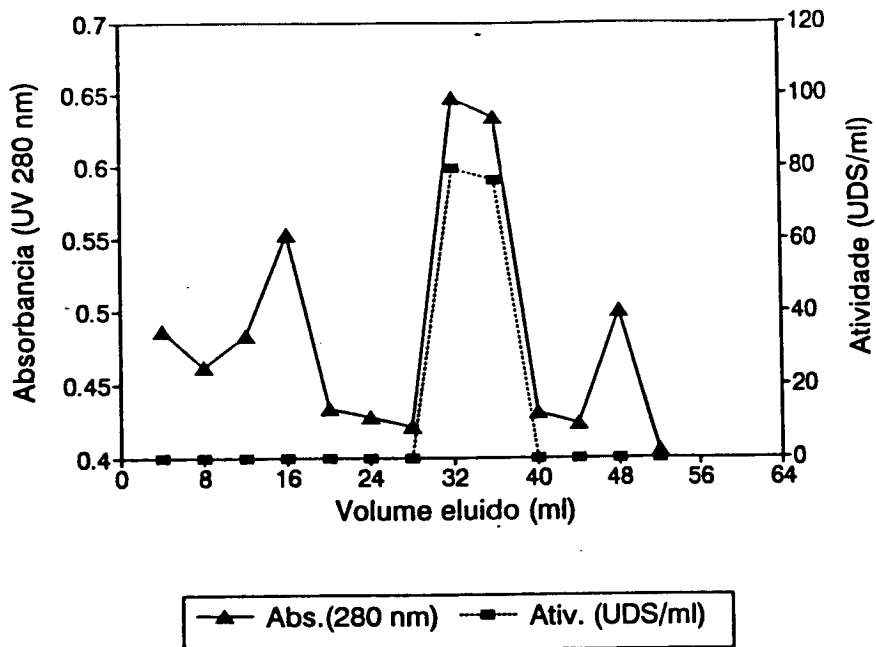
Pensou-se inicialmente que o gradiente salino aplicado na eluição poderia ter inativado a enzima, de forma que ela não

era detectada mesmo tendo sido eluída. Com o objetivo de verificar a possível interferência na atividade da enzima causada pelas soluções de NaCl e CaCl<sub>2</sub> utilizadas para dessorção, foram feitos testes de estabilidade da enzima nestas soluções. Os resultados estão apresentados na TABELA IV.1 e conclui-se que estas soluções não estariam causando perda total da atividade no tempo decorrido e sim que não estava ocorrendo dessorção. Como a matriz das resinas DEAE-Sephadex são à base de dextrana, provavelmente algum outro tipo de interação, não troca iônica, estaria ocorrendo entre a matriz e a dextrana-sacarase impossibilitando a dessorção com gradiente salino. Nota-se, por outro lado que o CaCl<sub>2</sub> tem maior efeito na perda de atividade da enzima, de forma que passou-se a trabalhar com NaCl.

Em seguida testou-se a resina DEAE-Celulose da Sigma, que também é uma resina aniônica, com matriz à base de celulose. Foi feita a adsorção e posterior dessorção com NaCl 1M. As alíquotas que apresentaram maior leitura de absorbância (UV 280 nm) foram reunidas e determinou-se a atividade enzimática, constatando-se que a enzima foi eluída, conforme pode ser observado na FIGURA IV.2. As amostras referentes ao pico maior apresentaram uma atividade de 42% da atividade inicial empregada.

TABELA IV.1 - Estabilidade da dextrana-sacarase em NaCl e CaCl<sub>2</sub>

NaCl [M]	% perda atividade	CaCl <sub>2</sub> [M]	% perda atividade
0,2	2,36	0,2	10
0,5	4,18	0,5	19
0,75	10,86	0,75	22
1	12,08	1	40
2	16,97	2	68



**FIGURA IV.2** - Dessorção da dextrana-sacarase adsorvida em DEAE-Celulose, utilizando NaCl como eluente.

Os resultados confirmaram que a resina DEAE-Celulose pode ser utilizada em processos de purificação da dextrana-sacarase (SUZUKI & KOBAYASHI, 1975).

De acordo com a equação III.(17) foi feito o cálculo da concentração mínima de NaCl para que ocorra a desorção da enzima:

$$C(t) = C_0 - \left(1 - \frac{Ft}{2V_0}\right) (C_0 - C(0)) \quad \text{III. (17)}$$

Onde:

$$C_0 = 1 \text{ M}$$

$$F = 4,5 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{h}$$

$$t = \text{vazão/volume (saída da amostra)} = 0,711 \text{ h}$$

$$V_0 = 30 \text{ ml} = 30 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$$

$$C(0) = 0 \text{ (concentração de NaCl no tampão no instante } t=0)$$

Portanto,  $C(t) = C(0,711) = 0,53 \text{ M}$ .

Esta concentração salina de 0,53 M será um parâmetro importante a ser empregado na operação do reator duplo estágio proposto.

Na próxima etapa do trabalho, determinação do tempo para estabelecimento do equilíbrio na adsorção, foi necessário um método que permitisse a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro (UV 280 nm) durante a adsorção sem que houvesse interferência da resina na leitura. Devido à presença de partículas finas, a resina foi então separada em diversas granulometrias objetivando eliminá-las. Após a separação foi feito a adsorção (100 UDS iniciais) e dessorção da enzima nas resinas separadas e os resultados obtidos estão mostrados na TABELA IV.2.

**TABELA IV.2** - Dessorção da dextrana-sacarase nas resinas de DEAE-Celulose em função da granulometria.

Tipo de resina	Enzima dessorvida (UDS)
normal	29
tyler 60	33
tyler 100	26
tyler 150	23
tyler 200	20

Conseguiu-se então a separação das partículas finas, e na resina com partículas maiores, o processo de adsorção e dessorção da enzima apresentou melhor resultado. Passou-se então a utilizar nos próximos experimentos a resina DEAE-Celulose separada em tyler 60.

## 1.2- DETERMINAÇÃO DO TEMPO PARA ALCANÇAR O EQUILÍBRIO NA ADSORÇÃO.

Para determinar o tempo necessário para atingir o equilíbrio durante a adsorção da enzima, foram feitos experimentos em reator, utilizando um sistema como ilustrado na FIGURA III.3, com diferentes concentrações de enzima (UDS totais). No instante  $t=0$  a enzima foi adicionada, obtendo-se a leitura de absorvância no espectrofotômetro de minuto em minuto e o gráfico de absorvância (UV 280 nm) versus tempo no registrador. Os gráficos obtidos têm o mesmo comportamento do mostrado na FIGURA IV.3, onde o eixo y corresponde à absorvância, UV 280 nm (cada intervalo corresponde a 0,001 de abs.) e o eixo x ao tempo (cada cm corresponde a 5,88 min.).

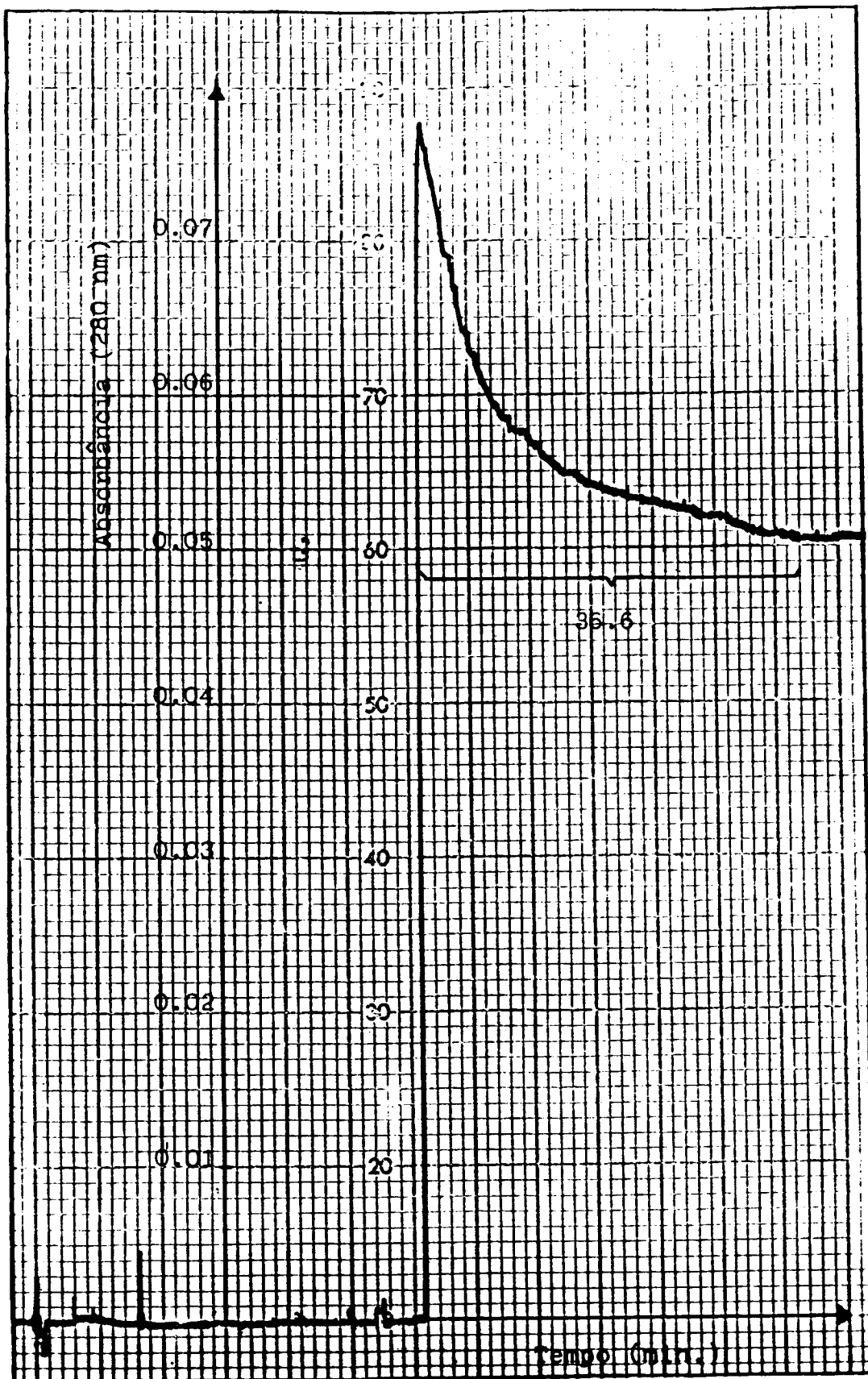
Através do gráfico (FIGURA IV.3) obteve-se um tempo mínimo para estabelecimento do equilíbrio de 36,6 minutos. Os outros experimentos foram feitos da mesma forma obtendo-se os seguintes resultados (TABELA IV.3):

TABELA IV.3 - Tempo para estabelecimento do equilíbrio na adsorção da enzima.

Experimento	Conc. de enzima (UDS totais)	Tempo de equilíbrio (min.)
1	10	28
2	20	29,4
3	30	36,6
4	40	26

Os resultados indicam o tempo médio para estabelecimento do equilíbrio de 30 minutos, o qual foi utilizado para construção da curva de equilíbrio e determinação de  $K_d$  e  $q_m$ .





**FIGURA IV.3** - Variação da absorbância com o tempo, durante adsorção da enzima (30 UDS) pela resina.

### 1.3- DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA ADSORÇÃO

#### a) Curva de equilíbrio e constantes $K_d$ e $q_m$

Para a construção da curva de equilíbrio procedeu-se como descrito no ítem III.6. Os resultados estão apresentados na TABELA IV.4 e com a curva padrão de albumina obteve-se a função  $[g/l]$  albumina =  $1,876 \cdot (UV) - 0,0136$ , determinando-se então  $C_0$  e  $c^*$ . Utilizando a equação III.(18) determinou-se  $q^*$ .

**TABELA IV.4** - Resultados obtidos para determinação da curva de equilíbrio

tubo	UDS	$C_0$ (g/l)	$UV^*$ (280 nm)
1	30	0,1485	0,053
2	40	0,2047	0,072
3	70	0,4229	0,144
4	80	0,4082	0,159
5	90	0,5436	0,195
6	100	0,5106	0,203
7	110	0,6652	0,228
8	120	0,6129	0,255
9	130	0,7859	0,299
10	160	0,8566	0,341
11	200	1,0707	0,434
12	220	1,1778	0,464
13	250	1,3384	0,546

Na tabela IV.5 são apresentados os valores de  $c^*$  e  $q^*$  à partir dos quais foi traçada a isoterma de adsorção (FIGURA

IV.4) e os valores de  $1/c^*$  e  $1/q^*$  que foram graficados (FIGURA IV.5) para determinação de  $K_d$  e  $q_m$ .

TABELA IV.5 - Valores obtidos para  $c^*$  e  $q^*$

tubo	$c^*$	$q^*$	$1/c^*$	$1/q^* \cdot (10^2)$
1	0,0858	12,54	11,6550	7,9745
2	0,1215	16,74	8,2305	5,9737
3	0,2565	27,64	3,8986	3,6179
4	0,2847	30,24	3,5125	3,3069
5	0,3522	31,71	2,8393	3,1536
6	0,3672	35,28	2,7233	2,8345
7	0,4141	39,78	2,4149	2,5138
8	0,4648	40,08	2,1515	2,4950
9	0,5473	47,72	1,8272	2,1441
10	0,6234	46,64	1,6041	2,0956
11	0,8006	54,02	1,2491	1,8512
12	0,8569	64,18	1,1670	1,5581
13	1,0107	65,54	0,9894	1,5258

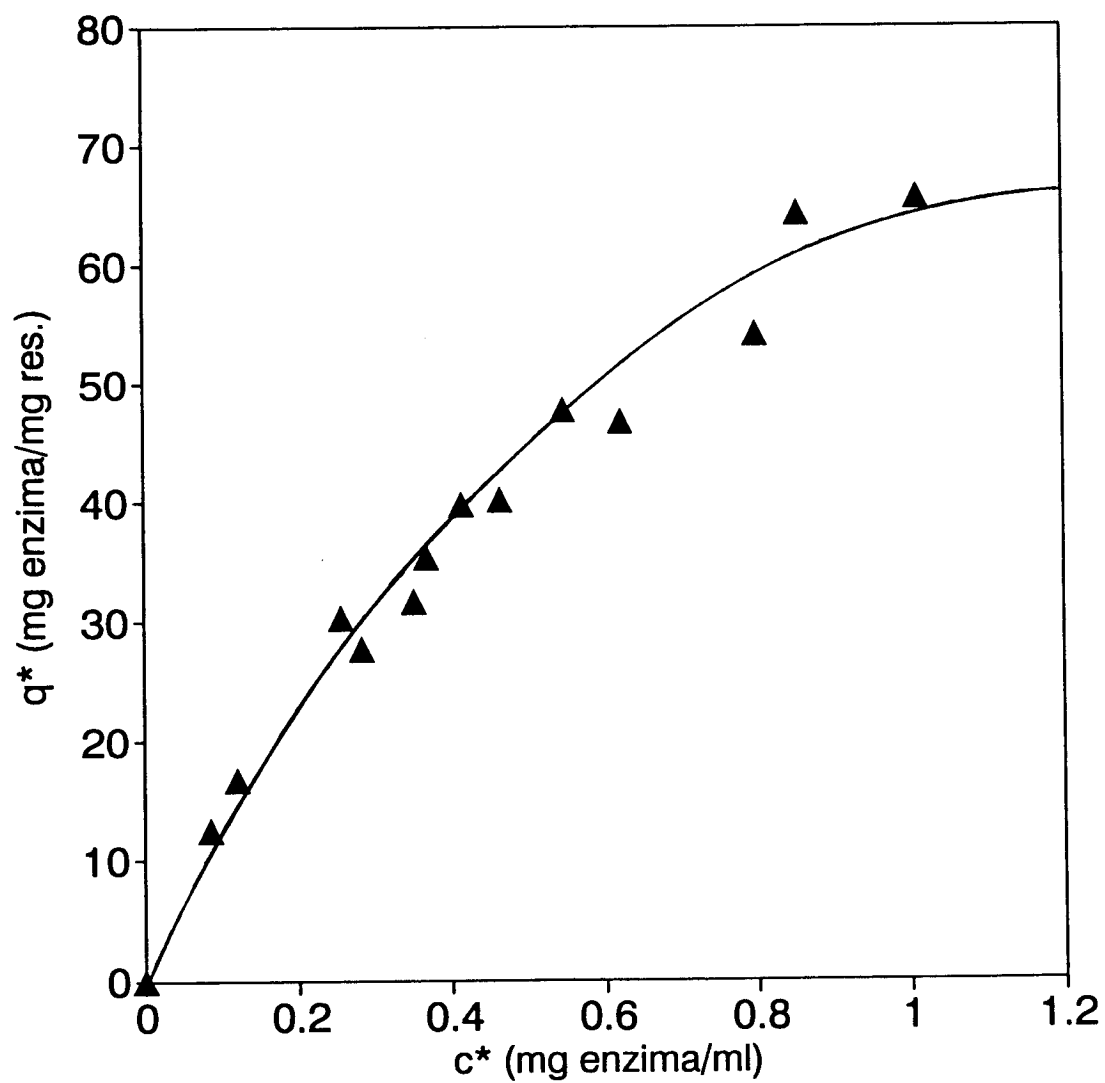


FIGURA IV.4 - Isotherma de adsorção.

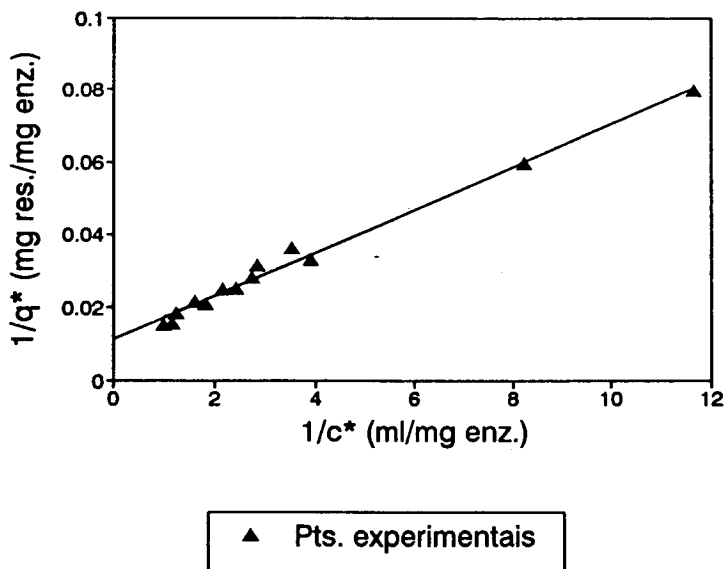


FIGURA IV.5 - Gráfico de  $1/q^*$  em função de  $1/c^*$  para obtenção de  $k_d$  e  $q_m$ .

Conforme equação III. (19):

$$\frac{1}{q^*} = \frac{K_d}{q_m c^*} + \frac{1}{q_m} \quad \text{III. (19)}$$

e utilizando o gráfico mostrado na FIGURA IV.5 determinou-se  $K_d/q_m$  pelo coeficiente angular da reta e  $1/q_m$  pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas, obtendo-se então:

. equação da reta ( $r^2=0,993$ )

$$1/q^* = 5,8773 \cdot 10^{-3} \cdot 1/c^* + 1,1814 \cdot 10^{-2}$$

.  $1/q_m = 1,1814 \cdot 10^{-2}$

$$q_m = 84,65 \text{ mg enzima/ml.g resina}$$

- Como havia 10 ml em cada tubo, tem-se:

$$q_m = 8,465 \cdot 10^{-1} \text{ mg enzima/mg resina}$$

- Densidade da resina =  $0,614 \text{ g/cm}^3$

$$q_m = 519,751 \text{ g.l}^{-1}$$

.  $K_d/q_m = 5,8773 \cdot 10^{-3}$

$$K_d = 4,975 \cdot 10^{-1} \text{ g.l}^{-1}$$

b) Constantes cinéticas  $k_1$  e  $k_2$

Para a determinação de  $k_1$  e  $k_2$  foi elaborado um programa computacional empregando o método de Runge-Kutta de 4ª ordem (Anexo A) para resolução da equação II.(3) descrita a seguir:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c(q_m - q) - k_2 q \quad \text{II.(3)}$$

Estimando-se  $k_1$  e consequentemente  $k_2$ , pois  $k_d$  é conhecido, os valores das constantes puderam ser determinados por método iterativo sendo feita comparação por mínimos quadrados da curva obtida com a curva experimental. O melhor ajuste entre as curvas está apresentado na (FIGURA IV.6).

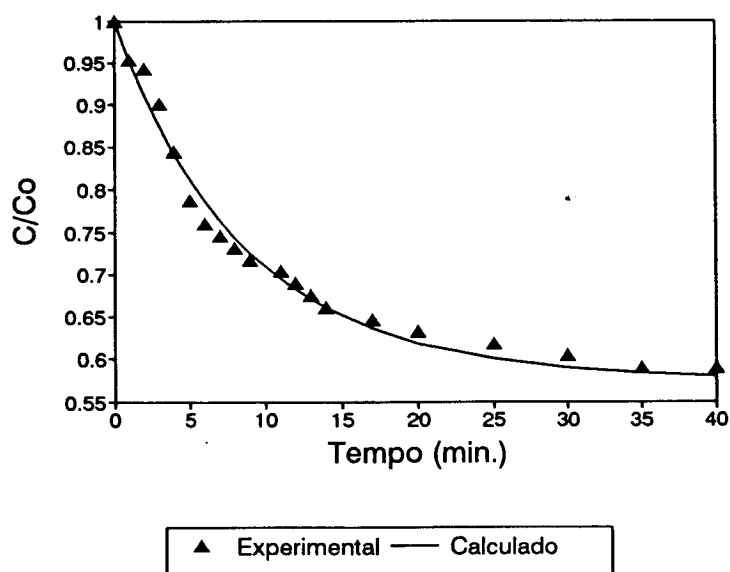


FIGURA IV.6 - Resolução numérica de melhor ajuste aos resultados experimentais para determinação de  $k_1$  e  $k_2$ .

Com desvio da ordem de  $4,664 \cdot 10^{-3}$  obteve-se:

$$k_1 = 1,185 \cdot 10^{-1} \text{ ml.mg}^{-1}.\text{seg}^{-1} = 426,6 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

$$k_2 = 5,895 \cdot 10^{-2} \text{ seg}^{-1} = 212,22 \text{ h}^{-1}.$$

É importante ressaltar que os valores encontrados para as constantes cinéticas de adsorção da enzima somente são aplicáveis nas mesmas condições que foram medidos, valores diferentes desses parâmetros podem ser obtidos em estudos de adsorção da mesma enzima em outras soluções. Os valores podem ser alterados devido à diferenças nas propriedades físicas da solução (temperatura, pH, força iônica) ou pela presença de outros componentes na solução interferindo na ligação.

## 2. MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO REATOR DUPLO ESTÁGIO PARA PRODUÇÃO DE DEXTRANA

### 2.1- DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE REATORES

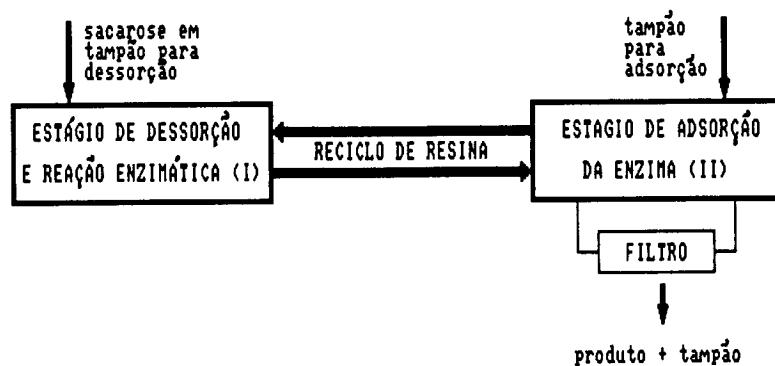


FIGURA IV.7 - Sistema duplo estágio para produção de dextrana com reciclo da enzima.

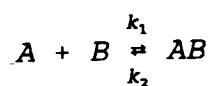
De acordo com o esquema mostrado na figura acima, inicialmente enzima é fornecida ao sistema. A alimentação (sacarose + tampão) ocorre no estágio (I) onde há dessorção da enzima ligada à resina pelo uso do tampão conveniente e reação enzimática ( $S + E \rightarrow P$ ), com produção de dextrana. Todos os compostos presentes no estágio (I), inclusive a enzima, são reciclados continuamente ao estágio (II) onde a enzima, em condições favoráveis é adsorvida pela resina não permitindo assim que ela seja eliminada e juntamente a outros compostos retorna ao estágio (I), enquanto isso, produto isento de enzima é removido continuamente através do filtro presente no estágio (II). Ambos os estágios são considerados perfeitamente agitados.



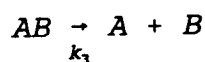
## 2.2- MODELAGEM DO REATOR

O sistema foi matematicamente descrito por um processo simultâneo de adsorção, dessorção e reação enzimática com um balanço de massa, onde os parâmetros cinéticos da adsorção foram estimados em experimentos batelada. Como uma primeira aproximação assumiu-se que os dois reatores são perfeitamente agitados (PUNGOR et al, 1987). O processo de adsorção foi considerado como uma reação reversível de segunda ordem enquanto o processo de dessorção foi modelado como uma reação irreversível de primeira ordem (CHASE, 1984b):

adsorção



dessorção



Onde A, B e AB são a enzima a ser adsorvida, o adsorvente e o complexo enzima-adsorvente, respectivamente. As constantes ( $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$ ) representam não somente a cinética de adsorção e dessorção intrínseca, mas incluem também resistência à transferência de massa externa e interna. Assim, estes efeitos estão agregados num único coeficiente que pode ser determinado experimentalmente (CHASE, 1984a). No caso de proteínas com alto peso molecular, estas são adsorvidas principalmente nos sítios localizados na, ou próximo à superfície do adsorvente. Dessa forma as moléculas fixadas nestes sítios bloqueiam o caminho para a difusão dentro do adsorvente (HARSA et al, 1990) e a resistência à difusão no líquido pode ser significativa dentro de uma coluna, mas não em um sistema de tanque agitado, devido à agitação (COWAN & GOSLING, 1987). Algum efeito térmico associado à adsorção, dessorção e reação enzimática também é desprezado, sendo o processo conduzido sob condições isotérmicas

à temperatura de 25°C.

Com relação à dessorção, os resultados indicam que a dessorção da proteína é muito mais rápida que a adsorção, sendo descrita como instantânea e completa (AFEYAN et al, 1989). Foi verificado que o valor do parâmetro cinético  $k_3$  não exerce forte influência nas simulações do sistema, podendo assumir valores da ordem de  $10^3 \text{ h}^{-1}$  (RODRIGUES et al, 1992).

Portanto a taxa de transferência de massa para a fase imobilizada, no processo de adsorção e dessorção, é respectivamente:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c (q_m - q) - k_2 q \quad \text{II. (3)}$$

$$\frac{dq}{dt} = - k_3 q \quad \text{IV. (1)}$$

A cinética da dextrana-sacarase tem sido geralmente descrita pelo modelo de Michaelis-Menten. O valor de  $k_m = 5,12 \text{ g/l}$  encontrado por MARTINEZ-ESPINDOLA & LOPES-MUNGUIA (1985) foi utilizado, já que as condições de obtenção foram as mesmas deste trabalho. Dessa forma a taxa de transformação da sacarose, de acordo com o modelo de Michaelis-Menten, é dada pela equação IV. (2).

$$\frac{dS}{dt} = -V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad \text{IV. (2)}$$

onde:

$$V_{\max} = K [c] \quad \text{IV. (3)}$$

O valor de  $K (\text{h}^{-1})$  foi obtido à partir da curva padrão de albumina bovina, concentração [conc.] (g/l) versus absorvância

[abs.] (280 nm) e de dextrana-sacarase, atividade [ativ.] (UDS/ml) versus abs. (280 nm) (FIGURA IV.8), obtendo-se uma relação direta da atividade de dextrana-sacarase [ativ. dextrana-sac.] (UDS/ml) e concentração de albumina bovina [conc. alb.] (g/l):

$$\text{Conc. alb. (mg/ml)} = 1,8402 \times \text{Abs}(280 \text{ nm}) \quad (r^2 = 0,9990)$$

$$\text{Ativ. dextrana-sac. (UDS/ml)} = 344,0846 \times \text{Abs}(280 \text{ nm}) \quad (r^2 = 0,9922)$$

Portanto:

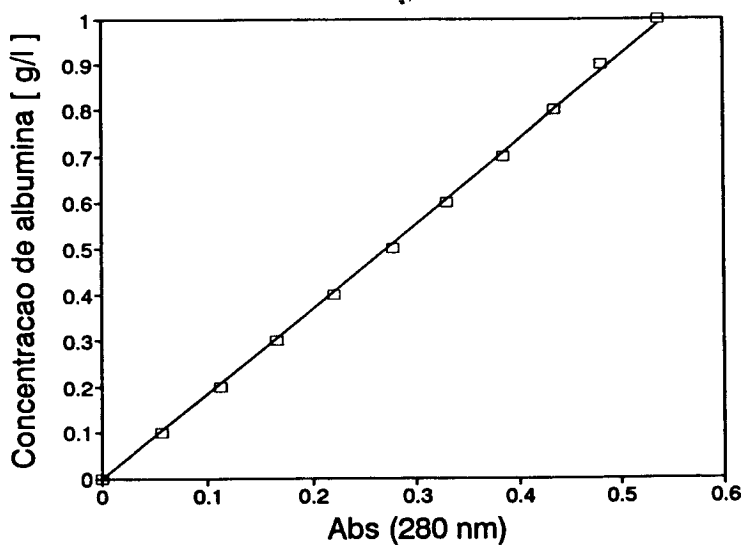
$$\text{Ativ. dextrana-sac. (UDS/ml)} = 186,98 \times \text{Conc. alb. (mg/ml)}$$

O valor de K é dado em: UDS/ml x ml/mg

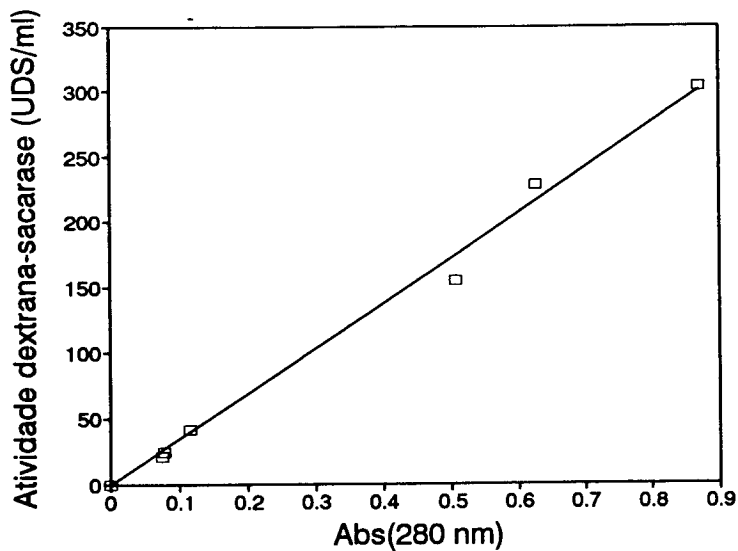
Tendo-se que a unidade de dextrana-sacarase (UDS) converte 1 mg de sacarose por hora (HEHRE, 1955) obtém-se:

$$K \rightarrow \text{mg}/(\text{h.ml}) \times \text{ml}/\text{mg} \rightarrow \text{h}^{-1}$$

$$K = 186,98 \text{ h}^{-1}.$$



**FIGURA IV.8.a** - Curva padrão de albumina bovina (g/l)



**FIGURA IV.8.b** - Curva padrão da atividade de dextrana-sacarase (UDS/ml)

Considerando-se que durante o processo para produção de dextrana há uma perda na atividade da enzima, foi calculado o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima à temperatura de operação (25°C) de acordo com dados obtidos em trabalho realizado por RIBEIRO & MAUGERI para verificar a influência da temperatura na atividade da enzima. De acordo com equação IV.(4) descrita a seguir, calculou-se  $K_D$ , constante ou velocidade específica de inativação térmica ( $\text{min.}^{-1}$ ) e em seguida utilizando-se a equação IV.(5) foi calculado o tempo de meia vida.

$$\ln KD = 266,29 - 83959,29 \frac{1}{T} \quad \text{IV. (4)}$$

Onde:  $T$  = temperatura (°K),  
 Para  $T = 25^\circ\text{C} \rightarrow KD = 1,167 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-1}$

$$\ln \left( \frac{A}{A_0} \right) = - KD t \quad \text{IV. (5)}$$

Onde:  $A$  = atividade enzimática no tempo  $t$ ,  
 $A_0$  = atividade enzimática inicial,  
 Para o  $t_{1/2}$ ,  $A = A_0/2$  portanto:

$$t_{1/2} = - \frac{\ln(1/2)}{KD} \quad \text{IV. (6)}$$

$$t_{1/2} = 59395 \text{ h} = 2000 \text{ dias.}$$

Conclui-se que a temperatura de 25°C não exerce influência significativa na perda de atividade da dextransacarase, portanto a enzima apresenta ótima estabilidade.

Levando em conta as considerações feitas e de acordo com as equações II.(3), IV.(1) e IV.(2), foi feito o balanço de massa no estado transiente para os estágios I (dessorção e reação enzimática) e II (adsorção) do reator proposto (FIGURA IV.9).

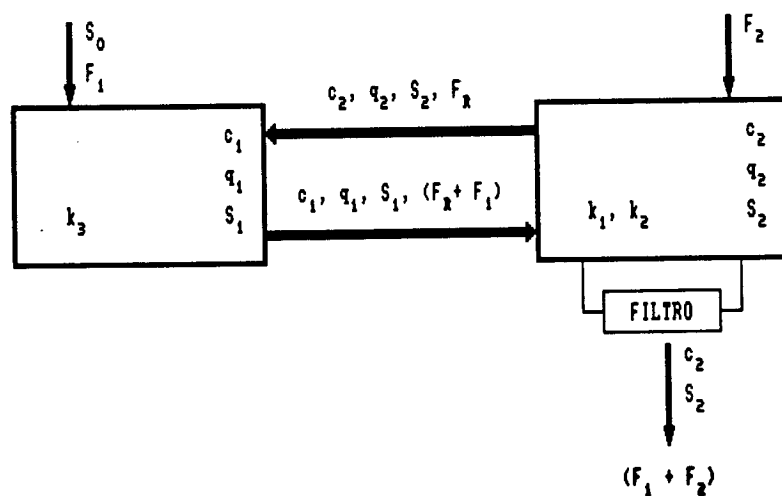


FIGURA IV.9 - Reator indicando os fluxos.

Obteve-se então 6 equações para a modelagem do sistema, das quais 4 são para a enzima: 2 em fase líquida ( $c$ ), 2 em fase sólida ( $q$ ) e 2 são para o substrato ( $S$ ). Rearranjando

e fazendo-se:

$$\tau_1 = \frac{V_1}{F_1} \quad \tau_2 = \frac{V_2}{F_1} \quad \psi = \frac{F_1}{F_1} \quad \gamma = \frac{F_1}{F_2} \quad \text{IV. (7)}$$

obtem-se:

$$\frac{dc_1}{dt} = \frac{\psi e (c_2 - c_1)}{\tau_1} - \frac{c_1}{\tau_1} + \frac{k_3 q_1 (1-e)}{e} \quad \text{IV. (8)}$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{\psi e (q_2 - q_1)}{\tau_1} - \frac{q_1}{\tau_1} - k_3 q_1 \quad \text{IV. (9)}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{\psi e (S_2 - S_1)}{\tau_1} + \frac{(S_o - S_1)}{\tau_1} - \frac{V_{\max} S_1}{K_m + S_1} \quad \text{IV. (10)}$$

$$\frac{dc_2}{dt} = \frac{\psi e (c_1 - c_2)}{\tau_2} + \frac{(c_1 - c_2)}{\tau_2} - \frac{c_2}{\gamma \tau_2} + (k_2 q_2 - k_1 c_2 (q_m - q_2)) \frac{(1-e)}{e} \quad \text{IV. (11)}$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{\psi e (q_1 - q_2)}{\tau_2} + \frac{q_1}{\tau_2} + (k_1 c_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2) \quad \text{IV. (12)}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{\psi e (S_1 - S_2)}{\tau_2} + \frac{(S_1 - S_2)}{\tau_2} - \frac{S_2}{\gamma \tau_2} - \frac{V_{\max} S_2}{K_m + S_2} \quad \text{IV. (13)}$$

Onde:

$c_1$	= conc. de enzima livre no estágio (I)	(g.l <sup>-1</sup> )
$c_2$	= conc. de enzima livre no estágio (II)	(g.l <sup>-1</sup> )
$q_1$	= conc. de enzima adsorvida no estágio (I)	(g.l <sup>-1</sup> res.)
$q_2$	= conc. de enzima adsorvida no estágio (II)	(g.l <sup>-1</sup> res.)
$q_m$	= capacidade máxima de adsorção da resina	(g.l <sup>-1</sup> res.)
$S_1$	= concentração de substrato no estágio (I)	(g.l <sup>-1</sup> )
$S_2$	= concentração de substrato no estágio (II)	(g.l <sup>-1</sup> )
$S_0$	= conc. de substrato na alimentação do estágio (I)	(g.l <sup>-1</sup> )
$k_1$	= constante cinética da enzima na adsorção	(l.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
$k_2$	= constante cinética da enzima na adsorção	(h <sup>-1</sup> )
$k_3$	= constante cinética da enzima na dessorção	(h <sup>-1</sup> )
$K_m$	= constante de Michaelis-Menten	(g.l <sup>-1</sup> )
$V_{max}$	= velocidade máxima que a reação pode atingir	(g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )

O sistema de equações apresentado foi numericamente integrado utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª ordem (Anexo B), onde se encontra também o desenvolvimento completo das equações do balanço de massa. As condições iniciais para  $t=0$  foram:

$$\begin{aligned}c_1 &= C_0; \\q_1 &= 0; \\S_1 &= S_0; \\c_2 &= 0; \\q_2 &= 0 \text{ e} \\S_2 &= 0\end{aligned}$$

### 2.3- SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA

Esta etapa foi realizada visando um estudo do comportamento geral do sistema proposto. Foram feitas algumas simulações iniciais para testar o modelo matemático descrito e especificar as variáveis operacionais. Em seguida foram feitas 16 simulações perturbando o sistema dentro de limites exequíveis e foi feita uma análise dos resultados obtidos, buscando correlações entre as variáveis, tendo em vista um futuro trabalho para otimização do processo de forma a alcançar valores ótimos de produtividade e rendimento.

### 2.3.1- DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS

De acordo com resultados obtidos nas simulações iniciais e em trabalho publicado (RODRIGUES, 1993) as variáveis operacionais do processo são: concentração inicial de enzima ( $C_0$ ), concentração de substrato na alimentação do estágio I ( $S_0$ ), vazão de alimentação no estágio I ( $F_1$ ), vazão de tampão no estágio II ( $F_2$ ), vazão de reciclo ( $F_r$ ) e porosidade do leito ( $\epsilon$ ). As simulações foram feitas com mudanças nestas variáveis dentro das limitações operacionais, o volume do reator foi mantido constante (1 litro) e as vazões  $F_1$ ,  $F_2$ , e  $F_r$  foram englobadas em um parâmetro adimensional  $\phi = F_r / (F_1 + F_2)$ . De acordo com a TABELA IV.6, na simulação 1 tem-se:  $\phi=0,05$ ;  $\epsilon=0,5$ ;  $C_0=0,3$  g/l ;  $S_0=25$  g/l, e assim por diante para as demais simulações.

### 2.3.2- ANÁLISE DAS SIMULAÇÕES

Os resultados das simulações descritas na TABELA IV.6 estão apresentados no Anexo C, assumindo comportamento semelhante ao obtido na simulação 1 mostrado na FIGURA IV.10. Conforme pode ser observado nas FIGURAS C.1 a C.36 tem-se um sistema transiente que após uma fase inicial, de aproximadamente 30 horas, atinge uma fase denominada pseudo-estacionária. O estado estacionário pleno não ocorre devido à perda de enzima durante o processo, o que pode ser observado na FIGURA IV.10.c, existindo uma perda praticamente linear da enzima com o tempo de operação, assim como um acréscimo contínuo da fração de substrato não convertido ( $S_2/S_0$ ).



TABELA IV.6 - Condições dos parâmetros  $\phi$ ,  $\epsilon$ ,  $C_0$  (g/l) e  $S_0$  (g/l) usados nas 16 simulações.

EXP.	$\phi$	$\epsilon$	$C_0$	$S_0$
1	0,05	0,5	0,3	25
2	0,1	0,5	0,3	50
3	0,15	0,5	0,3	100
4	0,2	0,6	0,6	150
5	0,05	0,6	0,6	25
6	0,1	0,6	0,6	50
7	0,15	0,6	0,6	100
8	0,2	0,6	0,6	150
9	0,05	0,7	1,338	25
10	0,1	0,7	1,338	50
11	0,15	0,7	1,338	100
12	0,2	0,7	1,338	150
13	0,05	0,8	2,0	25
14	0,1	0,8	2,0	50
15	0,15	0,8	2,0	100
16	0,2	0,8	2,0	150

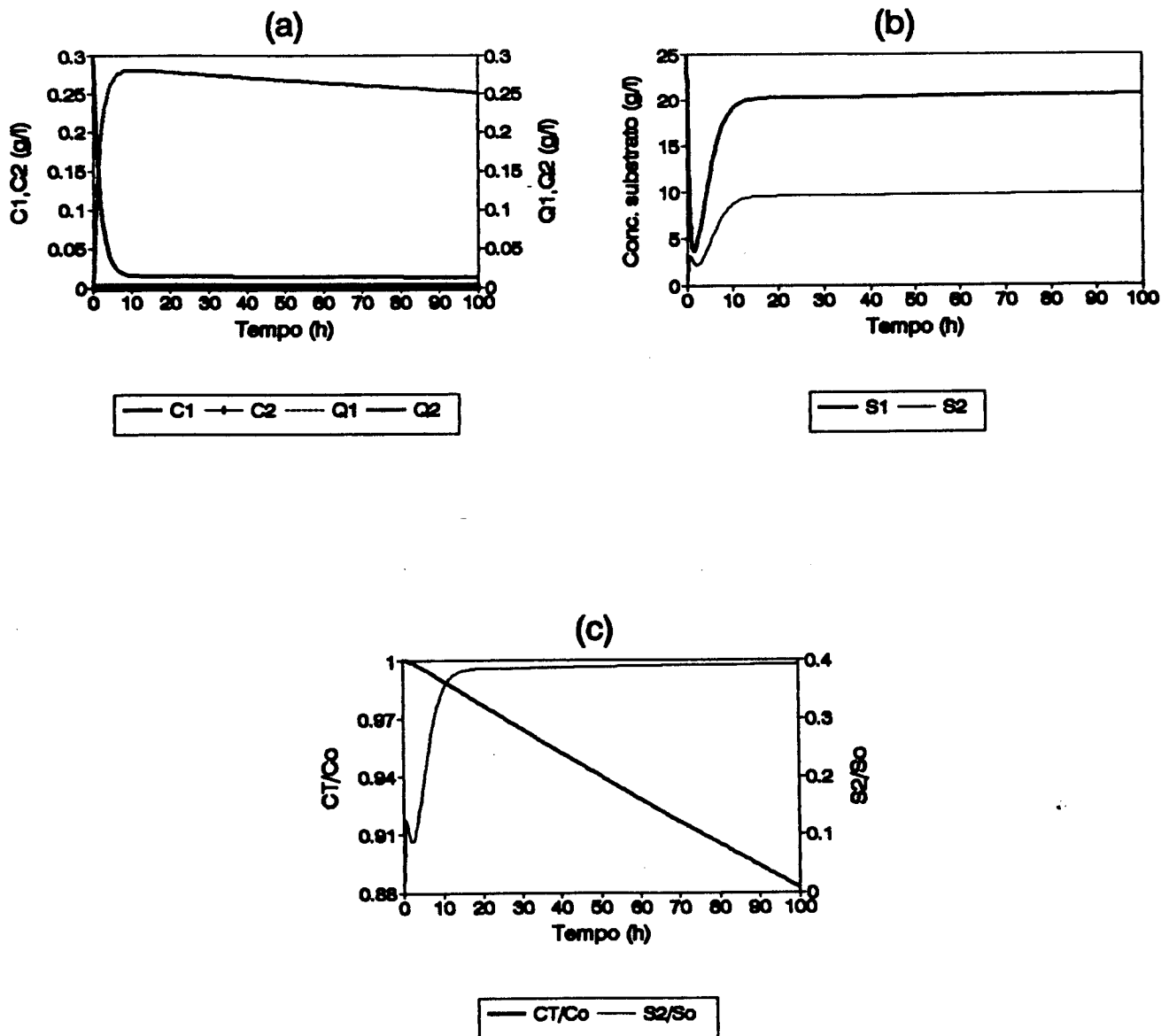


FIGURA IV.10 - Resultados obtidos na simulação 1. (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração de enzima no sistema e de substrato no II estágio. ( $C_0=0,3$  g/l,  $S_0=25$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,05$ ).

Para uma análise da influência de  $C_0$ ,  $S_0$ ,  $\epsilon$  e  $\phi$  na concentração de enzima ( $CT/C_0$ ) presente nos reatores e de substrato não convertido ( $S_2/S_0$ ) foram feitos, de acordo com os resultados obtidos nas simulações, os gráficos mostrados nas FIGURAS IV.11 e IV.12 (escala arbitrária para os valores de  $C_0$ ).

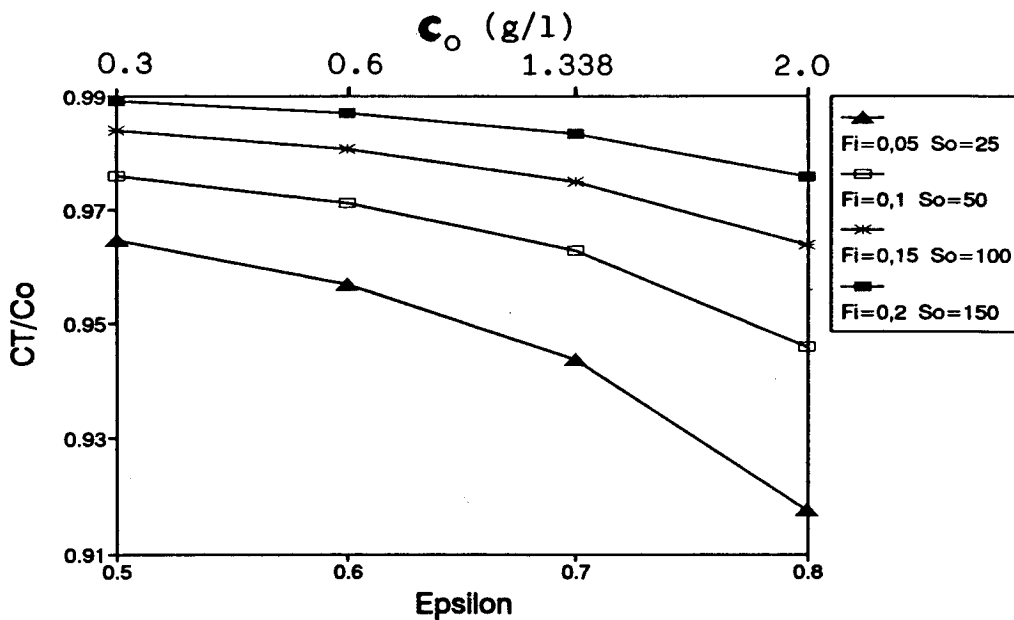


FIGURA IV.11.a - Gráfico de  $CT/C_0$  após atingir estado pseudo-estacionário (30 h) em função de  $\epsilon$  e  $C_0$  (g/l).

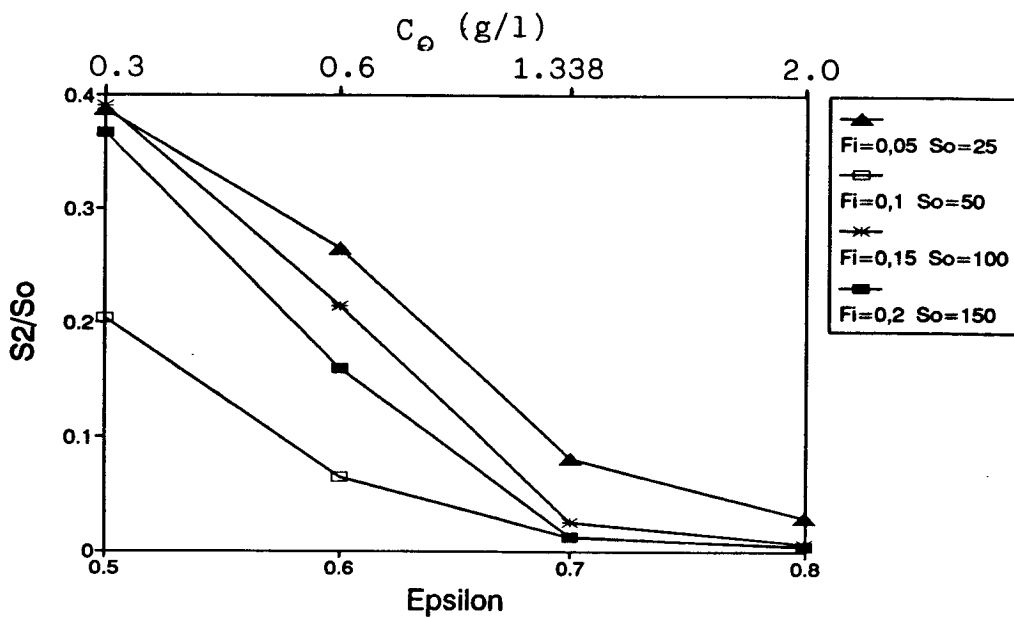


FIGURA IV.11.b. - Gráfico de  $S_2/S_0$  após atingir estado pseudo-estacionário (30 h) em função de  $\epsilon$  e  $C_0$  (g/l).

Os gráficos mostrados nas FIGURAS IV.11.a e IV.11.b apresentam o mesmo valor de  $S_0$  e  $\phi$  para cada curva. Nota-se que o aumento de  $\epsilon$  (diminuição da quantidade de resina) e  $C_0$  é prejudicial à retenção de enzima (FIGURA IV.11.a) e benéfica em relação a fração de substrato não convertida (FIGURA IV.11.b). Por outro lado, o aumento de  $\phi$  e  $S_0$  é benéfico em ambos os casos. Portanto, pode-se inferir que mantendo um  $\phi$  relativamente alto pode-se trabalhar com teores de sólidos não muito elevados, o que é recomendável para uma melhor hidrodinâmica do sistema.  $C_0$  deve ser preferencialmente alto para evitar perda de substrato. A variável  $S_0$  não parece ter grande influência desde que os outros parâmetros sejam bem dimensionados.

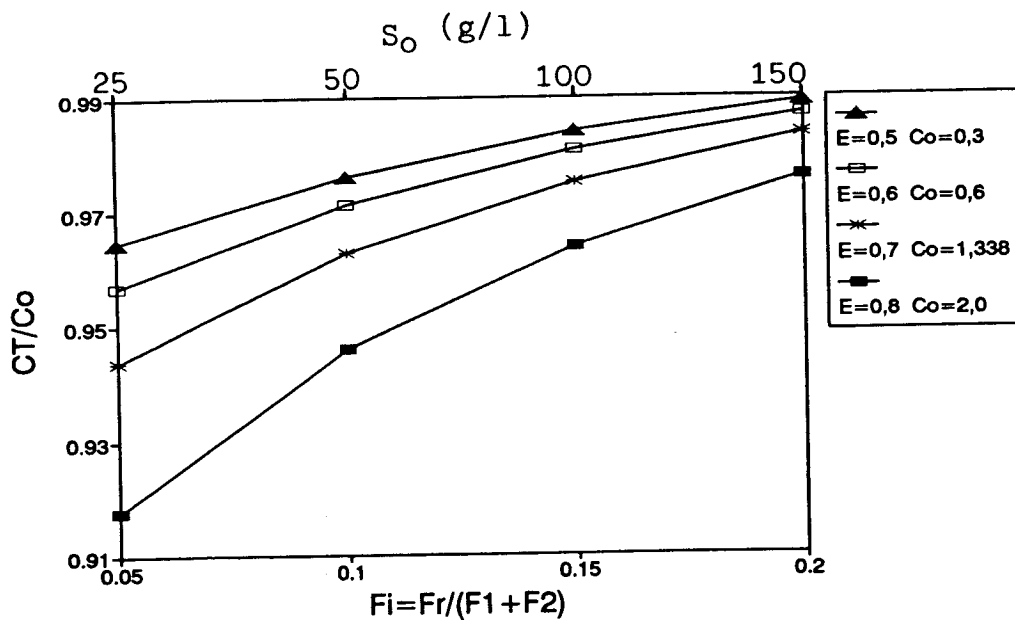


FIGURA IV.12.a - Gráfico de  $CT/C_0$  após atingir estado pseudo-estacionário (30 h) em função de  $\phi$  e  $S_0$  (g/l).

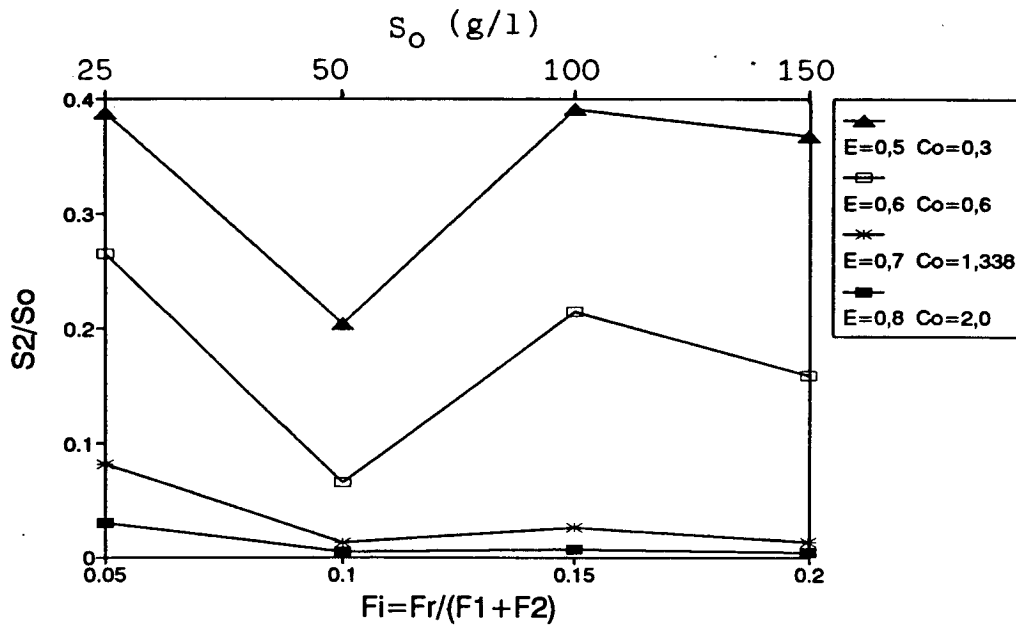


FIGURA IV.12.b - Gráfico de  $S_2/S_0$  após atingir estado pseudo-estacionário (30 h) em função de  $\phi$  e  $S_0$  (g/l).

Os gráficos mostrados nas FIGURAS IV.12.a e IV.12.b (escala arbitrária para os valores de  $S_0$ ) apresentam o mesmo valor de  $C_0$  e  $\epsilon$  para cada curva. A análise destas figuras vêm confirmar o que foi dito no parágrafo anterior a respeito dos efeitos das variáveis  $\epsilon$ ,  $\phi$ ,  $C_0$  e  $S_0$  no comportamento geral do sistema.

Verifica-se por outro lado, que a perda de enzima e de substrato no efluente varia aproximadamente de forma linear com o tempo (FIGURA IV.10.c). Assim pode-se representar as perdas da seguinte forma:

$$\frac{CT}{C_0} = - K_c t + 1 \quad \text{IV. (14)}$$

$$\frac{C_o - CT}{C_o} = K_c t \quad \text{IV. (15)}$$

$$\frac{S_2}{S_o} = K_s t \quad \text{IV. (16)}$$

Portanto as constantes  $K_c$  e  $K_s$  podem ser interpretadas como as constantes que se relacionam com as perdas de enzima e substrato respectivamente, e quanto maior os seus valores, maiores serão as perdas. Desta forma, seria interessante conhecer os parâmetros que influenciam estas constantes e tentar equacioná-los.

Os valores de  $K_c$  e  $K_s$  obtidos nas simulações estão apresentados nas TABELAS IV.7 e IV.8.

Verifica-se que o menor valor obtido para  $K_c$  foi na simulação 4 e o maior valor na simulação 13, observando-se ainda que os valores apresentam certa tendência, diminuindo à medida que  $\phi$  e  $S_o$  aumentam e aumentando à medida que  $\epsilon$  e  $C_o$  aumentam. Esta tendência pode ser notada claramente nas FIGURAS IV.13.a e IV.13.b onde estão mostrados respectivamente, os gráficos dos valores de  $K_c$  em função de  $\epsilon$  e  $C_o$  (g/l) e de  $K_c$  em função de  $\phi$  e  $S_o$  (g/l).

**TABELA IV.7 - Valores obtidos para  $K_c$ .**

Simul.	$K_c \times 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$r^2 \text{ (coef. correl.)}$
1	1,196	0,9998
2	0,848	0,9999
3	0,573	0,9999
4	0,399	0,9998
5	1,46	0,9997
6	1,03	0,9998
7	0,7	0,9999
8	0,48	0,9997
9	1,89	0,9994
10	1,33	0,9997
11	0,91	0,9998
12	0,63	0,9997
13	2,69	0,9986
14	1,91	0,9995
15	1,31	0,9997
16	0,92	0,9997

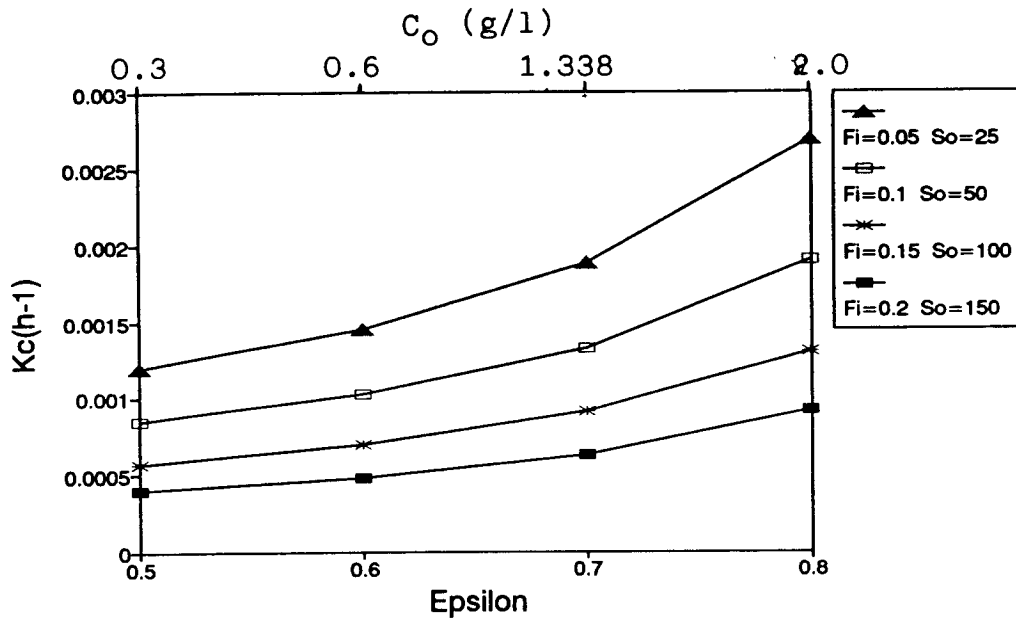


FIGURA IV.13.a - Gráfico dos valores de  $K_c$  em função de  $\epsilon$  e  $C_o$  (escala arbitrária - g/l).

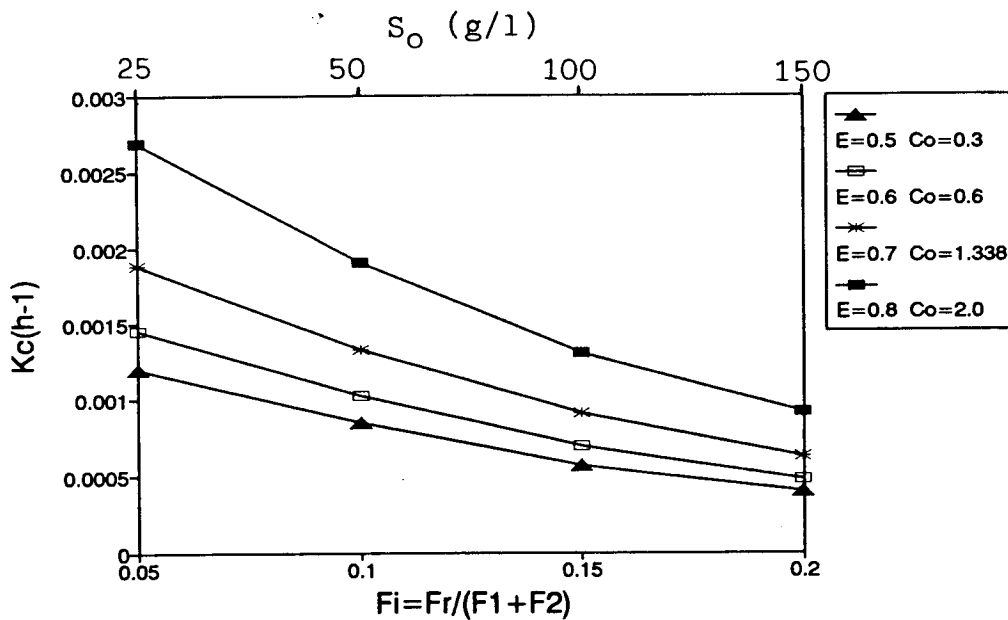


FIGURA IV.13.b - Gráfico dos valores de  $K_c$  em função de  $\phi$  e  $S_o$  (escala arbitrária - g/l).

De acordo com as FIGURAS IV.13.a e IV.13.b percebe-se que a perda de enzima é inversamente proporcional à taxa de reciclo no sistema (representada por  $\phi = F_r / (F_1 + F_2)$ ) e diretamente proporcional à  $\epsilon$  (porosidade) que indica o volume de resina



presente no reator.

TABELA IV.8 - Valores obtidos para  $K_s$ .

Simul	$K_s \times 10^5 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$r^2 \text{ (coef. correl.)}$
1	8,95	0,9999
2	10,2	0,9985
3	6,12	0,9989
4	5,15	0,9987
5	2,52	0,9999
6	12,7	0,9999
7	17,6	0,9999
8	14,2	0,9992
9	27,7	0,9997
10	2,78	0,9998
11	5,67	0,9994
12	1,98	0,9999
13	18,1	0,9990
14	1,67	0,9996
15	2,09	0,9997
16	0,719	0,9999

Na TABELA IV.8 pode ser visto que o menor valor obtido para  $K_s$  foi na simulação 16 e o maior valor na simulação 9. No entanto, as FIGURAS IV.14.a e IV.14.b mostram que os valores de  $K_s$  não apresentam uma tendência lógica nítida como a encontrada para  $K_c$ . Nota-se que a taxa de reciclo (representada por  $\phi = F_r / (F_1 + F_2)$ ) exerce maior influência na perda de substrato e que há uma certa tendência à diminuição de  $K_s$  com o aumento de  $\epsilon$  e  $C_0$ , embora este efeito deva-se muito mais ao aumento de  $C_0$  do que ao de  $\epsilon$ .

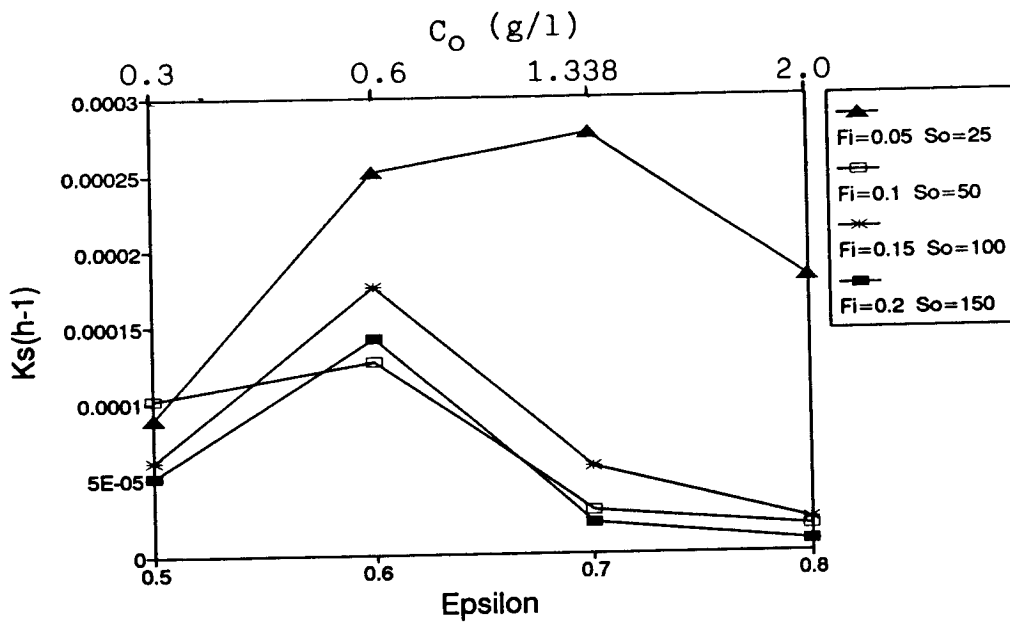


FIGURA IV.14.a - Gráfico dos valores de  $K_s$  em função de  $\epsilon$  e  $C_o$  (escala arbitrária - g/l)

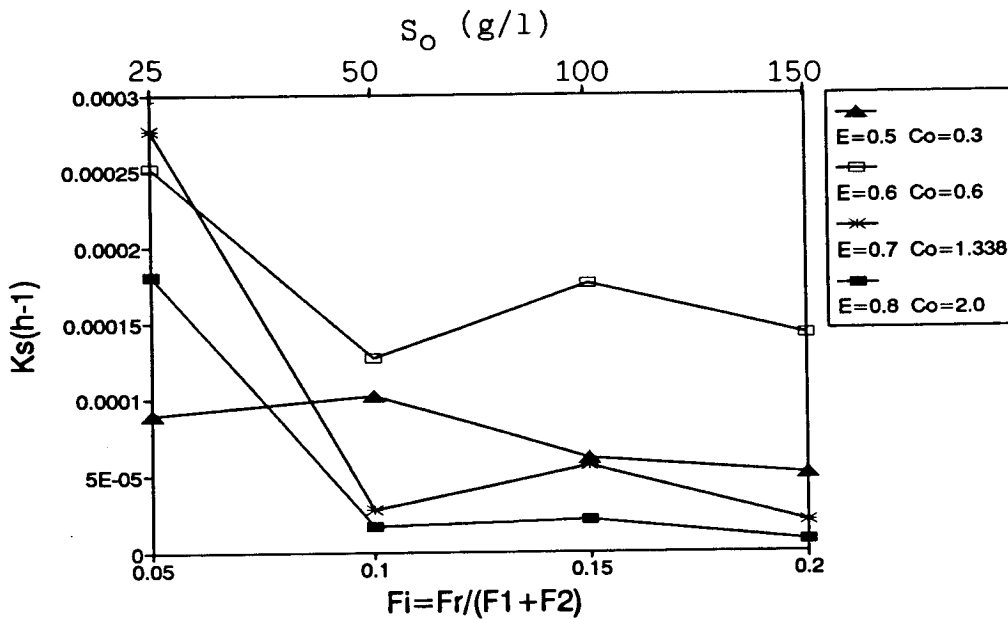


FIGURA IV.14.b - Gráfico dos valores de  $K_s$  em função de  $\phi$  e  $S_o$  (escala arbitrária - g/l).

Com o objetivo de encontrar correlações das variáveis operacionais para otimização do processo, estas foram reunidas em dois grupos adimensionais, um caracterizando o sistema hidrodinâmico e outro relacionando as constantes cinéticas da enzima, a concentração de alimentação e a velocidade de perda da

enzima.

Para a caracterização hidrodinâmica do sistema definiu-se a relação entre o tempo de residência hidráulico e o tempo de residência de sólidos em cada reator expressos pelas equações IV.17 e IV.19 a seguir:

$\tau_s$  = Tempo de residência dos sólidos em cada reator  
 $\tau_h$  = Tempo de residência hidráulico

$$\tau_s = \frac{V_t}{F_r(1-\epsilon)} = \frac{V_1(1+\frac{(1-\epsilon)}{\epsilon})}{F_r(1-\epsilon)} \quad \text{IV. (16)}$$

$$\tau_s = \frac{V_1}{F_r\epsilon(1-\epsilon)} \quad \text{IV. (17)}$$

$$\tau_h = \frac{V_1}{F_1 + F_r\epsilon} + \frac{V_1}{F_1 + F_2 + F_r\epsilon} \quad \text{IV. (18)}$$

$$\tau_h = V_1 \left( \frac{1}{F_1 + F_r\epsilon} + \frac{1}{F_1 + F_2 + F_r\epsilon} \right) \quad \text{IV. (19)}$$

Onde:

$F_r$  = Vazão de reciclo ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$F_1$  = Vazão de alimentação no estágio (I) ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$F_2$  = Vazão do tampão para adsorção no estágio (II) ( $\text{g.l}^{-1}$ )

$V_t$  = Volume total de cada reator ( $V_t = V_s + V_l$ ) (l)

$V_l$  = Volume de líquido em cada reator (l)

$V_s$  = Volume de sólidos em cada reator (l)

$\epsilon$  = Porosidade

Obtendo-se então:

$$\tau_{s/h} = \frac{\tau_s}{\tau_h} = \frac{(F_1 + F_r \epsilon) (F_1 + F_2 + F_r \epsilon)}{F_r \epsilon (1 - \epsilon) (F_2 + 2F_1 + 2F_r \epsilon)} \quad \text{IV. (20)}$$

Para achar uma correlação de  $K_c$  (taxa de perda da enzima) em função de  $\epsilon$  e dos adimensionais  $\tau_{s/h}$  e  $C_o/K_d$ , seus valores foram graficados de diferentes formas. A que melhor correlação forneceu está representada na FIGURA IV.15.

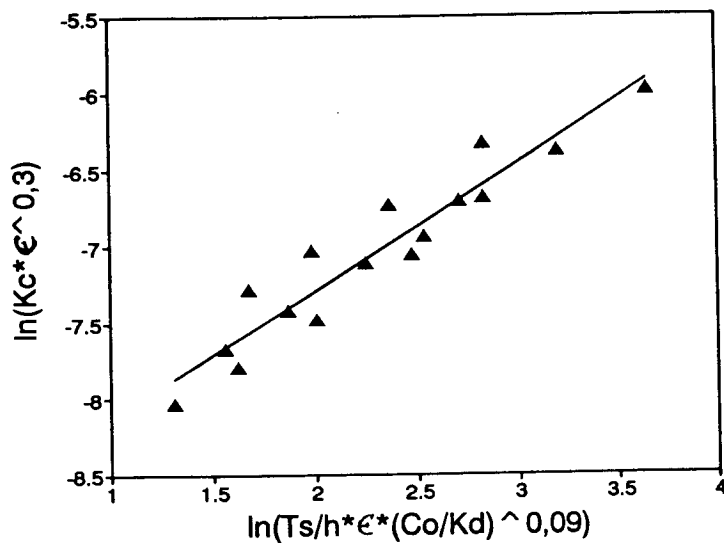


FIGURA IV.15 - Gráfico de  $\ln(K_c \cdot \epsilon^{0,3})$  versus  $\ln(\tau_{s/h} \cdot \epsilon \cdot (C_o/K_d)^{0,09})$ .

Com um coeficiente de correlação linear igual a 0,9057 tem-se então:

$$K_c = 1,6768 \cdot 10^{-4} \cdot \tau_{s/h}^{0,834} \cdot \epsilon^{0,534} \cdot \left(\frac{C_o}{K_d}\right)^{0,075} \quad \text{IV. (21)}$$

A equação IV.(21) é útil para critérios de otimização, pois ela permite minimizar  $K_c$  para diversas situações de processo. Uma análise desta equação objetivando uma menor perda de enzima indica os fatores que contribuem para o decréscimo de

$K_c$ : diminuição de  $\epsilon$  (porosidade), o que acarreta uma maior quantidade de resina no processo, e diminuição da relação entre os tempos de residência ( $\tau_{s/h}$ ) que pode ser alcançada com uma diminuição do tempo de residência dos sólidos (aumento de  $F_r$ ) ou por um aumento no tempo de residência hidráulico (diminuição de  $F_1$  e/ou  $F_2$ ).

Por outro lado, considerando a perda de substrato ( $S_2$ ) no efluente, é desejável que esta seja igualmente mínima. Isto pode ser conseguido com uma conduta apropriada em termos de escolha das variáveis de operação, que deverá implicar na máxima transformação do substrato e mínima perda de enzima, pois a perda de enzima significa automaticamente em perda de substrato. Assim sendo,  $S_2$  e  $K_c$  devem ser mínimos para que se obtenha o máximo do processo.

Para a caracterização do sistema relacionando as constantes cinéticas da enzima, a concentração de substrato na alimentação e a velocidade de perda da enzima definiu-se segundo a equação IV.(22) o número adimensional X.

$$X = \frac{K_c K_m^2}{V_{\max} S_o} \quad \text{IV. (22)}$$

Onde:

$K_m$  = constante de Michaelis-Menten (g/l)

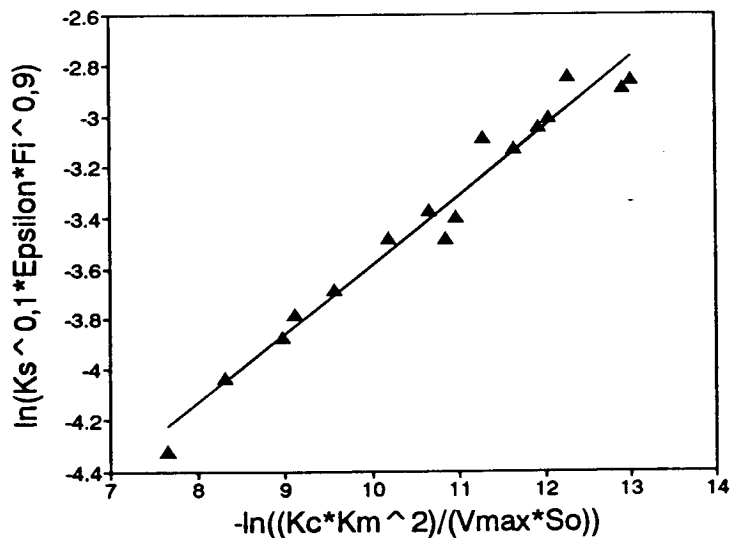
$V_{\max}$  =  $K C_o$  = velocidade máxima que a reação pode atingir (g/l.h)

$S_o$  = conc. de substrato na alimentação do estágio (I) (g/l)

$K_c$  = taxa da perda de enzima com o tempo ( $h^{-1}$ )

Assim como foi determinada uma correlação para  $K_c$ , para achar uma correlação de  $K_s$  (taxa de perda de substrato) em função do adimensional X, número que relaciona as constantes cinéticas da enzima, a concentração de substrato na alimentação e a taxa de perda da enzima, foram graficados os valores de  $K_s$  contra X, em diferentes formas. A que melhor correlação forneceu está

representada na FIGURA IV.(16).



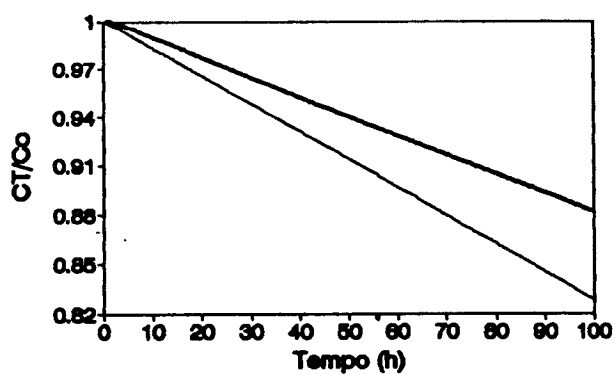
**FIGURA IV.16** - Gráfico de  $\ln(K_s^{0,1} \cdot \epsilon \cdot \phi^{0,9})$  versus  $-\ln(X)$

Com um coeficiente de correlação igual a 0,9695 tem-se então à partir da FIGURA IV.(16):

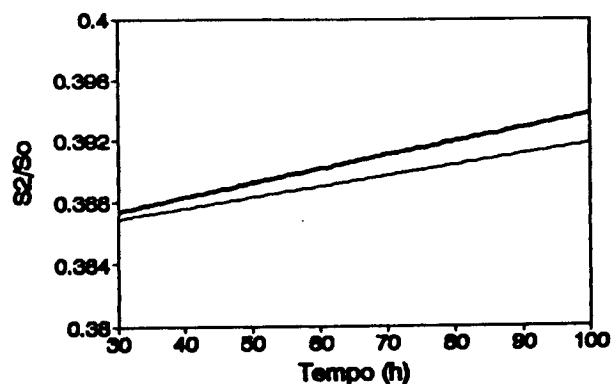
$$K_s = \frac{3,7948 \cdot 10^{-28}}{e^{10} \phi^9} \left( \frac{V_{max} S_o}{K_c K_m^2} \right)^{2,7} \quad \text{IV. (23)}$$

Observa-se através dos gráficos apresentados nas FIGURAS IV.11 a IV.14 e das equações IV.(21) e IV.(23) que o aumento de  $\phi = F_r / (F_1 + F_2)$  é favorável à retenção de enzima e conversão de substrato no sistema. Por outro lado um aumento de  $\epsilon$  é prejudicial à retenção de enzima e favorável à conversão de substrato.

Para verificar a validade das correlações obtidas para  $K_c$  e  $K_s$  (equações IV.21 e IV.23) foi feita uma comparação entre os perfis de concentração de enzima ( $C_T/C_o$ ) e substrato no efluente ( $S_2/S_o$ ), calculados à partir destas correlações, com os perfis obtidos nas simulações para algumas situações, apresentadas nas FIGURAS IV.17 a IV.20.

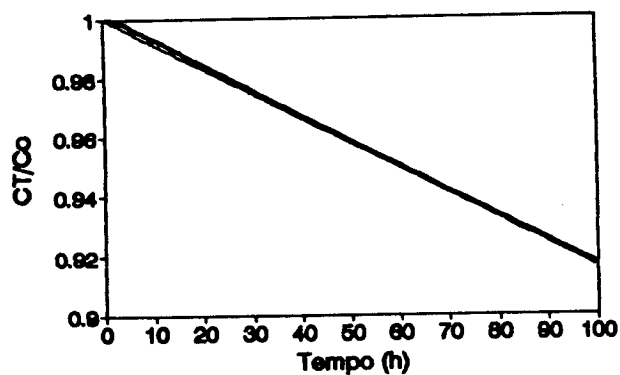


— CT/Co(simul.) — CT/Co(calc.)

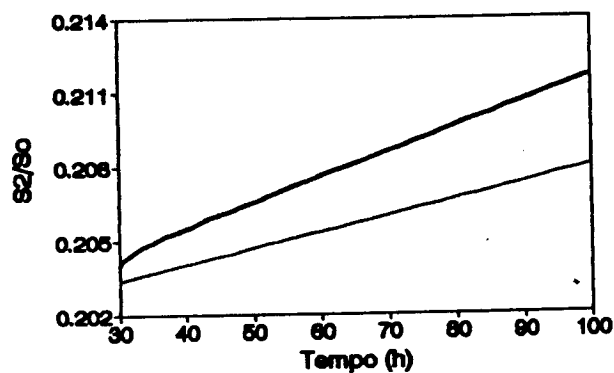


— S2/So(simul.) — S2/So(calc.)

FIGURA IV.17 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 1:  $C_0=0,3$  g/l,  $S_0=25$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,05$ .

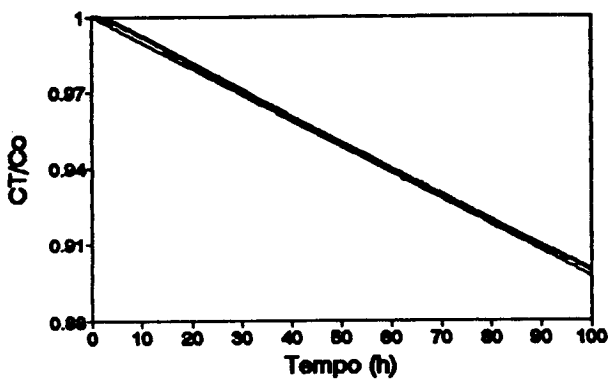


— CT/Co (simul.) — CT/Co (calc.)

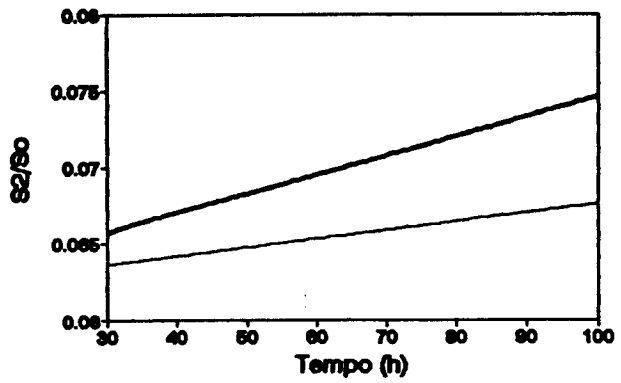


— S2/So (simul.) — S2/So (calc.)

FIGURA IV.18 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 2:  $C_0=0,3$  g/l,  $S_0=50$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,1$ .

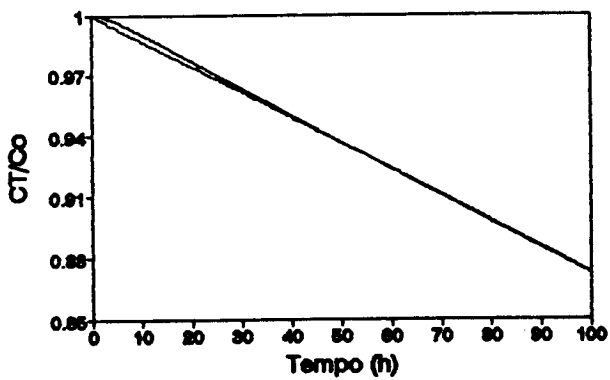


— CT/Co (simul.) — CT/Co (calc.)

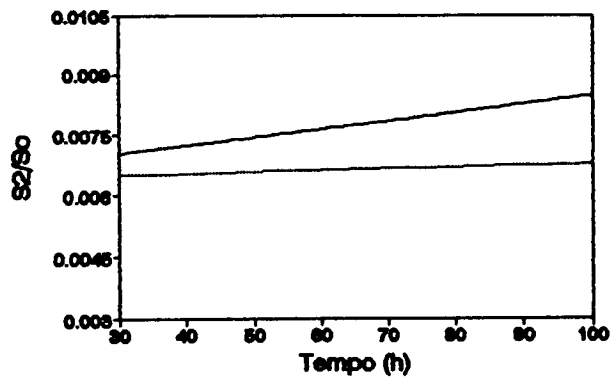


— S2/So (simul.) — S2/So (calc.)

FIGURA IV.19 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 6:  $C_0=0,6$  g/l,  $S_0=50$  g/l,  $\epsilon=0,6$  e  $\phi=0,1$ .



— CT/Co (simul.) — CT/Co (calc.)



— S2/So (simul.) — S2/So (calc.)

FIGURA IV.20 - Comparação entre os resultados obtidos na simulação 15:  $C_0=2,0$  g/l,  $S_0=100$  g/l,  $\epsilon=0,8$  e  $\phi=0,15$ .



Pode-se verificar que os perfis obtidos através das correlações de  $K_c$  e  $K_s$  se aproximam dos obtidos nas simulações, embora exista algum desvio. Observa-se que através das correlações encontradas prevê-se uma maior perda de enzima e uma menor perda de substrato no efluente do que o previsto pelas simulações.

Acredita-se que as correlações obtidas possam ser úteis como instrumento para otimização do processo.

## V. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos na parte experimental confirmam que a relação de equilíbrio descrita pela equação II.(1) pode ser usada para descrever o processo de adsorção em cromatografia por troca iônica.

- Constatou-se a possibilidade de reciclo da enzima, existindo no entanto uma perda contínua da mesma não permitindo o sistema atingir um estado estacionário pleno, e sim, após uma fase inicial de aproximadamente 30 h atingir uma fase denominada pseudo-estacionária. Em decorrência dessa perda de enzima há também uma perda crescente de substrato no efluente. Desta forma, para viabilizar o processo torna-se necessário minimizar essas perdas. Com esse intuito foram definidas as constantes  $K_c$  e  $K_s$  relacionadas com as perdas de enzima e substrato respectivamente, para as quais chegou-se à correlações em função das variáveis do processo, que podem ser aplicadas em estudos de otimização.

- Verificou-se que dentro dos limites operacionais do processo existem variáveis que contribuem para minimizar essas perdas: pela equação IV.(21), a diminuição da relação entre os tempos de residência ( $\tau_{s/h}$ ), que pode ser alcançada com uma diminuição no tempo de residência dos sólidos (aumento de  $F_r$ ) ou por um aumento no tempo de residência hidráulico (diminuição de  $F_1$  e/ou  $F_2$  e pela equação IV.(23), o aumento de  $\phi = F_r / (F_1 + F_2)$  que também pode ser conseguido da mesma forma anterior.

- O processo indicado para produção de dextrana, baseado no processo CARE (Continuous Affinity-Recycle Extraction) proporciona uma opção atrativa oferecendo uma alternativa aos processos convencionais. Pelas suas próprias características este processo tem potencialidade para ser aplicado na obtenção de outros produtos onde a imobilização e/ou recuperação da enzima seja tecnicamente ou economicamente inviável.

## VI. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Aplicação de um planejamento experimental melhorado, por exemplo um planejamento experimental fatorial, para a execução das simulações, sendo feito posteriormente um refinamento das correlações para  $K_c$  e  $K_s$ .
- Estudo de otimização do processo.
- Montar o sistema proposto a nível de laboratório.
- Aplicação deste sistema duplo estágio para outros casos onde a imobilização da enzima seja inviável tecnicamente e/ou economicamente, tais como: hidrólise de celulose e hidrólise de pectina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - AFEYAN, N. B.; GORDON, N. F.; COONEY, C. L. - Mathematical modelling of the continuous affinity-recycle extraction purification technique. J. Chromatography 478: 1-19, 1989.
- 02 - ALSOP, R. M. - Industrial production of dextran. Progress in Industrial Microbiology (Microbial Polysaccharides) 18: 1-44, 1983.
- 03 - ARVE, B. H. & LIAPIS, A. I. - Modelling and analysis of biospecific adsorption in a finite bath. Aiche Journal 33(2): 179-91, feb. 1987.
- 04 - ARVE, B. H. & LIAPIS, A. I. - Modelling and analysis of elution stage of biospecific adsorption in finite bath. Biotech. Bioeng. 31: 240-49, 1988.
- 05 - ASPINALL, G. O. - Classification of polysaccharides. The Polysaccharides. Academic Press, N.Y., 1983. cap. 2, p. 1-9.
- 06 - AURIOL, D. - Production et purification en continu de la dextrane saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Toulouse, 1985. Tese (Doutor em Engenharia) - INSA - França.
- 07 - BARKER, P. E.; ZAFAR, I.; ALSOP, L. M. - Separations for biotechnology. Ed by Verral, M. S. & Hudson, M.J., Ellis Horwood Series in Biochemistry and Biotechnology, Chichester, U.K., 1987.
- 08 - BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. - Bioseparation - downstream processing for biotechnology. Adsorption. 1ª ed. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1988. cap. 6, p. 145-79.
- 09 - BUSSO, E. M. & RESNICK, L. - Anti-human immunodeficiency virus effects of dextran sulfate are strain dependent and synergistic or antagonistic when dextran sulfate is given in combination with dideoxynucleosides. Antimicrob. Ag. and

Chemoth. 34(10): 1991-95, 1990.

10 - BRAITHWAITE, A. & SMITH, F. J. - Chromatographic methods.  
4ª edição, 1985.

11 - CHASE, H. A. - Prediction of the performance of preparative  
affinity chromatography. J. Chromatography 297: 179-202, 1984a.

12 - CHASE, H. A. - Affinity separations utilising immobilised  
monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer.,  
Chem. Eng. Science 39: 1099-1125, 1984b.

13 - CHEN, Y. E. & KABOLI, H. - Purification and properties of  
dextranase. Scale up study on several enzymatic process  
for industrial application., ERI project, 1045, Eng. Res Inst.,  
Iowa State University, Ames, Iowa, Final Report, 1976.  
p. 136-62.

14 - COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. - Introdução a métodos  
cromatográficos. Campinas, ED. da UNICAMP, 4ª edição, 1990.

15- COWAN, G. H.; GOSLING, I. S.; SWEETENHAM, W. P. - Modelling  
for scale-up and optimisation of packed-bed columns in adsorption  
and chromatography., In: VERRALL, M. S. & HUDSON, M. J., ed.  
Separations for Biotechnology. Ellis Horwood Ltd., 1987. cap.  
10, p. 152-75.

16 - COWAN, G. H.; GOSLING, I. S.; LAWS, J.F.; SWEETENHAM, W. P.  
- Physical and mathematical modelling to aid scale-up of liquid  
chromatography. J. Chromatography 363: 37-56, 1986.

17 - DORFNER, K. - Ion exchangers properties and applications,  
Ed. by André Fé Coers

18 - EBERT, K. H. e SCHENK, G. - Mechanisms of biopolymer  
growth: the formation of dextran and levan., Adv. in Enzimol.  
30: 179 - 221, 1968.

- 19 - GORDON, N. F.; TSUJIMURA, H.; COONEY, C. L. - Optimization and simulation of continuous affinity-recycle extraction (care)., Bioseparation 1: 9-21, 1990.
- 20 - GOSLING, I. S.; COOK, D.; FRY, M. D. M. -The role of adsorption isotherms in the design of chromatographic separations for downstream processing., Chem. Eng. Res. Des. 67: 232-242, may 1989.
- 21 - HARRIS, E. L. V. Purification Strategy. In: HARRIS, E.L.V & ANGAL, S. Protein purification methods - A practical approach. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, IRL Press, 1989 p. 51-64.
- 22 - HARSA, S.; PYLE, D. L.; ZAROR, C. A. - Adsorption of polygalacturonase in CM-sephadex gels., In: PYLE, D. L., ed. Separations for biotechnology II. Elsevier, 1990.
- 23 - HEFTMANN, E. - J. chromatography, 1983., V. 22A, cap. 7.
- 24 - HEHRE, E. J. - Polysaccharide synthesis from disaccharides I dextransucrase, In: COLOWICK, S. P. & KAPLAN N.O., ed. Methods in Enzimology. Academic Press, New York, 1955. p. 178-84.
- 25 - HIMMELHOCH, S. R. - Chromatography of Proteins on ion-exchange adsorbents., Meth. Enzimol. 22: 273-286, 1971.
- 26 - JEANES, A. R. - Extracellular microbial polysaccharides new hidrocolloides of interest to the food industry., Food Technol. 28(5): 34-40, may, 1974.
- 27 - KABOLI, H. & REILLY, P. I. - Immobilization and properties of **Leuconostoc mesenteroides** dextransucrase., Biotech. Bioeng. 22(5): 1055-1069, 1980.
- 28 - KOCH, W. F. - Ion chromatography and the certification of standard reference materials., Journal of Chromatography Science 27: 418-421, 1989.

- 29 - KOEPEL, H. J.; TSUCHIYA, H. M. et al. - Enzymatic synthesis of dextran acceptor specificity and chain initiation., J. Biol. Chem. 200: 793-801, 1952.
- 30 - LAWYER, G. R.; KLINGEMAN, A.; WILLIAMS, T. - Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of **Leuconostoc mesenteroides**., Biotech. Bioeng. 21: 1121-1131, 1979.
- 31 - LIAPIS, A. I. - Modelling and analysis of bioespecific adsorption process; 32<sup>o</sup> IUPAC CONGRESS, Stockholm, Sweden, 2-7 aug. 1989.
- 32 - LIAPIS, A. I.; ANSPACH, B. et al. - Bioespecific adsorption of lysozyme onto monoclonal antibody ligand immobilized on nonporous silica particles, Biotech. Bioeng. 34: 467-477, 1989.
- 33 - LOPES, A. - Production, purification et immobilization de la dextran-saccharase de **Leuconostoc mesenteroides** B-512F. Toulouse, 1979. Tese (Doutor em Engenharia) n<sup>o</sup> 26 - INSA - França.
- 34 - MARTINEZ-ESPÍNDOLA, J. P. & LOPEZ-MUNGUÍA, C. A. - On the kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batch reactors., Biotechnol. Letters 7(7): 483-486, 1985.
- 35 - MILLER, A. W.; EKLUND, S. H.; ROBYT, J. F. - Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from **Leuconostoc mesenteroides** NRRL B-512F., Carbohyd. Res. 147: 119-133, 1986.
- 36 - MILLER, A. W. & ROBYT, J. F. - Activation and Inhibition of dextransucrase by calcium., Biochem. Biophys. Acta, 880(1): 32-39, 1986.
- 37 - MILLER, A. W. & ROBYT, J. F. - Stabilization of dextransucrase from **Leuconostoc mesenteroides** NRRL B-512F by nonionic detergents, polyethylene glycol an high molecular weight

- dextran., Biochem. Biophys. Acta 785(3): 89-96, 1984.
- 38 - MILLER, G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar., Anal. Chem. 31(3): 426-428, 1959.
- 39 - MONSAN, P. & LOPES, A. - On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase., Biotech. Bioeng. 23: 2027-2037, 1981.
- 40 - MURPHY, P. T. & WHISTLER, R. L. - Dextrans. In: WHISTLER, R. L. & BEMILLER, J. N. Industrial gums: polysaccharides and their derivatives. 2nd ed., Academic Press, N.Y., 1973. cap. 23, p. 513-42.
- 41 - NEELY, W. B. - Dextran: structure and synthesis., Adv. Carbohyd. Chem. 15: 341-369, 1960.
- 42 - NEELY, W. B. & NOTT, J. - Dextransucrase, an induced enzyme from **Leuconostoc mesenteroides**., Biochem. 1: 1186-1140, 1962.
- 43 - PAUL, F.; AURIOL, D.; ORIOL, E.; MONSAN, P. - Production and purification of dextransucrase from **Leuconostoc mesenteroides** NRRL B-512F., Enzyme Eng. 7: 267-270, 1984a.
- 44 - PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. - Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides, application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans., Carbohyd. Res. 149: 433-441, 1986.
- 45 - PAUL, F.; ORIOL, E.; WILLEMOT, R. M.; MONSAN, P. - Effect of maltose in the reaction of highly purified **Leuconostoc mesenteroides** B-512F dextransucrase: kinetic study and product characterization. Third European Congress on Biotechnology. p. 83-388, 1984b.
- 46 - PENNELL, R. D. & BARKER, P. E. - The production of the enzyme dextransucrase using unaerated continuous fermentations,



J. Chem. Tech. Biotechnol., 53: 21-27, 1992.

47 - PETERSON, E. A. & SOBER, H. A. - Chromatography of proteins I cellulose ion-exchange adsorbents., J. Amer. Chem. Soc. 78: 75-755, 1956.

48 - PHARMACIA - Ion Exchange Chromatography. Principles and methods., 1991.

49 - PUNGOR, E.; AFEYAN, N. B.; GORDON, N. F.; COONEY, C. L. Continuous affinity-recycle extraction: a novel protein separation technique, Biotechnology 5: 604-608, 1987.

50 - QUEIRÓZ, J. H. - Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Campinas, 1989. Tese (Mestre em Eng. de Alimentos) - Fac. Eng. Alim.- Universidade Estadual de Campinas.

51 - QUEIROZ, J. H. & MAUGERI, F. - Otimização da produção de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* à partir de melaço como fonte de carbono., Rev. Microbiol. 20(2): 150-156, 1989.

52 - RIBEIRO, E.J. & MAUGERI, F. - Influência da temperatura na atividade e estabilidade de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides*, Revista Brasileira de Microbiologia., (in press)

53 - ROBYT, J. F. - Mechanism of action of saccharide polymerisation and depolymerisation. Miami Beach, Academic Press, 1980. p. 43-45.

54 - ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, J. F. - The mechanism of dextransucrase action: direction of dextran biosynthesis., Arch. Biochem. Biophys. 165: 634-640, 1974.

55 - ROBYT, J. F. & WALSETH, T. F. - The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F Dextransucrase., Carbohyd. Res. 61: 443-445, 1978.

- 56 - RODRIGUES, M. I. - Contribuição ao estudo da utilização da enzima dextrana-sacarase na modificação de polissacarídeos. Campinas, 1989. Tese (Mestre em Eng. de Alimentos) - Fac. Eng. Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
- 57 - RODRIGUES, M. I.; FILHO, R. M.; MAUGERI, F. - Optimization of a process of enzyme purification by surface response analysis. *Food Control*, Vol.4, nº 3, 1993.
- 58- RODRIGUES, M. I.; ZAROR, C. A. et al. - Dynamic modelling simulation and control of continuous adsorption recycle extraction., Chem. Eng. Science 47(1): 263-269, 1992.
- 59 - SANDFORD, P. A. - Exocellular microbial polysaccharides., Adv. in carbohyd. chem. and biochem. 36: 265-313, 1979.
- 60 - SANDFORD, P. A. & BAIRD, J. - Industrial utilization of polysaccharides. The polysaccharides. Academic Press, N. Y., 1983. cap. 2, p. 412-90.
- 61 - SCOPES, R. K. - Protein purification - Principles and practice, 2ª edição, 1987. p. 73-181.
- 62 - SIDEBOTHAM, R. L. - Dextrans, Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 30: 371-444, 1974.
- 63 - SKIDMORE, G. L. & CHASE, H. A. - Multi-component adsorption of proteins to ion exchangers, *Sep. Biotechnol.* (Pap. Int. Symp.), *Dep. Chem. Eng., Univ. Cambridge, U.K.*, 2: 418-427, 1990.
- 64 - SUBOSA, P. F.; KIHARA, K. et al. - Ion chromatography of inorganic anions in brine samples, Journal of Chrom. Science 27: 680-684, nov. 1989.
- 65 - TARTER, J. G. - Eluent selection criteria for the simultaneous determination of anion and cations., Journal of Chrom. Science 27: 462-467, aug. 1989.

66 - TSUCHIYA, H. M.; KOEPESELL, H. J. et al. - The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by **Leuconostoc mesenteroides.**, J. Bacteriol. 64: 521-527, 1952.

67 - YAMAMOTO, S.; NAKANISHI, K. et al. - Ion exchange chromatography of proteins - Prediction of elution curves and operating conditions I. Theoretical considerations, Biotech. Bioeng. 25: 1465-1483, 1983.

**ANEXO A**

**FLUXOGRAMA DO PROGRAMA PARA DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES  
CINÉTICAS  $K_1$  E  $K_2$  .**

Valores encontrados para  $K_d$  e  $q_m$ :

$$K_d = 4,975 \cdot 10^{-1} \text{ g enzima/l} = K_2/K_1$$

$$q_m = 519,751 \text{ g de enzima/l}$$

Com relação ao processo de adsorção, para a enzima adsorvida tem-se a equação II.(3) descrita a seguir:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c (q_m - q) - k_2 q \quad \text{A. (1)}$$

Com relação às unidades tem-se:

$$q[\text{mg/ml}_{res.}] = \frac{(C_o - c)}{V_{res.}} \frac{[\text{mg/ml}]}{[\text{ml}_{res.}]} \cdot 10 \text{ ml} \quad \text{A. (2)}$$

$$q[\text{mg/ml}_{res.}] = 10 \cdot \frac{(C_o - c)}{V_{res.}} \quad \text{A. (3)}$$

$$\frac{dq}{dt} = \frac{-10}{V_{res.}} \frac{dc}{dt} \quad \text{A. (4)}$$

E então, rearranjando a equação III.(4):

$$\frac{-10}{V_{res.}} \frac{dc}{dt} = k_1 c (q_m - (\frac{C_o - c}{V_{res.}}) 10) - k_1 k_d (\frac{C_o - c}{V_{res.}}) 10 \quad \text{A. (5)}$$

$$\frac{dc}{dt} = -k_1 c \left( q_m \frac{V_{res}}{10} - (C_o - c) \right) + k_1 k_d (C_o - c) \quad \text{A. (6)}$$

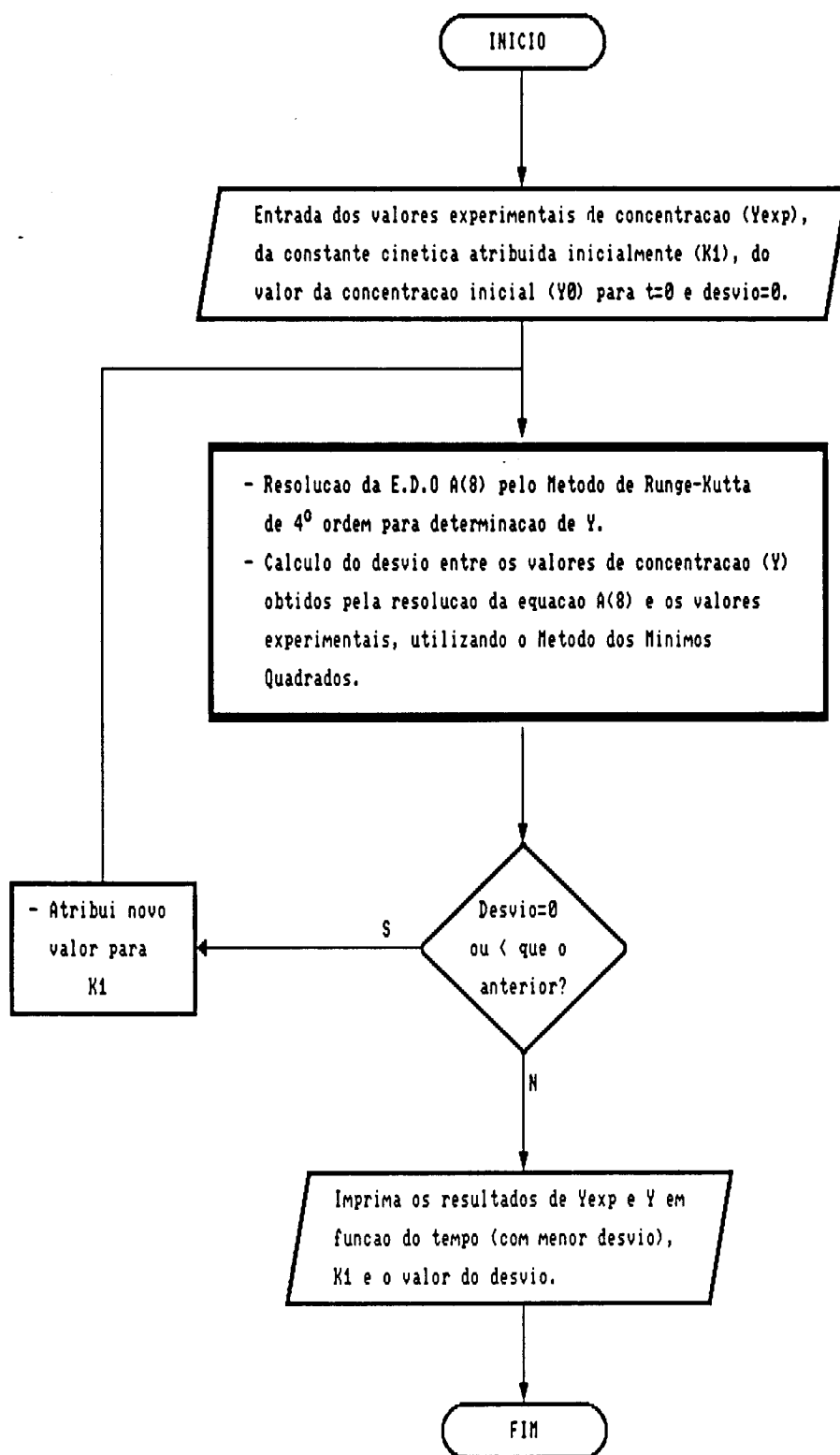
Multiplicando ambos os membros da equação anterior por  $1/C_o$ :

$$\frac{dc/C_o}{dt} = -k_1 \frac{c}{C_o} \left( q_m \frac{V_{res.}}{10} - C_o \left( 1 - \frac{c}{C_o} \right) \right) + k_1 k_d \left( 1 - \frac{c}{C_o} \right) \quad \text{A. (7)}$$

Fazendo  $Y = c/C_o$ :

$$\frac{dY}{dt} = -k_1 Y \left( q_m \frac{V_{res.}}{10} - C_o (1 - Y) \right) + k_1 k_d (1 - Y) \quad \text{A. (8)}$$

A seguir tem-se o diagrama de blocos do programa em turbo pascal utilizado para resolução da equação anterior. A curva obtida foi comparada à cada iteração com a curva experimental pelo método dos mínimos quadrados, definindo então o valor de  $k_1$  quando obteve-se o menor desvio entre as curvas.



**ANEXO B**



FLUXOGRAMA DO PROGRAMA PARA SIMULAÇÃO DO REATOR E DESENVOLVIMENTO DAS EQUAÇÕES DO BALANÇO DE MASSA EXECUTADO.

De acordo com figura IV.7 (esquema do sistema de reatores proposto) e considerações feitas anteriormente, no item IV.2.2 deste trabalho, tem-se o seguinte balanço de massa para o sistema de reatores:

$$\frac{dc_1}{dt} = \frac{F_r c_2 \epsilon}{V_1} - \frac{F_r c_1 \epsilon}{V_1} - \frac{F_1 c_1}{V_1} + k_3 q_1 \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon} \quad \text{B. (1)}$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_r q_2 \epsilon}{V_1} - \frac{F_r q_1 \epsilon}{V_1} - \frac{F_1 q_1}{V_1} - k_3 q_1 \quad \text{B. (2)}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1 S_0}{V_1} + \frac{F_r S_2 \epsilon}{V_1} - \frac{F_r S_1 \epsilon}{V_1} - \frac{F_1 S_1}{V_1} - \frac{K C_1 S_1}{K_m + S_1} \quad \text{B. (3)}$$

$$\frac{dc_2}{dt} = \frac{F_r c_1 \epsilon}{V_2} + \frac{F_1 c_1}{V_2} - \frac{(F_2 + F_1) c_2}{V_2} - \frac{F_r c_2 \epsilon}{V_2} + \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon} (k_2 q_2 - k_1 c_2 (q_m - q_2)) \quad \text{B. (4)}$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_r q_1 \epsilon}{V_2} + \frac{F_1 q_1}{V_2} - \frac{F_r q_2 \epsilon}{V_2} + (k_1 c_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2) \quad \text{B. (5)}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_r S_1 \epsilon}{V_2} + \frac{F_1 S_1}{V_2} - \frac{F_r S_2 \epsilon}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) S_2}{V_2} - \frac{K C_2 S_2}{K_m + S_2} \quad \text{B. (6)}$$

Onde:

$c_1$  = concentração de enzima livre no estágio (I)

$c_2$  = concentração de enzima livre no estágio (II)  
 $q_1$  = concentração de enzima adsorvida no estágio (I)  
 $q_2$  = concentração de enzima adsorvida no estágio (II)  
 $S_1$  = concentração de substrato no estágio (I)  
 $S_2$  = concentração de substrato no estágio (II)  
 $S_0$  = conc. de substrato na alimentação do estágio (I)  
 $F_r$  = vazão de reciclo  
 $F_1$  = vazão de alimentação no estágio (I)  
 $F_2$  = vazão do tampão para adsorção no estágio (II)  
 $V_1$  = volume de líquido no estágio (I)  
 $V_2$  = volume de líquido no estágio (II)  
 $\epsilon$  = porosidade  
 $k_1$  e  $k_2$  = constantes cinéticas do processo de adsorção  
 $k_3$  = constante cinética do processo de dessorção  
 $q_m$  = capacidade máxima de adsorção da resina  
 $K_m$  = constante de Michaelis-Menten

Além disso:

$$\epsilon = \frac{\text{Vol. liq.}}{\text{Vol. total}}; \quad 1 - \epsilon = \frac{\text{Vol. sol.}}{\text{Vol. total}}; \quad \frac{1 - \epsilon}{\epsilon} = \frac{\text{Vol. sol.}}{\text{Vol. liq.}} \quad \text{B. (7)}$$

Rearranjando o sistema de equações e fazendo:

$$\tau_1 = \frac{V_1}{F_1}; \quad \tau_2 = \frac{V_2}{F_1}; \quad \psi = \frac{F_r}{F_1}; \quad \gamma = \frac{F_1}{F_2} \quad \text{B. (8)}$$

tem-se:

$$\frac{dc_1}{dt} = \frac{\psi \epsilon (c_2 - c_1)}{\tau_1} - \frac{c_1}{\tau_1} + k_3 q_1 \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon} \quad \text{B. (9)}$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{\psi \epsilon (q_2 - q_1)}{\tau_1} - \frac{q_1}{\tau_1} - k_3 q_1 \quad \text{B. (10)}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{(S_o - S_1)}{\tau_1} + \frac{\psi e (S_2 - S_1)}{\tau_1} - \frac{Kc_1 S_1}{K_m + S_1} \quad \text{B. (11)}$$

$$\frac{dc_2}{dt} = \frac{\psi e (c_1 - c_2)}{\tau_2} + \frac{(c_1 - c_2)}{\tau_2} - \frac{c_2}{\gamma \tau_2} + (k_2 q_2 - k_1 c_2 (q_m - q_2)) \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon} \quad \text{B. (12)}$$

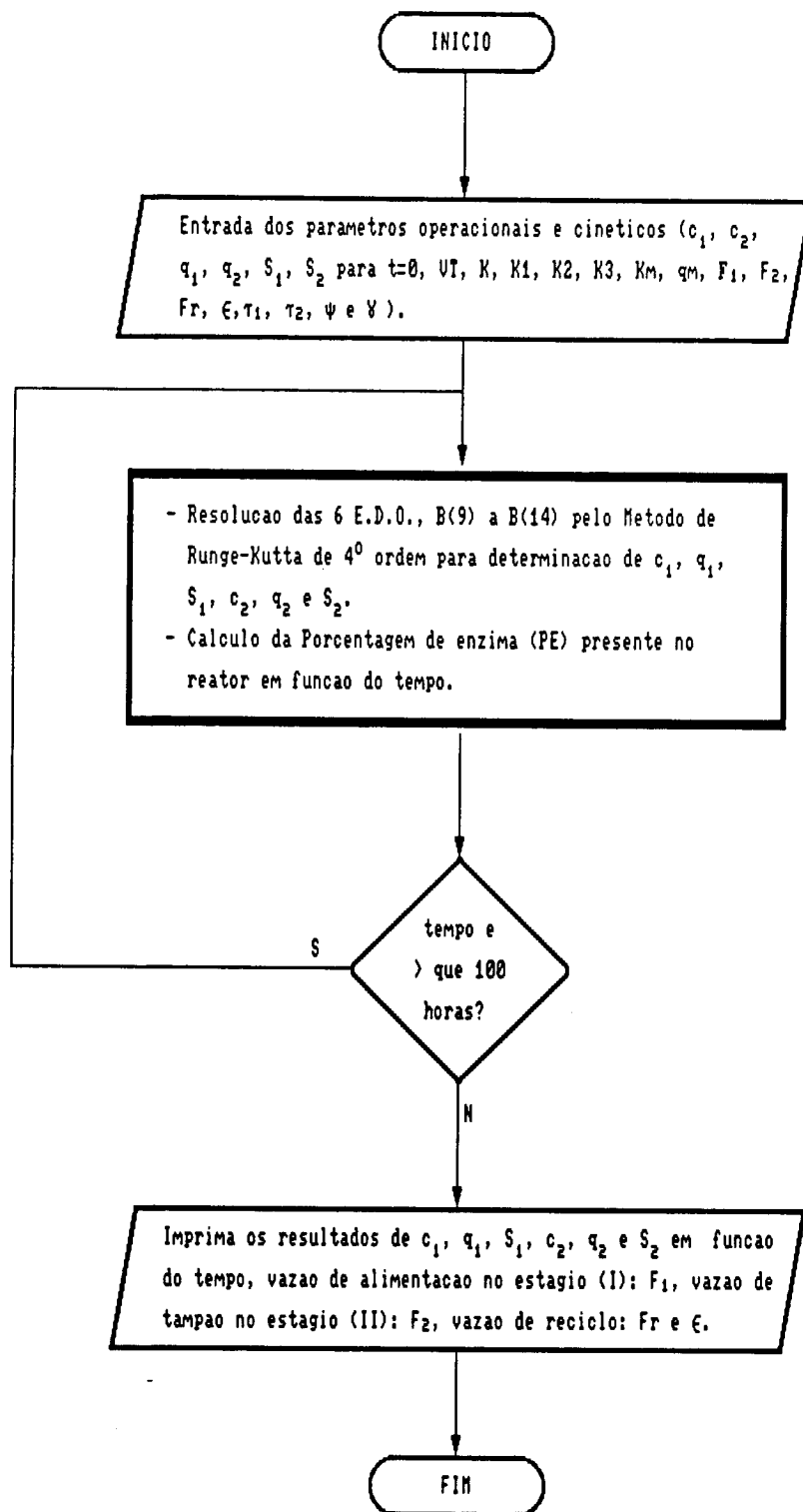
$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{\psi e (q_1 - q_2)}{\tau_2} + \frac{q_1}{\tau_2} + (k_1 c_2 (q_m - q_2) - k_2 q_2) \quad \text{B. (13)}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{(S_1 - S_2)}{\tau_2} + \frac{\psi e (S_1 - S_2)}{\tau_2} - \frac{S_2}{\gamma \tau_2} - \frac{Kc_2 S_2}{K_m + S_2} \quad \text{B. (14)}$$

Para resolução do sistema pelo método de Runge-Kutta de 4ª ordem, foram utilizadas as seguintes condições iniciais:

$$\begin{aligned} c_1 &= C_o ; \\ q_1 &= 0 ; \\ S_1 &= S_o ; \\ c_2 &= 0 ; \\ q_2 &= 0 \quad \text{e} \\ S_2 &= 0 \end{aligned}$$

A seguir o diagrama de blocos do programa utilizado.



**ANEXO C**

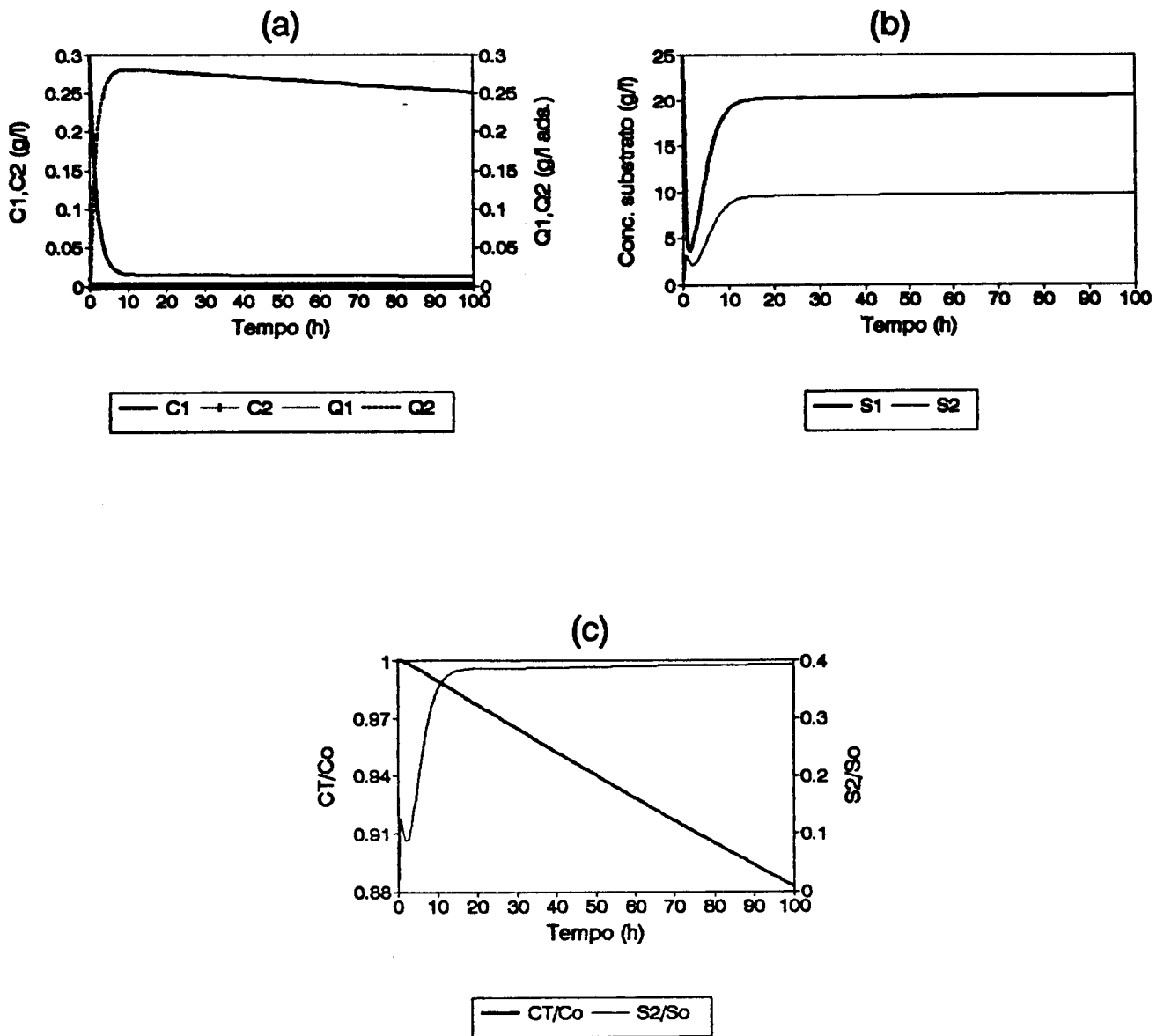


FIGURA C.1 - Resultados obtidos na simulação 1 ( $C_0=0,3$  g/l,  $S_0=25$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,05$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da

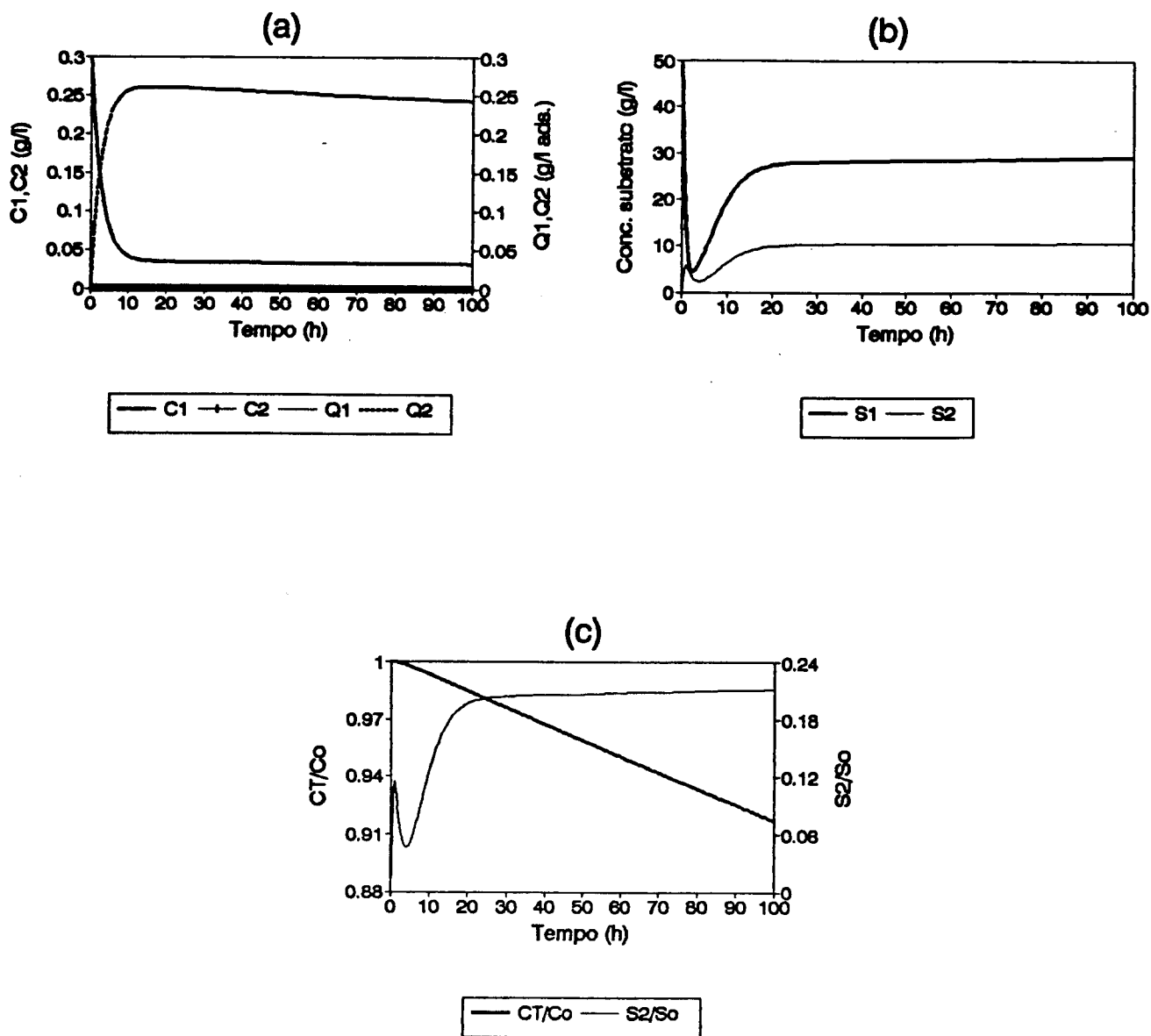


FIGURA C.2 - Resultados obtidos na simulação 2 ( $C_0=0,3$  g/l,  $S_0=50$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,10$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

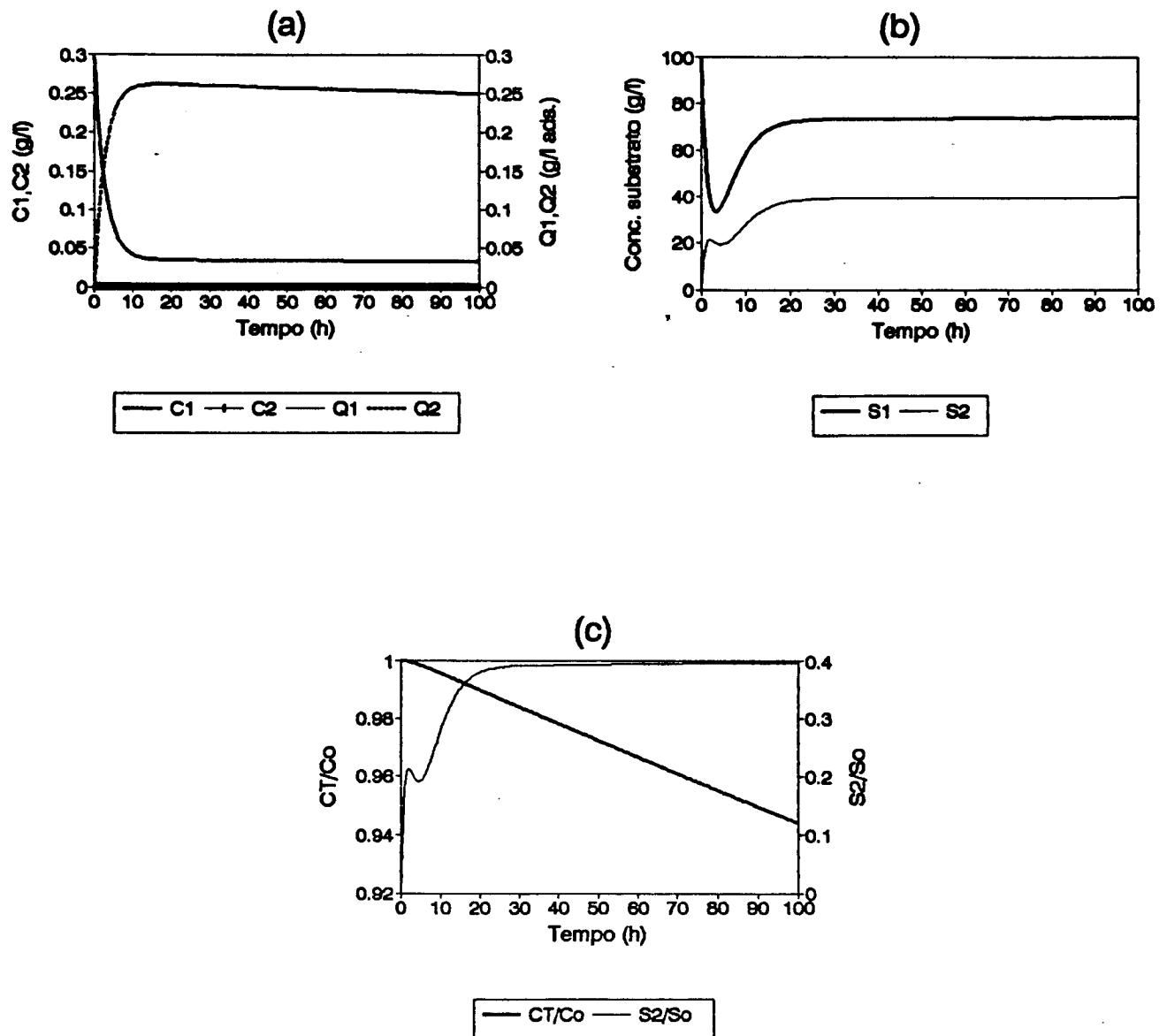


FIGURA C.3 - Resultados obtidos na simulação 3 ( $C_0=0,3$  g/l,  $S_0=100$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,15$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.



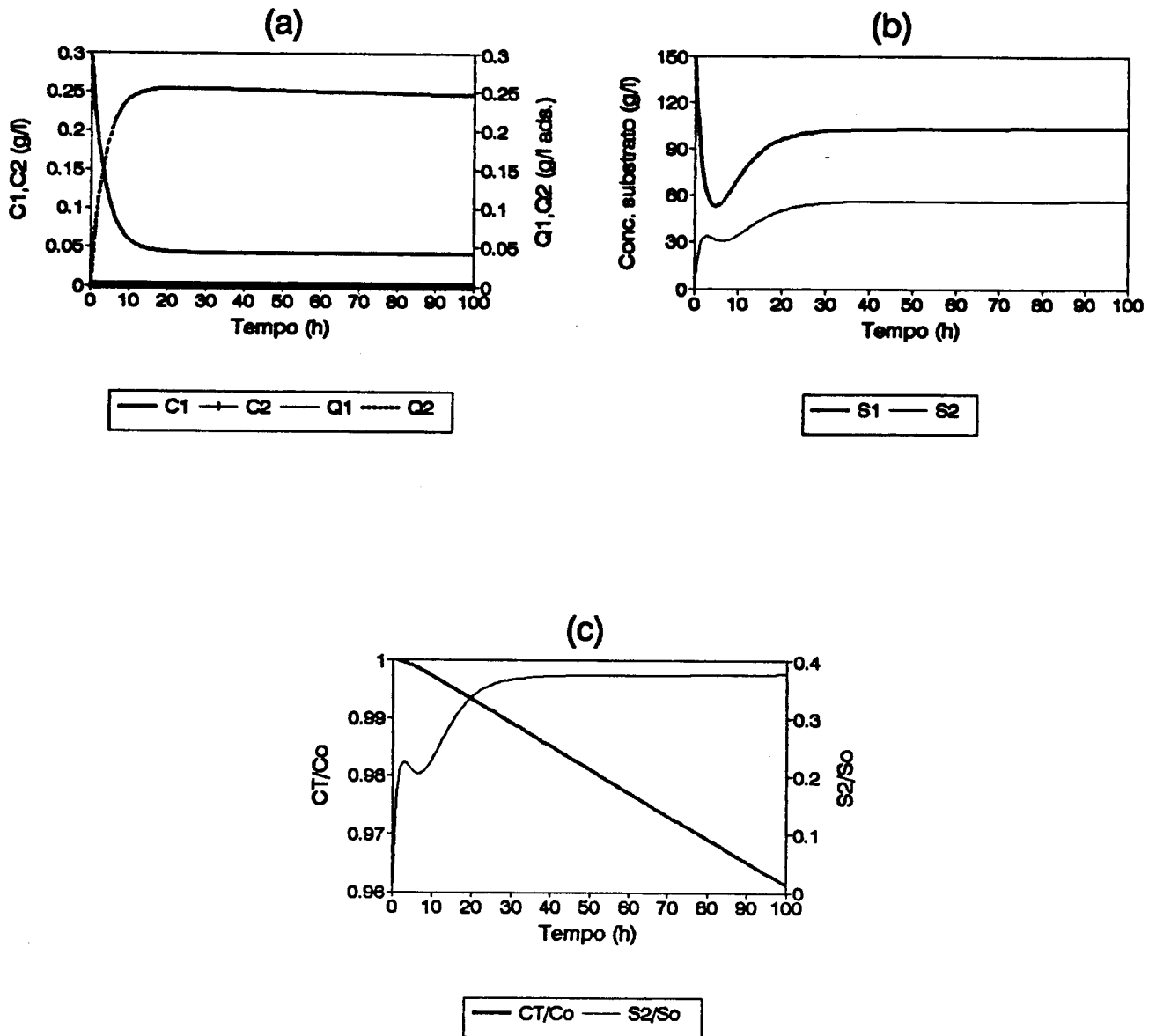


FIGURA C.4 - Resultados obtidos na simulação 4 ( $C_o=0,3$  g/l,  $S_o=150$  g/l,  $\epsilon=0,5$  e  $\phi=0,20$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

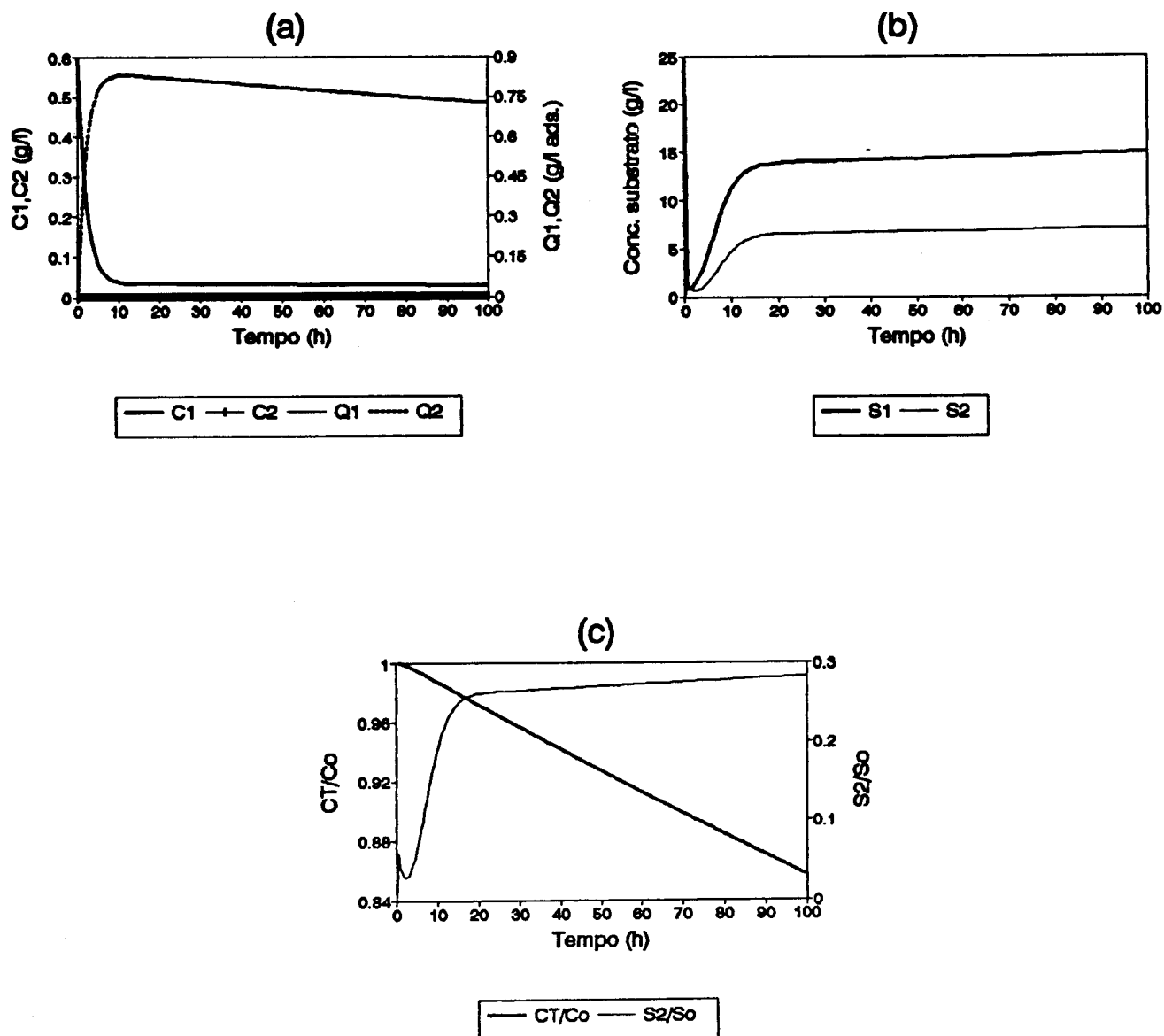


FIGURA C.5 - Resultados obtidos na simulação 5 ( $C_0=0,6$  g/l,  $S_0=25$  g/l,  $\epsilon=0,6$  e  $\phi=0,05$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

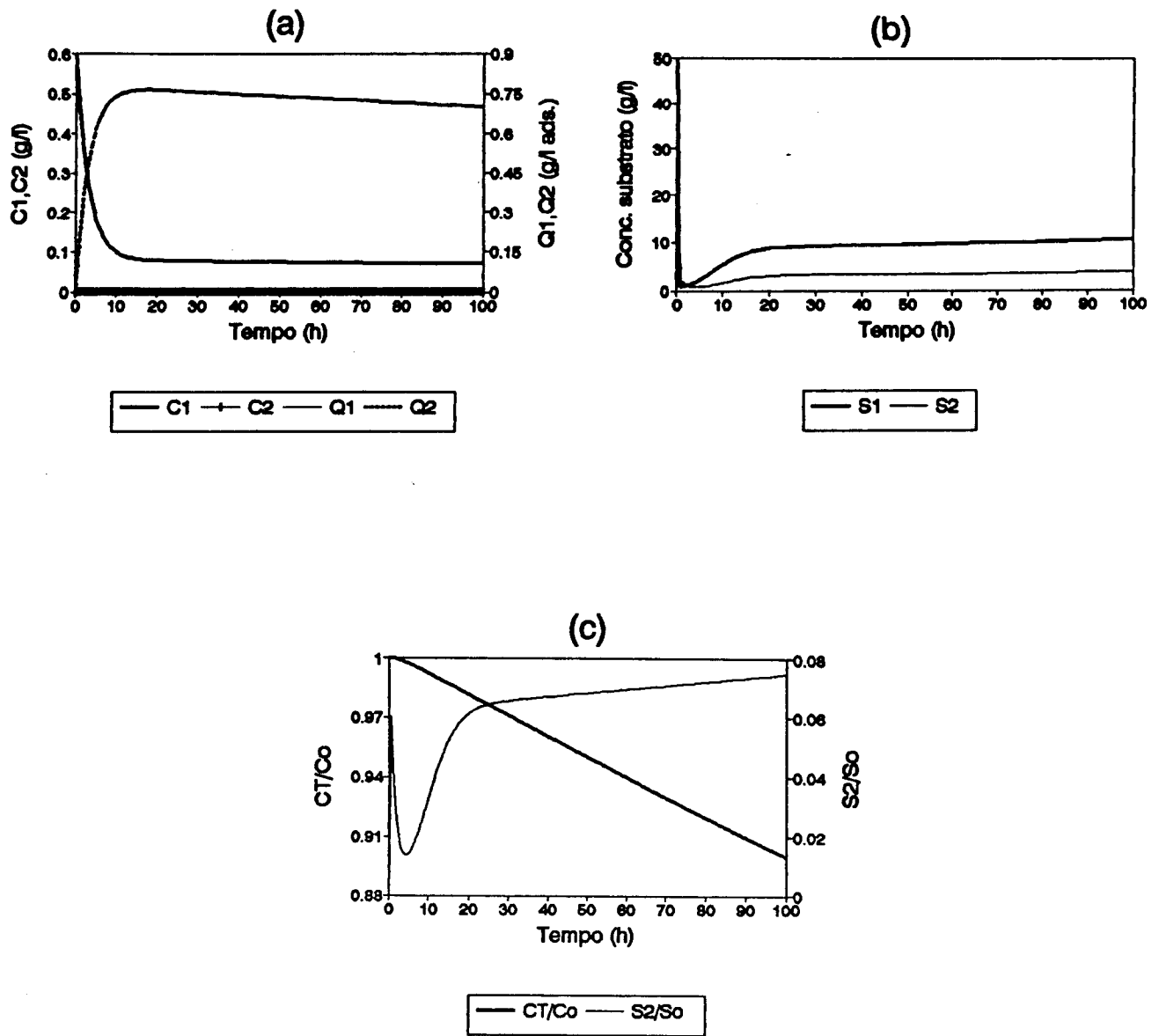


FIGURA C.6 - Resultados obtidos na simulação 6 ( $C_0=0,6$  g/l,  $S_0=50$  g/l,  $\epsilon=0,6$  e  $\phi=0,10$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

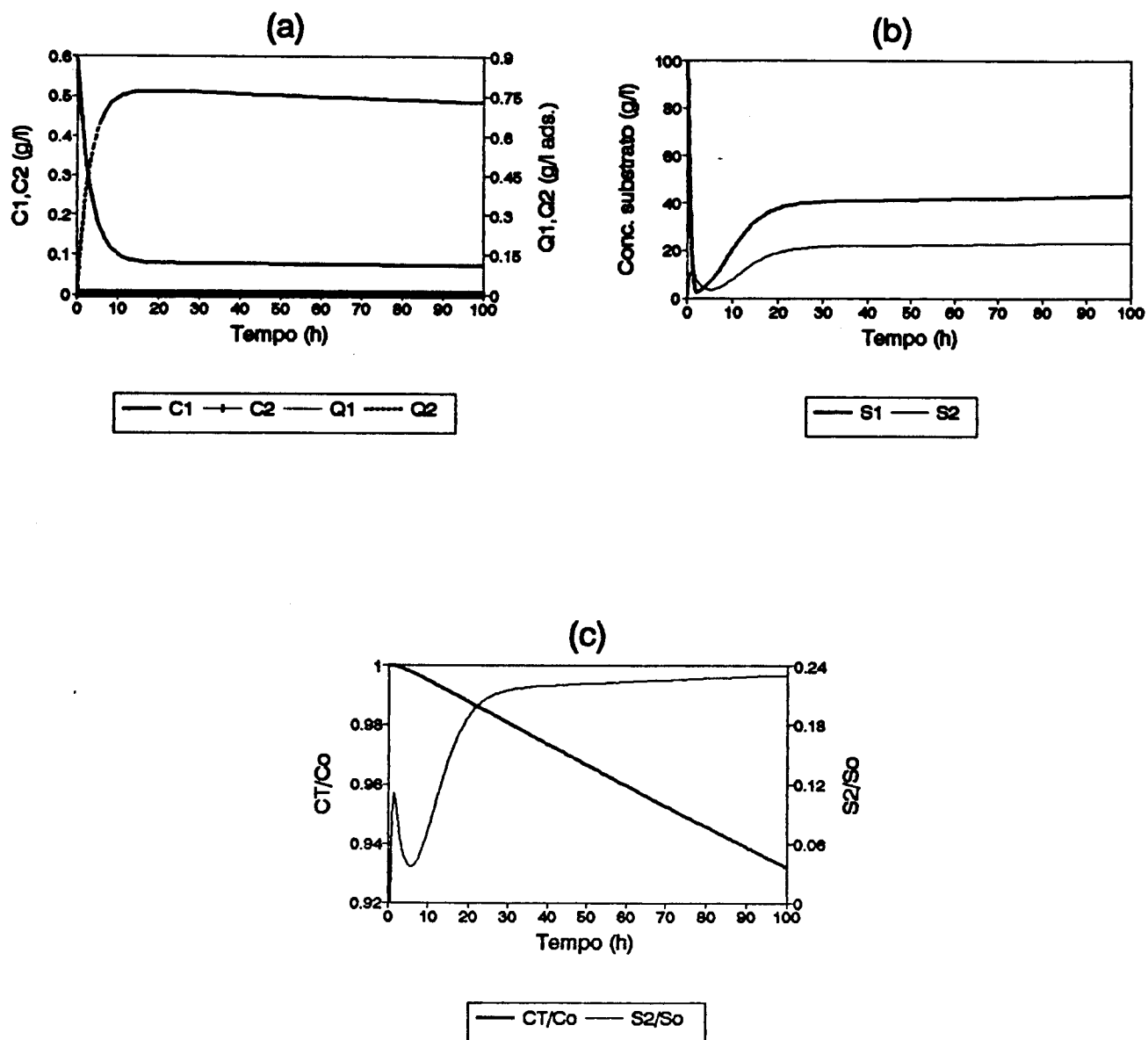


FIGURA C.7 - Resultados obtidos na simulação 7 ( $C_0=0,6$  g/l,  $S_0=100$  g/l,  $\epsilon=0,6$  e  $\phi=0,15$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

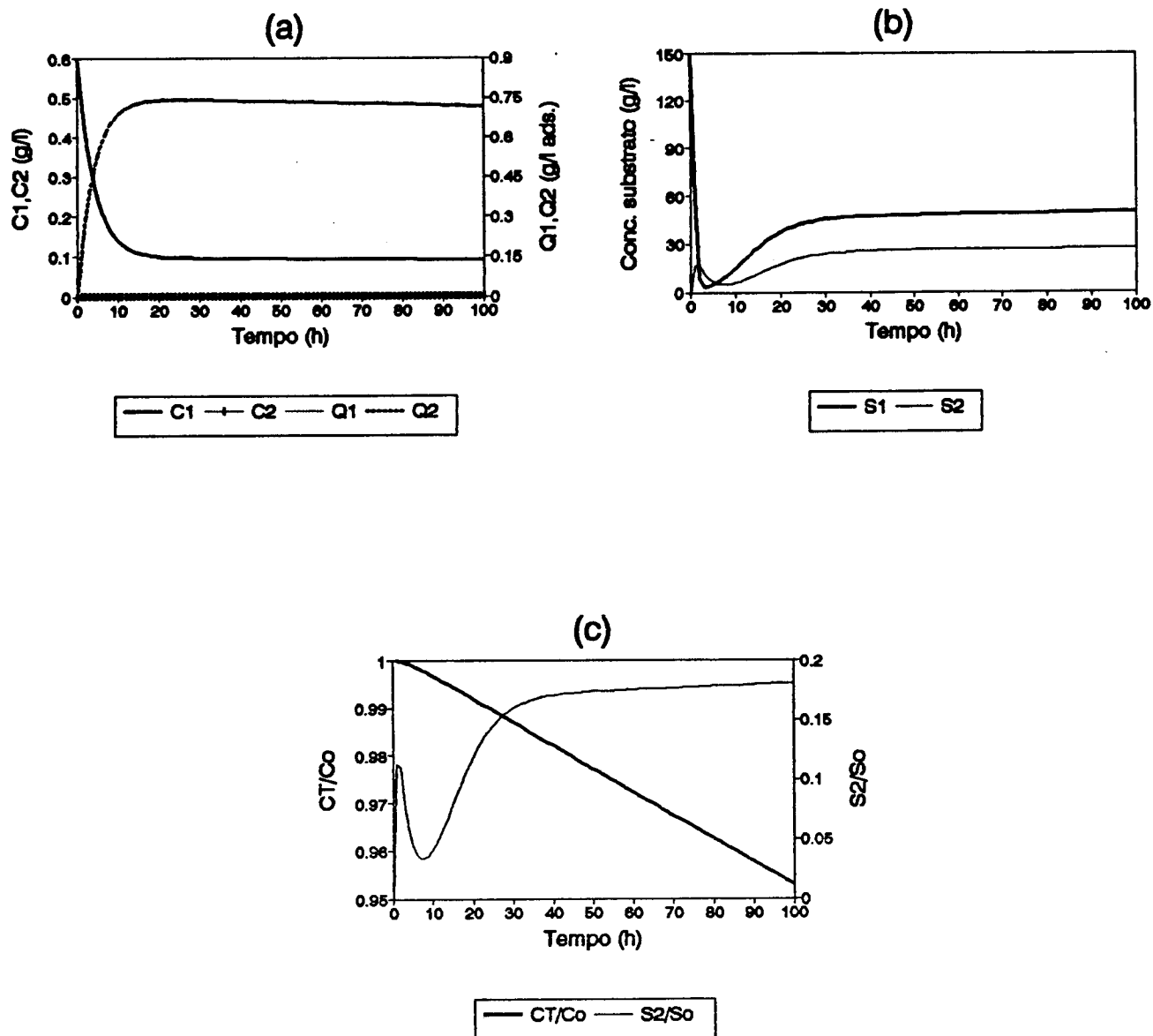


FIGURA C.8 - Resultados obtidos na simulação 8 ( $C_0=0,6$  g/l,  $S_0=150$  g/l,  $\epsilon=0,6$  e  $\phi=0,20$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

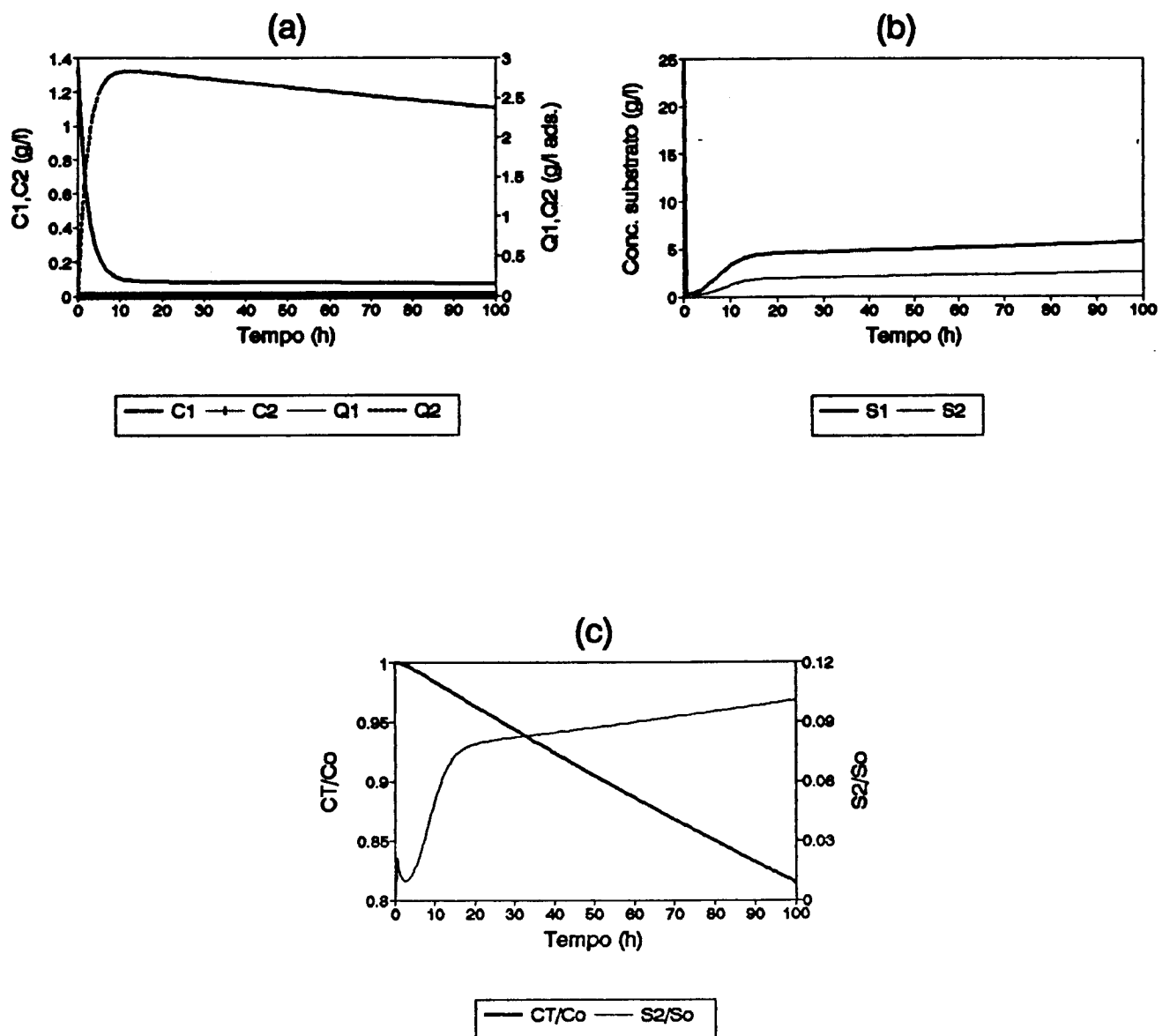


FIGURA C.9 - Resultados obtidos na simulação 9 ( $C_0=1,338$  g/l,  $S_0=25$  g/l,  $\epsilon=0,7$  e  $\phi=0,05$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

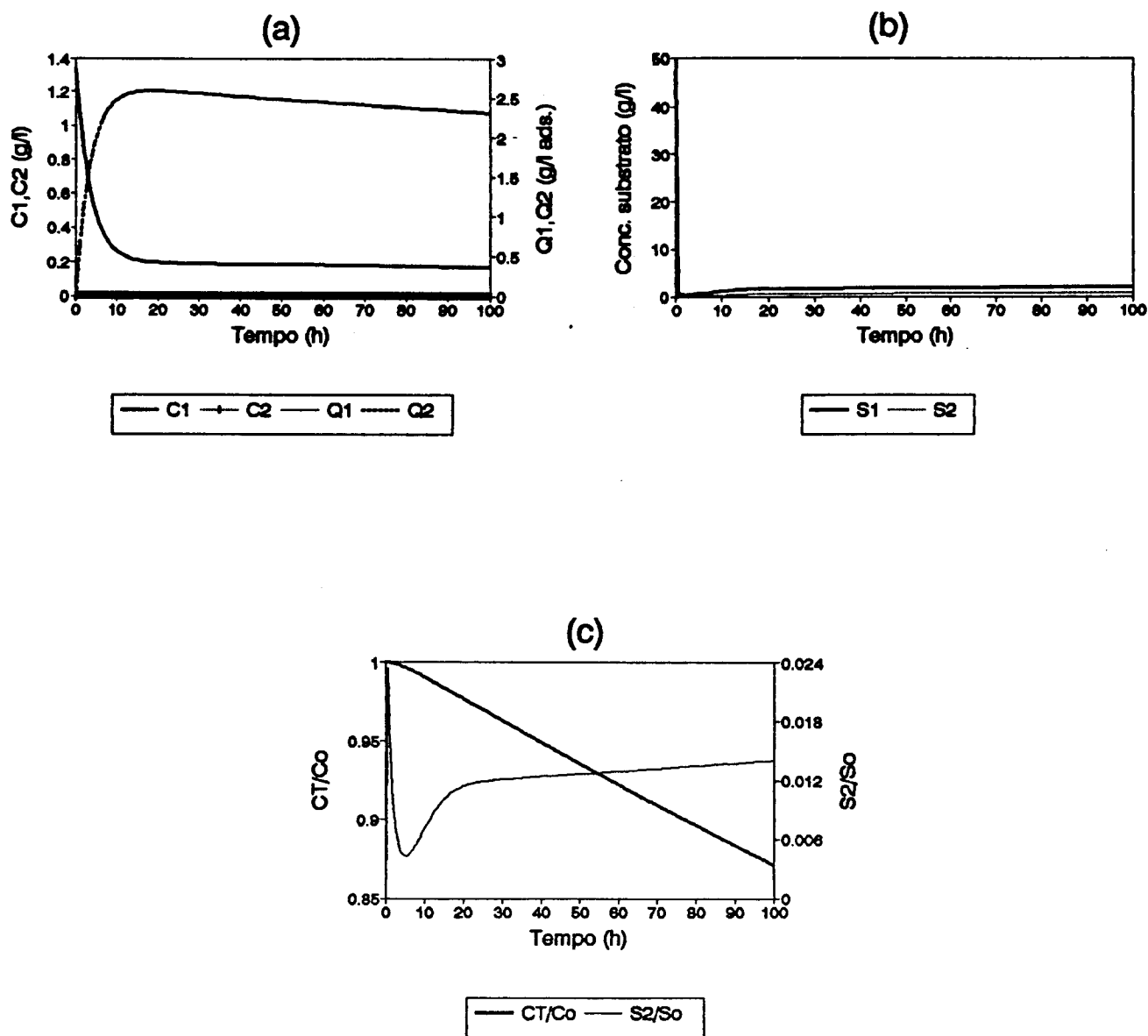


FIGURA C.10 - Resultados obtidos na simulação 10 ( $C_0=1,338$  g/l,  $S_0=50$  g/l,  $\epsilon=0,7$  e  $\phi=0,10$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

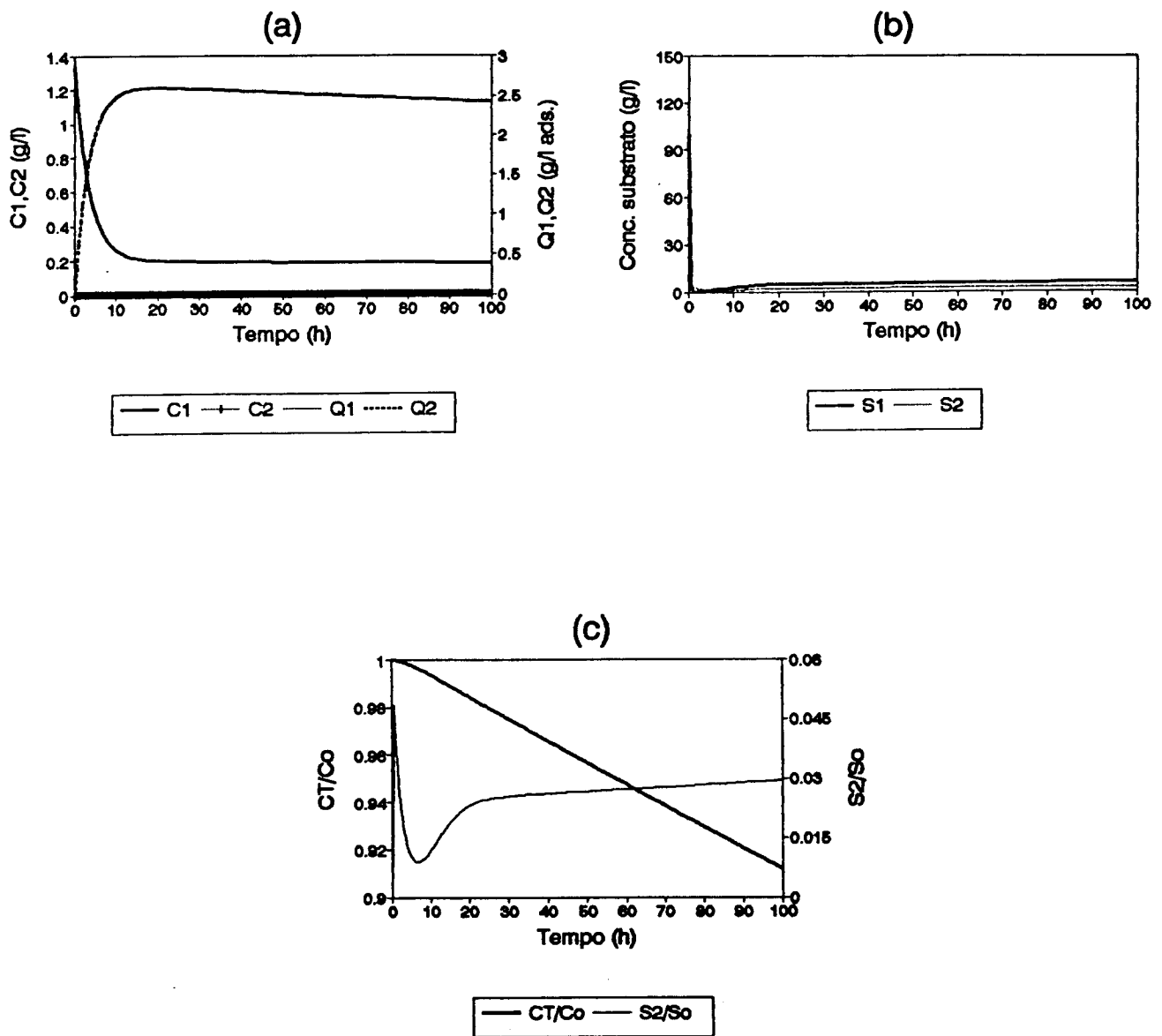


FIGURA C.11 - Resultados obtidos na simulação 11 ( $C_o=1,338$  g/l,  $S_o=100$  g/l,  $\epsilon=0,7$  e  $\phi=0,15$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.



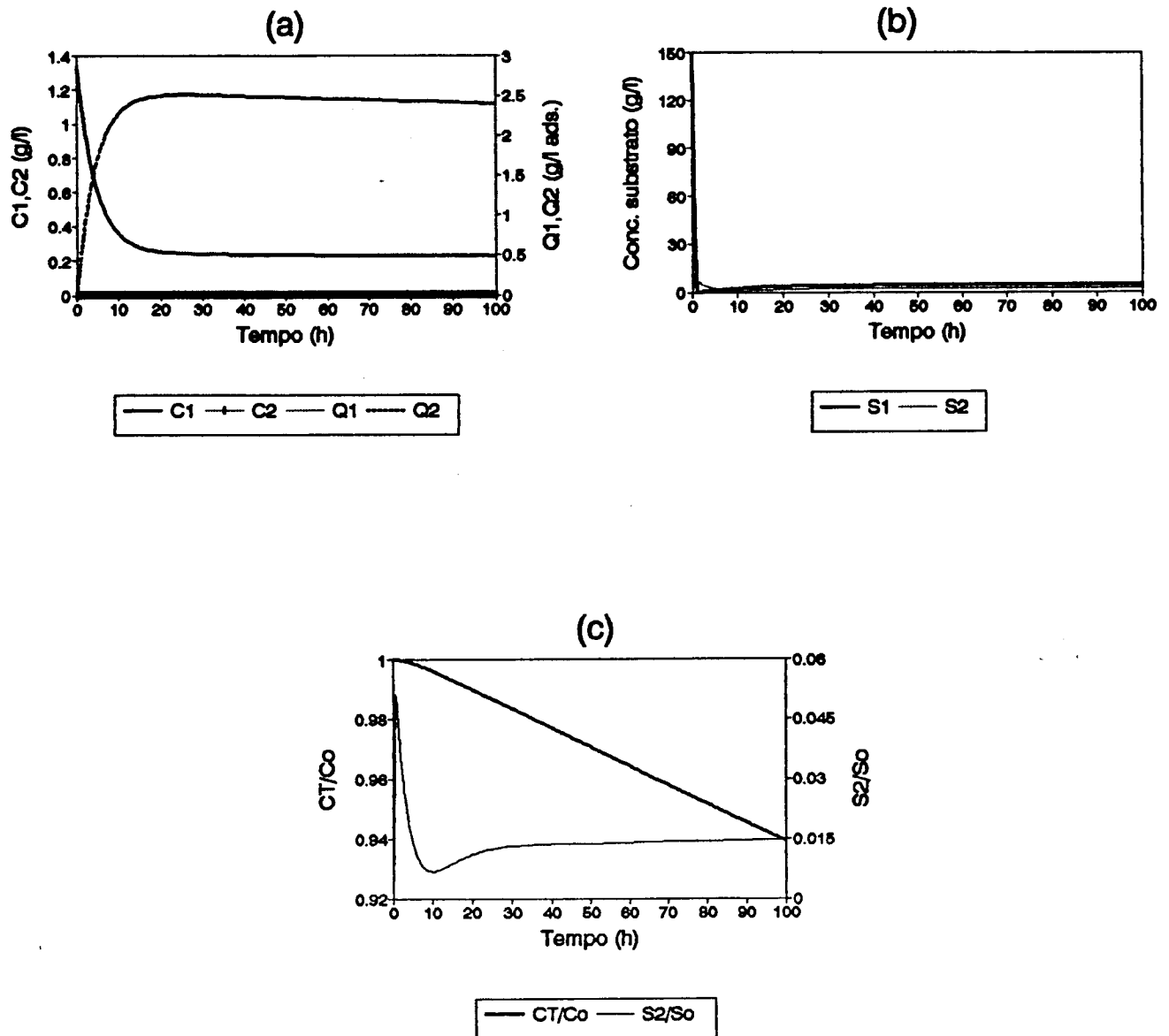


FIGURA C.12 - Resultados obtidos na simulação 12 ( $C_o=1,338$  g/l,  $S_o=150$  g/l,  $\epsilon=0,7$  e  $\phi=0,20$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

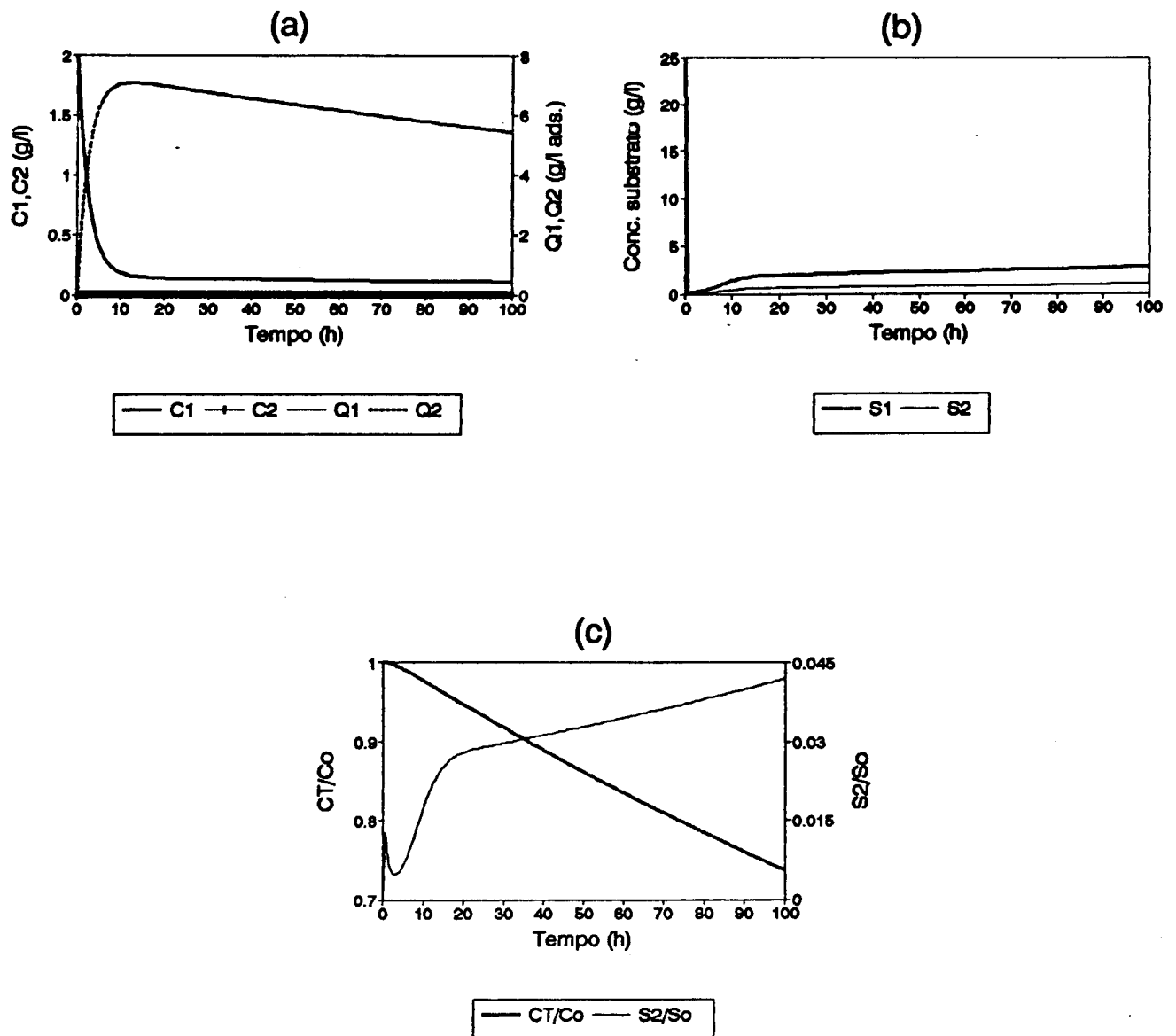


FIGURA C.13 - Resultados obtidos na simulação 13 ( $C_0=2,0$  g/l,  $S_0=25$  g/l,  $\epsilon=0,8$  e  $\phi=0,05$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

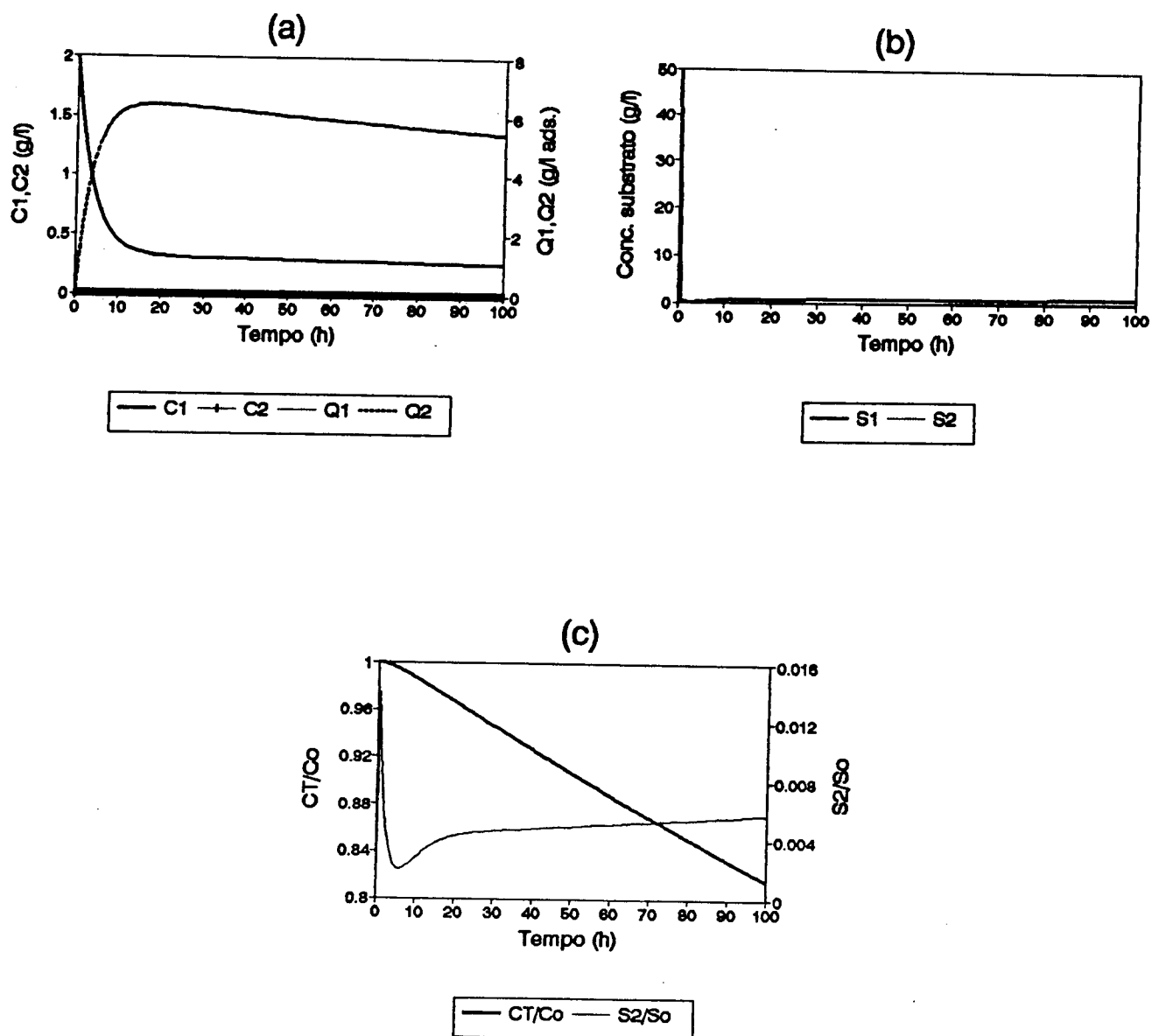


FIGURA C.14 - Resultados obtidos na simulação 14 ( $C_0=2,0$  g/l,  $S_0=50$  g/l,  $\epsilon=0,8$  e  $\phi=0,10$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

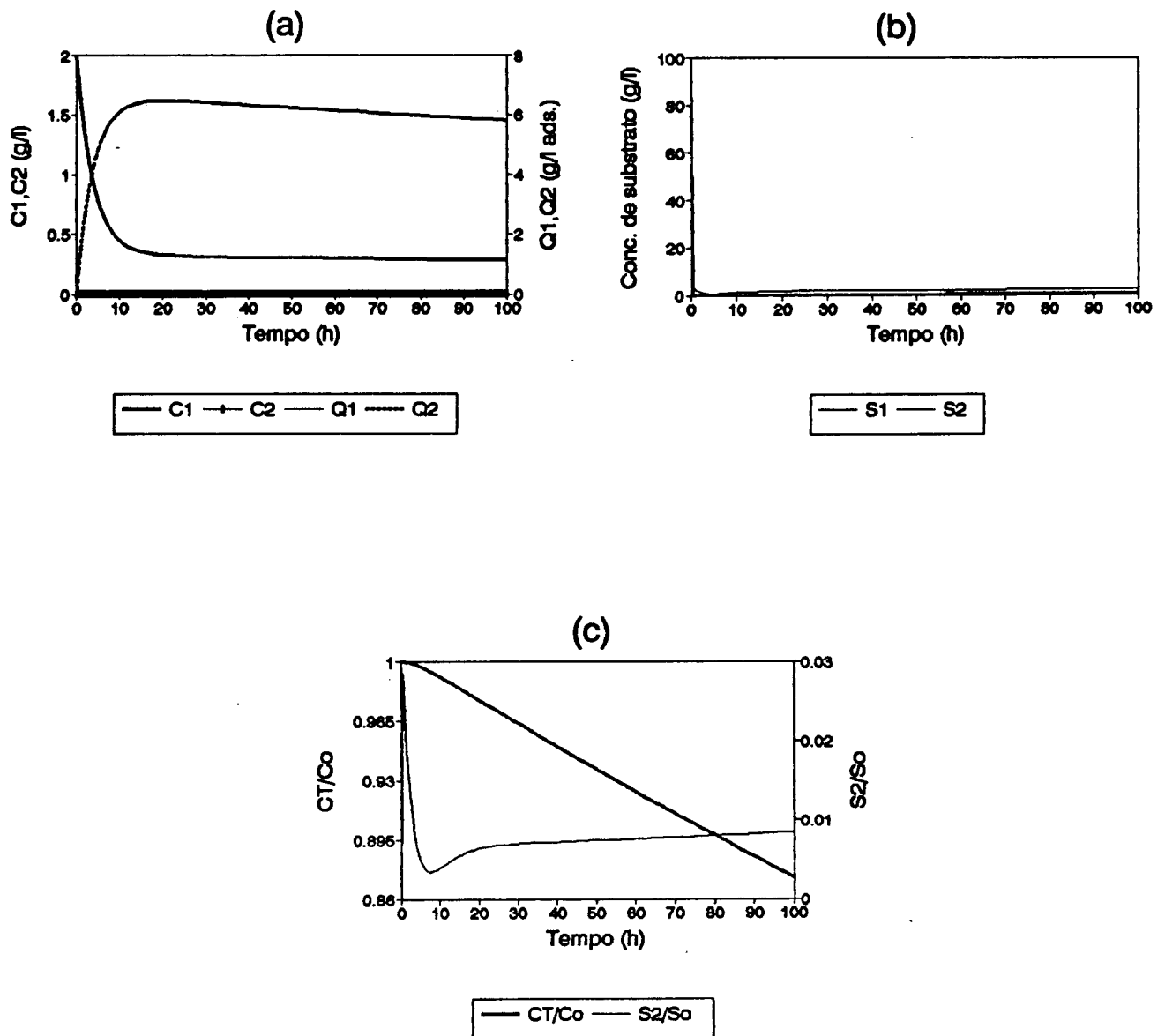


FIGURA C.15 - Resultados obtidos na simulação 15 ( $C_0=2,0$  g/l,  $S_0=100$  g/l,  $\epsilon=0,8$  e  $\phi=0,15$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.

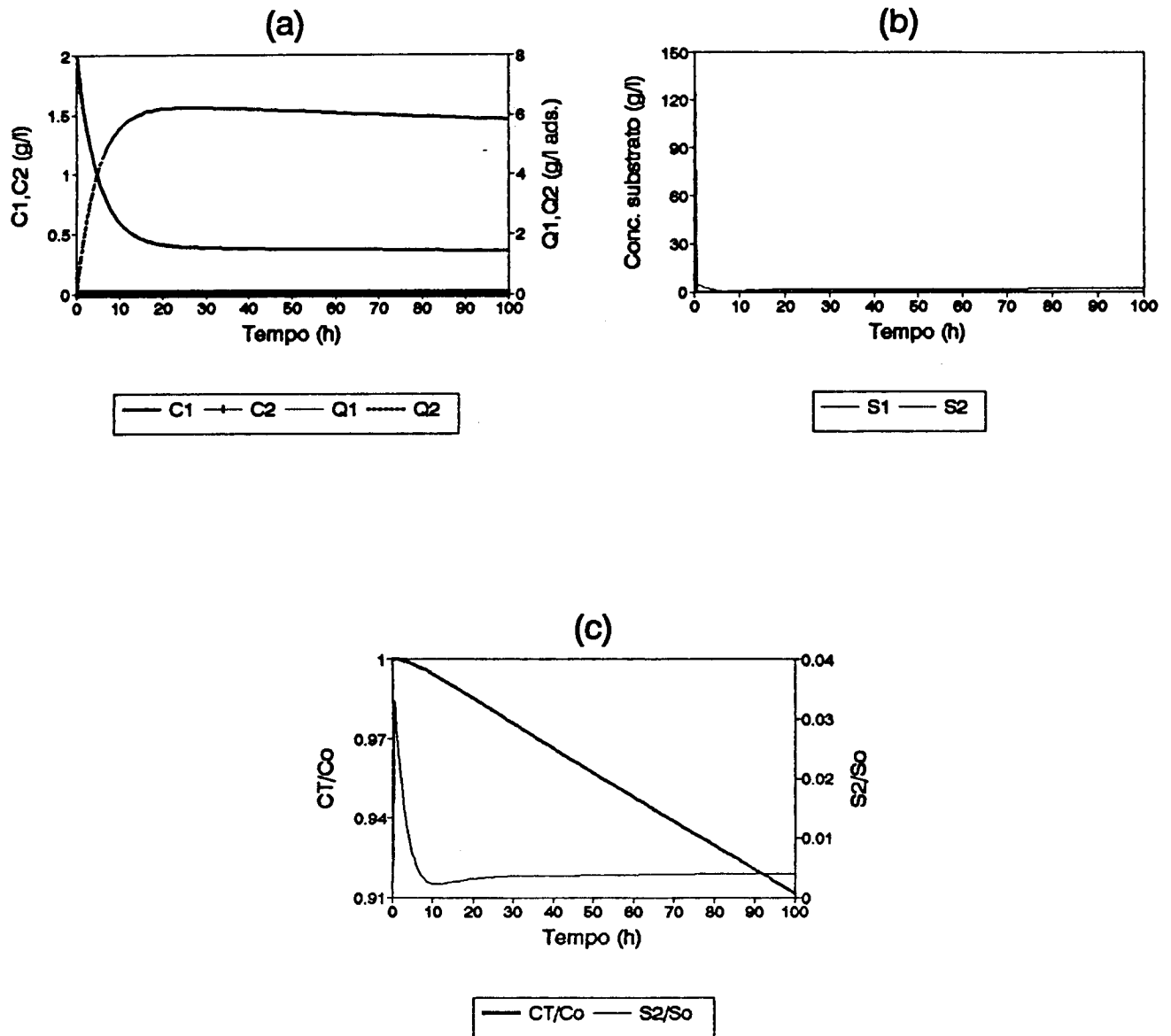


FIGURA C.16 - Resultados obtidos na simulação 16 ( $C_0=2,0$  g/l,  $S_0=150$  g/l,  $\epsilon=0,8$  e  $\phi=0,20$ ). (a) Perfil das concentrações de enzima livre e enzima adsorvida nos estágios I e II. (b) Perfil da concentração de substrato nos estágios I e II. (c) Perfil da concentração, de enzima no sistema e de substrato no estágio II.