

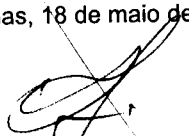
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE FRUTOSE
PRODUZIDA NA SÍNTESE ENZIMÁTICA
"IN VITRO" DE DEXTRANA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria Eugênia Cavenaghi aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de maio de 1999.

Campinas, 18 de maio de 1999


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

**Maria Eugênia Cavenaghi
Engenheira de Alimentos, UNESP/1995**

**Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas, Março de 1999



UNIDADE BC
Nº CHAMADA
V
38246
229/99
R\$ 11,00
10/08/99

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

CM-00134252-3

C315e

Cavenaghi, Maria Eugênia

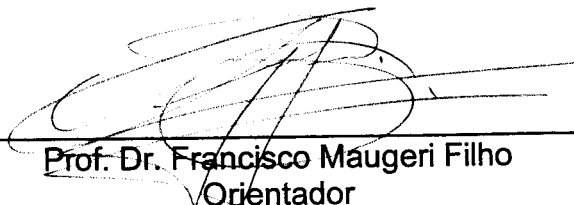
Estudo da recuperação de frutose produzida na síntese enzimática "in vitro" de dextrana. / Maria Eugênia Cavenaghi. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Francisco Maugeri Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutose. 2. Separação (Tecnologia). 3. Dextrana.
4. Biopolímeros. 5. Resinas. I. Maugeri Filho,
Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

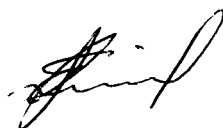
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Membro



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Membro

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco
Membro

Campinas, 18 de Maio de 1999.

**Aos meus queridos pais, Laércio e Áurea,
por todo apoio e imenso amor**

Marió

**"E ainda que tivesse o dom de profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
E ainda que tivesse toda a fé,
de maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse amor, nada seria"**

1 Corintios 13, versículo 2

**Ao meu querido Lelê,
eterno em meu coração!**

Sua Mel

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Francisco Maugeri Filho pela orientação, compreensão, paciência e amizade durante todo o trabalho.

Às amigas Lia, Fifa e Eliana: ajuda imensurável, obrigada pela força!

A minha amiga e companheiríssima, Fábria. Por cada pequenino momento, alegre ou não, fácil ou difícil, mas sempre compartilhado. Saudades!

Ao meu amigo Caco, pelas sugestões e principalmente por toda sua bondade, carinho, amizade e alegria contagiantes!

Aos meus amigos inesquecíveis, Flávio, André e Janaína, Mauro, Márcia e Marília; pelos risos, pela força, pelo carinho e amizade!

Aos amigos também especiais, Oscar, Mari, Alfredo, Suzana, Yemiko, Marley, Marco, Danny, Dona Maria e Prof. Maria Isabel, por todo carinho.

Aos amigos Marco e a Valéria, por compartilharem comigo cada momento dessa batalha! E à Aline pela amizade e paciência na convivência diária durante o mestrado!

Às amigas Karina, Érica, Taninha, Lília e Dri, pelo carinho e pelas bagunças em Campinas!

À banca examinadora, pela valiosa contribuição através de correções e sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

A toda minha família, em especial, meus pais e minhas irmãs, Adriana, Ana e Si, por estarem sempre ao meu lado. A minha avó querida (in memoriam), por tanta bondade! A Deus, por iluminar os nossos caminhos.

ÍNDICE GERAL

INDICE DE TABELAS	vii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
SUMARY	xiii
1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	04
2.1 - Generalidades	04
2.2 - Dextrana-sacarase	06
2.2.1 - Propriedades	06
2.2.2 - Condições de Produção	08
2.2.3 - Mecanismo de Ação Catalítica	10
2.2.4 - Cinética Enzimática	13
2.3 - Dextrana	14
2.3.1 - Propriedades	14
2.3.2 - Aplicações	15
2.3.3 - Produção	17
2.3.4 - Redução de Peso Molecular	22
2.3.5 - Fracionamento	23
2.3.6 - Caracterização do Peso Molecular	24
2.4. - Frutose	26
2.4.1 - Propriedades	26
2.4.2 - Produção e Mercado	29
2.4.3 - Aplicações	31

2.4.4 - Metabolismo e Absorção	32
2.5 - Processos de Separação de Frutose	33
3. Materiais e Métodos	42
3.1 - Síntese de Dextrana	42
3.1.1 - Meio de Cultura Padrão para a Produção de Dextrana-sacarase	42
3.1.2 - Reativação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	43
3.1.3 - Inóculo	44
3.1.4 - Alimentação	44
3.1.5 - Produção da Enzima	44
3.1.6 - Purificação de Dextrana-sacarase	45
3.1.7 - Síntese "In Vitro" de Dextrana	45
3.2 - Resinas Empregadas na Absorção de Frutose	46
3.2.1 - Resina Dowex 50W X4 - 200R	46
3.2.2 - Resina Dowex 50W X8	46
3.2.3 Resina Dowex XUS-40285	48
3.3 - Gel Superdex 30	50
3.4 - Separação de Frutose	50
3.4.1 - Testes Preliminares	50
3.4.2 - Separação Cromatográfica em Coluna de Vidro	51
3.4.3 - Sistema de Separação de Frutose da Síntese em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)	53
3.5 - Intensidade de Absorção UV de Dextrana em Sistema FPLC	55
3.6 - Métodos Analíticos	56
3.6.1 - Determinação de Açúcares Redutores	56
3.6.2 - Determinação de Atividade Enzimática	58
3.6.3 - Análises de Amostras da Síntese de Dextrana por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	58
3.6.3.1 - Preparo da Fase Móvel	59
3.6.3.2 - Preparo das Amostras e Padrões de Dextrana	60
3.6.3.3 - Injeção das Amostras no Sistema HPLC	60

3.6.4 - Curva de Calibração	61
3.6.5 - Quantificação de Amostras	62
3.6.6 - Determinação dos Açúcares Produzidos na Síntese	62
3.6.6.1 - Preparo da Fase Móvel	62
3.6.6.2 - Curva de Calibração	62
3.6.6.3 - Preparo de Amostra	63
3.6.6.4 - Injeção de Amostra no Sistema HPLC	63
3.6.6.5 - Identificação e Quantificação dos Açúcares Obtidos na Síntese	64
4. Resultados	65
4.1 - Produção da Enzima	65
4.2 - Purificação da Enzima	65
4.3 - Produção de Dextrana	66
4.3.1 - Caracterização de Amostra da Síntese	66
4.3.2 - Identificação e Quantificação dos Açúcares Obtidos na Síntese	70
4.4- Separação de Frutose	71
4.4.1 - Testes Preliminares de Separação	71
4.4.2 - Processos de Separação de Frutose	73
5 - Conclusões	81
6. Sugestões para Trabalhos Futuros	83
7. Bibliografia	84
Apêndice a	93
Apêndice b	94
Apêndice c	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Comparação da atividade de água e solubilidade a 25°C para açúcares no estado cristalino e polióis	28
Tabela 2.2: Efeito de Counterions no Coeficiente de distribuição	37
Tabela 2.3: Coeficientes de partição (Kd) para glicose e frutose	39
Tabela 3.1: Meio de cultura padrão determinado por Queiroz e Maugeri, citado por Bazán, 1993) com alteração na concentração de sacarose de 40g/l para 50g/l	43
Tabela 3.2: Características da coluna Hiloal 16 / 60 empacotada com gel superdex 30	54
Tabela 3.3: Características das Colunas Empregadas na Separação	59
Tabela 3.4: Condições de injeção das amostras de dextrana no HPLC	61
Tabela 3.5: Padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation)	61
Tabela 4.1: Tempos de Retenção e Peso Molecular Médio dos Padrões da Curva de Calibração	67
Tabela 4.2: Distribuição de Peso Molecular para Amostra da Síntese	68

Tabela 4.3: condições de separação para coluna de vidro de 18 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro (altura de leito de 5 cm) - Dowex 50w X4	71
Tabela 4.4: condições de separação para coluna de vidro de 18 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro (altura de leito de 10,5 cm) - resina Dowex 50w X4	72
Tabela 4.5: Resultados das Separações de Frutose para a Resina Adsorvente Dowex 50W X8	76
Tabela 4.6: Resultados das Separações de Frutose para a Resina Dowex XUS-40285	78
Tabela 4.7: Resultados das Separações de Frutose para Gel Superdex 30	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura básica da macromolécula de dextrana	05
Figura 2.2: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT <i>at al.</i> (1974)	12
Figura 2.3: Comparação entre os perfis de intensidade de doçura (HANOVER & WHITE, 1993)	27
Figura 2.4: Consumo Mundial de HFS (VUILLEUMIER, 1997)	30
Figura 2.5: Formas tautoméricas da D-frutose em solução (SCHENEIDER, 1996)	33
Figura 3.1: Esquema da Montagem Experimental	53
Figura 3.2: Perfil de Concentração de Dextrana - Absorção UV	55
Figura 4.1: Cromatograma da síntese de dextrana (Separação realizada em HPLC - Cromatografia de Permeação em Gel)	69
Figura 4.2: Cromatogra do Produto da Síntese de Dextrana - Separação Realizada em HPLC com coluna de Separação de Açúcares (F=Frutose, S=Sacarose, G=Glicose, O=Oligossacarídeos)	70
Figura 4.3: Perfis de Concentração - resina Dowex 50 WX8 (60°C e 0,1 ml/min)	77
Figura 4.4: Perfis de Concentração - resina Dowex XUS-40285 (60°C e 1ml/min)	79

Figura 4.5: Perfis de Concentração - Gel Superdex 30 a 45°C e 1ml/min -----80

NOMENCLATURA

Cads	Capacidade de adsorção
d	Volume de diluição final no reator de vidro
ES	Eficiência de Separação de frutose e dextrana
Mi	Peso Molecular de moléculas de classe i
Mn	Peso Molecular numérico
Mv	Peso Molecular viscosimétrico
Mw	Peso Molecular médio
ni	número de moléculas de classe i
Nreg	Normalidade de regenerante
Rreg	Requerimento de regenerante
TrD	Tempo de retenção de Dextrana
TrF	Tempo de retenção de Frutose
ti	tempo de residência médio
U	Unidade Internacional: corresponde a 20,27 UDS
Vres	Volume de resina
α	Coefficiente angular da curva da absorbância em função do tempo
β	Coefficiente angular da curva padrão de açúcares redutores
wi	Porcentagem do componente i na alíquota do eluente
ϕ	Vazão mássica da mistura
δ_i^2	Variância

RESUMO

A dextrana é um biopolímero, com grande potencial industrial, produzido principalmente pelo microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* e formado por resíduos de glicose unidos por ligações α -1,6. Este polissacarídeo apresenta hoje diversas aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, indústrias química e fotográfica, devido provavelmente às inúmeras pesquisas realizadas. As características e propriedades da dextrana são muito específicas e seu uso é diferenciado de acordo com seu peso molecular. Durante a síntese enzimática de dextrana, a partir da sacarose, obtém-se ainda a frutose, muito utilizada nas indústrias alimentícias devido principalmente ao seu grande poder adoçante. Entretanto, encontram-se pouquíssimos estudos que avaliam a separação da frutose, presente em grandes quantidades no produto da síntese, cuja recuperação traria grandes ganhos econômicos. O objetivo deste trabalho é selecionar e estudar resinas que promovam a separação da frutose obtida durante a síntese "in vitro" de dextrana. A enzima dextrana-sacarase, responsável pela síntese de dextrana, foi produzida por fermentação do microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, em sacarose, e utilizada na síntese "in vitro" de dextrana. A reação enzimática foi realizada com solução 10% de sacarose, em pH 5,2, e 20°C. O produto direto da síntese de dextrana foi submetido a processos de separação cromatográfica em colunas de vidro empacotadas com a resina de troca iônica Dowex 50WX4, Dowex 50WX8 e a resina Dowex XUS 40285. As resinas na forma de hidrogênio foram submetidas à troca iônica para substituição dos ions hidrogênio por ions cálcio. Foram testadas as vazões de 0,1 e 0,55ml/min e as temperaturas de 35, 45 e 60°C e realizou-se também a separação à 45°C em uma coluna com gel Superdex 30 num sistema FPLC. Durante a separação, amostras foram recolhidas em intervalos de tempo definidos e analisadas por cromatografia de permeação em gel, em um sistema HPLC para obtenção dos perfis de concentração para dextrana e frutose. Observou-se um aumento na eficiência de separação com o aumento da temperatura para processos de

separação com vazão de 0,1 ml/min, sendo que a resina Dowex XUS 40285 apresentou maior eficiência que as outras resinas e as melhores condições para a separação foram vazão de 0,1ml/min e temperatura de 60°C.

SUMMARY

Dextran is a biopolymer from bacteriological origin, with great industrial potential. It is mainly produced by the enzyme dextran sucrose from *Leuconostoc mesenteroids*. It is mainly formed by glucose residues linked by α -1,6 bonds. This polysaccharide has many uses today, for example in many foods, pharmaceuticals products, cosmetics, chemical and photographic industries. The characteristics as well as properties of dextran are very specific and its use is different for each molecular weight range. In the enzymatic synthesis from sucrose, fructose as by-product is obtained and this monosaccharide is used in food industries. However, very few studies about separation of the fructose from dextran medium can be found in the literature. The fructose recovery will provide a substantial savings for the process as a whole. The objective of this work is to select and study resins that provides the fructose separation from the medium. Dextran sucrose, was produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F on sucrose, and used in the dextran synthesis. The enzymatic reaction was realized with 10% sucrose solution, in pH 5,2 and 20°C. The dextran direct synthesis product was separated in a glass chromatographic column, packed with Dowex 50W X4 ion exchange resin, Dowex 50W X8, Dowex 40285 resin or Superdex 30 from Pharmacia Biothec. The original hydrogen resins were changed by calcium ions. Separation occurred at elution rate of 0,1 and 0,55 ml/min at temperatures of 35, 45 e 60°C; and the separation with Superdex 30 gel column was performed at 45°C. The separation samples were collected at defined intervals of time and analysed by gel permeation chromatography, in an HPLC system in order to obtain the fructose concentration profile. It has been shown that there is an increase in the separation efficiency when the temperature is increased at a flow rate of 0,1 ml/min. The best result was obtained with Dowex 40285 resin, to flow at 0,1 ml/min at a temperature of 60°C.

1 - INTRODUÇÃO

As dextranas são um grupo de polissacarídeos bacteriológicos, constituída por uma cadeia principal de moléculas de D-glucose unidas por ligações α -1,6, produzida principalmente pelo microrganismo *Leuconostoc mesenteroides*. Essa bactéria produz extracelularmente a enzima dextrana-sacarase responsável pela síntese de dextrana a partir de sacarose. O grau de ramificação, o peso molecular e outras propriedades da dextrana, são muito específicas, variando conforme o microrganismo usado para a produção de dextrana-sacarase.

O estudo sobre dextrana iniciou-se com a busca de solução para problemas surgidos na indústria açucareira, e posteriormente pelas características notáveis deste biopolímero e a variedade de usos que o mesmo possibilita.

Esse polissacarídeo é de grande interesse comercial, devido a sua grande aplicabilidade tanto na indústria petroquímica, de alimentos, química ou farmacêutica. Nesta última, a dextrana de baixo peso molecular é usada para fins clínicos, podendo ser um substituto do plasma sanguíneo (70000 daltons) e agir como um expensor do sangue aumentando sua fluidez e auxiliar a circulação nos vasos capilares (40000 daltons). Nesta faixa de peso molecular a dextrana é classificada como clínica. As propriedades mais importantes da dextrana no uso clínico são: a característica de conferir viscosidade ao plasma e de, em sua decomposição, produzir moléculas de glicose que são completamente metabolizadas pelos tecidos animais. Observa-se portanto que o controle do peso molecular é um fator importante no processo de produção, e por isso diversos estudos científicos estão sendo desenvolvidos para esse fim. A dextrana apresenta também, alguns derivados com importantes aplicações, como a dextrana-sulfato com propriedades anticoagulantes e a ferro dextrana, utilizada no tratamento de anemia em humanos e animais.

No processo de conversão da sacarose em dextrana, obtém-se ainda a frutose, de grande importância para as indústrias alimentícias e também farmacêuticas, onde sua aplicabilidade é bastante vasta, e também oligossacarídeos, com potencial de uso nas indústrias de alimentos, ração animal e cosméticos.

A frutose passou a ser importante como fonte de carboidrato para o ser humano na década de 70, com a introdução do xarope de alto teor de frutose (high-fructose syrups, HFS), sendo produzido principalmente a partir do amido de milho e açúcar invertido.

A utilização industrial de frutose se deve a diversas propriedades desse monossacarídeo, assim como a doçura relativa (que às vezes pode ser maior que de outros açúcares, dependendo de sua concentração e estado físico), sinergia com outros açúcares (promove um aumento da doçura relativa quando em presença de certos adoçantes), redução de atividade de água da solução (que dificulta o crescimento de microorganismos).

O crescente aumento do consumo de frutose nos últimos anos, tem proporcionado um grande número de pesquisas envolvendo processos industriais alternativos para a produção de frutose, estudos sobre metabolismo, absorção e efeitos de consumo de frutose no corpo humano.

Acredita-se que a separação entre a dextrana e a frutose seja facilitada devido às grandes diferenças estruturais e diferenças de peso molecular entre os dois produtos da síntese a partir de sacarose. Entretanto encontram-se na literatura, pouquíssimos estudos que avaliem a utilização de resinas adsorventes para na separação de frutose, presente em grandes quantidades no produto da síntese, cuja recuperação traria grandes ganhos econômicos. Por outro lado o método de separação comumente

utilizado pelas indústrias, emprega o sistema de separação por cromatografia de permeação em gel, o qual representa grande custo para o processo de produção.

O objetivo geral deste trabalho é estudar o comportamento de resinas adsorventes que promovam a separação da frutose obtida durante a síntese "in vitro" de dextrana e selecionar a resina que proporcione maior eficiência de separação.

Este trabalho justifica-se pela importância econômica e aplicação dos produtos da síntese, assim como pelo interesse industrial no conhecimento das condições de separação da frutose obtida na síntese de dextrana a partir de sacarose e pelo fato de toda a dextrana utilizada no Brasil provir de importação. Em função do recente aumento do consumo da frutose, seu alto valor de mercado e a obtenção de dextrana isenta de frutose, torna importante o estudo de uma resina de custo reduzido que possibilite a separação dos dois principais produtos da síntese.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Generalidades

As dextranas começaram a ser estudadas há cem anos atrás quando a alta viscosidade presente nos caldos açucarados nas indústrias de açúcar causavam problemas como o entupimento de filtros e bombas e interferiam na cristalização da sacarose e em 1861, Pasteur demonstrou que a formação de películas, consideradas indesejáveis durante o processo de fabricação de vinho e refino de açúcar era causada pela ação de microrganismos (NEELY, 1960).

O termo "dextrana" foi usado primeiramente por Scheibler em 1874, quando ele encontrou que essa turvação era causada por um carboidrato de fórmula empírica ($C_6H_{10}O_5$) tendo uma rotação óptica positiva. Em 1878, Van Tieghem chamou a bactéria produtora de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* (ALSOP, 1983 e DE BELDER, 1987).

Mais tarde, pesquisadores mostraram que a dextrana pode ser produzida por muitos microrganismos e o termo "dextrana" ou "dextranas" é o nome coletivo dado agora à larga classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares compostos quase exclusivamente de unidades monoméricas α -D-glucopirranose ligadas principalmente por ligações α -1,6. (ALSOP, 1983), sabendo-se hoje que a fórmula molecular da dextrana é $(C_6H_{10}O_5)_n$ (NEELY, 1960).

A principal bactéria sintetizadora de dextrana pertence ao gênero *Leuconostoc*, espécie *mesenteroides*, *dextranicum*, grupo *Streptococceace* e família *Lactobacillaceae*. Muitos membros do grupo *Streptococcus* estão relacionados com o desenvolvimento de placa cariogênica na superfície dos dentes (DE BELDER, 1987).

Todas as espécies têm uma característica comum pois em geral utilizam a sacarose como única fonte de carboidratos para a produção do polissacarídeo. Outros açúcares como a glicose, frutose, manose e lactose promovem um crescimento vegetativo da bactéria, mas sem produção da enzima (ALSOP, 1983 e BARKER, 1991). Entretanto, os resultados obtidos por Jung & Mayer (1981), mostraram que α -1-fluorglicose é um substrato alternativo à sacarose (citado por PEREIRA, 1996).

A maioria dos trabalhos recentes com dextrana têm sido conduzidos com várias linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e em particular a linhagem NRRL B512 F, que produz dextrana contendo 95% de ligações glicosídicas α -1,6 as quais são lineares e 5% de ligações α -1,3 (BARKER, 1991). Essa linhagem é comumente usada para a produção comercial de dextrana nos Estados Unidos e Europa (JEANES, citado por ALSOP, 1983). A Figura 2.1 mostra a macromolécula linear de dextrana, com um certo grau de ramificação:

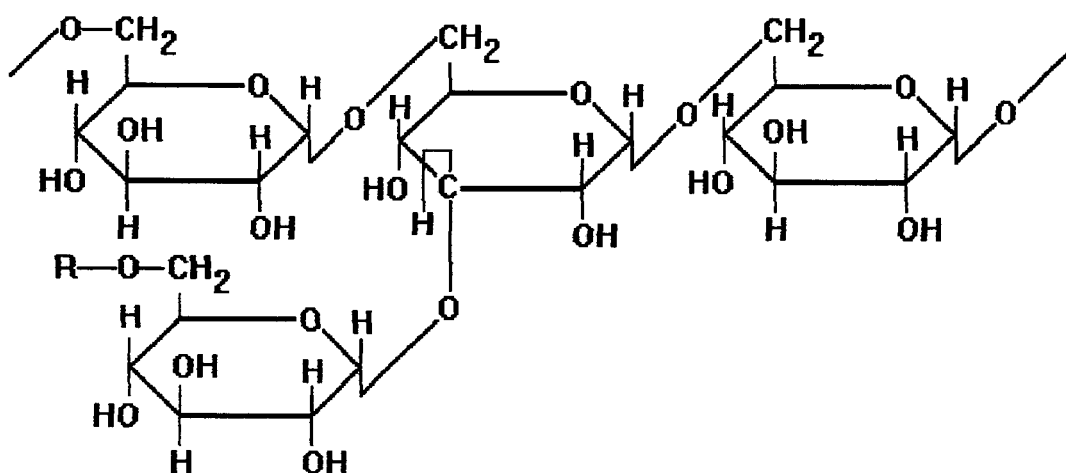


Figura 2.1: Estrutura básica da macromolécula de dextrana

Em 1941, Henhe iniciou o estudo da produção enzimática de dextrana na ausência de células livres e pouco depois, em 1942 Henhe e Sugg demonstraram que

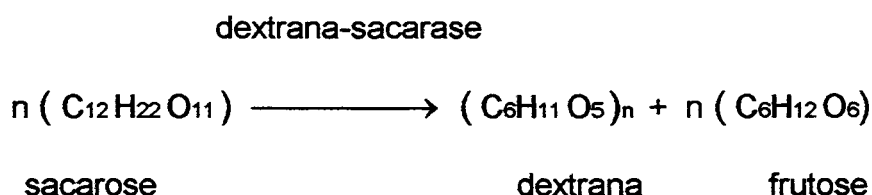
um extrato de *Leuconostoc mesenteroides*, livre de células, tinha a capacidade de catalisar a formação de dextrana (NEELY, 1960).

Em 1944, Hestrin e Avineri-Shapiro denominaram dextrana-sacarase a enzima envolvida na síntese de dextrana (NEELY, 1960). Portanto é importante salientar que a dextrana não é um produto direto da fermentação bacteriana na presença de sacarose, mas provém da ação da enzima dextrana-sacarase produzida pelo microrganismo sobre a sacarose existente no meio.

2.2 - Dextrana-sacarase

2.2.1 - Propriedades

Dextrana-sacarase é a enzima responsável pela conversão de sacarose a dextrana de acordo com a seguinte reação:



É uma enzima extracelular induzida, produzida por bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. A sacarose é o único substrato conhecido capaz de induzir a produção da enzima (BARKER, 1991). Esta enzima catalisa a síntese do polissacarídeo sem envolver intermediários fosforilados. A energia requerida para a formação das unidades glicosídicas é obtida pela quebra da molécula de sacarose, ou seja, pela hidrólise da ligação entre glicose e frutose. Isto constitui uma

diferença fundamental com o mecanismo geral de síntese dos polissacarídeos intracelulares, onde um considerável número de intermediários são utilizados, como o caso do glicogênio e amido (SABATIE, et al., 1986).

As propriedades, mecanismos de ação, métodos de produção e purificação da enzima estão relativamente bem caracterizados, principalmente a enzima produzida por *Leuconostoc mesenteroides* da linhagem NRRL B-512F (ALSOP, 1983). A dextrana produzida por esta linhagem apresenta estabilidade aos processos de esterilização, congelamento e descongelamento (DE BELDER, 1987).

ROBYT & WALSETH, em 1979, estudaram a possibilidade da dextrana-sacarase ser uma glicoproteína. Eles realizaram a hidrólise ácida da enzima seguida por cromatografia de papel e obtiveram manose como maior fração de carboidratos constituintes. Concavalina A removeu completamente a atividade de dextrana-sacarase da solução, confirmando o carácter glicoproteico da enzima.

KABOLI & REILLY (1980) determinaram a energia de ativação da reação de síntese de dextrana por dextrana-sacarase na forma livre e imobilizada, chegando a 8,6 e 1,7 Kcal/mol respectivamente. Relatam ainda outros valores bastante diferentes para a reação com enzima livre, de 5 a 10 Kcal/mol (citado por CURRALERO, 1993).

Segundo CURRALERO (1993), Miller *et al.* (1986) usando apuradas técnicas de purificação, conseguiram preparações de dextrana-sacarase de baixos teores de carboidratos (abaixo de 1%), colocando em dúvida o fato da enzima ser uma glicoproteína e ter peso molecular ao redor de 180.000 daltons.

A enzima purificada perde atividade rapidamente a 4°C e perde aproximadamente 60% de atividade a -15°C após um período de 20 dias. A adição de 4

mg/mL de dextrana, entretanto, estabiliza a enzima e, a adição de 25% de glicerol tem um efeito pequeno na estabilidade de estocagem (ROBYT & WALSETH, 1979).

ROBYT & WALSETH (1979) confirmaram que o EDTA diminui a atividade de dextrana-sacarase e ainda mostraram que a atividade é restaurada com a adição de íons cálcio.

MILLER & ROBYT (1984), verificaram que a presença de dextrana, polímeros neutros como o polietilenoglicol (PEG), metil-celulose e detergentes neutros aumentam a estabilidade da dextrana-sacarase. No caso do polietilenoglicol em concentrações acima de 0,5%, foi verificada uma relação entre o efeito de estabilidade e o peso molecular (citado por BAZÁN, 1993).

2.2.2 - Condições de Produção

A enzima dextrana-sacarase é produzida por microrganismos em meios ricos em sacarose. As células em crescimento liberam a enzima no meio onde o excesso de sacarose é convertido a dextrana (BARKER & AJONGWEN, 1991).

Segundo ALSOP (1983), Kosepsel estabeleceu em 1952 que o pH ótimo para a produção da enzima é de 6,5 a 7,0 e o pH ótimo para a atividade da enzima está entre 5,0 e 5,2 e que a enzima é mais estável nesta mesma faixa de pH, mas relativamente instável à pH 6,7.

Em 1979, ROBYT & WALSETH estudaram o efeito do cálcio na produção de dextrana-sacarase, mostrando que acima de 0,1% o crescimento pode ser afetado e a atividade enzimática diminuída.

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria aeróbica facultativa, desenvolvendo-se bem em anaerobiose. ALSOP (1983), estudou alguns efeitos da variação do grau de aeração na produção de dextrana-sacarase por fermentação e demonstrou que com oxigênio puro ou saturação de dióxido de carbono, o crescimento é finalizado rapidamente e que um aumento no crescimento é obtido sem aeração.

Altos rendimentos de dextrana-sacarase foram obtidos por técnicas de fermentação com batelada alimentada e atividade de 21,9 U/mL foi obtida pela cultura de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F sob condições anaeróbicas de fermentação. A enzima foi produzida com alta atividade requerendo mínima agitação e condições anaeróbicas de produção (BARKER & AJONGWEN, 1991).

Entretanto, em 1993 Lazic *et al* determinaram que a taxa de crescimento específica, a taxa de produção de dextrana-sacarase e o rendimento da enzima são maiores, e a duração do processo menor, sob condições aeróbicas, que em condições anaeróbicas (citado por SANTOS, 1996).

BAZÁN (1993), estudando a produção enzimática de dextrana clínica, concluiu que a enzima dextrana-sacarase produzida por fermentação em batelada de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, atinge valores máximos de atividade enzimática com uma alimentação de sacarose de 160 g/L e NaOH 1M, temperaturas de 27°C. Estas condições favoreceram processos de ultrafiltração e precipitação com solução 50% de PEG 1500 na purificação da enzima.

Segundo ALSOP (1983), em 1980 Lopez e Monsan conseguiram obter os máximos rendimentos de dextrana-sacarase até então obtidos, pela adição contínua de sacarose, obtendo rendimentos de 180 UDS/mL .

Altos rendimentos da enzima foram obtidos pela otimização das condições de processo e em particular pelo controle do nível de sacarose na fermentação. Este é mantido na faixa de 0,5 a 1,0% pela adição contínua de sacarose, particularmente durante a fase de crescimento logarítmica, onde a produção da enzima é induzida (ALSOP, 1983).

Estudos mais recentes mostraram que mutantes isolados de células de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F foram capazes de produzir a enzima dextrana-sacarase em um meio contendo outros açúcares, que não a sacarose, tais como glicose, frutose e maltose, sem a síntese simultânea de dextrana. A atividade enzimática encontrada para uma linhagem mutante (SH 3002) foi duas a três vezes mais alta que para a linhagem original crescida em sacarose. A capacidade de SH3002 produzir dextrana-sacarase sem formação de dextrana é considerada proveitosa na produção industrial desta enzima. A facilidade de isolamento da enzima deverá contribuir para o desenvolvimento de um método enzimático para a produção industrial de dextrana (MIZUTANI et al., 1994).

2.2.3 - Mecanismo de Ação Catalítica

A dextrana-sacarase catalisa a produção de dextrana quebrando a ligação entre a glicose e a frutose, ou seja, hidrolisando a sacarose, formando o grupo D-glicosil e transferindo-o para a cadeia do polímero em formação (BAZÁN, 1993). Mecanismos distintos ocorrem com ou sem a presença de aceptores na reação.

• Mecanismo sem Aceptor

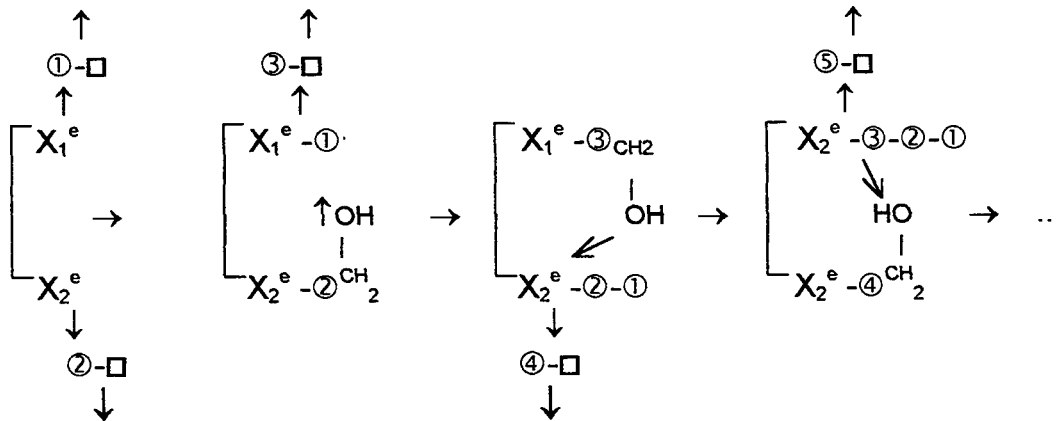
Em 1960, NEELY propôs um mecanismo que explica a formação da cadeia principal, mas não as ramificações presentes. Neste mecanismo a enzima teria dois

sítios ativos, doador e aceptor, e o crescimento da molécula de dextrana se iniciaria a partir da extremidade não redutora. A síntese da molécula do polissacarídeo seria finalizada pela dissociação ou inativação do complexo dextranosil.

Vários estudos sobre o mecanismo de ação da dextrana-sacarase foram realizados e várias teorias foram defendidas por muitos pesquisadores.

ROBYT e colaboradores (1974), utilizando técnicas cromatográficas e metodologia de carbono marcado, demonstraram um mecanismo de ação catalítica para a dextrana-sacarase sem a presença de aceptores. No mecanismo proposto, a enzima possui dois sítios ativos X1 e X2 e seus dois nucleófilos iniciam o processo atacando duas moléculas de sacarose, formando dois grupos complexos enzima-glicosil. Estes complexos estão formados por ligações covalentes através dos nucleófilos e o carbono1 da glicose. A hidroxila do carbono 6 de uma das unidades de glicose do complexo enzima-glicosil fazem um ataque nucleofílico ao carbono 1 de outra unidade de glicose, formando uma ligação α -(1,6), liberando um nucleófilo que ataca outra molécula de sacarose, formando um novo complexo enzima-glicosil. Em seguida, a hidroxila do carbono 6, do novo glicosil formado, faz um ataque ao carbono1 do isomaltosil formado na etapa anterior. O processo continua com os dois sítios, formando alternadamente, complexos com a glicose e a dextrana. A cadeia de dextrana cresce com as unidades de glicose sendo transferidas da sacarose presente no meio ao sítio ativo e sendo inseridas entre a enzima e o final redutor do polímero.

Na presença de sacarose, o final da cadeia ocorrerá quando a dextrana for liberada da enzima, e isso acontecerá quando o aceptor natural, por exemplo frutose ou glicose, estiver numa concentração suficiente para concorrer ao nível do sítio ativo com a sacarose. Um grupo hidroxila do aceptor natural efetua um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 da cadeia de dextrana. Este mecanismo está esquematizado na Figura 2.2.



X_1 e X_2 = grupos nucleófilos no sítio ativo

O = glicose

□ = frutose

O-□ = sacarose

O-O = glicoses ligadas por ligação α -1,6

Figura 2.2: Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT *et al.* (1974)

A formação das ligações α -(1,3), conforme foi proposto por ROBYT & TANIGUCHI (1976), 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.

• Mecanismo com Aceptor

KOEPSEL e colaboradores (1952) notaram que a adição de certos açúcares como maltose e isomaltose, na síntese de dextrana causavam a formação de oligossacarídeos de cadeia curta. Esta observação foi interessante, especialmente para o controle da produção de dextrana clínica com peso molecular médio 50.000 a 100.000 (NEELY, 1960).

A ação aceptora da dextrana-sacarase consiste na transferência de grupos D-glicosil da sacarose para outros carboidratos e ocorre durante a síntese de dextrana (ROBYT & EKLUND, 1983). Esses carboidratos são chamados aceptores (ROBYT & WALSETH, 1978). Foi observado que muitos carboidratos diferentes agem como aceptores e o mecanismo de reação dos aceptores foi estudado por ROBYT & WALSETH (1978).

Os aceptores agem como nucleófilos nos quais um grupo hidroxil (C_6-OH para o D-glicosil e maltose, C_5-OH para D-frutose) ataca o carbono 1 dos grupos glicosil e dextranosil no complexo com a enzima. Dextranas são obtidas pelo deslocamento do grupo dextranosil, e oligossacarídeos são obtidos pelo deslocamento do grupo D-glicosil. Quando a concentração do primeiro produto, proveniente da reação com o aceptor, torna-se suficientemente alta (10:1), o aceptor desloca continuamente o grupo D-glicosil a partir da enzima, diminuindo ou impedindo a biossíntese da dextrana.

2.2.4 - Cinética Enzimática

A cinética da reação de síntese da dextrana por dextrana-sacarase é geralmente descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, aplicável para níveis de sacarose abaixo de 10 a 15%, quando a saturação da enzima é alcançada (Alsop (1983).

PAUL *et al.* (1986), estudando a cinética da reação de síntese de dextrana pela enzima dextrana-sacarase na presença de maltose como um aceptor glicosil, mostraram que um aumento na concentração de maltose de 0 a 200 g/L produziu um aumento linear na constante aparente de Michaelis-Menten de 12 para 163 mM e a velocidade máxima de 5,8 U/mL aumentou para 19,1 U/mL.

2.3 - Dextrana

2.3.1 - Propriedades

A maioria das propriedades observadas para dextranas podem diferir de acordo com a linhagem do microorganismo produtor (JEANES, 1996). Sobre a hidrólise, o grau de ramificação encontrado diminui um pouco com a diminuição da massa molecular (DE BELDER, 1987).

O peso molecular da dextrana depende das condições de síntese tais como: temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares (ROBYT citado por BAZAN, 1993 e SABATIE *et al.*, 1986). Quando é sintetizada somente com sacarose, denomina-se dextrana nativa, apresenta em média, um peso molecular entre 30 e 90 milhões de daltons e alta viscosidade. Baixos pesos moleculares são obtidos na presença de outros açúcares (aceptores), como maltose e isomaltose, ou pela hidrólise da dextrana nativa (BAZAN, 1993).

A dextrana produzida pela linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) é completamente solúvel em água, metil sulfóxido, formamida, etilenoglicol, glicerol e hexametilfosforamida. Algumas frações de dextrana podem possuir um certo grau de cristalização e podem ser solubilizadas através de aquecimento (DE BELDER, 1987).

As propriedades reológicas da dextrana foram bastante estudadas, devido às suas aplicações industriais e uma solução de dextrana com concentrações até 5% (p/v) apresenta comportamento Newtoniano (JEANES, 1953 citado por CURRALERO, 1993).

A capacidade de complexar íons metálicos é outra importante propriedade da dextrana e aparentemente está relacionada com os grupos 3-hidroxil das ramificações α -(1,3). Esta constatação foi feita medindo-se a rotação ótica a 20°C, para dextranas com diferentes porcentagens de ligações α -(1,3) (SANFORD, 1983 citado por BAZAN, 1993).

Em soluções alcalinas, dextranas formam complexos de composição definida, mas estrutura incerta, com muitos íons metálicos como antimônio, cálcio, cobalto, cobre, ferro e urânio (JEANES, 1966).

Há direta correspondência entre a magnitude de rotação ótica e a proporção de ligações α -(1,3) da dextrana. Dextrana B-512(F) mostra valores de rotação ótica específica de +199°, +203° e +215° em água, hidróxido de potássio 1N e formamida, respectivamente (JEANES, 1966).

Alta proporção de ligações α -(1,6) em dextrana concedem excelente estabilidade à degradação sob condições ácidas ou alcalinas. Para hidrólise ácida, a energia de ativação para a dextrana B-512(F) está entre 30 e 35 kcal/moles (JEANES, 1966).

A caracterização de polissacarídeos é geralmente conduzida por vários métodos espectrofotométricos incluindo eletromicroscopia, infravermelho (espectrofotômetro),

dispersão óptica, e espalhamento de luz (BETTELHEIM, 1970 citado por KOBAYASHI et al, 1985).

Entretanto tem sido mostrado que soluções de dextrana de alto peso molecular dão forte intensidade de absorção ultra violeta. A intensidade de absorção varia com a concentração de dextransas. Um estudo a 220 nm mostrou existir uma correlação entre a absorbância e a concentração de dextransas até 1,5 mg/mL. Estes resultados indicaram que a intensidade de UV pode ser aplicado como um método de determinação quantitativa para dextransas nativas (KOBAYASHI et al., 1986).

Sacarose, D-frutose e D-glicose não proporcionam a leitura de absorbância, então, dextrana nativa de *Leuconostoc mesenteróides* pode ser especificamente detectada por este procedimento. A vantagem deste método é que a quantidade de dextrana de alto peso molecular pode ser determinada diretamente sem pré-tratamento ou reagentes, embora uma desvantagem seja o limite de detecção para amostras à baixas concentrações. Neste aspecto, o sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) combinada com o sistema de detecção ultra violeta pode melhorar a determinação da concentração de dextrana (KOBAYASHI et al, 1986).

2.3.2 - Aplicações

O uso de dextrana é baseado em certas características distintas que diferenciam dextransas de outros polissacarídeos do comércio. Estas características são afetadas fundamentalmente pelo peso molecular e distribuição de peso molecular, pelo tipo de estrutura, pela solubilidade ou insolubilidade da dextrana em água, ou se o polímero ou derivado do mesmo é utilizado (JEANES, 1966).

Dextransas de alto peso molecular são antigênicas e causam efeitos colaterais (ALSOP, 1983), por outro lado as de baixo peso molecular são completamente

metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos ou alérgicos (BAZAN, 1993).

As dextranas de baixo peso molecular são largamente utilizadas na indústria farmacêutica onde frações de vários pesos moleculares e distribuição de pesos moleculares são empregadas como expansores do plasma e auxiliares do fluxo sanguíneo. Esses produtos foram introduzidos pela primeira vez há trinta anos atrás, como substitutos do plasma sanguíneo como uma solução salina isotônica a 6% promovendo viscosidade e propriedades coloidais e osmóticas equivalentes às proteínas do plasma (ALSOP, 1983). São comercializadas de acordo com o peso molecular sendo a dextrana 70 (peso molecular médio 75.000 ± 25.000) utilizada como expansor do sangue e para manter a pressão arterial em casos de choque por queimaduras ou hemorragias severas, e a dextrana 40 (peso molecular médio 40.000 ± 20.000) empregada com a finalidade de aumentar a fluidez do sangue (ALSOP, 1983).

As soluções de dextrana clínica apresentam as vantagens de serem estáveis à esterilização por calor e a estocagem, independem do tipo sanguíneo, apresentam baixos incidentes de reações adversas e estão livres da transmissão de doenças (JEANES, 1966).

Ainda dentre as dextranas clínicas encontram-se a dextrana-sulfato, a ferro-dextrana e a dextrana hemoglobina. A dextrana-sulfato tem sido utilizada com sucesso como agente anti-coagulante, com propriedades semelhantes à heparina.

Recentemente têm sido investigadas suas propriedades anti-virais, inclusive contra o vírus HIV e a ferro-dextrana, complexo preparado de dextrana de peso molecular 5.000, é usada para o tratamento da deficiência de ferro (DE BELDER, 1987), particularmente para o tratamento de anemia em animais e seres humanos (ALSOP, 1983). Soluções preparadas de dextrana-hemoglobina são utilizadas como substitutos

do sangue, atuando como expensor do plasma e agindo na transferência de oxigênio (ALSOP, 1983).

A dextrana de peso molecular médio é muito utilizada tanto na indústria de alimentos como na indústria química. Na indústria química é usada com sucesso na produção de peneiras moleculares e os produtos mais conhecidos são SEPHADEX e DEAE-DEXTRANA. Na indústria de alimentos é aplicada como agente gelificante em gomas de mascar, como inibidor de cristalização em sorvetes, homogeneizador e espessante em doces e xaropes (BAZAN, 1993).

Encontra também usos significativos nas indústrias de fotografia e produção de cosméticos (ALSOP, 1983).

2.3.3 - Produção

Considerando a produção de dextrana nativa, particularmente da linhagem NRRL B-512(F) de *Leuconostoc mesenteroides*, não se deve esquecer que o principal produto da fermentação na presença de sacarose como substrato é a enzima dextransacarase (ALSOP, 1983). A enzima é extracelular, podendo ser isolada e usada para converter sacarose a dextrana na ausência do microorganismo ou ainda a dextrana pode ser obtida pelo processo convencional.

• Processo Convencional de Fermentação

A dextrana é produzida diretamente no meio de cultura durante o crescimento do microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*. Soluções de açúcar enriquecidas com nutrientes adequados, estimuladores de crescimento, tampões e sais minerais são inoculados com a bactéria em um pH próximo ao neutro. Deste modo a fermentação

ocorre em três etapas: fase de crescimento dos microrganismos, fase de produção da enzima e fase de reação da enzima com sacarose para produzir dextrana.

A temperatura aumenta muitos graus centígrados devido à natureza exotérmica da reação e ocorre uma queda no pH, devido à formação de subprodutos ácidos (ALSOP, 1983).

Diferentes condições ótimas de pH são encontradas para cada fase do processo de fermentação, tendo sido encontrado pH 7,0 para o crescimento celular, pH 6,0 a 6,9 para a produção da enzima e pH 5,2 para a produção de dextrana. Embora ocorram essas diferenças, este método foi tido como satisfatório para a produção de dextrana por muitos anos (ALSOP, 1983).

O término do processo se dá entre 18 e 24 horas, atingindo-se máxima viscosidade, pesos moleculares da ordem de 100 milhões e um rendimento em relação à sacarose inicial de aproximadamente 25% (BAZAN, 1993 e CURRALERO, 1993). A dextrana nativa é extraída do meio através de processos de centrifugação e precipitação com etanol (até 4% v/v) (BAZAN, 1993). A separação das células é dificultada pela alta viscosidade presente.

• Processo Enzimático

A enzima dextrana-sacarase é produzida por fermentação por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F), como primeira etapa do processo. A enzima produzida, na sua forma bruta ou purificada, é então utilizada na síntese "in vitro" da dextrana. A síntese "in vitro" apresenta um grande potencial econômico por ser a dextrana-sacarase uma enzima extracelular, sem intermediários fosforilados, não sendo

necessário energia adicional para sintetizar dextrana e por ser uma reação irreversível (BAZAN, 1993).

CURRALERO (1993) relacionou várias vantagens do processo enzimático em relação ao processo convencional:

- Purificação simplificada: no processo enzimático não ocorre aumento da viscosidade do caldo como no convencional, já que a produção de dextrana nativa, causadora de alta viscosidade se dá em meio já livre de microrganismos, não sendo necessário a separação das células.
- Maior rendimento: o rendimento teórico da síntese enzimática é de 100%, já que não há consumo de sacarose no crescimento microbiano. Em condições industriais, com concentrações de sacarose abaixo de 10%, a produção fica pouco abaixo do valor teórico.
- Melhores condições de controle: no processo tradicional ocorrem simultaneamente três etapas - crescimento celular (pH ótimo 7.0), produção de dextrana-sacarase (pH ótimo 6.0 a 6.9) e síntese de dextrana (pH ótimo 5.2); além das condições de temperatura e concentração de sacarose ótimas distintas. Este fato dificulta o controle, já que as condições são transitoriamente ótimas para cada processo. No processo enzimático o controle e otimização da fermentação e da síntese ficam grandemente facilitados.

Vários estudos foram realizados sobre o uso de aceptores na síntese enzimática de dextrana. ROBYT & EKLUND (1983), estudaram os efeitos quantitativos de diferentes aceptores na reação de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) e determinaram o número de produtos formados por cada acceptor. O efeito relativo de cada acceptor foi determinado pela comparação da porcentagem de D-glicose incorporada aos vários oligossacarídeos produzidos. A maltose foi o acceptor mais eficiente, desviando 75% dos grupos D-glicosil da sacarose para formar panose.

A quantidade de D-glicose desviada da dextrana ao produto acceptor foi dependente da razão maltose/sacarose.

SU & ROBYT (1993) demonstraram que um aumento na razão maltose/sacarose aumentou a quantidade de produtos aceptores e diminuiu a síntese de dextrana. Na síntese de dextrana de sacarose por dextrana-sacarase B-512(F), leucrose e isomaltose são sempre observados como produtos secundários; eles são resultado da reação de polimerização do D-glicosil.

ALSOP (1983) reportou que a distribuição de pesos moleculares e rendimento de dextrana sintetizada por dextrana-sacarase depende primordialmente da concentração inicial de sacarose. Utilizando técnicas de cromatografia de permeação em gel, verificou-se que com um aumento de 2% para 20% na concentração de sacarose, a quantidade de monossacarídeos formados, principalmente a frutose aumenta consideravelmente. A quantidade de dissacarídeos (principalmente leucrose) aumenta consideravelmente e a quantidade de dextrana de baixo peso molecular, incluindo oligossacarídeos, aumenta, principalmente acima de 10% de sacarose. Como consequência disso o rendimento em dextransas de alto peso molecular decresce drasticamente.

Um sistema de fermentação de cultura mista foi desenvolvido por KIM & DAY (1994), para a produção de dextransas. A coprodução utilizando 2 microrganismos diferentes (*Lipomyces starkey* e *Leuconostoc mesenteroides*), produzindo diferentes enzimas, foi necessário para produzir dextransas de pesos moleculares limitados. Na fermentação da cultura mista, em sacarose, o *L. starkey*, utilizou a frutose como fonte de carbono produzindo a enzima dextranase e aumentando a formação de leucrose. Em adição, a concentração de isomaltose e outros oligossacarídeos (produtos da hidrólise de dextrana por dextranase) foram mais altos, deslocando a frutose, como

acceptor. Estes oligossacarídeos foram incorporados à dextrana e vistos como um aumento na quantidade de dextrana clínica.

A fermentação da cultura mista manteve baixas viscosidades no caldo de fermentação, sendo cinquenta vezes menos viscoso que um caldo de cultura pura (KIM & DAY, 1994).

2.3.4 - Redução de Peso Molecular

Tanto o processo convencional como o enzimático, quando não utilizam aceptores, produzem dextrana de alto peso molecular (superior a $50 \cdot 10^6$) (CURRALERO, 1993).

Para a obtenção de dextrana a ser utilizada em produtos farmacêuticos e industriais, faz-se a redução do peso molecular da dextrana nativa. Dentre os métodos de redução do peso molecular estão: hidrólise ácida, hidrólise enzimática e clivagem por ultrassom (ALSOP, 1983). As principais vantagens da hidrólise ácida são a facilidade no controle, possibilidade de utilização de dextrana nativa úmida ou mesmo não isolada e a não exigência de equipamentos sofisticados (CURRALERO, 1983).

WOLFF *et al.* (1954) estudaram a hidrólise ácida da dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) para a obtenção de dextrana clínica e encontraram que a concentração inicial de dextrana não altera significativamente o resultado da hidrólise, havendo apenas um compromisso com a agitação em função da alta viscosidade observada em altas concentrações. Constataram também que para um mesmo pH (entre 1,0 e 1,5) o ácido clorídrico foi mais eficiente que o ácido sulfúrico, além deste trazer problemas de purificação devido ao fato de ocorrer a formação de sulfato de sódio depois da neutralização com hidróxido de sódio, bem menos solúvel em água que o cloreto de sódio (citado por CURRALERO, 1993).

SANTOS (1996) determinou as condições ótimas de hidrólise com ácido clorídrico, conseguindo um rendimento máximo de 95% a pH 1,5 e temperatura de 75°C, com 7 horas de hidrólise.

2.3.5 - Fracionamento

A distribuição de peso molecular do hidrolisado pode ser rapidamente medida por cromatografia de permeação em gel e a hidrólise pode ser finalizada quando o resultado mostrar o máximo número de moléculas na faixa de peso molecular desejada, como por exemplo de 10.000 a 100.000 para a dextrana clínica 40 (ALSOP, 1983).

A cromatografia de permeação em gel é um método cromatográfico que se baseia num processo físico, onde uma amostra adequadamente diluída é passada através de uma coluna empacotada com um meio cromatográfico que é um gel. A separação é resultado do acesso limitado das moléculas grandes dentro da estrutura porosa do recheio. Assim as moléculas que difundem para dentro do gel são retardadas na sua passagem através da coluna, comparadas às moléculas grandes que não podem difundir dentro do gel e se movem continuamente na coluna fluindo com o eluente. As moléculas com tamanho intermediário migram com velocidade entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada com seus tamanhos efetivos (SANTOS, 1996).

Outros métodos para determinar pesos moleculares como ultracentrifugação, dispersão da luz e técnicas cromatográficas para escala industrial são também utilizadas. Métodos para determinar peso molecular e distribuição de peso molecular de dextrana foram revisados em 1977, relatando as vantagens de se utilizar a Cromatografia de Permeação em Gel, por ser este um método rápido e sensível (ALSOP, 1983).

Barker e colaboradores realizaram diversas pesquisas sobre o fracionamento de dextrana utilizando várias técnicas cromatográficas. Com um cromatógrafo semi-contínuo em contra-corrente (SCCR5) para fracionamento de dextrana, BARKER et al. (1983) variaram certos parâmetros de operação como eluente, taxa de alimentação, temperatura, tempo de parada, alimentação e empacotamento da coluna, para avaliar seus efeitos sobre o sistema cromatográfico.

BARKER *et al.* (1987) obtiveram frações de dextrana utilizando cromatografia de permeação em gel para um sistema em batelada. Encontraram que um aumento em cada volume da carga de alimentação ou concentração de alimentação resultou na produção de material tendo médias de peso molecular altas.

Mais tarde, em 1988, BARKER e outros colaboradores descreveram um processo contínuo de fracionamento de dextrana, utilizando um cromatógrafo de permeação em gel em escala preparativa, semi-contínuo em contra-corrente. O sistema teve sucesso em remover frações de alto e baixo peso molecular e obteve produtos dentro da especificação. Acima de 90% de recuperação foi alcançada.

2.3.6 - Caracterização do Peso Molecular

Os principais tipos de pesos moleculares citados na literatura são o peso molecular numérico (M_n); o peso molecular ponderal médio (M_w) e o peso molecular viscosimétrico (M_v).

Os polímeros não são produtos homogêneos no que se refere ao peso molecular, mas sim, apresentam uma mistura de moléculas de pesos moleculares variados, a polimolecularidade. Para a caracterização da amostra é necessário o

conhecimento da distribuição de pesos moleculares e o peso molecular médio do produto (SANTOS, 1996).

O peso molecular numérico médio, representado pela Equação 2.1, depende do número de moléculas com determinado peso, e é geralmente obtido através de osmometria de membrana, osmometria de pressão de vapor e análise de grupos terminais pode ser expressa como (SANTOS, 1996):

$$M_n = (\sum_{i=1} n_i M_i) / \sum_{i=1} n_i \quad (2.1)$$

onde: M_i = peso molecular de moléculas de classe i

n_i = número de moléculas de classe i

O peso molecular ponderal médio (M_w) é definido pela Equação 2.2:

$$M_w = (\sum_{i=1} n_i M_i^2) / \sum_{i=1} n_i M_i \quad (2.2)$$

Este peso molecular depende do número e do peso das moléculas presentes na solução do polímero. É obtido principalmente por espalhamento de luz e laser.

O peso molecular viscosimétrico médio, Equação 2.3, se baseia na propriedade dos polímeros de produzirem soluções viscosas mesmo a grandes diluições, sendo determinado por viscometria. É influenciado não apenas pelo número e peso das moléculas do polímero, mas também por sua forma na solução. Depende do espaço ocupado pelas macromoléculas, causando resistência ao escoamento.

A Equação 03 representa o peso molecular viscosimétrico:

$$M_w = [(\sum_{i=1} n_i M_i^{1+a})]^{1/a} / \sum_{i=1} n_i M_i \quad (2.3)$$

onde: a é a constante que depende do sistema polímero-solvente e da temperatura;

2.4 - Frutose

2.4.1 - Propriedades

A frutose, também conhecida como levulose, é uma hexose, cuja fórmula molecular é $C_6H_{12}O_6$ e o peso molecular é igual a 180,16 Da (RUMESSEM, 1992 citado por SCHENEIDER, 1996).

Existe nos alimentos como açúcar simples, sendo também um constituinte frequente dos oligossacarídeos como inulina (O'DELL, 1993).

Os xaropes contendo frutose e a frutose propriamente dita apresentam propriedades funcionais múltiplas quando utilizados em alimentos ou bebidas. Estas propriedades podem ser atribuídas às suas propriedades físicas e químicas ou à interação da frutose com o sistema (HANOVER & WHITE, 1993).

Assim como a glicose, a frutose abaixa o ponto de congelamento dos alimentos, por possuírem baixo peso molecular quando comparadas com di e oligossacarídeos; e por serem açúcares redutores estes monossacarídeos desenvolvem cor nos produtos através da reação de Maillard, envolvendo proteínas e aminoácidos. Esta reação promove a formação de cor marrom e o estágio inicial da reação ocorre mais rapidamente com frutose do que com glicose (DILLS, 1993).

A doçura relativa da frutose em alimentos ou bebidas depende de fatores como temperatura, pH, porcentagem de sólidos e presença ou não de adoçantes no sistema. A frutose exibe um sinergismo com outros adoçantes e esta propriedade permite a obtenção de altos graus de doçura no produto final sem aumentar o nível total de

adoçantes ou promover a retenção de um grau satisfatório de doçura, enquanto reduz a quantidade de adoçantes utilizada e o custo (HANOVER & WHITE, 1993).

O perfil de doçura da frutose é diferente do perfil para a sacarose e dextrose, como mostra a Figura 2.3. A intensidade de doçura da frutose é percebida anteriormente à da sacarose e dextrose e a sensação do sabor atinge um pico (mais alto que o da dextrose) e diminui mais rapidamente que o da sacarose. Isto resulta em um melhoramento do flavor dos sistemas, que não é mascarado pela frutose (HANOVER & WHITE, 1993).

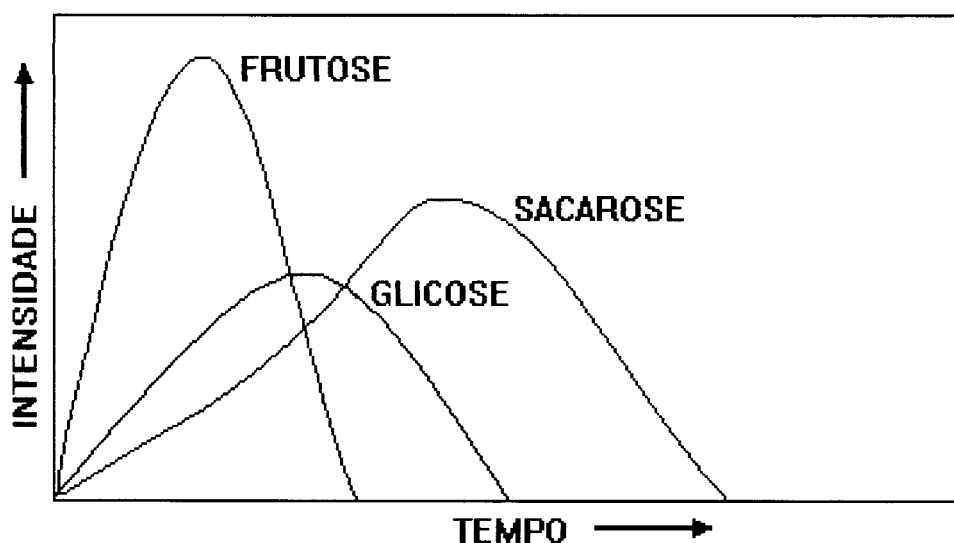


Figura 2.3: Comparação entre os perfis de intensidade de doçura (HANOVER & WHITE, 1993)

Outra importante propriedade da frutose é apresentar solubilidade de 4g/g água à 25°C sendo por isso, difícil ocorrer a sua cristalização em soluções aquosas (HANOVER & WHITE, 1993).

A frutose forma complexos estáveis com ferro e efeitos sobre cobre estão sendo estudados mais intensivamente. Em humanos, a frutose consumida como 20% de energia não tem efeito no balanço de cobre (O'DELL, 1993).

A molécula de frutose produz pressão osmótica mais alta e atividade de água mais baixa em alimentos, quando comparada com a sacarose ou outras moléculas de pesos moleculares mais altos. A Tabela 2.1 mostra o efeito da atividade de água de vários açúcares e humectantes. Esta propriedade da frutose permite a obtenção de baixa atividade de água em formulações de alimentos, aumentando a estabilidade microbiológica sem remover a umidade necessária para se obter a textura desejada e a qualidade dos produtos (HANOVER & WHITE, 1993).

Tabela 2.1: Comparação da atividade de água e solubilidade a 25°C para açúcares no estado cristalino e polióis.

Composto Cristalino	Atividade de Água a 25°C	Solubilidade a 25°C (g/g água)
Manitol	0.997	0.22
Maltose	0.952	0.85
Lactose (monohidratada)	0.931	0.23
Dextrose (monohidratada)	0.891	1.04
Sacarose	0.844	2.07
Sorbitol	0.725	2.70
Frutose	0.634	4.00

A frutose é um excelente humectante pois retém a umidade por um longo período de tempo a uma umidade relativa baixa e ainda melhora a funcionalidade do

amido em sistemas alimentícios que atingem uma viscosidade final mais alta comparando-se com a sacarose (HANOVER & WHITE, 1993).

2.4.2 - Produção e Mercado

O açúcar mais comumente usado, há muitos anos, vem sendo a sacarose, extraída de cana-de-açúcar ou de beterraba. Entretanto, devido aos problemas de cariogênese, arteriosclerose e diabetes, causados pela sacarose, inúmeros trabalhos começaram a ser realizados com o objetivo de se produzir açúcares alternativos. Esta busca por adoçantes mais saudáveis levou ao aparecimento do xarope de frutose e constitui um marco na indústria de alimentos (VANDAMME & DERYCKE, 1983 citado por SCHENEIDER, 1996).

A facilidade de manuseio do adoçante líquido e o baixo custo acelerou a aceitação do uso HFS (High Fructose Syrup) em alimentos e bebidas. Após 25 anos no mercado, o HFS era consumido em quantidades próximas à da sacarose nos Estados Unidos (VUILLEUMIER, 1997).

O consumo mundial de xarope de alta frutose (HFS) teve um crescimento de 700.000 toneladas em 1975 para 10,2 milhões de toneladas em 1995 e é esperado que 13,6 milhões sejam consumidos no ano 2000, como mostra a Figura 2.4 (VUILLEUMIER, 1997).

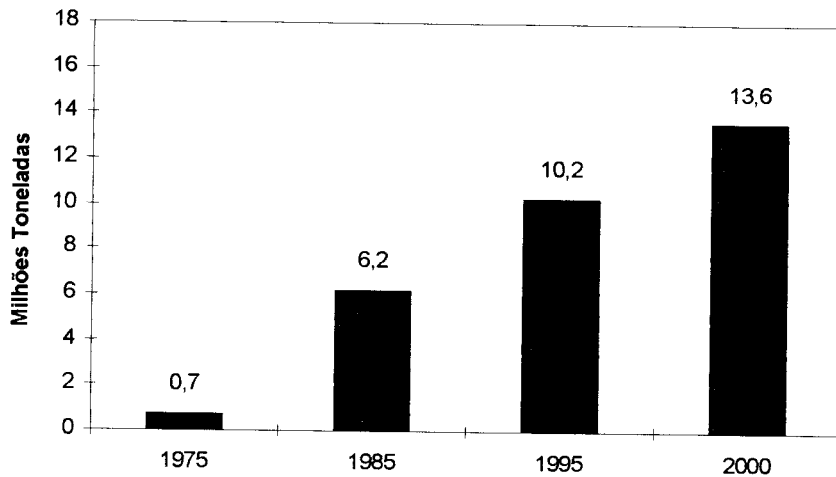


Figura 2.4: Consumo Mundial de HFS (VUILLEUMIER, 1997).

Desde há duas décadas atrás tem ocorrido uma rápida mudança no tipo de adoçantes usados nos Estados Unidos. Isto resultou num considerável aumento na disponibilidade da frutose livre dos adoçantes. Entretanto a disponibilidade da quantidade total de frutose dos adoçantes, que inclui frutose livre e frutose ligada, foi mantida relativamente constante, pois o aumento na disponibilidade de frutose livre do xarope de alta frutose foi acompanhado pelo decréscimo simultâneo na disponibilidade de frutose livre e ligada da sacarose. A taxa glucose-frutose dos adoçantes foi mantida constante nesta época (PARK & YETLEY, 1993).

A matéria-prima mais utilizada mundialmente para a produção de xarope de alto teor de frutose é o milho. O xarope de alta frutose derivado especificamente do amido de milho é chamado de FHCS (High Fructose Corn Syrup), enquanto que o xarope de alta frutose proveniente de outras formas é denominado HFS (High Fructose Syrup) (HANOVER & WHITE, 1993).

A produção do HFCS requer a extração do amido de milho por moagem úmida; sacarificação e liquefação para hidrolisar o amido à dextrose; isomerização para converter dextrose à frutose e posterior fracionamento da frutose (VUILLEMIER, 1997).

A tecnologia de separação cromatográfica disponível, usando carbono ativado ou óxido de ferro dão baixa eficiência na separação dextrose:frutose. Entretanto, a possibilidade de substituição da sacarose de alto preço na lucrativa indústria de bebidas carbonatadas, provocou um grande incentivo econômico para o desenvolvimento de um processo de separação de frutose. A Mitsubishi Chemical Industries desenvolveu um processo no qual a frutose é separada de dextrose e outros produtos da isomerização, utilizando resina de troca iônica na forma de cálcio, devido à maior afinidade da frutose por esse cátion (HANOVER & WHITE, 1993).

2.4.3 - Aplicações

A frutose, na dieta humana, pode ocorrer naturalmente nos alimentos ou ser adicionada ao alimento durante o processamento e a preparação, através do uso de adoçantes (PARK & YETLEY, 1993).

Na maioria dos alimentos a frutose livre é acompanhada pela glicose livre e sacarose em várias proporções e, a frutose em excesso de glucose é particularmente abundante em mel, maçãs, pêras e outras frutas, entretanto a maioria da frutose livre ingerida é adicionada aos produtos. A explicação primária para o uso da frutose na formação de alimentos e bebidas está relacionada com seu poder adoçante. A frutose é o mais doce de todos os carboidratos de ocorrência natural (HANOVER & WHITE, 1993).

As maiores aplicações para o HFS (High Fructose Syrup), xarope de alta frutose, são agora as bebidas carbonatadas e produtos de padaria. O uso do HFS proporciona a obtenção de produtos acabados quase idênticos àqueles adoçados com sacarose, sendo mais econômico e mais fácil de manusear que a sacarose, além de ser necessário menos espaço para estocar uma quantidade equivalente de adoçantes sólidos. É usado como adoçante em produtos lácteos como iogurte, leite achocolatado, sorvetes; melhorando a percepção do flavor e proporcionando rápida fermentabilidade em iogurtes e permitindo a obtenção de viscosidade adequada nos sorvetes e leites achocolatados. O xarope de alta frutose ainda melhora o flavor de frutas e estabiliza a cor dos produtos durante seu tempo de estocagem (HANOVER & WHITE, 1993).

A frutose cristalina foi introduzida em 1986, sendo um adoçante seco necessário em formulações da indústria de alimentos. A frutose cristalina é utilizada em cereais matinais, iogurtes, leites achocolatados, produtos de confeitaria, bebidas energéticas e confeitos doces, melhorando os processos de fabricação e reduzindo custos (HANOVER & WHITE, 1993).

Também encontra-se aplicação de frutose na nutrição de atletas. Devido à baixa elevação "pós prandial" do nível de açúcar no sangue após a ingestão da frutose, ou de alimentos contendo frutose, o nível de açúcar no sangue permanece praticamente constante, assegurando um suprimento ótimo de energia ao organismo, especialmente em casos da prática de esportes (SCHIWECK, 1988 citado por SCHENEIDER, 1996).

2.4.4 – Metabolismo e Absorção

O metabolismo de transporte da glicose tem sido extensivamente investigado, mas o mecanismo de transporte de frutose no intestino delgado em humanos continua desconhecido. Como a frutose é absorvida no intestino delgado em humanos, acredita-

se beneficiar pacientes diabéticos por produzir um pequeno aumento da glicose no sangue quando comparado com outros açúcares (SHI et al., 1997).

A frutose consumida via oral é absorvida por difusão no intestino delgado em velocidade menor que a sacarose ou a glicose, porém mais rapidamente que os polióis, sorbitol, xilitol e manitol (SHIWECK, 1988 citado por SCHINEIDER, 1996).

A capacidade intestinal humana de absorção de frutose na ausência de glicose é bastante heterogênea na população em geral, mas uma proporção relativamente grande de pacientes estudados foram capazes de absorver doses completas de frutose na faixa de 20 a 50 g, quantidades que são comumente encontradas em produtos adoçados com HFS ou frutose cristalina (RIBY et al., 1993).

A metabolização da frutose ocorre primeiramente no fígado, e as etapas iniciais são independentes da insulina. Devido à absorção lenta, transporte direto para o fígado e rápida metabolização, a frutose é adequada como carboidrato para diabéticos (SHIWECK, 1998 citado por SCHINEIDER, 1996).

2.5 - Processo de Separação de Frutose.

No processo de obtenção da dextrana, obtém-se uma solução de açúcares, contendo quantidades variáveis de frutose, leucrose, sacarose e outros oligossacarídeos, dependendo das condições de síntese. A separação desses açúcares é de grande interesse para as indústrias devido ao valor comercial atribuído a estes e várias técnicas cromatográficas podem ser utilizadas neste processo.

A frutose é um monossacarídeo, encontrados em muitas frutas e alguns legumes. Quando dissolvida em água, resulta em uma mistura complexa de isômeros

em equilíbrio, como α -D-frutopiranosose, β -D-frutopiranosose, α -D-frutofuranose, β -D-frutofuranose e uma solução aquosa a 20°C contém apenas 20% de frutose na forma de furanose. A proporção destas diferentes substâncias formadas pela frutose em solução pode variar com a temperatura, pH e outros fatores do meio. As fórmulas tautoméricas da D-frutose em solução estão representadas na Figura 2.5 (SCHENEIDER, 1996).

A cromatografia por troca iônica tem grande potencial na separação de carboidratos. Nesta, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel e podem ser eluídos por deslocamento com outros solutos com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação estacionária (COLLINS & BRAGA, 1995).

Muitos estudos foram realizados com relação à utilização de processos cromatográficos para separação de frutose, escolha de resinas para o empacotamento de colunas e condições de operação dos sistemas.

Processos envolvendo resinas de troca iônica geralmente fazem uso da permutação de íons com a resina. Exemplos desses processos são desmineralização, purificação e concentração. Entretanto, alguns processos estão sendo comercializados para simplesmente utilizarem o meio iônico que as resinas promovem, como no caso da separação não-iônica. Separações não iônicas são separações cromatográficas que ocorrem quando a distribuição de um soluto orgânico dentro e fora da resina é diferente da distribuição de uma segunda solução orgânica. Usando essa diferença é possível separar muitas soluções aquosas de materiais orgânicos pela simples eluição da coluna (com resina de troca iônica) com água deionizada (DECHOW, 1983).

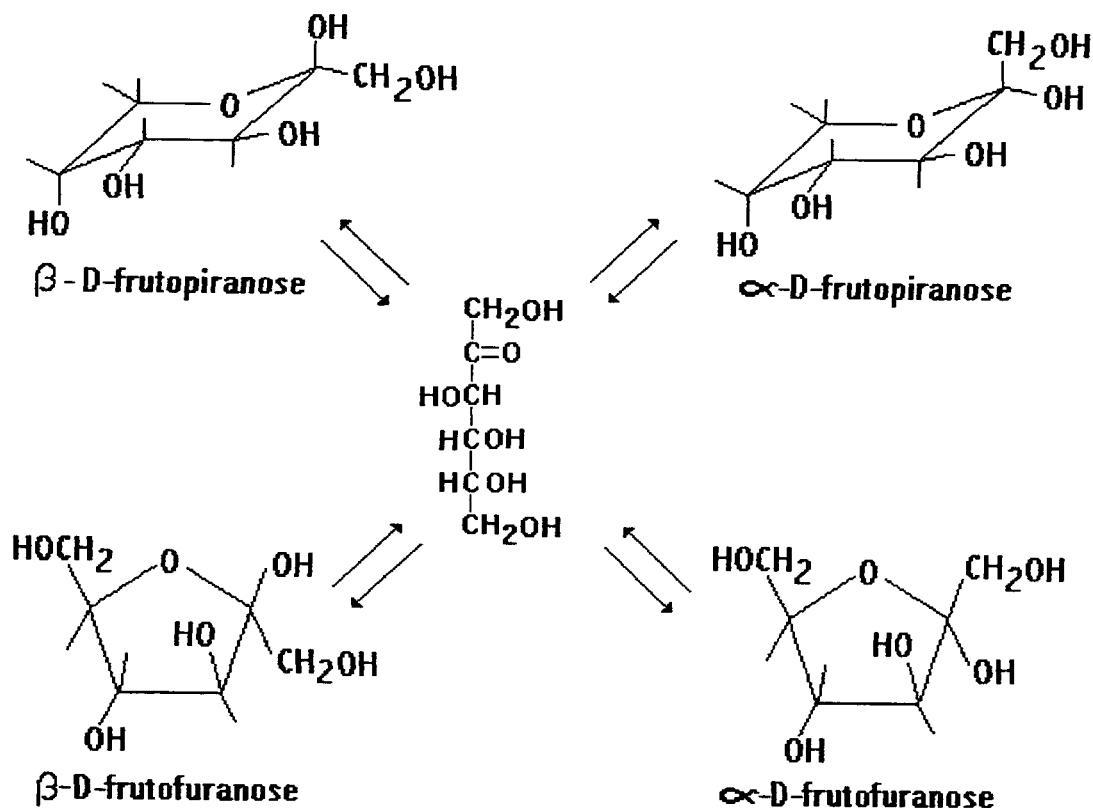


Figura 2.5: Formas tautoméricas da D-frutose em solução (SCHENEIDER, 1996)

LeFevre e Serbia, em 1962, aplicaram essa técnica para separar glicose e frutose, usando resina catiônica com 4 % de ligações cruzadas nas formas de Ba, Sr, Ag e Ca. A glicose e os sacarídeos maiores não formam um complexo tão forte com esses íons como a frutose. Então a glicose e os sacarídeos aparecem primeiro no eluente, seguidos pela mistura glicose-frutose e então a frutose relativamente pura. A resina na forma de Ca é preferida na cromatografia industrial (citado por DECHOW, 1989).

Em troca iônica podem acontecer várias interações entre os componentes da amostra e a resina. Adsorção é uma das interações mais comuns, embora o grau com

que a adsorção ocorre varie bastante.

Resinas de troca de cátions ou ânions apresentam fase aquosa no interior dos poros e entre as partículas de resina. O resultado é que os componentes neutros podem ser retidos na passagem pela coluna cromatográfica de troca iônica. Este fenômeno ocorre na cromatografia de exclusão iônica (GJERD & FRITZ, 1987).

A cromatografia de exclusão iônica é uma técnica antiga que teve atenção aumentada. Material iônico pode ser rejeitado pela resina de troca iônica devido à exclusão. Entretanto, substâncias não-iônicas podem se distribuir entre uma fase aquosa estacionária, líquido no interior das partículas da resina, e a fase líquida móvel entre as partículas da resina. Ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, álcoois, fenóis e outros materiais podem ser separados por esse método. Materiais iônicos são rejeitados pela resina e passam através dela, mas substâncias não-iônicas são retidas e então separadas. A resina de troca iônica age como uma membrana semipermeável entre as duas fases aquosas. Solutos ionizados da amostra são excluídos do líquido interior e passam rapidamente pela coluna; materiais não iônicos não são excluídos e se distribuem entre as duas fases citadas passando mais vagarosamente pela coluna. Solutos não-iônicos diferem em seus graus de retardamento pela fase da resina devido:

- diferença de atração polar entre o soluto e os grupos funcionais da resina;
- diferença nas forças de Van der Waals entre os solutos e a porção de hidrocarbonetos da resina.

O processo de exclusão iônica é então denominado desta forma quando usado para a separação de compostos iônicos de não-iônicos. Quando o processo é utilizado

para a separação de dois ou mais materiais não-iônicos, como glicose de frutose, o processo é denominado exclusão molecular (KELLER et al., 1981).

Ghim e Chang estudaram o efeito de diferentes formas iônicas de ânions e cátions na separação de frutose de glicose usando curvas de eluição. A Tabela 2.2 mostra os coeficientes de distribuição determinados pelos autores. Notaram que a ordem de eluição seria frutose, e então glicose, para as resinas aniônicas e glicose seguida pela frutose, para resinas catiônicas. É possível separar frutose de glicose usando resinas aniônicas, mas aplicações de cromatografia industrial utilizam somente resinas catiônicas. Isto acontece provavelmente porque as resinas catiônicas são geralmente mais duráveis e mais baratas que as resinas aniônicas (citado por DECHOW, 1989).

TABELA 2.2: Efeito de Counterions no Coeficiente de distribuição

forma iônica	Glucose	Frutose
SO_3^{-2}	0,45	0,27
CO_3^{-2}	1,43	1,00
H_2PO_4^-	0,16	0,08
Ca^{++}	0,30	0,80
Sr^{++}	0,30	0,80
Zn^{++}	0,20	0,30

(Dowex 1-X8 foi usada como resina aniônica e Dowex 50X8 como resina catiônica e o tamanho das partículas entre 200 e 400 mesh)

Em 1972, TAKASAKI reportou uma técnica de separação que pode ser empregada tanto para misturas de D-frutose e D-glicose, como para outros açúcares. O autor usou uma coluna com resina aniônica na forma de bissulfito e encontrou que a

eficiência da separação depende da temperatura da coluna. A melhor separação foi obtida a 35°C e somente água foi usada como eluente.

BARKER & GANETSOS (1985) utilizaram um cromatógrafo semi-contínuo com coluna empacotada com resina na forma de cálcio, com diâmetro das partículas entre 150 e 300µm (KORELAVO+C), para obter xarope de alta frutose de uma mistura contendo 42% de frutose, 52% de glicose e 6% de maltose e oligossacarídeos. Segundo os autores, a glicose é adsorvida com menos força e junto com maltose e oligossacarídeos, movem-se com a fase móvel (água deionizada). A frutose é retida pela resina, pois forma um complexo químico com íons cálcio, e é removida por um alto fluxo de água deionizada para dar um produto rico em frutose. O objetivo de obter um mínimo de 90% de frutose como produto e até 7% de impurezas no na porção rica em glicose foi atingido.

Dextrana e frutose foram produzidas pela primeira vez em um reator-separador cromatográfico em batelada em 1987 por BARKER & ZAFAR. A fase estacionária constituiu-se de uma resina de troca iônica na forma de cálcio e o eluente foi uma solução diluída de dextrana-sacarase. A separação resultou não só em dextrana pura, mas também em frutose altamente purificada e dextrana com peso molecular diferente do obtido em reatores convencionas. O reator precisou de um tempo para atingir o estado estacionário, porque uma certa quantidade de enzima é adsorvida na superfície da resina.

Mais tarde, em 1990, BARKER & KETAN JOSHI utilizaram um cromatógrafo semi-contínuo em contra-corrente (SCCR6) com resina de poliestireno à base de cálcio (Zerolit SRC14) para separação dos açúcares de melaço invertido de beterraba. Os íons cálcio presentes no melaço deslocavam íons cálcio da resina, resultando na pobre separação de glucose e frutose. Uma solução de nitrato de prata na purga da coluna

foi eficiente para manter os íons cálcio não permitindo a contaminação do produto rico em frutose.

VIARDE & LAMELOISE (1991) desenvolveram uma metodologia para modelagem de processos cromatográficos na indústria de alimentos. Isotermas de equilíbrio foram reportadas para resinas de troca iônica tipo gel a base de Ca^{+2} :

- Duolite Resins (Rohn and Hass Company), com dois tamanhos de partículas: 471 μm (C204/2115) e 269 μm (C204/2078)

- Dowex monosphere resin (Dow Chemical Company), com tamanho de partículas de 326 μm (C328)

Os autores obtiveram que a retenção da frutose é mais baixa a altas temperaturas (Tabela 2.3). Resinas com diferentes tamanhos de partículas foram utilizadas e pode-se concluir que houve concordância satisfatória entre os resultados experimentais e curvas simuladas. O modelo pode ser usado como guia na escolha da resina e condições de operação de separação cromatográfica dos dois açúcares.

Tabela 2.3: Coeficientes de partição (K_d) para glicose e frutose.

Resina	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_d glicose	K_d Frutose
Duolite C204/2115	60	0,34	0,46
Duolite C204/2078	30	0,36	0,59
	60	0,37	0,47
Dowex C326	30	0,42	0,72
	60	0,42	0,64

HO, CHING e RUTHVEN (1987) fizeram um estudo comparativo entre zeolitas e 2 resinas absorventes para a separação de misturas de frutose-glicose:

- Ca^{+2} Zerolit 225 SRC14 (0,25mm)

- Ca^{+2} Duolite c-214 (0,30mm)

- CaX Zeolit Si/Al = 2,2 (1,5mm)

- CaY Zeolit Si/Al = 1,3 (1,0mm)

Mostraram que a zeolita CaX não apresentou seletividade entre glicose e frutose, mas a seletividade de CaY é comparável com a da resina de troca iônica `a base de cálcio (Duolite C204). A melhor das resinas adsorventes (Zerolite 225SRC14) apresentou seletividades mais altas que a da zeolita CaY, mas a zeolita obteve a vantagem de, para um dado tamanho de partículas, a resistência a transferência de massa é considerada pequena. Observaram que, operando a altas concentrações, é necessário que o processo de separação ocorra a temperaturas elevadas, geralmente 55 a 60°C (para diminuir a viscosidade e manter a pressão) e que a temperaturas mais altas que 65°C, ocorre uma redução na qualidade do produto. Segundo os pesquisadores, a análise final da escolha do adsorvente dependerá mais dos fatores como custo e durabilidade, que da cinética fundamental e propriedades de equilíbrio.

Um processo para remoção de oligossacarídeos foi descrito por Hirota e Shioda (citado por DECHOW, 1989). Eles usaram uma resina catiônica na forma de cálcio para obter uma solução contendo 94 a 97% de frutose e menos que 2% de oligossacarídeos. O fluxo da solução rica em glicose teve uma pureza de 79 a 89% com uma concentração de oligossacarídeos de 9 a 20%. O fluxo rico em oligossacarídeos apresentou uma solução com 64 a 76% de oligossacarídeos. O baixo nível de oligossacarídeos na solução de alimentação (7 a 14%) e a alta pureza da corrente de frutose torna o processo aceitável para a remoção cromatográfica industrial de componentes residuais (DECHOW, 1989).

A cromatografia de troca de ligante foi revisada por STEFANSSON & WESTERLUND em 1996 . Este sistema também consiste de ions metálicos eletrostaticamente imobilizados em uma resina trocadora catiônica (poliestireno-divinilbenzeno com 4 a 8% de ligações cruzadas) usando água como fase móvel. Um

certo número de moléculas de água se ligam ao íon metal e quando uma mistura de carboidratos é introduzida na fase móvel, os componentes da amostra deslocam algumas moléculas de água, formando um complexo doador-aceptor. A separação é influenciada pela força iônica, pH e temperatura. Os pesquisadores encontraram um aumento na capacidade de separação de carboidratos, com um aumento na porcentagem de ligações cruzadas da resina e também demonstraram que a complexação ocorre mais rapidamente com a unidade de açúcar ionizada, existindo um aumento na retenção à pH maior que 11. Os valores de pKa para os carboidratos variam de 12 a 14 e o cálcio produz grande desvio no tempo de eluição dos carboidratos, promovendo a separação (STEFANSSON & WESTERLUND, 1997).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se a sacarose (açúcar cristal comercial) tanto na produção da enzima dextrana-sacarase, bem como na produção “in vitro” da dextrana. Outros reagentes usados nas análises são de pureza analítica.

O microrganismo utilizado nas fermentações para produção da enzima dextrana-sacarase foi o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F.

3.1 - Síntese de Dextrana

A síntese “in vitro” de dextrana foi realizada com a enzima dextrana-sacarase utilizando como substrato a sacarose.

A dextrana-sacarase foi produzida por fermentação utilizando o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, em meio rico em sacarose. Para produção e purificação da enzima dextrana-sacarase foi utilizada a metodologia empregada por Bazán (1993), descrita a seguir.

3.1.1 - Meio de Cultura Padrão para a produção de dextrana-sacarase

A Tabela 3.1 mostra o meio de cultura padrão empregado para a produção da enzima.

A sacarose (açúcar comercial) e o extrato de levedura foram dissolvidos em água destilada, então foram adicionados os oligoelementos e o volume foi completado até atingir as concentrações desejadas e o pH ajustado a 6,7 com HCl concentrado. A

solução de fosfato foi preparada separadamente e o pH também ajustado a 6,7. Ambas as soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C por 15 minutos e misturados depois de frias. A esterilização foi realizada separadamente para evitar a precipitação do sal, quando este é autoclavado em presença dos demais componentes do meio.

Tabela 3.1: Meio de cultura padrão determinado por Queiroz e Maugeri (citado por Bazán, 1993) com alteração na concentração de sacarose de 40g/L para 50g/L.

Componentes	g / l
Sacarose (açúcar cristal comercial)	50
Extrato de Levedura (marca DIFCO)	20
Sulfato de Magnésio (marca Ecibra, P.A.)	0,2
Cloreto de Sódio (marca Synth, P.A.)	0,01
Sulfato Ferroso (marca MERCK, P.A.)	0,01
Sulfato de Manganês (marca Ecibra, P.A.)	0,01
Cloreto de Cálcio (marca Synth P.A.)	0,02
Fosfato de Potássio Dibásico (marca Synth P.A.)	20

3.1.2 - Reativação do Microrganismo *Leuconostoc mesenteroides*

O microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* estocado, congelado, foi inoculado no meio padrão e várias repicagens foram realizadas para sua reativação. Foram necessárias quatro pré-fermentações e a atividade enzimática foi medida a cada etapa realizada, sendo a atividade final, ou seja, após a última pré-fermentação, igual a 46,5 UDS / min.

3.1.3 - Inóculo

Após ativação do microrganismo, inoculou-se o meio de cultura estocado contendo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F em erlenmayer contendo meio padrão estéril (10% de inóculo). Após a inoculação foi realizada a incubação a 27°C e 150 rpm por 10 horas.

3.1.4 - Alimentação

Utilizou-se o sistema de alimentação com adição de sacarose combinada com o sistema controlador do pH. Este sistema foi utilizado por Bazán (1993), pois a demanda de sacarose está associada ao crescimento e desta forma o controle do pH é adequado. Foram, preparadas uma solução de sacarose (200g/L) e outra de NaOH 5M, esterilizadas separadamente a 121°C por 15 minutos e então misturadas depois de frias, para obtenção de uma solução com concentração final de 160 g/L de sacarose e 40 g/L de hidróxido de sódio (NaOH 1M).

3.1.5 - Produção da Enzima

Em um fermentador de 3 litros de capacidade, contendo 900 mL do meio padrão estéril, foi adicionado o inóculo, incubado a 27°C com aeração de 0,5 L/min, agitação de 200 rpm e controle de pH. O pH foi mantido em $6,7 \pm 0,2$ pela adição da solução combinada de sacarose e NaOH, preparada de acordo com o item 3.1.3, através da ação de uma bomba operada pelo controlador automático de pH do fermentador. Depois de aproximadamente 7 horas de fermentação, a alimentação foi cortada para reduzir a quantidade de açúcares redutores totais e no final da fermentação, o caldo fermentado teve seu pH acertado a 5,2 com solução de HCl (1M).

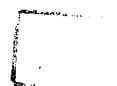
3.1.6 - Purificação da Dextrana-sacarase

O caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm a 4°C, por 15 min, para separação das células bacterianas e o sobrenadante foi colocado em banho de gelo e em seguida submetido a um processo de ultrafiltração para promover a concentração do meio. A uma temperatura de aproximadamente 4°C, foi adicionado lentamente ao concentrado um volume igual de uma solução de polietilenoglicol 1500 (PEG 1500) 50% (p/v) para precipitação da enzima. Quando a solução tornou-se turva, com o aparecimento de partículas esbranquiçadas, a adição de PEG foi interrompida, e o meio foi então centrifugado nas mesmas condições anteriores. A fase inferior rica em dextrana-sacarase, foi rediluída numa solução tampão de acetado de sódio 200 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio e estocada em frascos a -15°C.

3.1.7 - Síntese "In Vitro" de Dextrana

A produção de dextrana foi realizada num reator de vidro com agitador mecânico, devidamente termostatizado. Foram adicionadas ao reator, segundo os trabalhos de SANTOS (1996), uma solução de sacarose 100 g/L seguida da adição da enzima dextrana-sacarase 40 UDS/mL, temperatura de reação foi de 20°C e o pH foi mantido a 5,2, valor este que é o ótimo de atividade e estabilidade da enzima.

O avanço da reação foi acompanhado pela retirada de 1mL de amostra em intervalos regulares de tempo para a dosagem da frutose liberada. A amostra foi aquecida em banho-maria por 10 min para inativação da enzima e a frutose quantificada pelo método DNS (MILLER, 1959). A reação de polimerização foi interrompida quando a concentração de frutose se repetiu pelo menos duas vezes. O produto da reação foi então estocado a -15°C.



3.2 - Resinas Empregadas na Adsorção de Frutose

Neste trabalho foram utilizadas três diferentes resinas para a separação da frutose contida no produto de síntese de dextrana, cujas características e condições de utilização serão descritas a seguir.

3.2.1 - Resina Dowex 50W X4 - 200R

Dowex 50W X4, utilizada em testes preliminares, é uma resina de troca iônica catiônica na forma de hidrogênio (H⁺), com matriz polimérica (gel poliestireno-divinilbenzeno), com 4% de ligações cruzadas. Apresenta capacidade de adsorção de 1,1 meq / mL de resina úmida. Apresenta uma umidade de 64,7% e tamanho de partícula de 0,3 a 1,2 mm, com uma densidade de 1,20 g/L.

As condições de operação recomendadas pelo fabricante (Dow Chemical S/A) são: temperatura máxima de 120°C, pH de 0 a 14 e utilização de NaCl, HCl ou H₂SO₄ como substância de regeneração e um volume de 5 a 6 vezes o volume do leito para a lavagem da resina.

3.2.2 - Resina Dowex 50W X8

É uma resina de troca iônica catiônica, tipo gel com (matriz polimérica estireno-divinilbenzeno) com 8% de ligações cruzadas. Possui grupo nuclear ativo ácido sulfônico e como forma iônica o hidrogênio.

Apresenta capacidade de separação de 1,7 meq / mL resina úmida, conteúdo de umidade de 50 a 56% e tamanho de partícula de 200 mesh. A temperatura de operação

recomendada é de 150°C, e uma faixa de 0 a 14 para o pH de trabalho, sendo que a resina se encontra na forma iônica de hidrogênio.

Pré-tratamento:

1. Hidratação:

A resina se encontra em uma forma úmida para comercialização, entretanto a exposição ao ar ambiente durante a estocagem pode causar uma secagem do material que deve ser umidecido antes do uso. Portanto a resina foi transferida para um bécker de 500 mL ao qual foi adicionado água deionizada suficiente para atingir aproximadamente 4 cm acima do nível da resina. A solução foi agitada lentamente por um minuto para garantir uma mistura completa, deixando-se o material descansar por 15 min. A água sobrenadante foi descartada e o procedimento repetido.

2. Empacotamento da resina na coluna de vidro:

Após hidratação, a resina Dowex 50W X8 foi empacotada em uma coluna de vidro de 40 cm de comprimento e 1cm de diâmetro (Pharmacia Biotech C10/40), encamisada para controle da temperatura durante a separação. O excesso de água da coluna foi ocasionalmente drenado, mantendo sempre o nível da resina.

A resina foi adicionada na coluna até atingir uma altura de leito de 32 cm, com as partículas acomodadas e sem a presença de bolhas de ar.

3. Regeneração - Troca Iônica:

Em seguida ao empacotamento, a coluna foi lavada com água deionizada, utilizando-se dez vezes o volume do leito, para assegurar uma completa hidratação.

O passo de regeneração foi necessário para converter a forma iônica de hidrogênio para cálcio. A metodologia de troca empregada foi a mesma sugerida no catálogo do fornecedor da resina (Supelco, Inc 1994).

O regenerante utilizado foi o cloreto de cálcio (CaCl_2) com concentração de 10% e o volume utilizado foi calculado através da seguinte expressão:

$$V_{reg} = \frac{C_{ads} / V_{res} \times R_{re}}{N_{reg}} \quad (3.1)$$

onde: V_{reg} = Volume de leito de regenerante

C_{ads} = Capacidade adsorção

V_{res} = Volume de resina

R_{reg} = Requerimento de regenerante

N_{reg} = Normalidade de regenerante

onde a capacidade de adsorção por volume de resina foi obtida do catálogo da resina, assim como o requerimento regenerante.

Os ions hidrogênio foram então trocados por ions cálcio pela eluição com uma solução de cloreto de cálcio a 10% e acompanhou-se a troca através da leitura de pH da solução de lavagem da coluna.

3.2.3 - Resina Dowex XUS-40285

XUS-40285 é uma resina hidrofílicamente funcionalizada. É caracterizada pela alta área superficial e alta porosidade. O adsorvente funciona como o carbono ativado, o qual possui um grande número de pequenos poros ou sítios de adsorção. No entanto,

se difere do carbono ativado por conter macroporos que melhoram o movimento da solução no interior e exterior da partícula. Permite boa hidratação e compatibilidade com ácido e base como regenerante, sendo um polímero de estireno com alta porcentagem de ligações cruzadas, alta estabilidade em ácido (HCl 10%), base (soda cáustica 10%) ou solventes orgânicos.

Apresenta capacidade total de troca de 0,5 meq / mL, umidade de 45 a 55% e densidade de 1,04 g / cm³. A máxima temperatura de operação em água é de 60°C e a resina possui partículas de área superficial de 800 m² / g e tamanho de poros de 25 Angstrons.

Pré-tratamento:

1. Hidratação e Empacotamento:

A hidratação da resina XUS-40285 foi realizada em bécker com água deionizada, do mesmo modo como foi realizado para a resina Dowex 50W X8, assim como seu posterior empacotamento em coluna de vidro de mesmas dimensões.

2. Regeneração:

O adsorvente, após a hidratação e empacotamento na coluna de vidro, foi regenerado em preparação para uso. A ativação foi realizada permitindo-se primeiramente a passagem de uma solução 0,55% (p / v) de NaOH pela coluna (dez vezes o volume do leito) num vazão de 2,5 mL / min e posterior lavagem com água deionizada até a neutralização. Então realizou-se a passagem de solução e 0,5% (p / v) de HCl (dez vezes o volume do leito) e posterior lavagem até pH próximo ao neutro, com água deionizada.

3.3 - Gel Superdex 30

Utilizou-se uma coluna pronta da Pharmacia Biothec, empacotada com o gel superdex 30, produzido pela ligação covalente de dextrana aos poros de partículas de agarose (com alta porcentagem de ligações cruzadas).

Este adsorvente combina alta força mecânica com um caráter altamente hidrofílico, permitindo altas taxas de fluxo e mínimas interações específicas. Outra característica do gel é a estabilidade em relação ao pH, podendo ser usado em meios aquosos sob uma faixa de pH de 3 a 12, para operações contínuas e pH de 1 a 14 para procedimentos de limpeza.

3.4 - Separação de Frutose

3.4.1 - Testes preliminares

Utilizou-se a resina Dowex 50W X4 para os testes preliminares afim de se determinar as condições ideais tanto para a separação da frutose como, para uma posterior análise das amostras no sistema HPLC.

Primeiramente foi usada uma coluna de vidro de 18 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro com uma altura de leito de 5 cm, na vazão de 0,39 mL / min e temperatura de 25°C (ambiente) para as concentrações da amostra de síntese injetada, de 0,2, 5,0 e 50% (p / v). Em todas as separações, as amostras da síntese de dextrana contendo frutose, foram diluídas em água deionizada. A injeção foi efetuada através de uma seringa plástica de 1 mL, sendo o volume de injeção de 0,05, 0,1 e 0,1 mL respectivamente às concentrações.

Mediu-se as concentrações de frutose nas alíquotas recolhidas em um coletor de amostras, através do método DNS e também através da injeção em sistema HPLC. Porém as condições empregadas não possibilitaram a detecção de frutose nas alíquotas.

Desta forma variou-se as diversas condições do processo de modo a encontrar a condição que proporcionasse a quantificação de frutose e dextrana nas alíquotas coletadas e conseqüentemente a eficiência da separação.

As condições dos testes preliminares e suas variações são mostradas no capítulo de resultados.

3.4.2 - Separação Cromatográfica em Coluna de Vidro

O produto direto da síntese de dextrana foi submetido a um processo de separação cromatográfica em coluna de vidro empacotada com o adsorvente teste. Este procedimento foi utilizado tanto para a resina Dowex 50W X8 como para a resina Dowex XUS-40285.

Foram utilizados uma coluna de vidro encamisada (Pharmacia Biotech C10/40), com 1 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, um banho termostático (Tecnal TE-184) com controle automático de temperatura; uma bomba (Masterflex 50/60 de vazão máxima 3,6 mL/min) e um coletor de frações (Fraczil 100).

As separações foram realizadas nas temperaturas de 35, 45 e 60°C para as vazões de 0,1 e 0,55 mL / min.

Primeiramente foi permitida a circulação do eluente (água deionizada - sistema Milli-Q Plus) na coluna encamisada, na taxa de fluxo desejada (0,1 ou 0,5 mL / min). O pH do eluente foi acertado para um valor próximo de 7,0 com NaOH 0,5% (p / v). O banho termostático foi conectado à camisa para manter a temperatura constante (35, 45 ou 60°C).

O coletor de amostras foi então acionado e após 10 min (para a vazão de 0,1 mL / min) ou 2 min (para a vazão de 0,55 mL / min) uma amostra da solução de síntese de dextrana, contendo frutose, foi introduzida na coluna por intermédio de um "Loop" (anel).

O volume de injeção de amostra utilizado foi o mesmo sugerido por COLLINS & BRAGA (1995) : 1 a 5% do volume do leito, neste caso 1,3 mL de solução de síntese de dextrana. Este volume correspondente à 5% do volume do leito foi adequado para posterior injeção das alíquotas coletadas num sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Alíquotas de 1 mL (para a vazão de 0,1 mL / min) e 1,1 mL (para a vazão de 0,55 mL / min) foram coletadas na saída da coluna e congeladas para posterior análise por cromatografia em um sistema HPLC, para determinação das porcentagens de frutose e dextrana nas amostras.

Após o processo de separação, realizou-se a limpeza da coluna pela passagem de dez volumes de leito de água deionizada em fluxo invertido. A regeneração da resina Dowex 50W X8 foi realizada através da lavagem da coluna com solução 10% de cloreto de cálcio (10 volumes de leito). Para a resina Dowex XUS-4085, no procedimento de regeneração, foram utilizados NaOH 0,5% e HCl 0,5% como descrito no item 3.2.3 (em regeneração). O esquema da montagem experimental para separação da frutose pode ser visto na Figura 3.1.

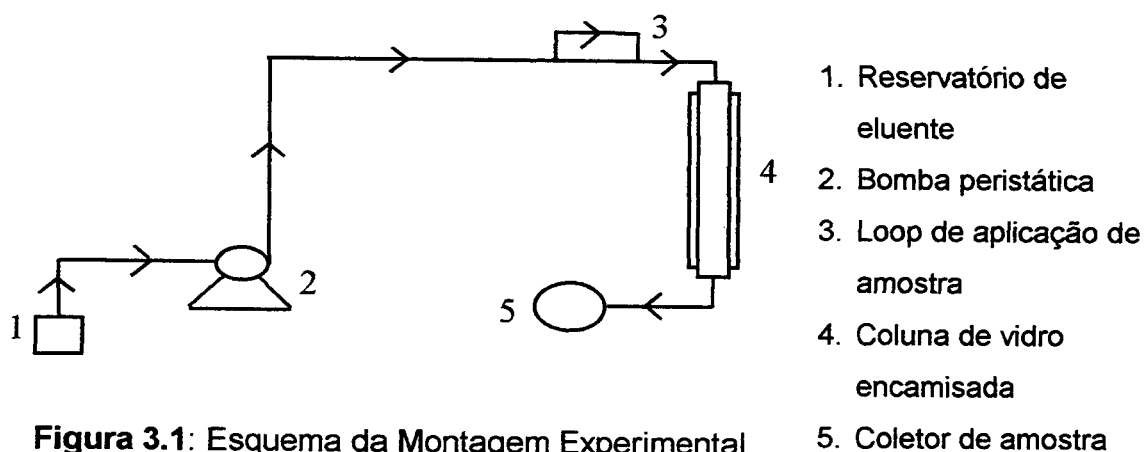


Figura 3.1: Esquema da Montagem Experimental

3.4.3 - Sistema de Separação da Frutose da Síntese em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Utilizou-se para esta separação, uma coluna HILOAD 16 / 60 (PHARMACIA BIOTECH) com diâmetro interno de 16 mm e altura do leito de gel (Superdex 30) empacotado de 60 cm. As características da coluna podem ser observadas na Tabela 3.2.

Foram também necessários, no processo de separação: banho termostático (Tecnal TE-184), coletor de frações automático Frac 100 (Pharmacia Biotech), Loop de injeção; Bomba de alta precisão (Pump P-500); Bomba peristáltica (Pump P-1), monitor (Software FPLC Director); monitor UV (Pharmacia Biotech Uvicord SII) e controlador de cromatografia líquida LCC-501 Plus (Pharmacia Biotech).

Água deionizada foi utilizada como eluente e a separação foi realizada numa vazão de 1mL/min e temperatura de 45°C

A preparação da amostra da síntese de dextrana foi efetuada através da diluição da mesma em água deionizada numa proporção de 1/ 3 (dextrana / água).

Tabela 3.2: Características da coluna Hiloal 16 / 60 empacotada com gel superdex 30.

PROPRIEDADE	DESCRIÇÃO
Volume de Leito	120 - 124 mL
Volume de amostra	até aproximadamente 5 mL
Máxima Pressão - Operação Contínua	3 bar
Número de Pratos Teóricos / metro	> 13.000 N / m
Tamanho Médio da Partícula	Aproximadamente 34 μ m
Estabilidade Química	- Todos os tampões comumente usados - Etanol 70%
pH (faixa de trabalho)	3 - 12
pH (limpeza)	1 - 14

Permitiu-se a circulação do eluente na coluna e após estabilização da vazão desejada (1mL / min) uma amostra de 4 mL da síntese de dextrana foi introduzida na coluna por intermédio de um "Loop".

Após 10 min o coletor de amostras foi ativado e alíquotas de 2,5 mL foram retiradas da coluna por um tempo de 240 min. As amostras foram congeladas para posterior análise em HPLC, para determinação das concentrações de dextrana e frutose, como para as resinas Dowex 50W X8 e Dowex XUS 40285.

3.5 - Intensidade de Absorção UV de Dextrana em Sistema FPLC

Uma amostra de solução da síntese de dextrana contendo frutose, foi diluída na proporção de 1/3 (dextrana / água deionizada) e então introduzida no aplicador de amostra.

A solução foi inserida em uma coluna, contendo gel superdex 30, na forma de um loop e eluída com água deionizada, circulando através da bomba peristáltica na vazão de 1 mL / min e temperatura de 25°C (ambiente).

Permitiu-se a passagem da solução de eluição em um sistema detector Ultra Violeta (UV) e a intensidade de absorção, a 216 nm, foi observada através do software FPLC Director.

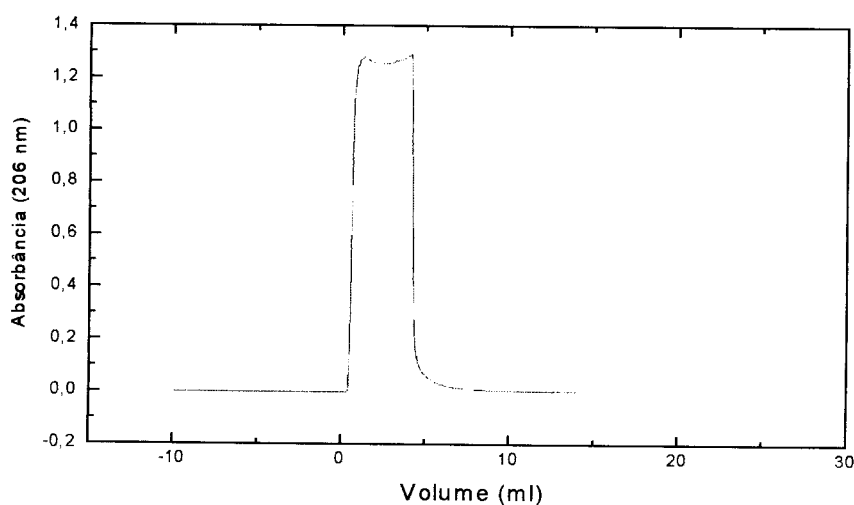


Figura 3.2: Perfil de concentração de dextrana - absorção UV

O perfil de concentração para o teste de absorção UV de dextrana se encontra na Figura 3.2. O pico obtido para dextrana pode ser visto na faixa de volume de

eluição de aproximadamente 0 a 5 min e a frutose não é detectada por este sistema de separação.

3.6 - Métodos Analíticos

3.6.1 - Determinação de Açúcares Redutores

Para esta determinação foi utilizado o método DNS (MILLER, 1959), também usado por BAZAN (1993), cujo procedimento está descrito abaixo.

Preparação do Reagente DNS

Foram dissolvidos, a quente, 10,16 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1416 mL de água destilada. Adicionou-se a esta mistura 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,32 g de meta bissulfito de sódio. Este reagente foi estocado em frasco âmbar e paralelamente foi preparada uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio 11,25 g/L.

Curva Padrão

Para construção da curva padrão, foram preparadas soluções de glicose, com concentrações na faixa de 0,1 a 1 g/L de açúcares redutores. Foram adicionados 1 mL de cada uma dessas soluções de concentração conhecida em tubos de ensaio contendo 1 mL de reagente DNS, e levou-se em banho-maria em ebulição por 5 min. Resfriou-se instantaneamente pela imersão dos tubos em banho de gelo fundente, em seguida foram adicionados 16 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 11,25 g/L, para estabilizar a cor. Agitou-se o tubo para homogeneização e foi feita a leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (Modelo B342 II da Micronal). O branco foi feito juntamente com as amostras, substituindo-se a solução de açúcar

reduzidor, por 1 mL de água destilada. Após obtenção das leituras de absorvância (ABS) construiu-se a curva padrão do tipo: $[g/L] = f(ABS)$

As amostras foram diluídas de forma a se obter concentração de açúcares redutores na faixa de 0,1 a 1 g/L. Das amostras convenientemente diluídas retirou-se 1 mL e procedeu-se da mesma forma descrita na curva padrão, para determinar a absorvância. Com o auxílio da curva padrão ou da equação determinada, obteve-se a concentração de açúcares redutores.

A reação do DNS com açúcares redutores resulta em uma solução de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcares redutores presentes na amostra. Uma correlação entre a concentração de açúcares redutores (neste caso a frutose) e a intensidade da cor amarela (medida pela absorvância) é obtida submetendo soluções de frutose com concentrações conhecidas ao teste e fazendo-se a leitura da absorvância como foi descrito acima.

3.6.2 - Determinação de Atividade Enzimática

Determinou-se a atividade da enzima nas repicagens de ativação, no final da fermentação e nas etapas de purificação da dextrana-sacarase.

A atividade da enzima foi determinada medindo-se a velocidade inicial de produção de frutose, quando a enzima foi colocada em contato com sacarose em condições controladas, utilizando um reator de vidro de 25 mL de volume, agitado magneticamente e termostaticado a 30°C. Adicionou-se ao reator 2 mL de solução de sacarose (600 g/L), 1 mL de tampão acetato de sódio 200 mM a pH 5,2, contendo 2,5 g/L de $CaCl_2$, e 8 mL de água destilada.

Após a adição de 1 mL da amostra de dextrana-sacarase retirou-se amostras de 1 mL a cada 3 min durante 12 min. Construiu-se a curva de absorvância em função do tempo e com o valor da inclinação da reta obtida e a curva padrão do DNS determinou-se a atividade enzimática através da Equação 3.2:

$$AT = (\alpha \cdot \beta \cdot d \cdot 60) / 0,52 \quad (\text{UDS/mL}) \quad (3.2)$$

Onde:

α = coeficiente angular da curva de absorvância em função do tempo

β = coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d = volume de diluição final no reator de vidro

A Unidade de Dextrana-Sacarase (UDS) é definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana, em 1 hora, liberando 0,52 mg de frutose, a pH 5,2 e temperatura de 30°C. Quanto à atividade enzimática, uma Unidade Internacional (UI) corresponde à 20,27 UDS.

3.6.3 - Análise das Amostras da Síntese de Dextrana por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel foi utilizada para a determinação das concentrações de dextrana e frutose nas alíquotas coletadas, durante os processos de separação cromatográfica nas colunas de vidro e sistema FPLC. Com as concentrações obtidas, foi possível calcular a eficiência das separações para as

diferentes resinas e respectivas condições empregadas nos processos cromatográficos. Utilizou-se ainda a cromatografia de permeação em gel para determinação da distribuição do peso molecular das amostras obtidas na síntese de dextrana. O sistema foi composto pelos seguintes equipamentos:

- Injetor automático Varian 9095
- Bomba ternária Varian 9010
- Forno Spark Holland 99
- Detector de índice de refração R 14
- Software de aquisição e processamento dos dados: Millenium Chromatography

Manager - Waters

- Conjunto de três colunas e uma pré-coluna Varian série Micropack.

A faixa de exclusão de cada coluna utilizada e suas dimensões são mostradas na Tabela 3.3. As colunas foram conectadas em série na sequência de poro decrescente com a finalidade de separar inicialmente as moléculas maiores, evitar problemas de viscosidade, e também para que a coluna de menor porosidade fique mais distante da bomba, já que é mais sensível à pressão.

Tabela 3.3: Características das Colunas Empregadas na Separação

Colunas TSK-Gel	Faixa de Exclusão	Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)
G 3000 PW	1×10^4	30,0	0,75
G 4000 PW	3×10^5	30,0	0,75
G 6000 PW	1×10^7	30,0	0,75
Pré-coluna	-	7,5	0,75

3.6.3.1 - Preparo da Fase Móvel

Água deionizada, obtida em um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus, foi utilizado como eluente. A água eluente foi degaseificada a vácuo em um banho ultra-

som Euronics modelo SX-20, por um período de 1 hora. A fase móvel foi mantida de 10 a 15 cm acima da entrada da bomba. Iniciou-se o processo com um fluxo de eluente de 0,1 mL / min e aumentou-se lentamente até 1 mL / min (fluxo desejado), monitorando-se a linha de base obtida no Software até conseguir a estabilização do refratômetro.

3.6.3.2 - Preparo das Amostras e Padrões de Dextrana

As amostras de dextrana a serem utilizadas na preparação da curva padrão foram diluídas em água deionizada (Milli-Q) numa concentração de 0,4% (p / v).Foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 μm de abertura de poros e em seguida, deixadas em repouso por um período de 16 a 20 horas antes da injeção no cromatógrafo.

As amostras das alíquotas obtidas nos processos de separação de dextrana e frutose, com as diferentes resinas testadas em coluna de vidro, foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 ou 0,8 μm de acordo com a concentração de dextrana, e também deixadas em repouso antes da injeção. Este período de equilíbrio antes da injeção de amostras e padrões com peso molecular superior a 200.000 daltons, permite que a cadeia do polímero estenda-se para sua conformação de solvatação no solvente.

3.6.3.3 - Injeção das Amostras no Sistema HPLC

As amostras coletadas nos processos de separação e os padrões de dextrana e frutose, foram injetadas no HPLC nas condições apresentadas na Tabela 3.4, sendo o tempo de corrida de 38 min.

Tabela 3.4: Condições de injeção das amostras de dextrana no HPLC.

Temperatura Ambiente	23°C
Temperatura do Forno	40°C
Temperatura do Detector de Índice de Refração	40°C
Vazão do Eluente	1,0 mL / min
Volume de Injeção	98 µL

3.6.4 - Curva de Calibração

A curva de calibração foi obtida utilizando três pesos moleculares como parâmetros básicos: M_w , M_n e M_p . Os padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation) e frutose utilizados na determinação da curva de calibração estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation)

Padrão	M_w	M_p	M_n
DXT 11K	11.700	9.900	8.000
DXT 43K	42.750	35.000	28.700
DXT 79K	78.800	68.000	49.400
DXT 165K	165.500	150.000	110.800
DXT 685K	685.000	500.000	380.600
DXT 1750K	1.750.000	1.450.000	1.250.000
DXT 5000K	4.900.000	4.500.000	1.500.000
Frutose		180	-

Otimizou-se a integração dos picos para cada padrão para que os pesos moleculares médios fornecidos e aqueles calculados fossem os mais próximos possíveis, sendo que o tipo de regressão para a curva de calibração foi definido com base no melhor coeficiente de regressão obtido. Para calibração do software "Millenium" utilizou-se a opção "Broad Standards" (Padrões Dispersos).

3.6.5 - Quantificação das Amostras

O software "Millenium" foi utilizado para a integração dos cromatogramas e cálculo da distribuição do peso molecular das amostras pela curva de calibração. As porcentagens de dextrana e frutose nas amostras são mostradas no capítulo de resultados, assim como as porcentagens de dextrana em cada faixa de peso molecular.

3.6.6 - Determinação dos Açúcares Produzidos na Síntese de Dextrana

3.6.6.1 - Preparo da Fase Móvel

A fase móvel utilizada foi água deionizada, preparada de acordo com a metodologia empregada para a cromatografia de permeação em gel (item 3.6.3.1). o Fluxo do eluente foi aumentado lentamente até atingir 0,3mL/min.

3.6.6.2 - Curva de Calibração

Utilizou-se a mesma metodologia empregada por SANTOS (1998). Foram preparadas inicialmente soluções padrões de oligossacarídeos, glicose, frutose e sacarose; todas nas concentrações de 0,5% a 3,0%, resultando ao todo sete soluções padrão. Em seguida, todas as soluções de uma mesma concentração foram misturadas

de modo a formar uma solução padrão de uma determinada concentração, a qual foi submetida a análise cromatográfica. Preparou-se as soluções até obtenção de sete soluções padrões.

A curva padrão obtida pode ser vista no apêndice A e a integração e otimização dos picos obtidos para cada padrão, com base no melhor coeficiente de regressão, foi realizada através do software Millennium de aquisição de dados.

3.6.6.3 - Preparo de Amostra

Foi retirada uma amostra de 1,0mL do produto da síntese de dextrana. A esta amostra foi adicionado 1,0mL de uma solução de etanol 1,0% (etanol PA 95%), para precipitar a dextrana produzida na síntese. Em seguida centrifugou-se a 5000g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro MilliPore 0,45 μ m. A amostra foi diluída convenientemente, para ficar numa faixa de concentração de 0,5% a 3,0%.

3.6.6.4 - Injeção de Amostra no Sistema HPLC

A amostra foi injetada em uma coluna Shodex Sugar SC 1011 nas seguintes condições de operação:

- Temperatura ambiente: 22-24°C
- Temperatura do forno: 80°C
- Temperatura do detector de índice de refração (RI): 45°C
- Volume de injeção: 98 μ l
- Fluxo do eluente: 0,3mL/min

3.6.6.5 - Identificação e Quantificação dos Açúcares obtidos na Síntese

A amostra foi identificada utilizando um software Millenium de aquisição e processamento de dados, tendo como base a curva padrão do item 3.6.6.2.

Utilizou-se a mesma metodologia empregada por SANTOS (1998) para quantificação dos açúcares presentes na amostra da síntese.

4. RESULTADOS

4.1 - Produção da Enzima

A fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* foi realizada utilizando-se o meio nas condições apresentadas no item 3.1.4, ou seja, temperatura 27°C com aeração de 0,5 L/min e pH inicial de 6,7.

O pH foi mantido em $6,7 \pm 0,2$ pela adição da solução combinada de sacarose e NaOH, e após 7 horas aproximadamente a alimentação foi cortada para reduzir a quantidade de açúcares redutores totais.

Estas condições foram determinadas por BAZÁN (1993) e permitem a produção da enzima dextrana-sacarase com maior atividade enzimática e menor quantidade de açúcares redutores totais no meio de fermentação. Grandes quantidades de açúcares redutores totais no meio, na fase final de fermentação, acarreta a produção de dextrana de alto peso molecular, junto com a dextrana-sacarase, proporcionando alta viscosidade do caldo fermentado e dificultando o processo de separação da enzima. A atividade enzimática do caldo fermentado foi medida de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.2, obtendo-se 99,8 UDS / mL no final da fermentação.

4.2 - Purificação da Enzima

A purificação de dextrana-sacarase envolveu os processos de centrifugação, ultrafiltração e precipitação com polietilenoglicol 1500 e acompanhou-se a variação de atividade durante a etapa de ultrafiltração.

Atividades de 561,0 UDS / mL foram conseguidas após o processo de ultrafiltração e foram produzidas 30.000 unidades de dextrana-sacarase após a precipitação com solução 50% (p/v) de PEG 1500.

4.3 - Produção de Dextrana

A síntese “in vitro” de dextrana foi realizada a 20°C e pH 5,2, com solução de sacarose 100 g/L e dextrana-sacarase (40 UDS/mL) retirando 1mL de amostra em intervalos regulares de tempo para a dosagem de frutose liberada, como descrito no item 3.1.6. A amostra foi aquecida para inativação da enzima e a frutose quantificada pelo método DNS (MILLER, 1959), considerando-se que todo o açúcar redutor da síntese seja frutose. A reação de polimerização foi interrompida 7 horas após o início, quando pelo menos dois valores iguais de concentração de frutose foram obtidos e a concentração final de frutose foi de aproximadamente 50 g/L. Posteriormente realizou-se a análise cromatográfica de frutose em coluna de determinação de açúcares.

4.3.1 - Caracterização de Amostra da Síntese

Para caracterização do produto da síntese, uma amostra do meio em reação “in vitro”, na síntese de dextrana foi preparada para a injeção no sistema cromatográfico HPLC de acordo com as condições descritas no item 6.3.6.2 no capítulo de Materiais e Métodos.

Utilizando o software “Millenium”, o cromatograma obtido foi integrado e a distribuição do peso molecular da amostra obtida através da curva de calibração. A curva de calibração foi obtida através da integração dos picos dos padrões relacionando os tempos de retenção (Tr) e os pesos moleculares médios (Mw). Os tempos de retenção para os padrões são mostrados na Tabela 4.1.

A curva de calibração encontrada foi representada pela Equação 04 e pode ser observada na Figura 01 do Apêndice A.

$$\log Mw = 1,34 \cdot 10^{-7} T_R - 7,13 \cdot 10^{-1} T_R + 2,56 \cdot 10^{-2} T_R^2 - 4,52 \cdot 10^{-4} T_R^4$$

$$r = 0,998$$

Tabela 4.1: Tempos de Retenção e Peso Molecular Médio dos Padrões da Curva de Calibração.

Padrão	Mw	Tr (min)
DXT 5000K	4.900.000	16,9
DXT 1750K	1.750.000	18,3
DXT 685K	685.000	19,6
DXT 165K	165.500	22,3
DTX79K	78.800	23,4
DXT 43K	42.750	24,5
DXT 11K	11.700	26,7
FRUTOSE	180	31,2

A caracterização do produto da síntese foi realizada dividindo-se a distribuição de peso molecular nas seguintes faixas:

- *Dextranas Totais*: porcentagem de dextrana acumulada até peso molecular de 10.000 daltons
- *Dextranas de Alto Peso Molecular* : dextranas com peso molecular maior que 100.000 daltons

- *Dextrana Clínica*: dextranas com peso molecular entre 30.000 e 100.000 daltons, sendo:
 - *Dextrana 40*: dextranas na faixa de peso molecular de 40.000 ± 10.000 daltons
 - *Dextrana 70*: dextranas na faixa de peso molecular de 75.000 ± 25.000 daltons
- *Dextranas de Baixo Peso Molecular*: dextranas com peso molecular entre 10.000 e 20.000 daltons

Considerou-se ainda uma faixa incluindo as dextranas com peso molecular abaixo de 10.000 daltons, frutose e oligossacarídeos.

A distribuição de pesos moleculares do produto da síntese pode ser verificado na Tabela 4.2 e o cromatograma da síntese é mostrado na Figura 4.1.

Tabela 4.2: Distribuição de Peso Molecular para Amostra da Síntese.

Faixa de Peso Molecular	% de Dextrana
Até 100.000 daltons	12,298
> 100.000 daltons (alto peso molecular)	12,082
Entre 20.000 e 60.000 daltons (dextrana 40)	0,122
Entre 50.000 e 100.000 daltons (dextrana 75)	0,053
Total Dextrana Clínica	0,162
< 10.000 daltons, frutose e oligossacarídeos	87,702

Os resultados mostram a alta porcentagem de dextrana de alto peso molecular quando comparada a dextrana de baixo peso ou dextrana clínica. A grande

quantidade de dextrana nativa se deve a fermentação de *Leuconostoc mesenteroides* em meio contendo somente sacarose, ou seja, à não utilização de aceptores na reação.

Pode-se observar os picos correspondentes aos produtos da síntese de dextrana através do cromatograma da Figura 4.1. As dextranas nas diferentes faixas de peso molecular são eluídas entre 16 e 20 minutos após a injeção na coluna cromatográfica.

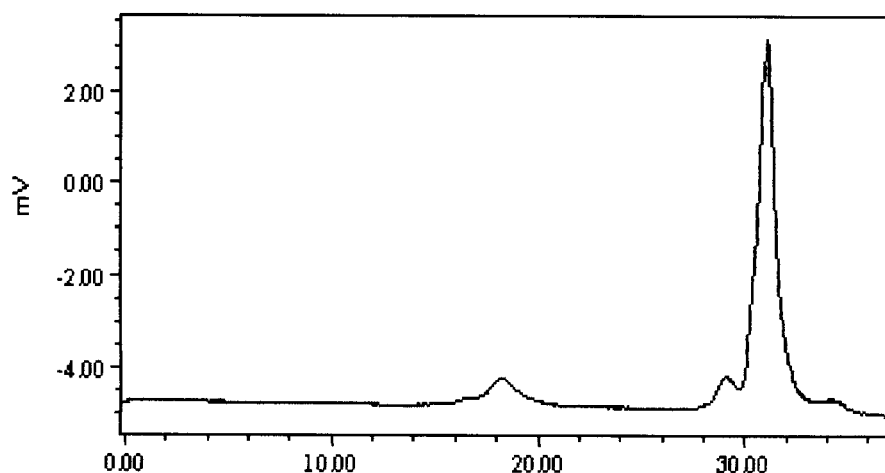


Figura 4.1: Cromatograma da síntese de dextrana (Separação realizada em HPLC - Cromatografia de Permeação em Gel)

Primeiramente são eluídas as frações de dextranas de pesos moleculares mais altos (em torno de 16 min). Após este tempo, até aproximadamente 30 minutos, são eluídas frações de dextrana em ordem decrescente de seus pesos moleculares.

Observa-se através do cromatograma que o maior pico foi eluído por volta de 31 minutos, pico este correspondente ao pico de eluição da frutose. Verifica-se ainda a não formação de oligossacarídeos em grandes quantidades, uma vez que o pico

destes encontra-se entre 28 e 30 minutos de eluição e deveria anteceder o pico de frutose no cromatograma.

4.3.2 - Identificação e Quantificação dos Açúcares Obtidos na Síntese

A amostra da síntese, após preparação com retirada da dextrana, foi injetada na coluna Shodex Sugar SC 1011 em sistema HPLC como mencionado no Capítulo 3 (Metodologia). O cromatograma de separação dos açúcares obtidos é mostrado na Figura 4.2.

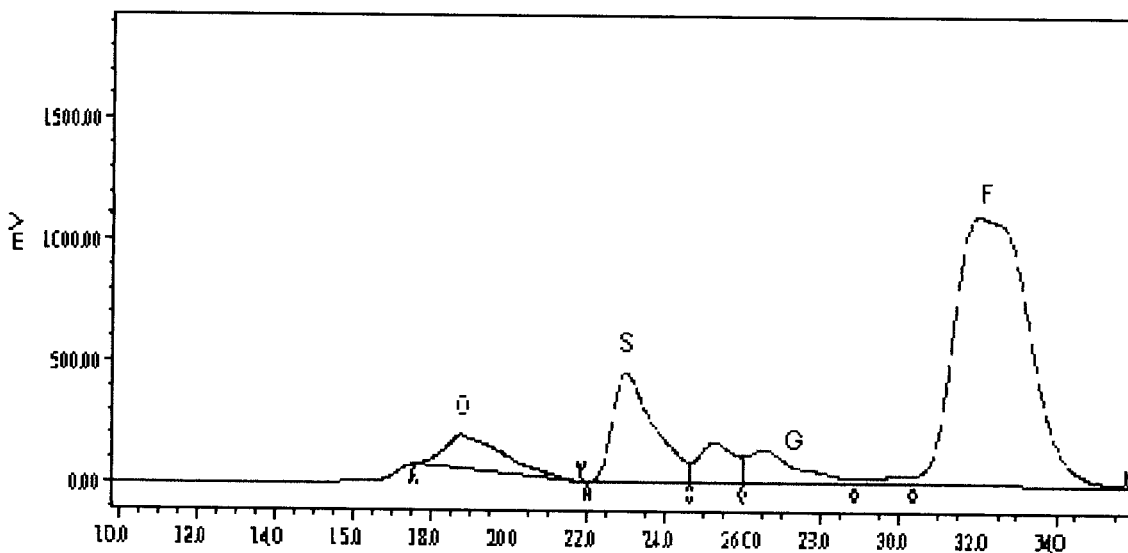


Figura 4.2: Cromatograma dos Produtos após precipitação da Dextrana - Separação Realizada em HPLC com coluna de Separação de Açúcares (F=Frutose, S=Sacarose, G=Glicose, O=Oligossacarídeos)

Observa-se através do cromatograma que os açúcares encontrados após a síntese, além da dextrana, são a frutose, sacarose, oligossacarídeos e outros, cujos picos não foram identificados, podendo ser resultantes da presença de glicose e outros

oligossacarídeos como leucrose ou isomaltose. Houve grande formação de frutose durante a síntese de dextrana, ou seja, entre os açúcares quantificados verifica-se maior concentração de frutose (47,7mg/L) e ainda, sacarose (8,4mg/L), oligossacarídeos (4,9mg/L) e glicose (3,4mg/L). Pode-se concluir através da sacarose remanescente que a reação ainda não tinha sido finalizada no momento em que se paralizou o processo.

4.4 - Separação de Frutose

4.4.1 - Testes Preliminares de Separação

As condições empregadas nos testes preliminares de separação de frutose da síntese de dextrana para uma altura de leito de 5 cm e 10,5 cm, com a resina Dowex 50W X4, são mostrados nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente.

Tabela 4.3: condições de separação para coluna de vidro de 18 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro (altura de leito de 5 cm) - Dowex 50w X4.

Teste	1	2	3
Vazão (mL / min)	0,39	0,39	0,39
Concentração Amostra (g/100mL)	0,2	5	50
Temperatura (°C)	25	25	30
Volume de injeção (mL)	0,05	0,1	0,1
Altura do leito (cm)	5,0	5,0	5,0

Tabela 4.4: condições de separação para coluna de vidro de 18 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro (altura de leito de 10,5 cm) - resina Dowex 50w X4.

Teste	1	2	3	4	5	6	7
Vazão (mL / min)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,54	0,54	0,54
Concentração Amostra (g/100mL)	100	100	100	100	100	100	100
Temperatura (°C)	30	40	50	35	25	35	45
Volume de injeção (mL)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
Altura do leito (cm)	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5

Inicialmente utilizou-se a resina Dowex 50W X4 para os testes de separação de frutose contida na síntese “in vitro” de dextrana, com uma concentração da solução da síntese de 0,5% e volume de injeção de 0,05 mL para uma altura de 5cm de leito. Estas condições não permitiram a detecção de dextrana ou frutose pelo método de DNS ou pelo método HPLC, impossibilitando a verificação do resultado da separação.

Portanto modificou-se as condições dos testes, empregando-se diferentes temperaturas e volumes de injeção para a mesma altura de leito e ainda a separação foi realizada para uma altura de leito de 10,5 cm, com a mesma resina, variando-se a vazão de operação e a temperatura do processo, para uma concentração de amostra de 100% (1000 g/L). Estas condições propiciaram a quantificação de açúcar redutor pelo método de DNS nas alíquotas coletadas, mas ainda assim não foi possível quantificar as porcentagens de dextrana e frutose das amostras na saída da coluna por cromatografia (HPLC) e portanto não verificou-se a eficiência da separação.

Devido a pequena quantidade disponível de resina Dowex 50W X4 para a realização dos experimentos e a pouca eficiência da metodologia empregada para estas condições de operação, partiu-se para a realização da separação em colunas de

vidro de dimensões maiores, com as resinas Dowex 50w X8 e XUS-40285 e determinou-se que a altura do leito devia ser maior que 10,5 cm para que se pudesse obter uma boa resolução.

4.4.2 - Processo de Separação de Frutose

As separações foram realizadas, de forma padronizada, em colunas de vidro de 40 cm de comprimento para uma altura de leito de 32 cm. Esta altura de leito e as condições de processo empregadas, mostradas no item 3.4.2, possibilitaram a detecção das porcentagens de dextrana e frutose nas alíquotas coletas no final da separação e analisadas em HPLC.

Alterações na vazão de eluente do sistema, verificadas nos testes preliminares, devido à injeção de amostra na coluna por meio de uma seringa, foram eliminadas através da utilização de um Loop de injeção. A amostra ficou preparada em um sistema "By Pass" e o fluxo de eluente foi desviado no momento da injeção de modo que a amostra da síntese fosse introduzida na coluna sem alteração da vazão do sistema.

A análise por cromatografia de permeação em gel não possibilitou a obtenção da concentração exata de dextrana e frutose nas alíquotas, uma vez que o software "Millenium" apresenta os resultados da análise em uma tabela de distribuição acumulativa das faixas de pesos moleculares e não o valor exato da concentração dos compostos injetados na coluna cromatográfica.

Desta forma foram utilizadas as porcentagens de dextrana e frutose em cada alíquota para se determinar a eficiência da separação, uma vez que, as concentrações

dos componentes da solução injetada foram correlacionadas com as áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

Integrou-se os cromatogramas de modo que a área dos picos entre os tempos de eluição de 12,5 a 27,5 min correspondiam as dextranas e a área entre os tempos de eluição de 30 a 34 min correspondiam a frutose. Considerou-se desprezível a concentração de oligossacarídeos eluidos nas alíquotas dos processos de separação (tempo de eluição de 27,5 a 30 min). Exemplos dos cromatogramas das alíquotas injetadas no sistema HPLC, para a resina Dowex XUS-40285 a 60°C e vazão de 1mL/min, são mostrados nas Figuras do apêndice B.

Foi utilizado um fator estatístico para caracterizar a eficiência da separação, através da determinação da área dos picos dos cromatogramas obtidos (LU & LEE, 1987). Para os componentes dextrana (1) e frutose (2), Δt_{12} é definido como:

$$\Delta t_{12} = \left| \bar{t}_1 - \bar{t}_2 \right| \quad (4.1)$$

onde, o tempo de residência médio é definido por:

$$\bar{t}_i = \frac{\int_0^{\infty} t_i w_i \Phi dt}{\int_0^{\infty} w_i \Phi dt} \quad (4.2)$$

onde, w_i = % do componente i na alíquota do eluente e Φ = vazão mássica da mistura. A eficiência da separação é então definida como:

$$(ES)_{12} = \frac{\Delta_{12}}{\delta_{12}} \quad (4.3)$$

onde, $\delta_{12} = (\delta_1 \delta_2)^{1/2}$

e a variância é definida por:

$$\delta_i^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t_i - \bar{t}_i)^2 w_i \Phi dt}{\int_0^{\infty} w_i \Phi dt} \quad (4.4)$$

Assim, o maior fator de separação (ES) representa a maior eficiência de separação.

A eficiência de separação na coluna de adsorção depende da natureza da resina, da temperatura de operação, taxa de fluxo e quantidade de amostra injetada. As condições empregadas no processo cromatográfico de separação de frutose com a resina Dowex 50W X8 e os resultados encontrados são mostrados na Tabela 4.5.

As separações foram realizadas nas vazões de 0,55 e 0,1 mL / min e nas temperaturas de 35, 45 e 60°C. O eluente utilizado, água "Milli-Q", teve o pH alterado para aproximadamente 7,0 com NaOH 0,5% (p / v) para todas as separações, com exceção dos dois primeiros experimentos mostrados na Tabela 4.5, nos quais manteve-se o pH inicial do eluente, ou seja, pH da água deionizada por volta de 5,6.

Tabela 4.5: Resultados das Separações de Frutose para a Resina Adsorvente Dowex 50W X8

Vazão mL / min	Temperatura (°C)	Tr _F (min)	Tr _D (min)	Tr _D - Tr _F (min)	ES
0,55*	35	41,35	40,6	0,798	0,06809
0,55*	45	43,17	42,39	0,785	0,06244
0,55	35	41,88	40,44	1,433	0,13397
0,55	45	41,99	41,11	0,882	0,07342
0,1	35	187,26	188,11	0,849	0,01336
0,1	45	206,84	208,22	1,377	0,01669
0,1	60	182,103	205,30	23,201	0,331128

* Eluente Água Milli-Q sem alteração de pH.

Tr_F = Tempo de retenção de Frutose

Tr_D = Tempo de retenção de Dextrana

ES = Eficiência de Separação de Frutose e Dextrana

Ocorreu um aumento na eficiência da separação quando o pH foi acertado para aproximadamente 7,0 na vazão de 0,55 mL / min (de 0,06809 à 0,13397 para a temperatura de 35°C e de 0,06244 para 0,07342 para a temperatura de 45°C). Desta forma padronizou-se todas as separações para que se trabalhasse com o eluente água deionizada em pH aproximadamente 7,0.

A resina de troca iônica Dowex 50W X8 apresentou menores eficiências de separação quando comparada às outras resinas utilizadas, porém ocorreu um aumento na eficiência de separação com o aumento da temperatura de operação, para a vazão de 0,1mL / min (de 0,01336 para 0,331128) como mostra a Tabela 4.5.

Os perfis de concentração para a melhor eficiência obtida para a resina Dowex 50W X8 (0,1 mL / min) podem ser observado na Figura 4.3 .

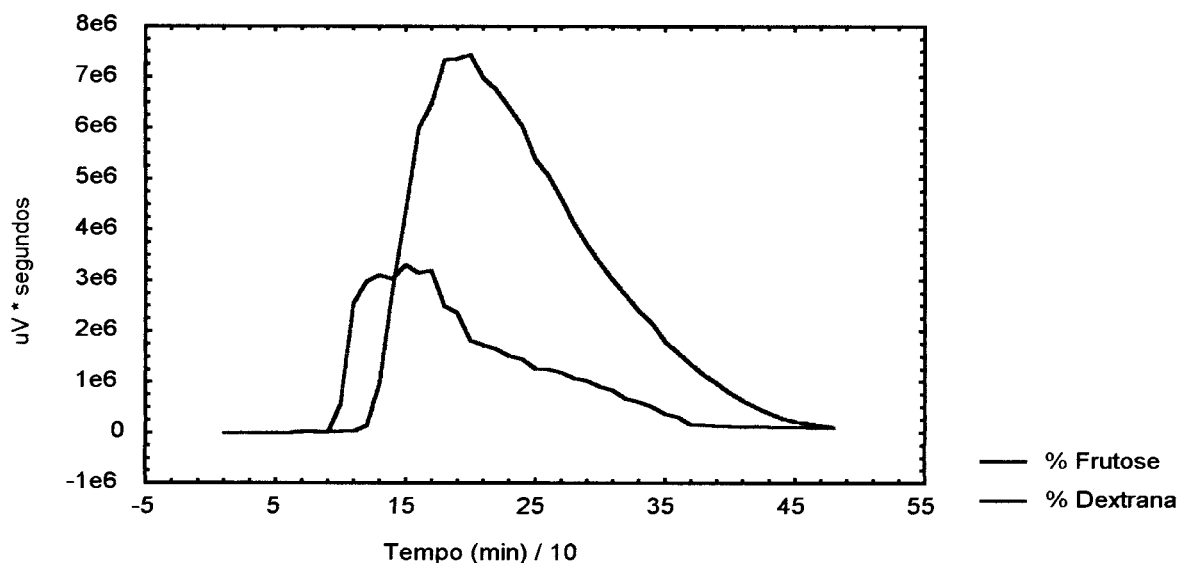


Figura 4.3: Perfis de concentração - resina Dowex 50 WX8 a 60°C e 0,1 mL/min

Para a vazão de 0,1 mL / min com a resina de troca iônica na forma de cálcio (Dowex 50W X8), ocorreu uma inversão na ordem de eluição esperada para os componentes da mistura, ou seja a frutose é eluída primeiramente, sendo que pode ter ocorrido uma interação também da dextrana com os íons cálcio da resina, retardando sua saída da coluna.

Observando a Tabela 4.6 , verifica-se também que a melhor separação para a resina XUS-40285 foi obtida a 60°C, tendo ocorrido um aumento da eficiência com o aumento da temperatura do sistema. A frutose penetra nos poros da resina, tendo seu tempo de eluição retardado e a dextrana por apresentar alto peso molecular, não penetra nos poros e se move junto ao eluente, como mostra a Figura 4.4.

Pode-se observar pela Figura 4.4 que praticamente toda dextrana é eluída em um tempo de 200 min após o início de injeção de amostra no cromatógrafo e que a

frutose inicia sua saída da coluna no tempo de 110 min, momento em que a concentração de dextrana é máxima.

Tabela 4.6: Resultados das Separações de Frutose para a Resina Dowex XUS-40285

Vazão mL / min	Temperatura (°C)	Tr _F (min)	Tr _D (min)	Tr _F - Tr _D (min)	ES
0,55	35	57,85	44,67	13,178	0,781534
0,55	45	57,31	45,22	12,094	0,712916
0,1	35	239,17	200,17	38,991	0,543374
0,1	45	223,36	178,18	45,178	0,677302
0,1	60	235,12	161,38	73,742	1,080899

* Eluente Água Milli-Q sem alteração de pH.

Tr_F = Tempo de retenção de Frutose

Tr_D = Tempo de retenção de Dextrana

ES = Eficiência de Separação de Frutose e Dextrana

Máxima concentração de frutose no eluente é conseguida no tempo de eluição de 220 min, quando toda dextrana já deixou a coluna, o que possibilita uma boa separação dos componentes da solução de síntese (dextrana e frutose).

O tempo de eluição de 150 min representa o instante em que as concentrações de dextrana e frutose no eluente se igualam. A porção de amostra coletada no intervalo de tempo em que frutose e dextrana se encontram misturadas no eluente, poderia ser reinjetada na coluna e reaproveitada no processo de separação.

A maior eficiência de separação foi obtida com a coluna empacotada com gel superdex 30 em sistema FPLC. Os perfis de concentração, obtidos a partir das amostras injetadas no sistema HPLC, podem ser observados na Figura 4.5.

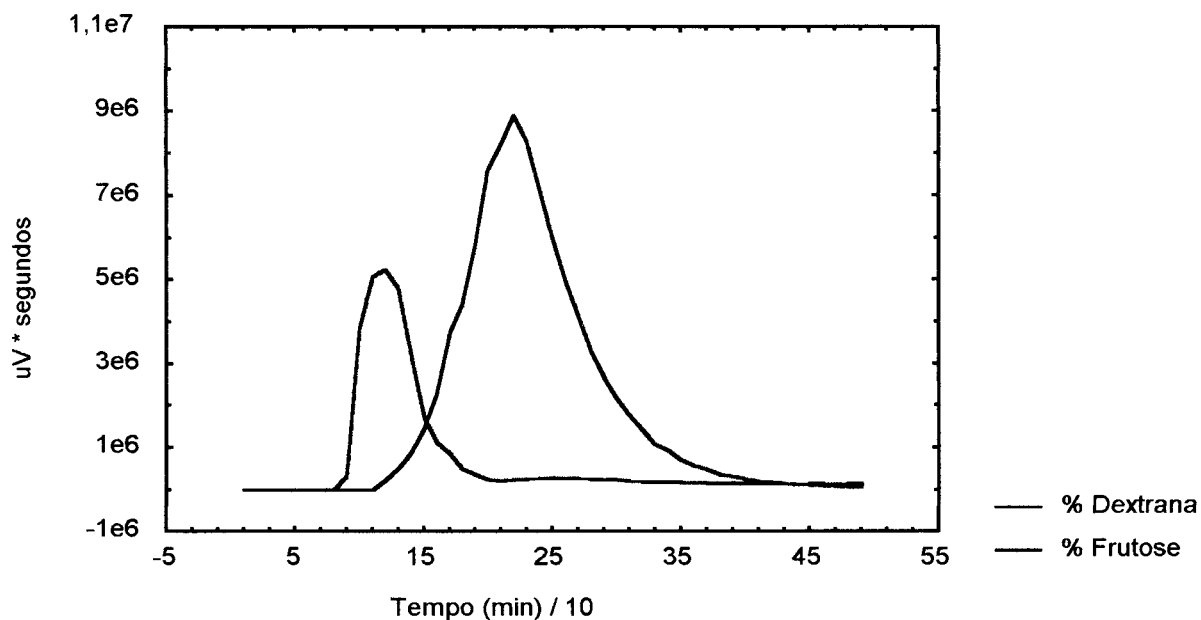


Figura 4.4: Perfis de Concentração - resina Dowex XUS-40285 a 60°C e 1mL/min

Pode-se verificar através da Figura 4.5 que a dextrana aparece primeiramente no eluente, sendo seguida de frutose e pequena concentração de frutose deixa a coluna quando ainda encontramos dextrana no eluente. Ocorre maior separação entre os picos de dextrana e frutose quando o perfil é comparado com a separação cromatográfica para as outras resinas.

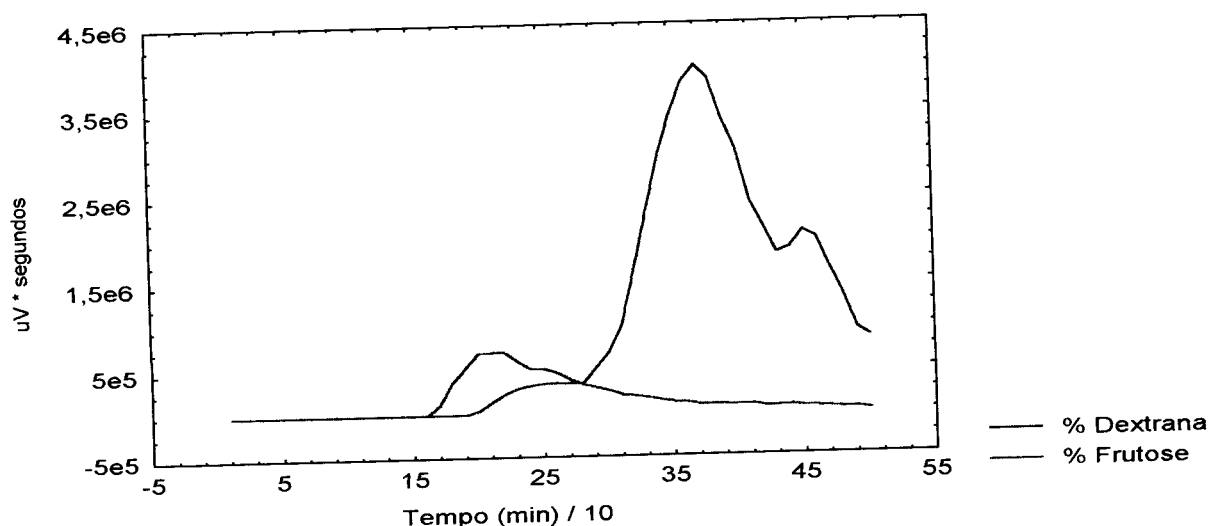


Figura 4.5: Perfis de Concentração - Gel Superdex 30 a 45°C e 1mL/min

A Tabela 4.7 mostra os resultados da separação de frutose para o gel Superdex 30 em sistema FPLC.

Tabela 4.7: Resultados das Separações de Frutose para Gel Superdex 30

Vazão mL / min	Temperatura °C	Tr (min) Frutose	Tr (min) Dextrana	Delta dxt-fru	ES dxt-fru
1	45	97.733	65.117	32.616	3.4836

Caminhos preferenciais no recheio da coluna podem ter provocado a formação de um segundo pico para a concentração de frutose quando a tendência seria a diminuição do conteúdo de frutose no eluente.

Os perfis de concentração para as separações realizadas com as resinas Dowex 50W X8 e XUS-40285, a 0,1mL/min e temperaturas de 45 e 60°C, podem ser vistos nas Figuras do Apêndice C.

5 - CONCLUSÕES

- A quantidade de oligossacarídeos formados na síntese de dextrana não foi significativa e a dextrana produzida comprovou que a síntese a partir de sacarose, na ausência de aceptores, resulta em um produto rico em dextrana de alto peso molecular
- A relação altura x diâmetro de leito de 32cm x 1cm respectivamente, possibilitou a separação de frutose para as resinas testadas, porém o aumento da altura do leito aumenta a resolução dos picos formados
- A separação com a resina Dowex 50W X4 não ofereceu resultados satisfatórios em virtude das dificuldades experimentais e da quantidade de resina disponível para o teste. A altura máxima de leito obtida não permitiu a detecção de concentrações significativas dos produtos de separação, mostrando a necessidade de se trabalhar com uma relação altura x diâmetro de leito que permita a injeção de amostras em concentração adequada para que se possa avaliar a eficiência da separação através do método analítico empregado.
- O sistema de injeção de amostra na coluna cromatográfica através de um sistema "By Pass" não provoca alteração na vazão do sistema
- A eficiência de separação na coluna de adsorção depende da natureza da resina e das variáveis de processo: temperatura, vazão de eluente, concentração de amostra, quantidade amostra injetada, pH do eluente utilizado. O uso de eluente com pH próximo do neutro resultou em maior eficiência de separação da frutose.

- Há um aumento na eficiência de separação com o aumento da temperatura de operação, trabalhando-se com uma vazão de 0,1 mL/min, uma vez que maior eficiência foi obtida para as resinas testadas à temperatura de 60°C.
- Observou-se uma inversão na ordem de eluição esperada para os componentes da mistura, com a resina de troca iônica na forma de cálcio (Dowex 50W X8), ou seja, a frutose aparece primeiro no eluente, sendo seguida pela dextrana. É provável que tenha ocorrido uma interação também da dextrana com os íons cálcio da resina, retardando sua saída da coluna cromatográfica
- A resina Dowex XUS-40285 apresentou maior capacidade de adsorção de frutose a 60°C e vazão de 0,1 mL/min quando comparada com as outras resinas testadas.
- Devido a sua alta eficiência na separação de frutose da solução de dextrana, o gel Superdex 30 pode ser utilizado para esse propósito, porém o baixo custo atribuído à resina Dowex XUS-40285 e a maior facilidade de tratamento e regeneração aliados a boa eficiência de separação encontrada, torna viável sua utilização para esse tipo de separação
- O teste de aplicação de amostra de dextrana em detector Ultra Violeta, mostrou que o método de intensidade UV pode ser aplicado na determinação quantitativa para dextranas nativas, uma vez que o sistema FPLC possibilita a obtenção da concentração exata de dextrana na amostra, não sendo necessário correlacionar os picos obtidos com a concentração do componente, como ocorre no HPLC com a metodologia utilizada neste trabalho.

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar o processo de separação de frutose, obtida na síntese “in vitro” de dextrana, por cromatografia em colunas de vidro utilizando a resina Dowex XUS-40285
- Estudar a separação de frutose, da solução de dextrana, com resinas de troca iônica, como a resina Dowex 50W X8, utilizando outros cátions como Bário, Magnésio ou mesmo íons hidrogênio
- Obter a eficiência de separação de frutose da síntese de dextrana utilizando maiores relações diâmetro e altura de leito nas as colunas cromatográficas empregadas
- Estudar a separação monitorando a adsorção de frutose e dextrana “on line” através do sistema FPLC com detector Ultra Violeta e um detector de índice de refração
- Realizar testes cinéticos de adsorção
- Realizar um “Scale-up” do processo de separação de frutose da síntese de dextrana

7. BIBLIOGRAFIA

01. ALSOP, L., Industrial production of dextrans. Progress in Industrial Microbiology, 18: 1-44, 1983.
02. BARKER, P.E., Dextran fractionation a semi-continuous counter-current simulated moving-bed chromatograph. Chromatographia, 17(3): 149-153, 1983.
03. BARKER, P.E. & GANETSOS, G., Production of high purity fructose from barley syrups using semi-continuous chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol. 35B: 217-228, 1985.
04. BARKER, P.E.; ENGLAND, K.; GANETSOS, G., Fractionation of dextran using repetitive batch chromatography. J. Chem. Technol. 41: 61-68, 1987.
05. BARKER, P.E.; ZAFAR, I., A novel method for production of dextran and fructose. International Conference on Bioreactors and Biotransformations Glasgow, Scotland, UK: 9-12, 1987.
06. BARKER, P.E.; GANETSOS, G.; ENGLAND, K., Dextran fractionation using preparative scale continuous chromatography. J. Chem. Tech. Biotech. 46: 209-218, 1988.

07. BARKER, P.E.; AJONGWEN, N., The production of the enzyme dextranasucrase using nonaerated fermentations techniques. Biotechnol. Bioeng. 37: 703-707, 1991.
08. BARKER, P.E.; JOSHI, K., The recovery of fructose from inverted sugar beet molasses using continuous chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol. 52: 93-108, 1990.
09. BAZÁN, J.H.V., Produção de Dextrana Clínica por Via Enzimática. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 123p. 1993.
10. CHENG, Y.L.; LEE, T.Y., Separation of fructose and glucose mixture by zeolite Y. Biotechnology and Bioengineering, 40: 498-504, 1992.
11. CHING, C.B.; HO, C.; HIDAJAT, K., Experimental study of a simulated counter-current adsorption system-V. Comparison of resin and zeolite absorbents for fructose-glucose separation at high concentration. Ind. Eng. Res. 2547-2555, 1987.
12. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S., Introdução a métodos cromatográficos, Campinas, Editora da Unicamp, 6ª ed., 279p, 1995.
13. CURRALERO, I.C.B., Estudo da Produção de Dextrana de Baixo Peso Molecular Por Via Enzimática. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 164p. 1993.

14. DE BELDER, A.N. Dextran., In: Ulman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim, W. Gerhart, vol.A8, p.449-454, 1987.
15. DECHOW, F.J. Ion Exchange., In: Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, Principles, Precess Design and Equipament, Vogel Henry C., p.203-223, 1983.
16. DECHOW, F.J., Separation and purification in biotechnology. Park Ridge: Noyes Publications, p.490, 1989.
17. DILLS, W. L. J., Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction, Am. J. Clin. Nutr., 58(suppl), 779S-87, USA, 1993.
18. Exchange Chromatography, Chromatografia, vol.35, n.o. 3/4, February, 1993.
19. Fructose and Related Food Carbohydrates - Sources, Intake, Absorption, and Clinical Implications, Scand J. Gastroenterol, 27: 819-828, 1992.
20. GJERD, D.T. & FRITZ, J.S., Chromatographic methods. In: Ion Chromatography, 66-246,1987.
21. HANOVER, L.M.; WHITE, J.S., Manufacturing, composition, and applications of fructose, American Journal of Clinical Nutrition, 58, 724S-732S, 1993.

22. HO, C.; CHING, C.B.; RUTHVEN, D.M. A comparative study of zeolite and resin adsorbents for the separation of fructose-glucose mixtures Ind. Eng. Res. 26: 1407-1412, 1987.
23. JEANES, A. Dextran. In: Encyclopedia of Polymer Science and Tecnology, John Wiley and Sons Inc., vol.4, p.805-824,1966.
24. KELLER, H. W.; REENTS, A. C.; LARAWAY, J. W.; Process for Fructose Enrichment from Fructose Bearing Solutions, Starch, n.o.2, 33: 55-57, 1981.
25. KIM, D.; DAY, D. F.; A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*, Enzyme Microb. Technol., vol 16, July, 848, 1994.
26. KOBAYASHI, M.; UTSUGI, H.; MATSUDA, K.; Intensive UV Absorption of Dextrans and Its Aplication to Enzyme reactions, Agric. Biol. Chem., 50(4), 1051-1053, 1986.
27. LU, T.; LEE, T.; Separation of Diethylbenzene Isomers by Colum Adsorption and Desorption, 26(10), 2027, 1986.
28. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428, 1959.

29. MIZUTANI, N.; YAMADA, M.; TAKAYAMA, K.; SHODA, M.; Constitutive Mutans for Dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B- 512F, Journal of Fermentation and Bioengineering, 77(3),248-251, 1994.
30. NEELY, W.B.J. Dextran Structure and synthesis. Adv. Carbohydr. Chem. 15: 34 - 369, 1960.
31. O'DELL, B. L, Fructose and mineral metabolism, American Journal of Clinical Nutrition, 58, 771S-778S, 1993.
32. PARK, Y. K.; YETLEY, E. A.; Intakes and food sources of fructose in the United States, Am. J. Clin. Nutr., 58(suppl), 737S-47S, United States, 1993.
33. PAUL, F; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Acceptor reaction of a highly purified dextranase with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled molecular weight dextrans. Carbohydr. Res. 149: 433-441, 1986.
34. PEREIRA, A. M. Estudo da Influência da Glicose na síntese "in vitro" de dextrana clínica. Tese de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 16p, 1996.
35. RIBY, J. E.; FUJISAWA, T.; KRETCHMER, N.; Fructose absorption, Am. J. Clin. Nutr., 58(suppl): 748S-53S, 1993.

-
36. ROBYT, J.F.; KIMBLE, B.K.; WALSETH, T.F. The mechanism of dextransucrase action direction of dextran biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 165: 634-640, 1974.
 37. ROBYT, J. & TANIGUCHI, H. The mechanism of dextransucrase action: biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions withde dextran. Arch. Biochem. Biophys. 174: 129-135.
 38. ROBYT, J.F.; WALSETH, T.F. Production, Purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Carboh Research, 68: 95-11, 1979.
 39. ROBYT, J.F.; WALSETH, T.F., The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase. Carbohydr. Res. 61: 443-445, 1978.
 40. ROBYT, J.F.; WALSETH, T.F., Production, purification and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. Carbohydr. Res. 68: 9 111, 1979.
 41. ROBYT & EKLUND, L.H. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. Carboh Res. 121: 279-286, 1983.

-
42. RODRIGUES, M.I. Contribuição ao Estudo da Utilização da Enzima Dextran-sacarase na Modificação de Polissacarídeos. Tese de mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas, 1995.
43. SABATIE, J.; CHOPIN, L.; PAUL.; MONSAN, P.; The effects of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran, *Biotechnol Letters*, 8(6), 425-430, 1986.
44. SANTOS, V.M. Estudo das condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica, Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 108p., 1996.
45. SASKA, M.; WU, M.D.; CLARKE, S.J.; IGBAL, K.; MRINI, M. Applications of continuous chromatographic separation in the sugar industry. *Int. Sugar Jnl.* 95: 137-143, 1993.
46. SCHINEIDER, A. L. S.; Estudo da produção de Inulinase por *kluveromyces marxianus* ATCC 36907, Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 137p.; 1996.
47. SHI, X.; SCHEDL, H. P.; SUMMERS, R. M.; LAMBERT, G. P.; CHANG, R.; XIA, T.; GISOLFI, C. V.; Fructose Transport Mechanisms in Humans, *Gastroenterology*, 113: 1171-1179, 1997.

-
48. SIDEBOTHAM, R.L; Dextran. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 371-444, 1974.
49. SOUZA, E.A. Modelagem e Simulação de um Reator Contínuo com Reciclo da Enzima para Produção "in vitro" de Dextrana. Tese de mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas, 1993.
50. STEFANSON, M.; WESTERLUND, D.; Strong Complex Formation of Carbohydrates with Metal Ions at Alkaline pH Studied by Ligand Exchange Chromatography, *Chromatografia*, vol.35, n.o. 3/4, February, 1993.
51. SU, D. & ROBYT, J.F. Control of the synthesis of dextran and acceptor products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. *Carbohydr. Res.* 248: 339-348, 1993.
52. TANRISEVEN, A.; ROBYT, J.F. Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentrations. *Carbohydr. Res.* 245: 97-104, 1993.
53. VIARD, V.; LAMELOISE, M. L. Modelling glucose-fructose separation by adsorption chromatography on ion exchange resins. *Journal of Food Engineering.* 17: 29-48, 1992.
54. VUILLEMIER, S., Prospects for HFS and high intensity sweeteners, *International Sugar Journal*, n.o. 1186, vol.99, 514-512, 1997.

55. WOLFF, I. A.; MEHLTRETTER, C. L.; MELLIES, R. L.; WATSON, P. R.; HOFREITER, B. T.; PARICK, P. L.; RIST, C. E., Production of clinical-type dextran. *Industrial Engineering Chemistry*, 46, 1954.

APÉNDICE

55. WOLFF, I. A.; MEHLTRETTER, C. L.; MELLIES, R. L.; WATSON, P. R.; HOFREITER, B. T.; PARICK, P. L.; RIST, C. E., Production of clinical-type dextran. *Industrial Engineering Chemistry*, 46, 1954.

APENDICE A

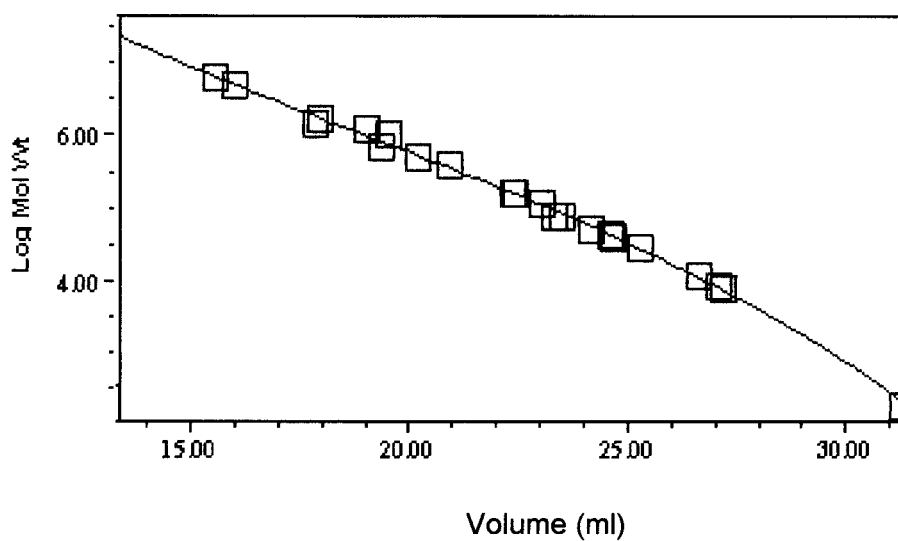


Figura 01: Curva de calibração de padrões de dextrana

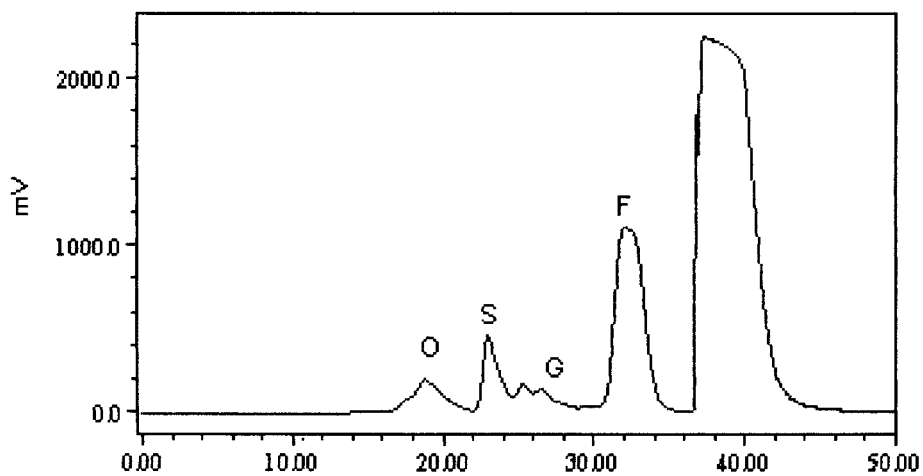


Figura 02: Curva de calibração de padrões de açúcares (O=Oligossacarídeos, S=Sacarose, G=Glicose, F=Frutose).

APENDICE B

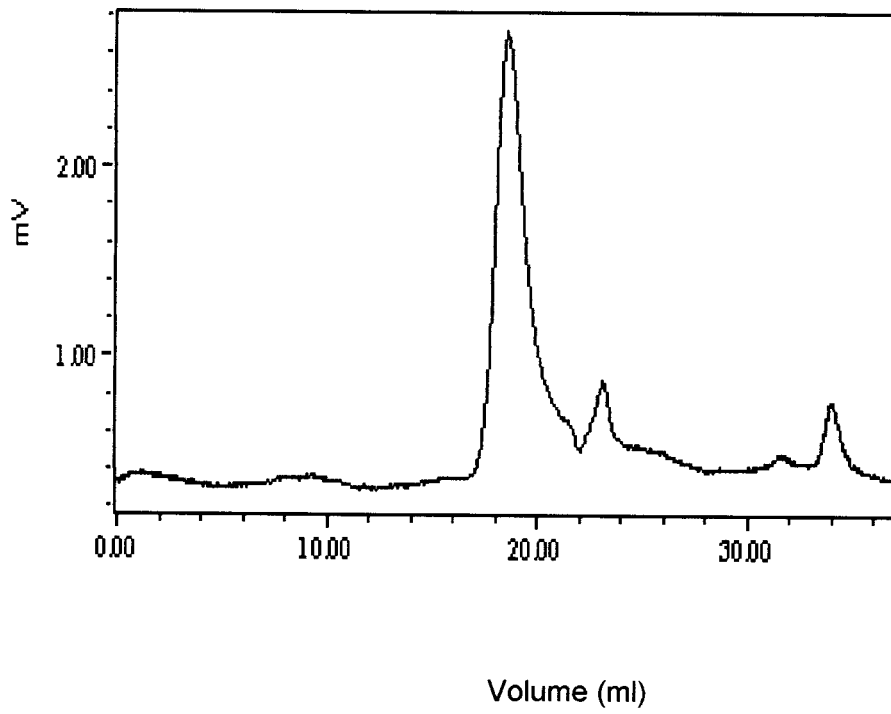


FIGURA 01: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de 90 min)

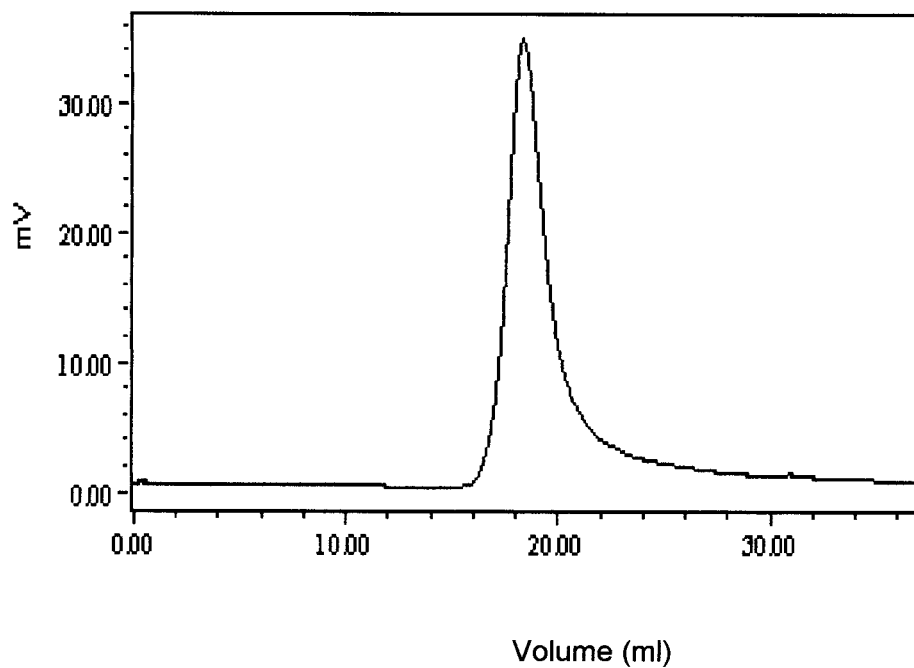


FIGURA 02: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de 110 min)

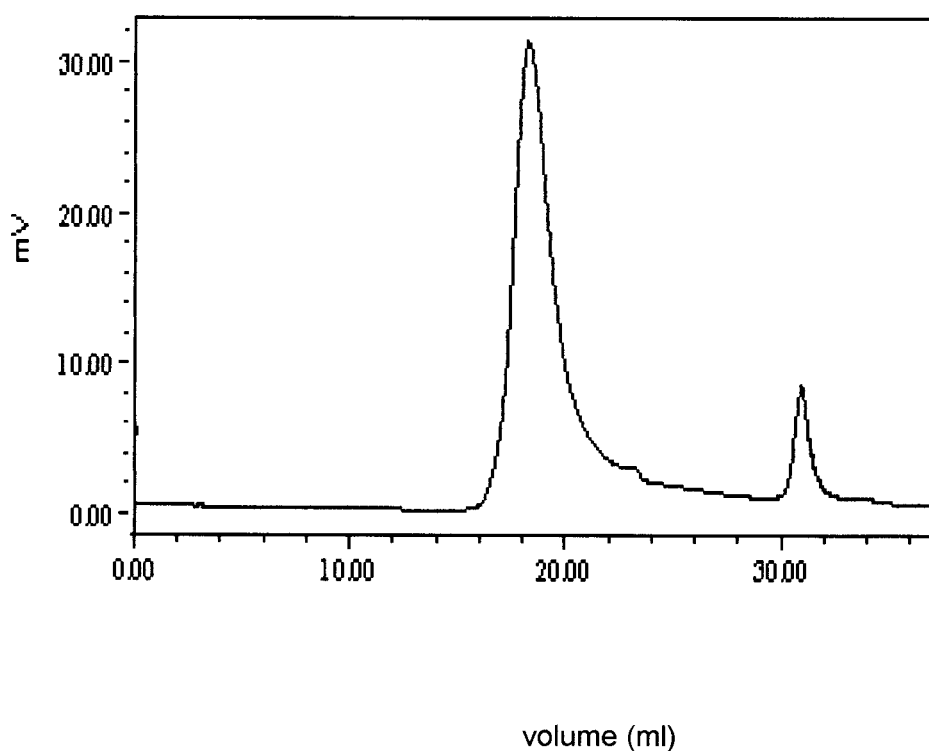


FIGURA 03: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de 130 min)

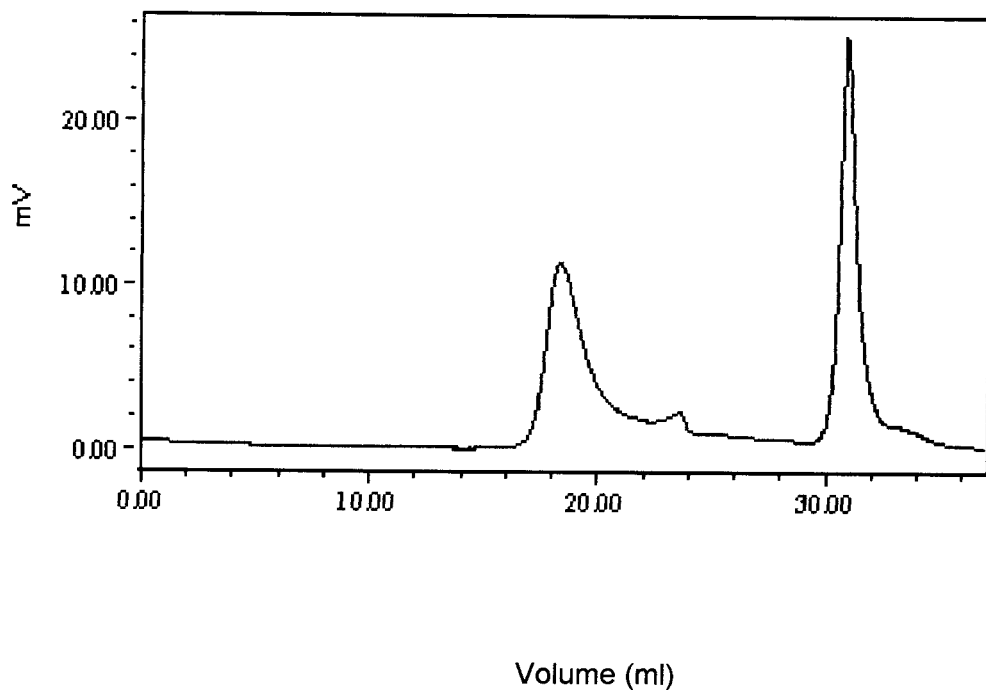


FIGURA 04: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de 150 min)

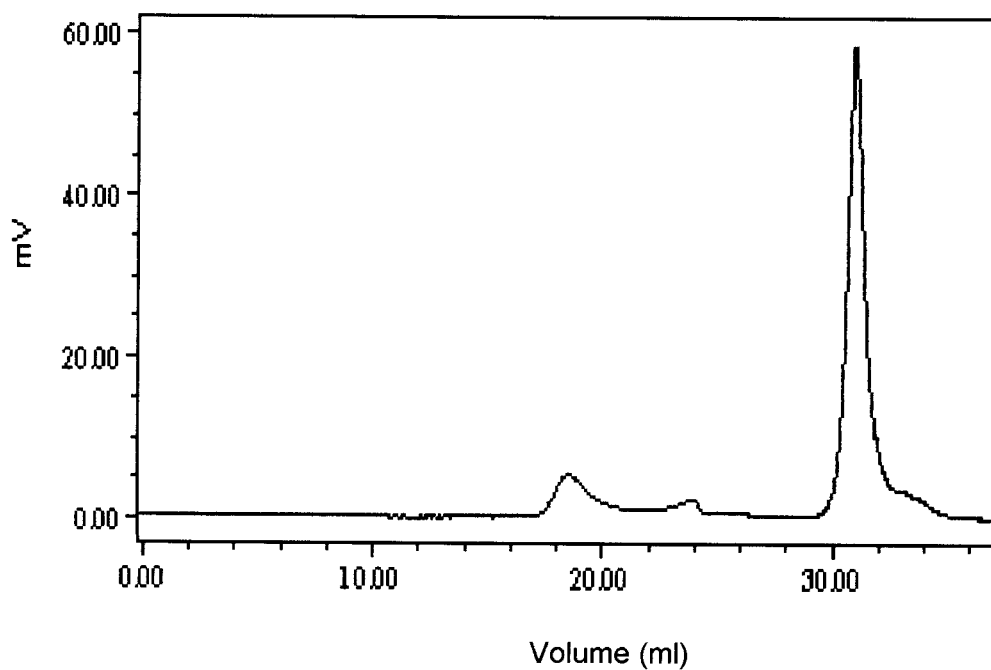


FIGURA 05: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de 170 min)

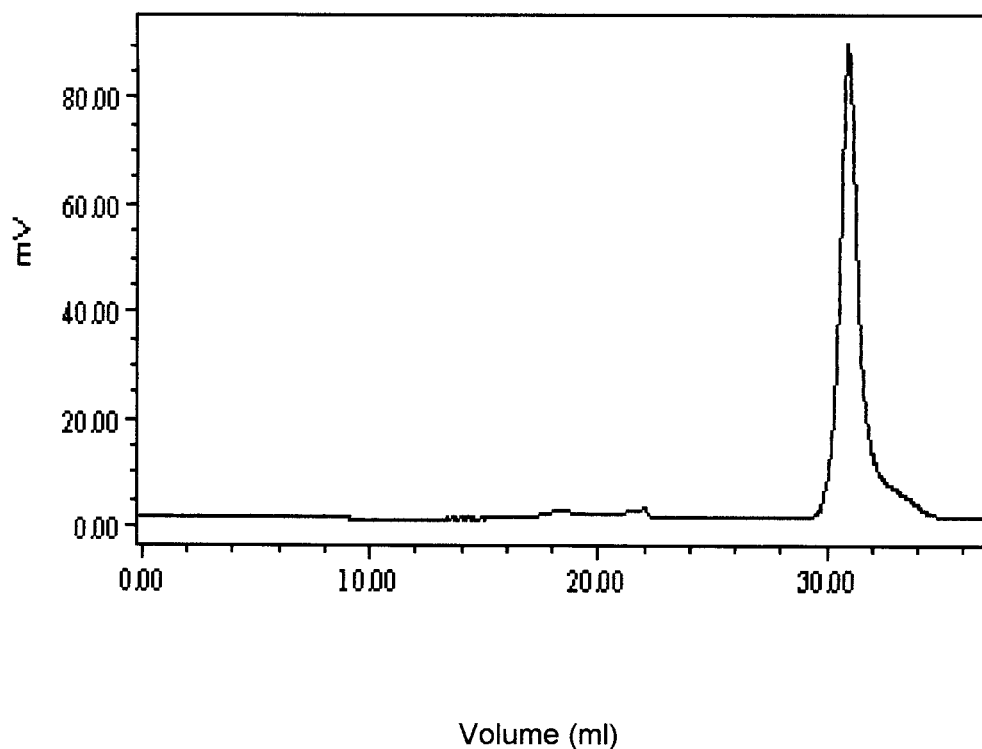


FIGURA 06: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de **190 min**)

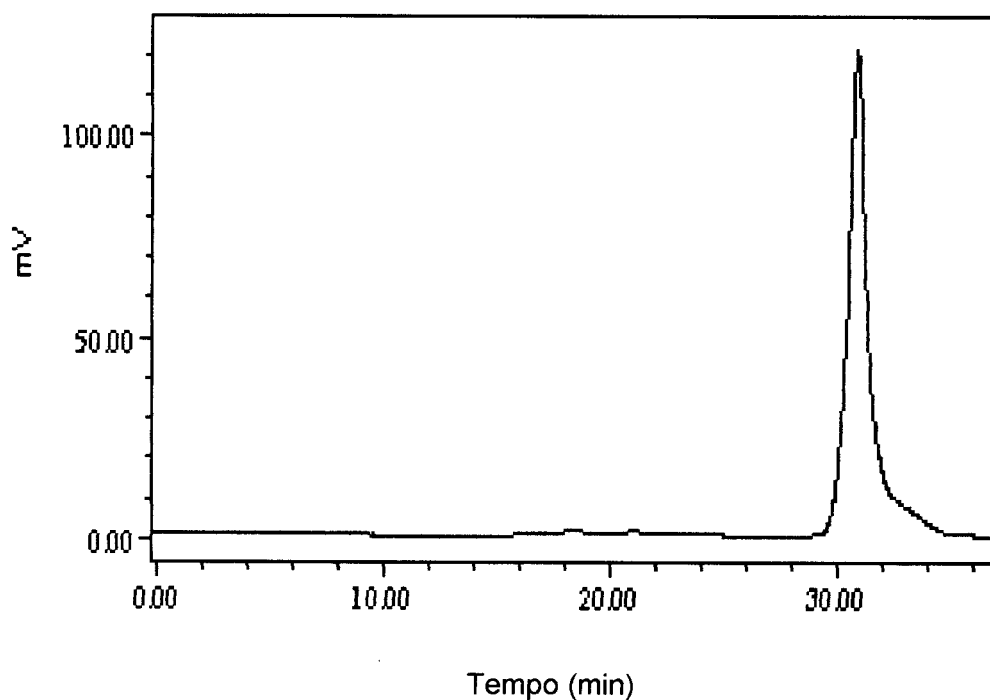


FIGURA 07: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de **210 min**)

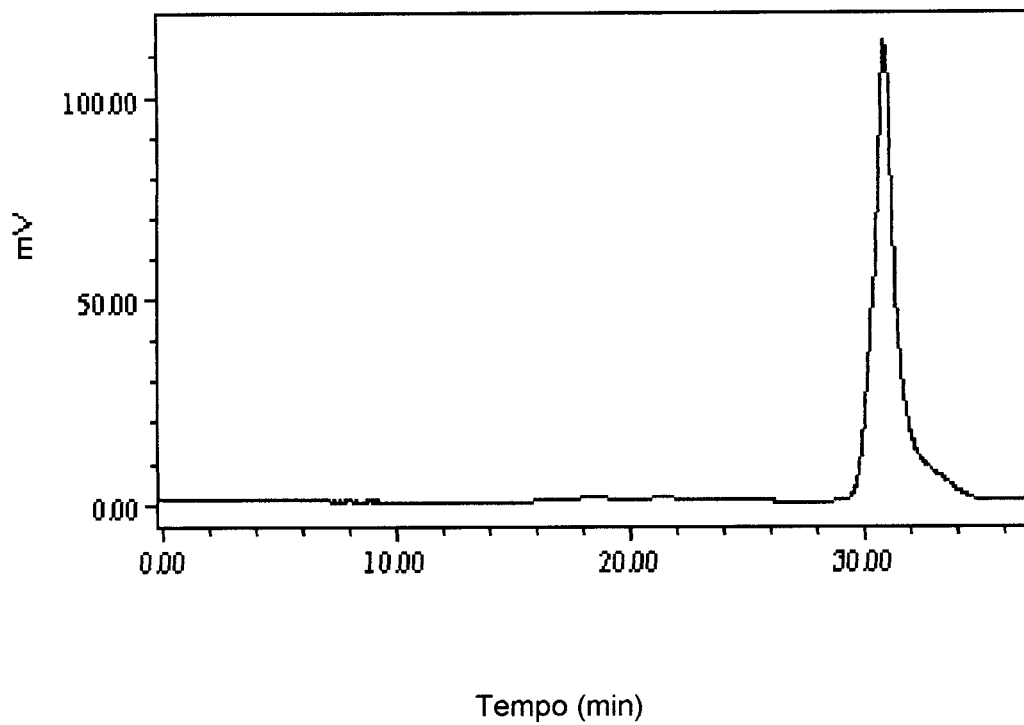


FIGURA 08: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de **230 min**)

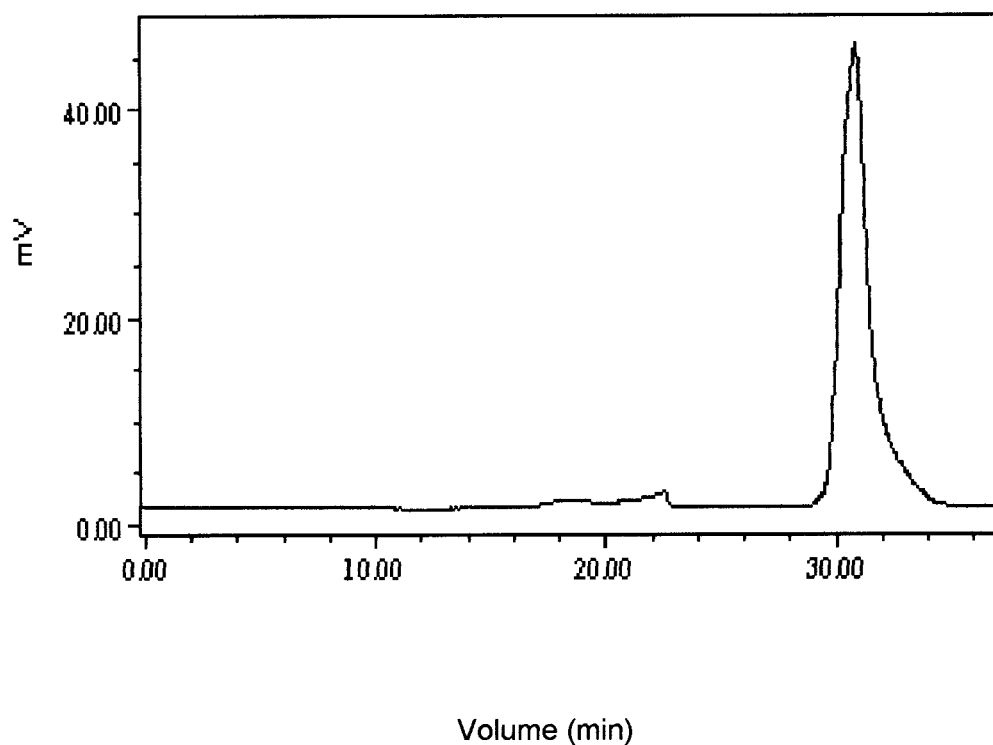


FIGURA 09: Cromatograma de amostra da separação de frutose utilizando resina Dowex XUS 40285 (60°C; 0,1 ml/min; tempo corrida de **270 min**)

APENDICE C

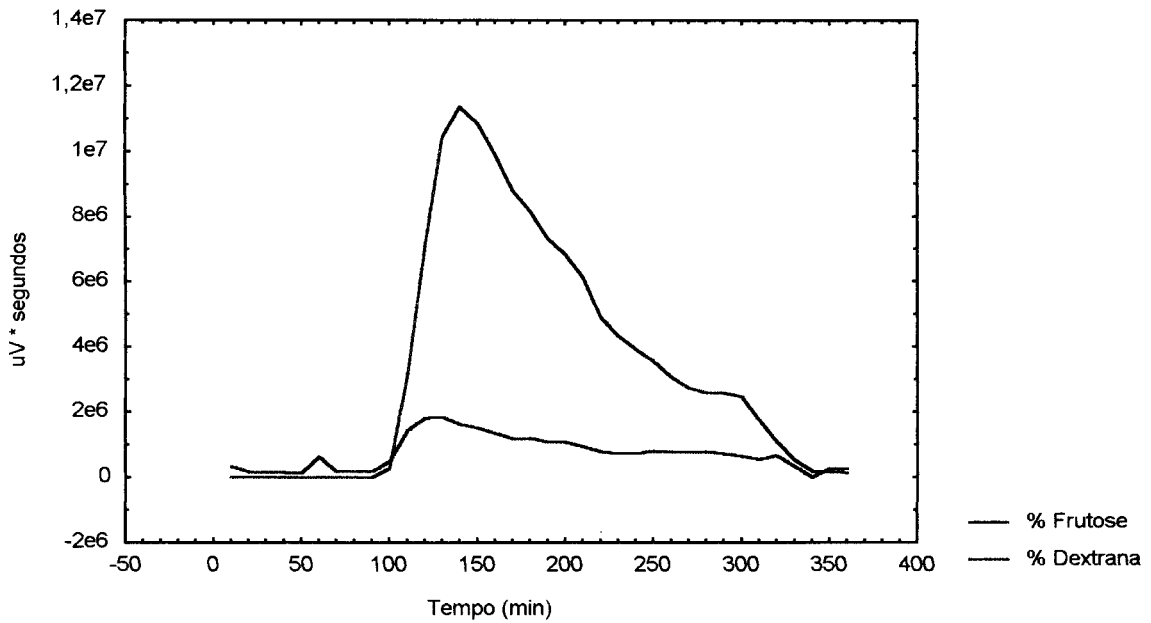


FIGURA 01: Perfis de concentração para resina Dowex 50W X8 (temperatura de separação de 35°C e vazão de 0,1ml/min)

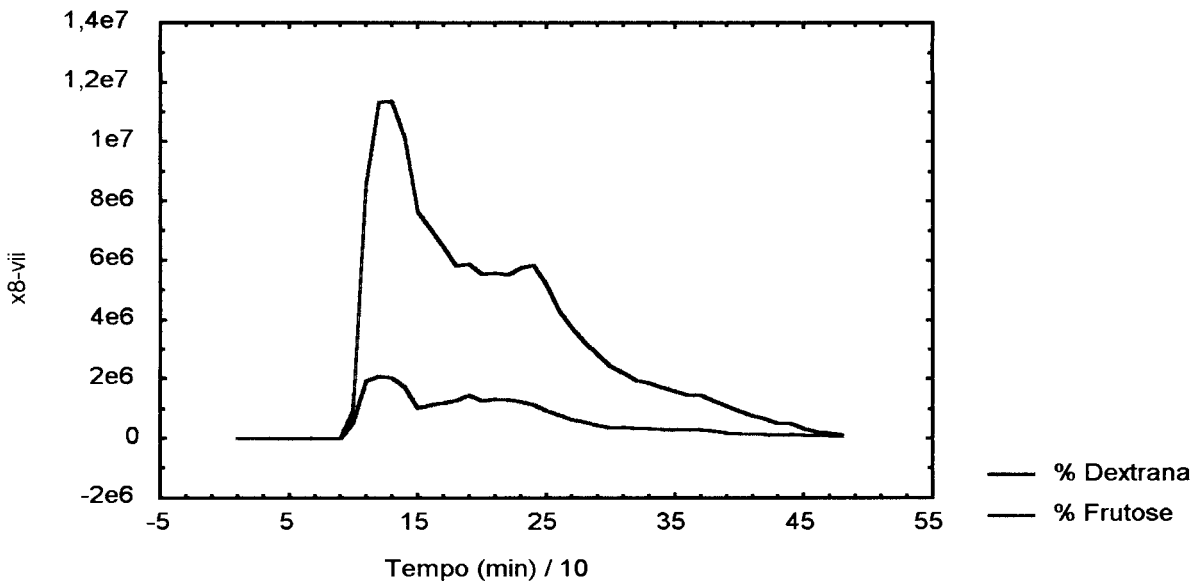


FIGURA 02: Perfis de concentração para resina Dowex 50W X8 (temperatura de separação de 45°C e vazão de 0,1ml/min)

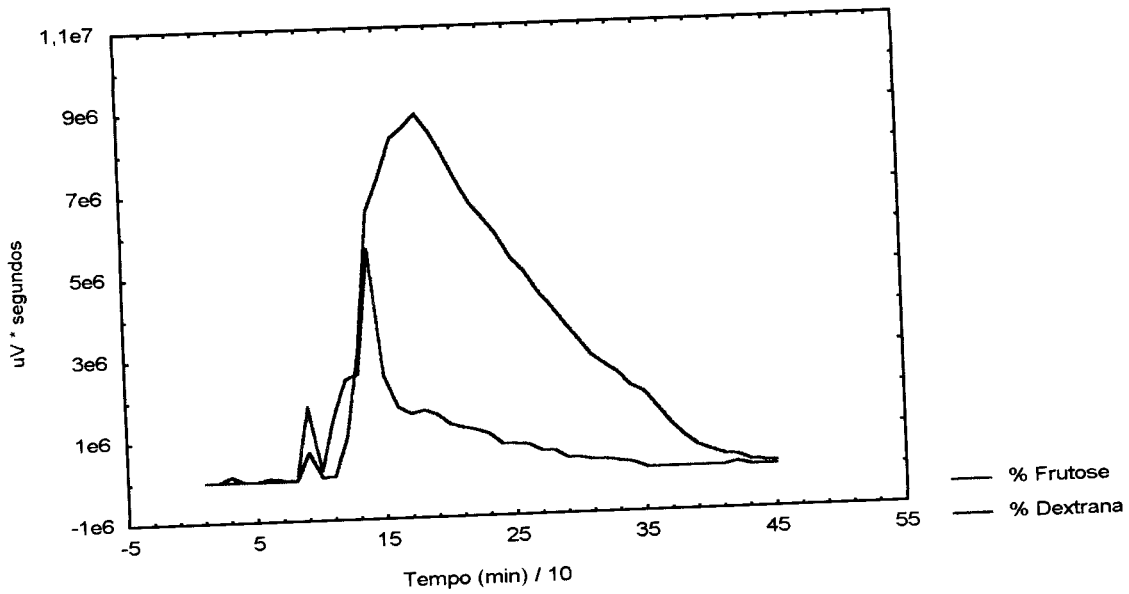


FIGURA 03: Perfis de concentração para resina Dowex XUS 40285 (temperatura de separação de 35°C e vazão de 0,1ml/min)

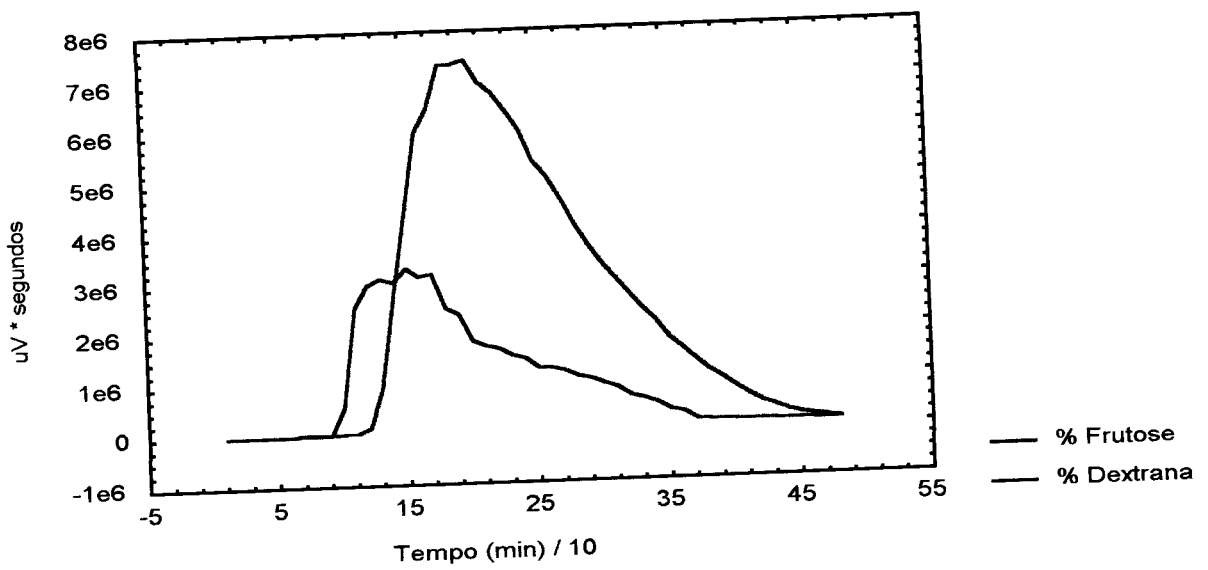


FIGURA 04: Perfis de concentração para resina Dowex XUS 40285 (temperatura de separação de 45°C e vazão de 0,1ml/min)

Resultados:

A curva de calibração encontrada foi representada pela Equação 4.0 e pode ser observada na Figura do Apêndice A.

$$\log M_w = 1,34 \cdot 10^{-7} T_R - 7,13 \cdot 10^{-1} T_R^2 + 2,56 \cdot 10^{-2} T_R^3 - 4,52 \cdot 10^{-4} T_R^4 \quad (4.0)$$

$$r = 0,998$$

Tabela 4.1: Tempos de Retenção e Peso Molecular Médio dos Padrões da Curva de Calibração.

Padrão	Mw	Tr (min)
DXT 5000K	4.900.000	18,9
DXT 1750K	1.750.000	18,3
DXT 685K	685.000	19,6
DXT 165K	165.500	22,3
DTX79K	78.800	23,4
DXT 43K	42.750	24,5
DXT 11K	11.700	26,7
FRUTOSE	180	31,2

A caracterização do produto da síntese foi realizada dividindo-se a distribuição de peso molecular nas seguintes faixas:

- *Dextranas Totais*: porcentagem de dextrana acumulada na faixa de peso molecular maior que 10.000 daltons
- *Dextranas de Alto Peso Molecular*: dextranas com peso molecular maior que 100.000 daltons

nº

Resultados:

- *Dextrana Clínica*: dextranas com peso molecular entre 20.000 e 100.000 daltons, sendo:
 - *Dextrana 40*: dextranas na faixa de peso molecular de 40.000 ± 20.000 daltons
 - *Dextrana 75*: dextranas na faixa de peso molecular de 75.000 ± 25.000 daltons
- *Dextranas de Baixo Peso Molecular*: dextranas com peso molecular entre 10.000 e 20.000 daltons

Considerou-se ainda uma faixa incluindo as dextranas com peso molecular abaixo de 10.000 daltons: frutose e oligossacarídeos.

A distribuição de pesos moleculares do produto da síntese pode ser verificada na Tabela 10 e o cromatograma da síntese é mostrado na Figura 4.1.

Tabela 4.2: Distribuição de Peso Molecular para Amostra da Síntese

Faixa de Peso Molecular	% de Dextrana
> 10.000 daltons	12,296
< 10.000 daltons, frutose e oligossacarídeos	87,702
Na faixa de Peso Molecular > 10.000 daltons:	
> 100.000 daltons (alto peso molecular)	12,082
Entre 20.000 e 60.000 daltons (dextrana 40)	0,122
Entre 50.000 e 100.000 daltons (dextrana 75)	0,053

Os resultados mostram a alta porcentagem de dextrana de alto peso molecular:

... correspondendo a dextrana de baixo peso ou dextrana clínica. A grande