



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**

*Estudo da síntese enzimática de dextrana na  
presença de maltose como acceptor*

**Sueli Rodrigues**

**Orientadora: Profa. Dra. Liliane M.F. Lona**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Telma T. Franco**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

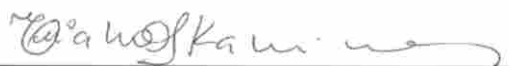
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

R618e	<p>Rodrigues, Sueli</p> <p>Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor 1 / Sueli Rodrigues. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.</p> <p>Orientadores: Liliane Maria Ferrareso. Lona e Telma Teixeira Franco</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Dextrano. 2. Carboidratos. 3. Biopolímeros. 4. Simulação (Computadores). 5. Maltose. I. Lona, Liliane Maria Ferrareso. II. Franco, Telma Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.</p>
-------	--

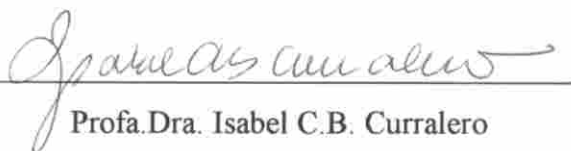
Tese de Doutorado defendida por Sueli Rodrigues e aprovada em 06 de outubro de 2003  
pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª. Dra. Liliane M.F. Lona - orientadora



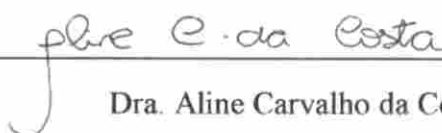
Profª. Dra. Eliana Setusko Kamimura



Profª. Dra. Isabel C.B. Curralero



Profª. Dra. Angela Maria Moraes



Dra. Aline Carvalho da Costa

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química de Sueli Rodrigues, defendida e aprovada pela banca examinadora em 06 de outubro de 2003.



Prof. Dra. Liliane M.F. Lona - orientadora

*Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor*

*Dedico este trabalho ao Fabiano pelo amor e  
companheirismo e à minha irmã pela amizade  
e companheirismo.*

*Sueli Rodrigues/ Tese de Doutorado (FEQ/DPQ/UNICAMP)/ Outubro de 2003*

## ***Agradecimentos***

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram, direta ou indiretamente para realização deste trabalho, não somente no aspecto profissional, mas também pessoal através da amizade e companheirismo.

Especialmente às Professoras Liliane e Telma pela excelente orientação, amizade e dedicação durante todo o trabalho de tese.

Ao Prof. Dr. John F. Robyt pela oportunidade de realização de um estágio no exterior.

Ao CNPq pela bolsa de doutoramento, que possibilitou a dedicação exclusiva ao trabalho de tese. À FAEP pelo apoio financeiro à aquisição de material de consumo e apresentação do trabalho em congressos e à CAPES pela concessão de bolsa para realização de estágio de doutoramento no exterior, através de seu Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE).

Às alunas de iniciação científica Ana Claudia e Adriana pela colaboração, dedicação e auxílio prestados durante o desenvolvimento de parte do projeto. A Lisanne e ao Dr. Lúcio Melo pelo fundamental e imprescindível auxílio com o cromatógrafo de permeação em gel (GPC). Aos amigos do LEB e LASSPQ pela prestatividade e companheirismo.

Ao Fabiano, sempre presente, pelo amor, companheirismo e carinho.

## **Resumo**

O principal objetivo do trabalho foi o estudo de um processo para obtenção de dextrana de massa molar controlada, via síntese enzimática, para com isso reduzir os custos da obtenção de dextrana clínica. Para isso foi considerada a modelagem de um reator contínuo com re-aproveitamento da enzima através da adsorção em resinas trocadoras de íons. Entretanto, os ensaios de adsorção demonstraram que a presença de dextrana impede a adsorção da enzima e seu re-aproveitamento através de cromatografia de troca iônica.

Para o controle da massa molar da dextrana foi desenvolvido um modelo matemático baseado no método dos momentos, o qual é largamente utilizado para processos químicos de polimerização, sendo este método, neste trabalho, aplicado de forma inédita para biopolímeros. Para o controle da massa molar de dextrana foi considerado o uso de maltose como acceptor. A enzima dextrana-sacarase (promotora da síntese) foi obtida de dois microrganismos diferentes: *Leuconostoc mesenteroides* B512 F e *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC. O primeiro por necessitar de sacarose como fonte de carbono para produção da enzima, contém dextrana como contaminante da enzima. Já o segundo, é capaz de produzir a enzima em meio contendo somente glicose, sendo obtida uma enzima totalmente livre de dextrana contaminante, o que possibilitou o estudo da síntese com e sem a influência de cadeias iniciais de dextrana.

O modelo baseado no método dos momentos foi então otimizado através de redes neurais e a dextrana obtida com ambas as enzimas foi caracterizada por cromatografia de permeação em gel. Os resultados obtidos mostram que a maltose não reduz a massa molar de dextrana como era esperado, mas somente sua quantidade, mesmo quando uma enzima livre de dextrana é utilizada. Quanto distribuição da massa molar, foi verificado uma distribuição bimodal para a dextrana obtida com a enzima da espécie nativa (B512F), sendo este material constituído de oligodextranas e dextrana de alta massa molar. Já a dextrana obtida com a enzima da espécie mutante (B512FMC) foi toda de alta massa molar ( $>10^6$ ). À luz dos resultados desse trabalho, e das recentes publicações na área, foi proposto um mecanismo, onde a síntese de dextrana ocorre de forma independente da formação dos produtos do acceptor.

## ***Abstract***

This work concerns on dextran enzymatic synthesis with maltose as acceptor. Dextran using maltose as acceptor was produced by enzymatic synthesis using two kinds of dextransucrase, one obtained from *Leuconostoc mesenteroides* B512F, native strain, and other obtained from *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC, a constitutive strain.

*L.mesenteroides* B512F is widely used to produce dextran and dextransucrase. It is an inductive strain that requires sucrose as carbon source to produce dextransucrase. On the other hand, *L.mesenteroides* B512FMC is a constitutive strain which is able to produce the enzyme in a medium containing only glucose as carbon source, avoiding the parallel dextran production.

Enzyme recovery by adsorption on ion-exchange resin and dextran molecular weight control were also studied. A mathematical model, based on the method of moments, was developed and used to simulate and optimize a batch reactor for dextran enzymatic synthesis with controlled weight. In this model, the kinetics of the two enzymes used in this work were considered.

Dextran produced by enzymatic synthesis, using maltose as acceptor and both enzymes used in this work, were characterized by gel permeation chromatography. The results were compared.



## Sumário

<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica</b>	
2.1 <i>Introdução</i>	3
2.2 <i>Produção de dextrana</i>	7
2.3 <i>Produção da enzima</i>	9
2.4 <i>Imobilização da enzima</i>	13
2.5 <i>Síntese de enzimática</i>	14
2.6 <i>Mecanismo da síntese de dextrana</i>	18
2.7 <i>Adsorção de proteínas</i>	22
2.8 <i>Cromatografia de troca iônica</i>	27
2.9 <i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	33
2.10 <i>Predição da massa molar de dextrana</i>	36
<b>Capítulo 3 – Materiais e métodos</b>	<b>47</b>
3.1 <i>Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS</i>	47
3.2 <i>Determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase do <i>L.mesenteroides</i> B512F</i>	48
3.3 <i>Determinação de proteínas</i>	51
3.4 <i>Determinação do massa seca celular</i>	52
3.5 <i>Determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase do <i>L.mesenteroides</i> B 512 FMC</i>	53
3.6 <i>Quantificação dos carboidratos envolvidos na síntese enzimática de dextrana</i>	56
3.7 <i>Determinação da quantidade de dextrana em função do tempo</i>	59
<b>Capítulo 4 – Ativação do microrganismo e produção da enzima</b>	<b>61</b>
4.1 <i>Introdução</i>	61

<i>Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor</i>	
4.2 Ativação da espécie nativa liofilizada ( <i>L. mesenteroides</i> B512F)	62
4.3 Ativação do microrganismo nativo ( <i>L. mesenteróides</i> B512F) congelado: pré fermentação	63
4.4 Fermentação do <i>L. mesenteróides</i> B512F para produção da enzima dextrana-sacarase	71
4.5 Conclusões e comentários	73
<b>Capítulo 5 – Modelagem e simulação da síntese enzimática de dextrana</b>	<b>75</b>
5.1 Modelo cinético e mecanismo de reação	75
5.2 Discussão dos parâmetros selecionados para cálculo	82
5.3 Seletividade da formação de panose	82
5.4 Modelagem matemática de reatores contínuos para síntese enzimática de dextrana	85
5.5 Simulação dos modelos	86
5.6 Resultados para o modelo batelada	89
5.7 Resultados para o modelo CSTR	91
5.8 Resultados para o modelo PFR	94
5.9 Análise dos efeitos das concentrações iniciais de maltose e sacarose nos rendimentos dos reatores estudados	97
5.10 Rendimentos de dextrana e panose com base no consumo de maltose	98
5.11 Conclusões	100
<b>Capítulo 6 – Adsorção da enzima obtida do <i>Leuconostoc mesenteróides</i> NRRL B512F</b>	<b>103</b>
6.1 Introdução	103
6.2 Determinação da isoterma de adsorção em DEAE-Streamline	104
6.3 Estudo da influência do pH na estabilidade da enzima	109
6.4 Influência do pH na adsorção da enzima	111
6.5 Cinética de adsorção	112
6.6 Dessorção da enzima	115
6.7 Conclusões e comparação com outros trabalhos de adsorção da dextrana-sacarase	115

<b>Capítulo 7 – Obtenção dos perfis de carboidratos e dextrana envolvidos na síntese enzimática de dextrana com a enzima obtida do <i>L.mesenteroides</i> B512FMC</b>	<b>119</b>
7.1 – Introdução	119
7.2 – Determinação da atividade enzimática	119
7.3 – Síntese enzimática de dextrana	121
7.4 – Perfis de carboidratos e dextrana obtidos na síntese	122
7.5 – Incorporação das constantes de formação do produto secundário do acceptor no modelo matemático	130
7.6 – Validação do modelo matemático para enzima dextrana-sacarase do <i>L.mesenteroides</i> B512FMC.	131
7.7 – Conclusões	134
<b>Capítulo 8 – Aplicação do método dos momentos para a síntese enzimática de dextrana</b>	<b>137</b>
8.1 Introdução	137
8.2 Mecanismo detalhado da síntese enzimática de dextrana	138
8.3 Aplicação do método dos momentos à síntese enzimática de dextrana	140
8.4 Resultados	149
8.5 Conclusões	154
<b>Capítulo 9 – Validação do modelo</b>	<b>157</b>
9.1- Introdução	157
9.2- Redes neurais	158
9.3 – Treinamento da rede neural	166
9.4- Síntese enzimática de dextrana	169
9.5 – Validação do modelo	170
9.6 - Conclusões, discussão dos resultados e proposta de um novo mecanismo para a síntese de dextrana na presença de aceptores	176

<b>Capítulo 10 – Conclusões e trabalhos futuros</b>	<b>179</b>
---	------------

<b>Capítulo 11 - Bibliografia</b>	<b>185</b>
-----------------------------------	------------

## **Apêndices**

<i>Apêndice 1 – Determinação da atividade enzimática</i>	<b>A.1</b>
--	------------

<i>Apêndice 2 – Cálculo do rendimento e produtividade para os reatores</i>	<b>A 5</b>
--	------------

<i>Apêndice 3 – Perfis de concentração para os reatores estudados no Capítulo 5</i>	<b>A.9</b>
---	------------

<i>Apêndice 4 – Determinação da massa proteica obtida do <i>L.mesenteroides</i> B512F</i>	<b>A.23</b>
---	-------------

<i>Apêndice 5 – Comparação entre as isotermas de Langmuir</i>	<b>A.29</b>
---	-------------

<i>Apêndice 6 – Equações diferenciais do modelo cinético para a síntese de dextrana</i>	<b>A.33</b>
---	-------------

<i>Apêndice 7 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos pelo modelo matemático para a síntese de dextrana com a enzima obtida do <i>L.mesenteroides</i> B512FMC</i>	<b>A.45</b>
---	-------------

<i>Apêndice 8 – Massa molar da dextrana</i>	<b>A.51</b>
---	-------------

## **NOTAÇÃO**

ABS	absorbância
C	concentração (mmol/L)
CPM	<i>counts per minutes</i> (unidade de radiação)
D	coeficiente de dispersão axial (cm <sup>2</sup> /min)
d	diluição da amostra
Dk	momento 'k' do polímero morto
E	concentração de enzima (UI/L)
F	concentração de frutose ( mmol/L)
F <sub>1</sub>	concentração de frutose na corrente de alimentação (mmol/L)
[I]	concentração de iniciador (mmol/L)
k <sub>fT</sub>	constante cinética da terminação da reação de polimerização através da transferência de cadeia para uma molécula T
k <sub>i</sub>	constante cinética de iniciação da reação de polimerização
k <sub>p</sub>	constante cinética de propagação da reação de polimerização
[M ]	concentração de monômero (mmol/L)
M	concentração de maltose (mmol/ L)
M <sub>1</sub>	concentração de maltose na corrente de alimentação (mmol/ L)
MW	massa molar do monômero
$\overline{M}_n$	massa molar média numérica do polímero
$\overline{M}_w$	massa molar média ponderal do polímero
P	concentração de panose (mmol/L)

*Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor*

P4	concentração do produto secundário do acceptor (mmol/L)
P5	concentração do produto terciário do acceptor (mmol/L)
[Pn·]	concentração da cadeia crescente de polímero (mmol/L)
P <sub>1</sub>	concentração de panose na corrente de alimentação do reator (mmol/L)
PD	produtividade em dextrana com base na sacarose consumida ( g/ L min)
PDI	índice de polidispersidade
pI	ponto isoelétrico da proteína
PP	produtividade da panose com base na sacarose consumida ( g/L min)
Q <sub>1</sub>	vazão de alimentação do reator CSTR( L/ min)
Q <sub>2</sub>	vazão de saída do reator CSTR (L/ min)
RD	rendimento em dextrana com base na sacarose consumida (%)
RDM	rendimento em dextrana com base no consumo de maltose (%)
RPM	rendimento em panose com base no consumo de maltose (%)
RP	rendimento em panose com base na sacarose consumida (%)
RS	consumo de sacarose (%)
[S]	concentração de substrato (mmol/L)
S	concentração de sacarose (mmol/L)
S <sub>1</sub>	concentração de sacarose na corrente de alimentação (mmol/L)
Sel <sub>0</sub>	seletividade do acetor
t	tempo (min)
[T]	concentração da molécula T (acceptor)
U	velocidade superficial (cm /min)
UDS	unidade de dextrana-sacarase
UI	unidade internacional de atividade enzimática
V	volume do reator (L)

*Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor*

$Y_k$  momento 'k' do polímero vivo

$Z$  comprimento (cm)

***Letras gregas***

$\alpha$  coeficiente angular da curva de calibração de DNS (mg/ ABS ml)

$\beta$  *coeficiente angular da reta da curva cinética (ABS/ min)*

$\tau$  tempo de residência (min)

$\sigma^2$  variância

$\mu_k$  momento 'k' de uma curva de distribuição

## Capítulo 1

### Introdução

---

O principal objetivo do trabalho foi o estudo de um processo para obtenção de dextrana de massa molar controlada, via síntese enzimática, para com isso reduzir os custos da obtenção de dextrana clínica. A dextrana é um polissacarídeo de alto valor agregado obtido à partir da sacarose, tendo a enzima dextrana-sacarase como promotora da síntese. Sua aplicação depende fortemente de sua massa molar., podendo ser aplicada nas áreas farmacêutica, química, petroquímica e de alimentos. A produção de dextrana em escala industrial é realizada através da fermentação da bactéria não patogênica *Leuconostoc mesenteroides*, sendo a síntese enzimática de dextrana um processo viável devido à alta estabilidade da enzima nas condições ótimas de síntese. As seguintes vantagens do processo enzimático sobre o processo fermentativo são destacadas:

- Maiores rendimentos
- Maior facilidade de purificação do produto final
- O controle do processo é facilitado

Apesar de apresentar diversas vantagens sobre o processo fermentativo, o alto custo da enzima inviabiliza a utilização do processo enzimático em larga escala. Para a redução do custo do processo enzimático, foi estudada a possibilidade de recuperação da enzima através da adsorção e dessorção em leitos expandidos, como forma de minimizar os custos de produção.

Neste trabalho é apresentado o estudo da síntese enzimática de dextrana com massa molar controlada e o estudo da viabilidade do reaproveitamento da enzima através da adsorção em leitos expandidos. O estudo envolve a produção da enzima, a obtenção da isoterma de adsorção da enzima em DEAE-Streamline, o desenvolvimento de um modelo matemático para estimar a massa molar da dextrana em função das condições operacionais



do reator, e por fim a síntese enzimática de dextrana e caracterização do produto através da determinação de sua massa molar.

Para obtenção da enzima, foram considerados dois microrganismos: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F (espécie nativa) e seu mutante constitutivo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512FMC. O primeiro (nativo) só produz a dextrana-sacarase, enzima promotora da síntese de dextrana, em meio contendo sacarose como fonte de carbono, pois trata-se de uma espécie com expressão da enzima indutiva. Já o segundo (mutante) é capaz de produzir a enzima em meio contendo glicose com fonte de carbono, pois trata-se de uma espécie com expressão da enzima constitutiva, e apresenta uma produtividade superior à 100 vezes a obtida com a espécie nativa (Kitaoka e Robyt, 1998a).

Para determinação da isoterma de adsorção da enzima, foi considerada a resina DEAE-Streamline. A escolha desta resina é atribuída ao fato de ser uma resina apropriada à operação em leitos expandidos, apresentar o mesmo grupo trocador que a DEAE-Celulose, a qual já foi estudada em trabalhos anteriores (Souza, 1993 e Currello *et al.*, 1998) além de ter suas propriedades hidrodinâmicas experimentalmente determinadas (Santos, 2001).

Para o controle da massa molar de dextrana, foi utilizado um mecanismo cinético onde a maltose é considerada como acceptor para a produção de dextrana de massa molar controlada (Heincke *et al.*, 1999). Primeiramente foi considerado um modelo onde o comportamento de três reatores é estudado através da simulação de três reatores ideais: batelada, contínuo (CSTR) e tubular (PFR), onde a presença de maltose é considerada. Os resultados são analisados em termos do rendimento em dextrana e em panose, subproduto da síntese devido à presença de maltose. Para a estimativa da massa molar de dextrana, foi utilizado o método dos momentos. Este método é freqüentemente aplicado a polimerizações químicas e não foram encontradas citações em literatura aberta da utilização de tal método para biopolímeros. Devido às particularidades da reação de biopolimerização, o método teve que ser adaptado para o desenvolvimento de um modelo matemático aplicado à síntese enzimática de dextrana.

As dextranas sintetizadas com a enzima dextrana-sacarase, proveniente tanto da espécie nativa como da espécie mutante, foram caracterizadas através de cromatografia de permeação em gel (GPC).

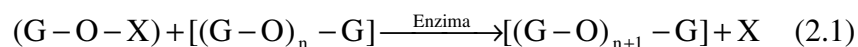
## Capítulo 2

### Revisão Bibliográfica

---

#### 2.1 Introdução

Biopolímeros extracelulares têm encontrado grande aplicação em diversas áreas tais como indústria alimentícia, onde são utilizados como estabilizantes, espessantes e emulsificantes, e na indústria farmacêutica, onde são utilizados como veículos para drogas e agentes complexantes para produção de medicamentos. A goma xantânica e as dextranas, são polissacarídeos extracelulares, solúveis em água e bastante conhecidos, sendo também de grande interesse comercial. Polissacarídeos são polímeros de carboidratos, cujas unidades são ligadas entre si pelo grupo hemicetal hidroxil do  $C_1$  da molécula de carboidrato, segundo reação genérica a seguir:



Onde:

G unidade de carboidrato

X produto não polimérico (pirofosfato ou oligossacarídeo)

Enzima transglicosidase

Os polissacarídeos podem ser extra-celulares ou intracelulares, podendo ou não se tratar de um componente estrutural da célula. Já quanto à natureza química, os mesmos podem ser classificados em homopolissacarídeos, aqueles que contêm apenas um tipo de açúcar (único monômero) e heteropolissacarídeos, os que contêm mais de um tipo de açúcar (mais de um monômero).

A maioria dos polissacarídeos é sintetizada no interior da célula, sendo que a maioria dos exopolissacarídeos é um metabólito secundário obtido quando o

microorganismo se encontra em um meio com excesso de sua fonte de carbono. A atividade metabólica está relacionada com a taxa de crescimento e o meio de cultura, sendo temperatura, pH, concentração de substrato e de nutrientes fatores importantes tanto para o crescimento do microorganismo como para a produção de polissacarídeos.

Denomina-se dextrana uma larga classe de polissacarídeos, obtidos por fermentação ou síntese enzimática, cujo monômero é o  $\alpha$ -D-glucopiranosil. Embora existam outras bactérias capazes de sintetizar dextrana, tais como *Acetobacter* e *Streptococcus*, a maioria dos estudos publicados se referem ao *Leuconostoc mesenteroides* ou *Leuconostoc dextranicum*, sendo que o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F produz dextrana com 95 % de ligações  $\alpha$ -1,6 e 5 % de ligações 1,3- $\alpha$ -D-glucanopirosídicas, sendo o mais utilizado industrialmente.

A dextrana é um dos poucos polissacarídeos extra-celulares que pode ser obtido via síntese enzimática sem alteração de suas características. Trata-se de um carboidrato de fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$  com rotação ótica positiva. Foi descoberta em 1874 por Scheibler como o agente causador do espessamento de xaropes de cana-de-açúcar e de beterraba. Entretanto, em 1864 Pasteur já havia atribuído este espessamento a uma ação microbiana (Alsop,1983). Atualmente existe uma ampla variedade de dextranas, as quais podem ser pouco ou altamente ramificadas. A faixa de massa molar deste produto é também bastante ampla, variando de 1000 daltons até dextranas com massa molar superior a  $2 \times 10^6$  daltons.

As soluções aquosas de dextrana são neutras, autoclaváveis e apresentam estabilidade superior a 5 anos. A ingestão de dextrana é seguida de um rápido aumento da taxa de açúcar no sangue e de glicogênio no fígado. Sua degradação no organismo é rápida sendo produzidos essencialmente açúcares de baixa massa molar, os quais são rapidamente reabsorvidos.

A massa molar da dextrana é uma propriedade chave, sendo definida em termos de massa molar média ( $\overline{M}_w$ ) e numérica ( $\overline{M}_n$ ). Estas propriedades caracterizam a dextrana e podem ser determinadas através de cromatografia de permeação em gel (GPC). As aplicações da dextrana estão altamente relacionadas com sua massa molar, podendo ser utilizada como estabilizante e espessante de alimentos, expensor de plasma sanguíneo,

película protetora de sementes, defloculante, estruturas cirúrgicas, veículo para medicamentos e peneiras moleculares, dentre outras aplicações.

A dextrana de baixa massa molar, ou clínica (massa molar na faixa de 40.000 a 70.000 Da), é largamente utilizada na indústria farmacêutica como matéria prima de medicamentos e expensor de plasma sanguíneo, soluções oftálmicas e soluções para preservação de órgãos humanos em procedimentos cirúrgicos (cirurgias cardíacas, por exemplo). O uso clínico de dextrana nos últimos 50 anos comprova a sua segurança e qualidade. Comercialmente, a dextrana farmacêutica é denominada Dextrana 40 e Dextrana 70, sendo sua massa molar rigorosamente controlada pelos órgãos de vigilância sanitária. As principais características da dextrana clínica são sua alta resistência ao calor (resistência à esterilização) e armazenagem, independência do sangue do receptor, baixo índice de efeitos colaterais e transmissão de doenças, além da propriedade química de se ligar a íons metálicos (propriedade relacionada com as ligações  $\alpha$ -1,3), proteínas e até mesmo à hemoglobina, formando compostos de interesse medicinal tais como dextrano-sulfato (anticoagulante semelhante à heparina) e ferro-dextrana (utilizada no tratamento de anemia em animais e humanos). Outra aplicação medicinal potencial relevante é o tratamento contra AIDS fazendo parte do coquetel anti-viral (Busso e Resnick, 1990). Sendo assim, a dextrana clínica pode ser uma alternativa para a obtenção de sangue artificial, dentre outros usos ainda não identificados (Alsop, 1983). A Dextrana 40 provoca expansão sangüínea menor que a Dextrana 70, sendo esta última utilizada para manter o volume de sangue e a pressão arterial em vítimas de queimaduras graves.

Já a dextrana de massa molar média (100.000 a 25.000.000 daltons) é utilizada na indústria alimentícia como agente geleificante, espessante e estabilizante de alimentos. Na indústria química, é empregada para obtenção de peneiras moleculares, tendo grande aplicabilidade na obtenção de colunas cromatográficas (DEAE-SEPHADEX) e na produção de soda e de alumínio. Há ainda a dextrana de alta massa molar (superior a 25 milhões de daltons), a qual pode ser empregada na extração de petróleo com alta viscosidade, fazendo parte da lama de perfuração e sendo também empregada na recuperação secundária de petróleo. Devido às suas particularidades, em muitos casos, a dextrana não pode ser substituída por polissacarídeos semelhantes, garantindo assim sua aplicabilidade industrial.

A dextrana nativa (alta massa molar) é obtida por fermentação na forma de um xarope viscoso, que é posteriormente processado para formar um pó seco, o qual pode ser estocado nesta forma ou ser solubilizado e armazenado na forma de solução. Ambas as formas de estocagem são estáveis por mais de cinco anos. No caso da estocagem do pó, este deve ser mantido selado para evitar a absorção de umidade. O pH ótimo de estocagem das soluções de dextrana está entre 6 e 7. A esterilização por aquecimento ou filtração não afeta a distribuição da massa molar do produto. Já a esterilização por meio de irradiação pode provocar a degradação das cadeias e alteração da distribuição da massa molar (Catálogo de Produtos Pharmacia, 2001)

Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior, foram importadas aproximadamente 16 toneladas de dextrana nativa no ano de 1999, o que corresponde a um gasto de US\$ 280.000, não sendo incluso neste montante despesas de frete. Apesar de se tratar de um biopolímero obtido a partir da sacarose, matéria-prima abundante e barata no Brasil, o país importa a totalidade do que consome, ou seja o mercado potencial para o produto é de aproximadamente 16 toneladas/ano, o que pode ser elevado com a diminuição do seu custo.

A dextrana produzida via *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F é solúvel em água, metil sulfóxido e etilenoglicol, apresentando atividade ótica positiva (+ 200°) em solução aquosa na faixa de 3 a 10 % e baixa viscosidade intrínseca. A viscosidade dinâmica de soluções aquosas de dextrana aumenta consideravelmente com a concentração (Carrasco *et al.*, 1989).

Soluções aquosas de dextrana de massa molar de até 2 milhões de daltons e concentrações até 30 % demonstraram comportamento Newtoniano. O gráfico de tensão de cisalhamento em função da concentração apresenta um ponto crítico para concentrações de 8%, onde há uma mudança do coeficiente linear da reta em soluções aquosas de dextrana de massa molar de 2 milhões de daltons. Já a viscosidade de soluções de concentração em torno de 25 % são pouco dependentes da massa molar. Essas propriedades indicam que a dextrana é um polímero de menor rigidez quando comparada com outros carboidratos (Tirtaatmaja *et al.*, 2000). A compreensão do comportamento reológico das soluções de dextrana é importante, pois a elevação da viscosidade causa aumento das resistências à

transferência de massa, o que pode influenciar os processos onde estes parâmetros sejam significativos tais como processos de adsorção.

## 2.2 - Produção de Dextrana

A produção enzimática de polissacarídeos é de grande interesse comercial, não somente devido à obtenção de um produto final mais puro e homogêneo, mas também devido a um melhor controle do processo para obtenção do produto desejado, além de não depender de condições climáticas e outros fatores ambientais que interferem na síntese natural destes produtos. Tradicionalmente a produção industrial de dextrana é realizada via processo fermentativo e o tipo de dextrana obtida depende do microorganismo empregado, dentre outros fatores. Utilizando sacarose como fonte de carbono, o microorganismo *L. mesenteroides* B512F primeiramente produz a enzima dextrana-sacarase, a qual é responsável pela conversão de sacarose em dextrana. A dextrana de interesse comercial pode ser nativa (alta massa molar) ou clínica (baixa massa molar), sendo esta última geralmente obtida a partir da hidrólise ácida da dextrana nativa utilizando-se HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou dextranases, dentre outras técnicas tais como ultra-som (Currello, 1993). Seja qual for a técnica de hidrólise empregada, trata-se de um processo de elevado custo.

O processo fermentativo é constituído de três etapas básicas: crescimento celular, produção enzimática e produção de dextrana, sendo que após a fermentação e a separação do produto, ocorre a hidrólise para redução da massa molar do polissacarídeo, o fracionamento por solvente para obtenção das frações desejadas, o isolamento sólido (*spray drier*) e a preparação em dosagens farmacêuticas (no caso da dextrana clínica).

O tempo total do processo é variável, a viscosidade aumenta gradativamente e o pH final atinge valores entre 4,5 e 4,8 devido à formação de metabólitos ácidos pelo microorganismo. O *L. mesenteroides* B512F é uma bactéria aeróbica facultativa. A injeção de CO<sub>2</sub> ou O<sub>2</sub> puro inibe seu crescimento. Quando uma pequena quantidade de ar é injetada, a produção de dextrana aumenta e, sem aeração, a produção da enzima é diminuída (Alsop, 1983).

O crescimento celular é realizado em meio tamponado, sendo 7 o pH ótimo para esta etapa. Já o pH ótimo para a produção enzimática se encontra na faixa de 6,0 a 6,9,

enquanto que o pH ótimo para reação enzimática (síntese de dextrana) é de 5,2. Sendo assim, o controle de pH nas diversas etapas da fermentação é imprescindível para obtenção de altos rendimentos tanto da enzima, como da dextrana (produto desejado). Durante a etapa de crescimento celular, devem ser adicionados nutrientes e sais minerais. O processo total dura em média 36 horas e a remoção da dextrana do caldo de fermentação é realizada via precipitação alcoólica com etanol.

Em termos de massa molar, o rendimento do processo pode ser dividido em dextrana de alta massa molar e baixa massa molar. Alsop (1983) cita em seu trabalho vários estudos de rendimento do processo, incluindo uma curva de custo. Da análise dos resultados destes estudos, verifica-se que o melhor rendimento em termos de quantidade de dextrana produzida é encontrado para uma concentração de 17,9 % de sacarose, enquanto que o menor custo operacional é encontrado em uma concentração de 12,5 %, em se tratando de dextrana de alta massa molar. Um dos fatores preponderantes no custo de produção da dextrana é a etapa de precipitação, que consome uma alta quantidade de solvente, o qual é posteriormente recuperado via destilação (operação de alto custo). Já no caso da produção de dextrana de baixa massa molar, há ainda a etapa de hidrólise, para a qual é também atribuído um alto custo operacional. Várias melhorias para produção de dextrana têm sido propostas desde que esta se tornou um produto de interesse comercial, sendo uma das mais promissoras a síntese do polissacarídeo em um meio livre de células (síntese *in vitro*), já que a enzima pode ser isolada e armazenada sem perda considerável de estabilidade.

A obtenção de dextrana via síntese enzimática apresenta várias vantagens em relação ao processo fermentativo, apesar de requerer um nível de controle do processo mais elevado. Dentre essas vantagens estão a possibilidade de controle da massa molar, etapa de purificação mais simples, pois não há presença de células nem metabólitos secundários no meio reacional, menor gradiente de viscosidade, mesmo para a produção de dextrana nativa, além de maior rendimento. A síntese enzimática torna-se viável, no caso da produção de dextrana, devido ao fato da dextrana-sacarase ser uma enzima exógena e com alta estabilidade nas condições de processo. Outros fatores relevantes são a possibilidade de maximizar a obtenção da enzima (processo fermentativo), já que há diferenças no tocante a

pH e temperatura ótimos para síntese da enzima e da dextrana, além da possibilidade de obtenção de frutose, que é um açúcar de alto valor comercial, como produto secundário.

A atividade enzimática é um fator importante para controlar a síntese. Várias definições de atividade enzimática têm sido propostas. Atualmente as mais aceitas e utilizadas são: a unidade de dextrana-sacarase (DSU) definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana em 1 hora (obtendo-se 0,52 mg de frutose), em pH 5,2 e temperatura de 30° C (Alsop, 1983), e a unidade internacional proposta por Robyt e Walseth (1979), definida como a quantidade de enzima que incorpora 1  $\mu$ mol de glicose no polímero de dextrana nas condições especificadas de pH, temperatura e concentração de substrato. A adição de oligossacarídeos ou mesmo de dextrana de baixa massa molar na síntese enzimática promove a formação de uma maior quantidade de dextrana de baixa massa molar (dextrana clínica). Alguns resultados experimentais utilizando maltose como acceptor para obtenção de dextrana de baixa massa molar para síntese de ferro-dextrana podem ser encontrados no trabalho de Currello (1993). Heincke *et al.* (1999) estudaram a influência da adição de maltose na síntese enzimática de panose à partir da sacarose com a enzima dextrana-sacarase e estabeleceram uma rota bioquímica que ilustra a inibição provocada pela introdução deste dissacarídeo no meio reacional, o qual em altas concentrações potencializa a síntese de panose em detrimento da síntese de dextrana. Algumas observações devem ser ressaltadas, como por exemplo: o aumento da quantidade de enzima não está diretamente relacionado com o aumento na quantidade de dextrana produzida. Além da inibição pela introdução de oligossacarídeos, a síntese enzimática apresenta também inibição pelo substrato, a qual segundo Tanriseven e Robyt (1993) se deve a um impedimento alostérico que altera a conformação da enzima e impede a formação de dextrana favorecendo a síntese de oligossacarídeos.

### **2.3 – Produção da Enzima**

A enzima dextrana-sacarase (1,6- $\alpha$ -D-glucan-6- $\alpha$ -glucanosil transferase, EC. 2.4.1.5) é geralmente obtida à partir do microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F via processo fermentativo. Trata-se de uma enzima indutiva, cujo único indutor



conhecido é a sacarose, a qual é utilizada como fonte de carbono. Embora o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F seja o mais empregado atualmente, Kitaoka e Robyt (1998a e b) através de uma cultura utilizando um mutante constitutivo (*L. mesenteroides* NRRL B512FMC) e tendo glicose como fonte de carbono, obtiveram uma produtividade de enzima bastante superior à obtida normalmente com o *L. mesenteroides* NRRL B512F.

Fatores como pH e temperatura são muito importantes na síntese enzimática. Um estudo realizado por Tuschlya (1952), citado em Alsop (1983), mostra que a 23 ° C os melhores rendimentos foram encontrados para pH igual a 6,7. É importante ressaltar que mesmo em pH 6,7 ocorre rápida desnaturação da enzima para valores de temperatura superiores a 25° C. O ajuste de pH é realizado com solução de NaOH. Estudos utilizando NH<sub>4</sub>OH mostraram queda na produtividade. Um dos principais fatores de otimização do processo é o controle da concentração de sacarose, o qual pode ser monitorado por HPLC, para evitar que uma queda no nível de sacarose, atingindo o valor zero, provoque uma queda irreversível no rendimento. Com base nestes dados, foi proposta a síntese da enzima via batelada alimentada, onde sacarose em solução de NaOH é adicionada ao meio, visando a maximização da concentração da enzima e minimização da produção de dextrana. Conforme Currello (1993), a obtenção de dextrana-sacarase utilizando este processo, sendo a separação das células do caldo de fermentação realizada através de centrifugação, resultou em um caldo de fermentação com alta atividade enzimática, entretanto o mesmo apresentava também elevada concentração de açúcares redutores e dextrana de baixa massa molar, o que inviabilizou sua utilização direta na síntese *in vitro* de dextrana. No processo de batelada alimentada, a fermentação é interrompida após seis horas e espera-se que o pH final atinja o valor de 5,2 (Mibielli, 2001), enquanto que na fermentação tradicional, devido à alta instabilidade da enzima mesmo em pH 6,7 o procedimento adotado é a diminuição do pH para 5,2 com ácido fosfórico após 8 horas de fermentação, pH no qual a enzima é estável e a atividade enzimática é ótima. Com este procedimento, o açúcar residual é convertido em dextrana de baixa massa molar, a qual contribui para manter a estabilidade da enzima durante a estocagem.

Bazán (1993) realizou um estudo da síntese enzimática da dextrana clínica (massa molar de 40.000 daltons), no qual os parâmetros que influenciaram na síntese, tais como concentração de sacarose, temperatura, concentração enzimática e de aceptores, foram

estudados. A baixas concentrações de sacarose (10 %), a maior parte da dextrana obtida é dextrana nativa (alta massa molar), e a altas concentrações obtém-se dextrana clínica e uma grande quantidade de frutose, glicose e outros oligossacarídeos. A dextrana é removida do meio por precipitação alcoólica utilizando-se etanol. A remoção da dextrana nativa por precipitação é obtida com solução de etanol a 38 % (v/v), já para dextrana clínica a separação ocorre com etanol a 51 % (v/v), sendo que os oligossacarídeos são precipitados com etanol a 90 % (v/v). Os rendimentos obtidos via síntese enzimática, tanto para dextrana nativa como para dextrana clínica, são superiores aos obtidos via fermentação, porque não há consumo de substrato para crescimento celular e pode-se utilizar o pH ótimo de síntese durante todo o processo. No processo enzimático, o rendimento teórico é de 100 %, em termos de sacarose total, entretanto na prática este valor não é atingido.

O trabalho de Bazán (1993) engloba a síntese da enzima (dextrana-sacarase) via processo fermentativo e a síntese de dextrana clínica. Para a obtenção de dextrana-sacarase foram realizados vários ensaios, variando-se a concentração de substrato no meio. O processo utilizado foi o de batelada alimentada, sendo a sacarose e o NaOH adicionados em uma única solução, o que segundo Monsan e Lopez (1981) é mais adequado que a alimentação dos mesmos em soluções separadas, já que a demanda de sacarose está associada ao pH e ao crescimento celular. A enzima foi obtida em reator termostaticado. Devido à baixa estabilidade da mesma no meio fermentativo, a alimentação de substrato foi cortada após sete horas de operação para favorecer a produção da enzima e diminuir a concentração de açúcares residuais. Foi notada uma queda da atividade enzimática no final do processo, o que era esperado devido à instabilidade da enzima. Os ensaios para obtenção da enzima foram realizados na faixa de temperatura de 27-29° C, pH 6,7, sendo este reduzido com HCl para 5,2 no final do processo, e concentrações de sacarose de 80, 160 e 200 g/l. Foram obtidas como condições ótimas concentração de substrato igual a 160 g/l e temperatura de 27° C. Nestas condições, obteve-se atividade enzimática de 106 UDS/ml e concentração de açúcares residuais de 6,54 g/l. Vale ressaltar que a utilização de uma concentração elevada de substrato leva à obtenção de um caldo de fermentação altamente viscoso, o que impede a separação da enzima por ultrafiltração. A dextrana-sacarase é uma enzima que se agrega facilmente, portanto a mesma não pode ser isolada do caldo de fermentação por precipitação convencional sem comprometer a batelada. Outra forma de separação da enzima é por cromatografia de permeação em gel.

Diversos estudos têm sido publicados em relação à estabilidade da enzima dentre os quais vale a pena referenciar o trabalho de Kobayashi e Matsuda (1980), o qual apresenta um estudo da atividade relativa em função do pH e da temperatura. De acordo com este estudo, a enzima apresenta atividade máxima em pH 6,0 e temperatura de 30°C, sendo que a variação da temperatura e do pH provocam variações não lineares para atividade enzimática.

Em relação à fonte de carbono, é indicada a utilização de uma baixa concentração de sacarose, visando obter maiores rendimentos (Alsop,1983). Sabe-se também que em qualquer processo envolvendo microorganismos, não somente o substrato é um insumo importante, mas também os nutrientes. Como nutrientes são adicionados nitrogênio, na forma de xarope de milho (ou extrato de levedura) e fosfato, bem como íons metálicos tais como magnésio, sódio e manganês. Lopretti *et al.* (1999) estudaram a influência de açúcares complementares e da razão de carbono/nitrogênio na síntese de dextrana-sacarase em fermentação anaeróbica com *L. mesenteroides* NRRL B512F. Segundo os autores, ocorre um decréscimo na taxa do crescimento do microorganismo com o decréscimo da razão carbono/nitrogênio, sendo que a adição de pulsos de extrato de levedura quando esta razão decresce permite a obtenção de uma taxa constante de produção da enzima e a diminuição do tempo de fermentação. Em relação à influência dos açúcares complementares, foi verificado que a lactose inibe a produção da enzima, enquanto que a adição de galactose não mostrou muita diferença de produtividade enzimática em relação ao uso de apenas sacarose. Já a presença de maltose resultou num aumento significativo da taxa de produção de dextrana-sacarase em relação ao uso de sacarose como única fonte de carbono. Esta última observação pode ser atribuída ao fato da maltose ser um inibidor da síntese de dextrana, cuja presença em elevadas concentrações pode mascarar a determinação da atividade enzimática

A estabilidade da enzima purificada pode ser melhorada pela adição de  $\text{Ca}^{+2}$ , o que também aumenta a atividade enzimática. Já a incubação na ausência de  $\text{Ca}^{+2}$  pode causar a desnaturação irreversível. A adição de  $\text{CaCl}_2$  em concentrações na faixa de 0,001% a 0,1 % podem dobrar a produção da enzima, entretanto concentrações acima de 0,1 % podem levar à morte do microorganismo (Alsop, 1993).

A enzima, como mencionado anteriormente, é bastante sensível ao pH e à temperatura, devendo ser estocada à baixa temperatura em pH adequado. Mibielli (2001), reporta a estocagem da enzima purificada a  $-15^{\circ}\text{C}$  na presença de tampão acetato em pH 5,2. A enzima purificada em solução perde estabilidade quando estocada a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo assim, o uso de estabilizantes tais como dextrana de baixa massa molar, polietileno-glicol, metil-celulose e até mesmo detergentes neutros se faz necessário (Currello, 1993). Já a estocagem da enzima liofilizada a temperaturas inferiores a  $5^{\circ}\text{C}$ , mantém sua atividade por 5 anos (Souza, 1993). Estudos sob a influência de metais pesados na atividade enzimática demonstraram que a maioria dos metais testados, mesmo em baixas concentrações, leva à desnaturação da enzima, a qual na maioria dos casos é irreversível. Quanto à estabilidade térmica, os estudos realizados demonstram que a enzima é fortemente degradada em temperaturas superiores a  $30^{\circ}\text{C}$ , e tem sua atividade máxima em pH 5,2, tanto para enzima livre como imobilizada (Bazán, 1993).

O trabalho de Girard e Legoy (1999) apresenta um estudo da estabilidade e atividade da dextrana-sacarase em alguns solventes orgânicos e temperaturas. Segundo as autoras, de forma geral, foi observado decréscimo proporcional da velocidade inicial de reação com o aumento da concentração de solvente, exceto para soluções aquosas de etanol e de dimetil sulfóxido (DMSO) tendo sido verificada também uma maior atividade da enzima após o contato com estas soluções, quando comparada com a atividade em solução tampão. Neste estudo foi verificada uma atividade relativa de 300 % após o contato de dois dias em solução de DMSO 20 % a  $4^{\circ}\text{C}$  e de 250 % a  $30^{\circ}\text{C}$ . Já no caso da solução de etanol 20 % foi verificada uma atividade final relativa de 180 %.

## **2.4 - Imobilização da Enzima**

A síntese enzimática pode ser realizada utilizando a enzima na forma livre e na forma imobilizada. Monsan e Lopez (1981) realizaram um estudo comparativo entre estes dois tipos de síntese, sob as mesmas condições. Foram notadas limitações difusionais durante a reação enzimática com a enzima imobilizada, as quais são fortemente dependentes do suporte utilizado. Foi observada também a tendência de formação de dextrana de alta massa molar, devido à ligação de unidades de glicose às cadeias pré-

existentes. A síntese de oligodextranas foi obtida utilizando-se maltose como acceptor, sendo a distribuição da massa molar obtida nesta última, menos dispersa que a obtida quando a dextrana clínica é obtida via hidrólise de dextrana nativa.

Vale também ressaltar que a síntese *in vitro*, utilizando-se enzima livre, segue a cinética de Michaelis-Menten, enquanto que para a síntese com enzima imobilizada devem ser considerados os desvios deste modelo, que ocorrem devido ao aumento da viscosidade durante a síntese. Esse fato também dificulta a recuperação do suporte após a síntese. Entretanto, o aumento da viscosidade não foi observado na presença de aceptores. Sendo assim, a síntese de dextrana clínica com enzima imobilizada poderia ser uma alternativa viável e interessante, embora existam poucos trabalhos publicados referentes a este processo. As condições ótimas de síntese (temperatura e pH) não são influenciadas pela imobilização. O maior problema encontrado é o aumento da viscosidade no interior dos poros, o que favorece o crescimento da cadeia. A resistência difusional devida a esse mecanismo é similar àquela apresentada em sínteses com inibição pelo produto. Quanto a síntese de dextrana de baixa massa molar, a utilização de enzima imobilizada, ou livre com aceptores (maltose por exemplo) são similares no tocante às condições de síntese, entretanto a síntese com enzima imobilizada permite a utilização de um processo contínuo, além de permitir a produção simultânea de açúcares de alto poder adoçante e grande valor agregado tais como frutose.

## **2.5 – Síntese enzimática de dextrana**

A síntese enzimática de dextrana é alvo de interesse comercial, devido à boa estabilidade da enzima nas condições ótimas de síntese, à não necessidade das etapas de crescimento celular e produção da enzima, o que implica em diminuição do tempo total do processo e do consumo de matéria prima (sacarose), bem como em maiores rendimentos. Apesar das inúmeras vantagens da síntese enzimática sobre a fermentação, o alto custo da enzima faz com que o principal processo para obtenção industrial de dextrana seja a fermentação. Entretanto, a possibilidade de recuperação da enzima, pode tornar a síntese *in vitro* uma alternativa economicamente viável.

A síntese *in vitro* não necessita de enzimas secundárias, como ocorre na maioria das reações bioquímicas, bem como a enzima dextrana-sacarase não necessita de cofatores e intermediários fosforilados, sendo a energia necessária para a condensação das unidades glicosídicas proveniente da hidrólise da sacarose. As propriedades da dextrana sintetizada *in vitro* são as mesmas que a obtida via processo fermentativo (Robyt e Walseth,1979).

Testes de produção *in vitro* de dextrana em escala industrial foram efetuados em pH 5,2. A enzima utilizada foi obtida previamente por fermentação, com adição de sacarose a uma taxa de 20g/l/h. Notou-se o aparecimento de frutose e de uma pequena quantidade de leucrose no meio reacional, entretanto o efeito destes carboidratos como aceptores foram ignorados no experimento em questão (Alsop,1983). O desenvolvimento de técnicas analíticas, tais como cromatografia líquida, dentre outras, permitiu o estudo do efeito de vários parâmetros na conversão de sacarose em dextrana em escala industrial, tendo sido encontrado como parâmetro mais importante de controle do rendimento e da massa molar a concentração de sacarose. A tabela 2.1 apresenta os rendimentos dos carboidratos envolvidos na síntese de dextrana a várias concentrações de sacarose:

Tabela 2.1 - Rendimentos das frações de carboidratos obtidos na síntese enzimática de dextrana variando-se a concentração de sacarose (g/100 g de sacarose)-(Alsop,1983).

Sacarose (% W/ V)	Monossacarídeos	Dissacarídeos	Dextrana Total	Dextrana alto PM (%)	Dextrana baixo PM (%)
2	52,2	1,9	45,9	45,9	0,0
4	50,0	4,4	45,6	45,6	0,0
5	51,3	4,3	44,4	44,4	0,0
10	51,2	6,8	42,0	39,0	3,0
15	55,5	9,4	35,3	25,3	10,0
20	56,9	11,2	31,9	17,9	14,0

Analisando a tabela 2.1, observa-se que quanto maior a concentração de sacarose, maior a quantidade de dextrana de baixa massa molar obtida, sendo o maior rendimento obtido para a concentração de 20 %. A concentração de leucrose (principal dissacarídeo) aumenta com o aumento da quantidade de dextrana de baixa massa molar produzida, dentro da faixa estudada. A quantidade de dextrana de baixa massa molar bem como de oligossacarídeos aumentam consideravelmente para concentrações de sacarose acima de 10 % (inibição pelo substrato).

Bazán (1993) realizou uma série de ensaios em escala laboratorial para produção de dextrana clínica via reação enzimática variando parâmetros como acceptor/sacarose, concentração de sacarose, e temperatura. Ensaios preliminares foram realizados utilizando-se maltose como acceptor, sendo posteriormente realizados ensaios mais conclusivos utilizando dextrana de baixa massa molar (4676 daltons) como acceptor.

Através da análise dos efeitos dos parâmetros estudados por Bazán (1993), pelo o estudo de superfície de resposta, verificou-se que a concentração de sacarose é a variável que mais influencia o processo, sendo que altas concentrações favorecem a produção da dextrana clínica. Já a relação acceptor/sacarose, tem influência semelhante na concentração de sacarose, porém em menor grau, sendo observado que o aumento desta razão favorece o rendimento. A temperatura é a variável de menor influência, embora tenha sido notado que a diminuição da mesma favorece a formação de dextrana clínica.

Zafar e Barker (1988) realizaram um estudo da síntese enzimática utilizando um reator cromatográfico, no qual resultados obtidos experimentalmente foram comparados com resultados obtidos em simulações do sistema proposto, tendo como objetivo prever o comportamento do reator em termos de alguns parâmetros, tais como: constante de Michaelis-Menten e coeficientes de distribuição. A idéia da utilização do reator cromatográfico é baseada na diferença de afinidade entre os componentes da fase estacionária (poliestireno cruzado) e fase móvel (soluções diluídas de dextrana-sacarase), possibilitando assim a separação do produto, reduzindo com isto os custos de purificação. O modelo proposto por Zafar e Barker (1988) considera a dispersão axial infinita, sendo o reator aproximado a um tanque agitado. O sistema proposto nada mais é que uma coluna preenchida com resina, onde dextrana-sacarase é alimentada continuamente e pulsos de sacarose são injetados no sistema. A medida da eficiência do reator revelou um consumo

maior de enzima que o obtido em processos convencionais. Os cromatogramas obtidos apresentam picos de sacarose e dextrana muito próximos, o que compromete a aplicabilidade do processo. Entretanto estes fatos podem ser alterados pela troca da resina. Quanto à simulação, a utilização de picos baixos de sacarose apresenta resultados concordantes com os experimentais, entretanto desvios são observados para picos elevados de sacarose. Neste caso, correções são feitas no modelo, que assume que a sacarose é injetada no sistema em solução de dextrana-sacarase de mesma concentração que a eluída continuamente pela coluna.

Souza (1993) propôs a síntese enzimática de dextrana utilizando o processo CARE (*Continuous Affinity Recycle Extraction*), tendo obtido experimentalmente as isotermas de adsorção da enzima em DEAE- Celulose e os parâmetros da isoterma de Langmuir. Segundo a autora, a DEAE Celulose foi escolhida dentre três resinas testadas, pois esta se mostrou a mais adequada para adsorção da enzima. Os resultados obtidos em simulação com o modelo proposto mostraram grande perda de enzima, o que foi atribuído ao fato do sistema não atingir o estado estacionário. O modelo proposto por Souza (1993) considera a reação de adsorção de 2<sup>a</sup> ordem e a de dessorção de 1<sup>a</sup> ordem, sendo a etapa de adsorção muito mais lenta que a de dessorção. Um segundo estudo, do mesmo processo realizado por Currello *et al.* (1998), engloba a análise das variáveis que mais afetam o processo, além do efeito do tampão de dessorção. Uma análise de superfície de resposta dos dados obtidos envolvendo os parâmetros rendimento de dextrana, concentração dos constituintes do tampão de dessorção, concentração de sacarose e quantidade de enzima retida, além de produtividade levam à conclusão que o tempo de residência no reator de adsorção tem influência significativa sobre todas as respostas, principalmente sobre a produtividade, variável sobre a qual o aumento do tempo de residência no estágio de adsorção tem efeito negativo. A retenção enzimática, entretanto, é favorecida pelo aumento do tempo de residência no estágio de adsorção. Estes efeitos dificultam a otimização do processo, já que a variável em questão tem efeito contrário entre estas duas respostas, as quais são de grande interesse. Com as respostas analisadas foram obtidos modelos quadráticos para produtividade, rendimento e retenção da enzima. Com o objetivo de aumentar o tempo de residência no estágio de adsorção, Rodrigues (2000) propôs um reator triplo estágio, também baseado no processo CARE, onde dois dos estágios são destinados à adsorção da

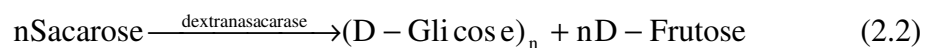


enzima. Os resultados obtidos com a simulação do sistema triplo estágio indicaram uma menor perda enzimática, tendo sido obtidos também maiores rendimentos e produtividade.

Mibielli (2001) realizou um estudo comparativo da síntese enzimática de dextrana para concentrações de sacarose de 50 e 100 g/L, tendo sido utilizada enzima bruta e purificada. Os ensaios foram realizados em reator batelada à temperatura de 23 ° C. Segundo o autor, a produtividade obtida em termos de consumo de sacarose foi igual para ambas as concentrações iniciais de sacarose, tendo sido obtidos maiores rendimentos percentuais em dextrana de alta massa molar para a concentração de sacarose de 50 g/L. Em termos de rendimento, o autor reporta que o processo enzimático utilizando a enzima purificada apresentou um rendimento 67 % superior ao obtido utilizando-se a enzima bruta.

## 2.6 - Mecanismo da síntese de dextrana

Vários mecanismos foram propostos para explicar a síntese de dextrana à partir de sacarose. Para se propor um mecanismo, deve-se levar em consideração o ciclo de crescimento da cadeia (múltipla ou única), o processo de início da polimerização (com ou sem uso de iniciadores), como ocorre o crescimento da cadeia (extremidade redutora ou não redutora da molécula), como ocorre a terminação da cadeia e como são formadas as ramificações (ligações  $\alpha$ -1, 3). A reação geral da síntese de dextrana é dada pela equação a seguir:



A reação é essencialmente irreversível e dentre os vários mecanismos que têm sido propostos para a mesma, o mais aceito é o de inserção proposto por Stay (1943), citado por Alsop (1983), onde ocorre o crescimento da cadeia em uma única etapa conforme equações a seguir:





Onde:

S        sacarose

EP<sub>n</sub>    complexo enzima polímero (enzima-dextrana)

X        frutose

Neste mecanismo, a enzima permanece combinada à cadeia crescente, sendo o mesmo concordante com medidas experimentais. Outro mecanismo proposto é o crescimento em cadeia múltipla, no qual a cadeia se dissocia e há a formação de oligossacarídeos e dextrana de baixa massa molar. Entretanto este mecanismo não encontra respaldo em medidas experimentais. Segundo o mecanismo de inserção, a dextrana-sacarase age transferindo o grupo glicosil do doador (sacarose) para o grupo acceptor (cadeia polimérica de dextrana). Se houver falha na identificação do grupo acceptor pela enzima, sendo identificada, por exemplo a água, ocorre hidrólise (invertase). Sendo assim, a enzima teria dois tipos de atividade, hidrolítica e de glicosiltransferase. A primeira etapa (atividade hidrolítica) seria a quebra da ligação glicose-frutose (constituintes da sacarose), originando o grupo D-glicosil. A seguir, o grupo glicosil é transferido para cadeia de polissacarídeo (glicosiltransferase). A enzima teria também dois grupos ativos, um doador e outro receptor. Duas moléculas de sacarose se ligam uma a cada um dos grupos citados. O grupo glicosil da sacarose, ligada ao sítio doador, é então transferido para o grupo receptor, liberando uma molécula de frutose. Dessa forma, ocorrem transferências sucessivas de grupos D-glico-piranosil da sacarose para o final da cadeia ligada ao sítio receptor. Esta transferência origina as ligações  $\alpha$ -1,6. A síntese é encerrada pela dissociação ou inativação do complexo enzima-dextranosil, que se dá devido à atividade de aceptores naturais, tais como glicose e frutose em concentrações suficientes para concorrer com a sacarose pelo sítio ativo, liberando a dextrana. Segundo Alsop (1983) há teorias quanto à utilização de iniciadores, que suportam o complexo enzima-sacarose como tal, embora haja evidências de que os mesmos não sejam necessários.

Quanto à direção de crescimento da cadeia, o trabalho de Sidebotham (1974), citado em Alsop (1983), menciona a existência de várias teorias a respeito do mesmo, que pode se dar na extremidade não redutora, redutora ou em ambas, bem como há possibilidade de não haver direção definida. Experimentos realizados por Robyt e Walseth (1978), utilizando traçadores ( $C^{14}$ ) e técnicas cromatográficas de análise, demonstram que o crescimento ocorre na extremidade redutora da cadeia. O mecanismo proposto por Robyt *et al.* (1974), citados por Alsop (1983), consiste na formação de complexo enzimático covalente de glicose e dextrana, sendo a glicose inserida entre a enzima e a dextrana por ataque nucleofílico do grupo  $C_6-OH$  da glicose ao  $C_1$  da dextrana, formando uma ligação  $\alpha$ -1, 6 -glicosídica. Desta forma, há a formação de um grupo nucleofílico que ataca a sacarose formando um grupo glicosil.

Quanto à terminação da cadeia, o mecanismo mais aceito é o mecanismo acceptor, conforme citado anteriormente, no qual os açúcares de baixa massa molar se ligam à extremidade crescente da cadeia cessando a transferência dos grupos glicosídicos. Esta técnica é também proposta para o controle do tamanho da cadeia, viabilizando a produção de dextrana de baixa massa molar através da adição de aceptores tais como: maltose e isomaltose, dentre outros. Estes aceptores promovem a quebra entre a cadeia crescente e a enzima segundo reação a seguir:



Este mecanismo pode também explicar porque com o aumento da concentração de sacarose, a massa molar da dextrana obtida é menor. Os aceptores podem ser classificados em:

- fracos (sacarose)
- moderadamente fortes ( $\alpha$ -metilglicosídeo)
- fortes (frutose e sorbitol)

O mesmo mecanismo pode explicar a diminuição da quantidade de dextrana de alta massa molar obtida por Currello (1993) a altas concentrações de sacarose. Robyt e Walseth (1978) investigaram a reação destes aceptores utilizando  $C^{14}$  como traçador dos aceptores. Neste experimento, foram utilizados como aceptores glicose, frutose e maltose, sendo obtidos produtos de alta e baixa massa molar para reação. A redução e hidrólise ácida dos aceptores demonstraram que todos os aceptores foram incorporados na extremidade redutora da cadeia. Isto demonstra que o mecanismo de reação dos aceptores pode ocorrer sem a presença de sacarose. Nesta reação, ocorre não somente a terminação da cadeia, mas também a produção de oligossacarídeos, conforme quadro a seguir:

Quadro 2.1 - Relação acceptor oligossacarídeo produzido - (Alsop,1983)

Aceptor	Oligossacarídeo
Glicose	Isomaltose
Frutose	Leucrose
Maltose	Panose

Quando a reação ocorre na presença de sacarose, há competição entre a reação de polimerização da sacarose e dos aceptores, entretanto a estrutura dos produtos dos aceptores e sua localização na cadeia é a mesma na presença ou ausência de sacarose. O mecanismo proposto para incorporação do acceptor na cadeia da dextrana é o mesmo proposto por Robyt e Walseth (1978), para o crescimento da cadeia, ou seja ataque nucleofílico do grupo glicosil e dextranglicosil do complexo enzimático formando oligossacarídeos e dextrana. Na presença de sacarose e do complexo enzima/dextrana/glicosil, o estado dinâmico dos oligossacarídeos permite a formação de outros complexos com a enzima, produzindo uma série de oligossacarídeos e dextranas de baixa massa molar. A mistura de produtos obtidos depende da cinética das reações e da força dos aceptores, bem como de suas concentrações.

Os oligossacarídeos obtidos através da reação do acceptor tem diversas aplicações potenciais na área alimentícia. A panose, por exemplo, pode ser empregada como adoçante não cariogênico em alimentos e bebidas, bem como suplemento alimentar uma vez que este trissacarídeo estimula o desenvolvimento da flora intestinal (bidifidobactérias).

As ramificações da cadeia de dextrana são constituídas de ligações  $\alpha$ -1,3. O estudo de Bovey (1959) e Bailey (1957), citados em Alsop (1983), atribuem as ramificações encontradas na dextrana a uma enzima secundária denominada alternansacarase, a qual é termicamente mais estável que dextrana-sacarase, entretanto só é obtida na presença de íons magnésio. Até pouco tempo atrás, não era possível separar a dextrana ramificada da não ramificada. Um estudo, utilizando *Leuconostoc mesenteroides* B1355, mostrou ser possível a obtenção de dextranas separáveis com características físicas diferentes denominadas 'L' e 'S', sendo a dextrana 'L' um produto típico com 95 % das ligações  $\alpha$  -1, 6 e a dextrana 'S' um produto com ligações alternadas  $\alpha$  - 1,6 e  $\alpha$  - 1,3, segundo Jeanes (1966). O mecanismo proposto para a formação de ramificações é análogo ao mecanismo de reação do acceptor, proposto por Robyt e Walseth (1978). Neste caso, a dextrana livre em solução se liga à cadeia em crescimento através do ataque nucleofílico de seu  $C_3$  ao  $C_1$  na extremidade redutora da cadeia, liberando a dextrana do complexo. Este mecanismo foi confirmado por experimentos laboratoriais, entretanto não foram realizados testes em escala industrial.

## 2.7 - Adsorção de Proteínas

A habilidade de sólidos porosos adsorverem reversivelmente grandes volumes de vapor foi reconhecida no século 18, mas a aplicação prática desta propriedade em processos industriais de separação e purificação é relativamente recente. O exemplo mais comum de tal processo é o uso de uma coluna adsorvente empacotada com um adsorvente hidrofílico para a remoção da umidade de fluxos de gás ou de líquidos. Tais processos são convenientemente classificados como processos de purificação, uma vez que os componentes que são adsorvidos estão presentes em baixas concentrações, têm pouco ou nenhum valor econômico, e frequentemente não são recuperados. Atualmente muitos processos que fazem uso da adsorção visam a recuperação do adsorbato e até mesmo a

separação e transporte do mesmo para outro meio, onde este é então dessorvido. Esta última aplicação é a base do projeto do sistema contínuo duplo estágio (processo CARE) proposto por Pungor *et al.* (1987). Os primeiros processos de adsorção usavam carvão ativado ou sílica gel como adsorvente, entretanto o potencial de adsorção de processos industriais tem sido aumentado pelo desenvolvimento de peneiras moleculares adsorventes, especialmente as zeólitas sintéticas.

A adsorção é um fenômeno no qual certos componentes de uma fase gasosa ou líquida são seletivamente transferidos para a superfície de um sólido. Pode ser compreendida como a concentração preferencial de uma determinada espécie na interface de duas fases. O sólido é então denominado adsorvente e os componentes adsorvidos, adsorbatos. Termodinamicamente, a adsorção pode ser vista como um caso em que o adsorbato apresenta uma menor energia livre de Gibbs na superfície do adsorvente do que na solução. Enquanto busca atingir o equilíbrio, o adsorbato desloca-se para a superfície do adsorvente de forma a atingir um estado de energia menor (de acordo com a 2ª lei da termodinâmica).

Processos de adsorção têm a capacidade de promover separações que, para as quais a utilização de outras técnicas de separação tais como: destilação, absorção e sistemas à base de membranas, dentre outras, seriam inviáveis. Sua importância tem aumentado nos processos de aplicação ambiental e na área bioquímica, estimulando avanços nas técnicas utilizadas e em pesquisa de novos materiais. A seleção do adsorvente é de grande importância para a eficiência do processo. O desenvolvimento de novos adsorventes, vem ao encontro da crescente necessidade de implantação e otimização de processos que se utilizam desta técnica.

No estudo e compreensão do fenômeno da adsorção, o conhecimento detalhado e preciso das propriedades físico-químicas do material adsorvente é essencial. As propriedades físicas do adsorvente relacionadas à sua eficiência dependem, dentre outros fatores, da forma em que o mesmo está sendo utilizado, que pode ser pó (utilizado em geral para o adsorbato na fase líquida) ou na forma granular (utilizado para o adsorbato na fase gasosa).

Sabe-se que a capacidade de um determinado adsorvente para um certo adsorbato é controlada pelo equilíbrio de fases. Os gráficos da quantidade de material adsorvido por

unidade de volume, a uma temperatura constante, são chamados isotermas de adsorção. Estas isotermas são uma expressão funcional para a variação da adsorção com a concentração de adsorbato na solução, à temperatura constante. Esses gráficos são divididos em cinco categorias principais, conforme mostrado na Figura 2.1

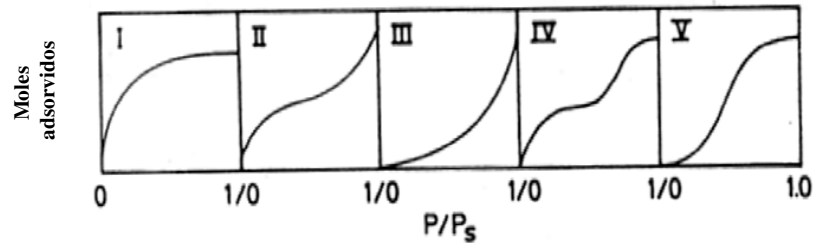


Figura 2.1 Classificação das isotermas segundo Braunauner (Ruthven, 1984).

As isotermas para adsorventes microporosos verdadeiros, nos quais o tamanho do poro não é muito maior que o diâmetro molecular da molécula de adsorbato, é normalmente do tipo I. Isto ocorre porque, com tais adsorventes, existe uma situação limite definida que corresponde ao completo preenchimento dos microporos. Ocasionalmente, se os efeitos da atração intermolecular forem grandes, uma isoterma do tipo V é observada. Uma isoterma do tipo IV, sugere a formação de duas camadas superficiais: em uma superfície plana ou na parede de um poro muito mais largo que o diâmetro do adsorbato. Isotermas dos tipos II e III são geralmente observadas apenas com adsorventes nos quais existe uma grande faixa de tamanho de poros. Em tais sistemas existe uma contínua progressão da adsorção em monocamada para a adsorção em multicamada, e então para condensação capilar.

A isoterma do tipo I corresponde a um tipo de adsorção altamente idealizada e é conhecida como isoterma de Langmuir, a qual é matematicamente descrita de acordo com a Equação 2.6:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_d + C^*} \quad (2.6)$$

Com um simples rearranjo dos termos da Equação 2.6 é possível se obter uma forma linearizada conforme Equação 2.7:

$$\frac{C^*}{q^*} = \frac{1}{q_m} C^* + \frac{K_d}{q_m} \quad (2.7)$$

Onde:

$q^*$  = quantidade adsorvida por volume de adsorvente no equilíbrio (mg/ml)

$q_m$  = valor de saturação da monocamada (capacidade máxima da resina)

$C^*$  = quantidade de adsorbato livre no equilíbrio (mg/ml)

$K_d$  = constante de equilíbrio (mg/ml).

Graficando-se os dados de  $C^*/q^*$  versus  $C^*$  para uma dada temperatura obtém-se uma reta, cujo ajuste por regressão resulta na Equação 2.7, através da qual é possível a obtenção dos parâmetros da isoterma de Langmuir ( $q_m$  e  $K_d$ ).

O tratamento e entendimento da adsorção de proteínas requer uma grande familiaridade com modernos conceitos sobre a estrutura e função das proteínas. Proteínas são macromoléculas biológicas construídas para funções específicas. Enzimas nada mais são que poliamidas de alta massa molar produzidas pela co-polimerização específica de cerca de 20 aminoácidos diferentes. A solubilidade geral característica da proteína, incluindo seu comportamento em diferentes meios de força iônica e pH, seu comportamento em soluções de uréia, em soluções contendo pequenas quantidades de metanol, etanol ou glicerol e informações relacionadas a soluções características são dados importantes na interpretação e predição das interações nas interfaces.

Com base no fenômeno de adsorção, desenvolveram-se várias técnicas de separação de proteínas, as quais são genericamente denominadas cromatografia. Cromatografia é um exemplo de um método de separação altamente seletivo. O líquido contendo o componente a ser purificado, ou separado, é posto em contato com o adsorvente (uma resina trocadora de íons, por exemplo), valendo-se do fato de que a adsorção é suficientemente específica e somente a proteína de interesse será adsorvida. Todos os componentes não-adsorvidos no líquido são removidos por um procedimento de lavagem. Finalmente a proteína desejada é retirada do adsorvente, através do contato com uma fase líquida (eluente), que diminui a força da interação entre adsorbato (proteína) e adsorvente



(resina). Tipicamente esses estágios são executados com adsorventes empacotados em um leito, entretanto podem ser utilizados em processos envolvendo tanques agitados ou leitos fluidizados.

No caso de adsorção em tanques agitados, o contato entre a resina e o adsorvente é promovido de forma a se atingir um estágio de equilíbrio (Araújo, 1996). Este sistema de adsorção é tradicionalmente utilizado para obtenção de dados referentes à cinética de adsorção, pois possibilita a realização de ensaios com monitoramento contínuo da concentração de adsorbato no seio do líquido.

Embora o modelo de Langmuir seja bastante comum, o processo real de adsorção pode diferir em maior ou menor grau das simplificações deste modelo. Quando se fala em adsorção de proteínas, deve-se levar em consideração que interações entre as macromoléculas podem resultar em adsorção em multicamada, ligação em mais de um sítio ativo ou competição pelo mesmo sítio ativo do adsorvente, o que é comum em sistemas bicomponentes (Anspach *et al.*, 1996).

Desvios do modelo de Langmuir são facilmente identificados pela forma do gráfico da concentração de enzima adsorvida em função da concentração de enzima livre no sobrenadante, após o sistema entrar em equilíbrio (Figura 2.1). A utilização do modelo simplificado de Langmuir, o qual supõe que não há competitividade entre os sítios ativos e a adsorção ocorre em monocamada, pode resultar em elevados erros numéricos na obtenção dos parâmetros da isoterma de Langmuir.

No caso de adsorção não ideal, outros modelos podem ser utilizados no lugar da isoterma de Langmuir. A Equação 2.8 é aplicada em casos onde proteína se liga ao adsorvente em mais de um sítio ativo :

$$q^* = \frac{q_{m,s} K_{A,s} C^*}{1 + K_{A,s} C^*} + \frac{q_{m,n} K_{A,n} C^*}{1 + K_{A,n} C^*} \quad (2.8)$$

A Equação 2.8 é conhecida como modelo de Bilangmuir e é empregada para separar a interação específica (*S*) da não específica (*n*) da proteína com o sítio ativo do

adsorvente. Já no caso de interação entre as moléculas do adsorbato, o que pode causar adsorção multicamada, emprega-se a Equação 2.9:

$$q^* = \frac{qmK_A}{\frac{1}{C^*} + K_A - 2K_p + (K_p^2 - K_p K_A)C^*} \quad (2.9)$$

Onde:

$K_p$  = constante para interação entre as moléculas do adsorbato

No caso de adsorção competitiva nos sítios do adsorvente, o fenômeno é descrito pela Equação 2.10:

$$q_i^* = \frac{qmKn_{A,i}C_i^*}{1 + \sum_{j=1} K_{A,j}C_j} \quad (2.10)$$

## 2.8 - Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é baseada na capacidade que uma resina com grupos carregados ligados à sua matriz tem de trocar seu contra-íon com outro composto de carga de mesmo sinal, tais como proteínas carregadas. Devido à versatilidade, alto poder de resolução e alta capacidade de purificação, a cromatografia de troca iônica é a técnica cromatográfica mais citada em protocolos de purificação de proteínas.

Existem dois tipos de resinas trocadoras de íons, as catiônicas e as aniônicas. Como o próprio nome sugere, as resinas catiônicas são trocadoras de cátions, sendo assim, são negativamente carregadas, enquanto que as resinas aniônicas são trocadoras de ânions e são, portanto, positivamente carregadas. A utilização de uma resina catiônica ou aniônica dependerá do objetivo da cromatografia e do tipo de substância que se deseja purificar.

Os grupos carregados de uma proteína são encontrados em sua superfície e dependem fortemente do pH do meio em que a proteína se encontra. Denomina-se ponto isoelétrico (pI) de uma proteína o valor de pH no qual a carga líquida da proteína é nula. Acima de seu ponto isoelétrico a proteína é negativamente carregada enquanto que abaixo do pI a proteína é positivamente carregada. Sendo assim, para operações em valores de pH acima do pI utiliza-se uma resina trocadora de ânions e abaixo do pI, utiliza-se uma resina trocadora de cátions.

A maioria das proteínas apresenta ponto isoelétrico em valores de pH abaixo de 7,0. Sendo assim, a cromatografia de troca iônica muitas vezes é realizada em valores levemente básicos (pH acima de 8,0). Proteínas com a maioria de grupos básicos e com ponto isoelétrico alto (acima de 7,0) são denominadas proteínas básicas. Já proteínas com ponto isoelétrico abaixo de 5,0 são denominadas proteínas ácidas.

A interação entre a proteína e a resina depende de diversos fatores tais como:

- carga líquida e sua distribuição na superfície da proteína
- natureza e força iônica do solvente e pH
- aditivos do solvente (substâncias orgânicas, detergentes, estabilizantes, etc)

O pH é um dos fatores mais importantes, pois esta variável não só influencia a carga da proteína, mas também da resina. Já o pKa dos aminoácidos de uma proteína dependem da carga dos aminoácidos vizinhos. A posição das cadeias laterais é dada pela conformação da proteína (estrutura terciária). A variação do pH do meio é um dos fatores que mais afetam a estrutura terciária de uma proteína, embora esta possa ser alterada também devido às mudanças de temperatura, efeitos alostéricos, além da adição de agentes modificadores de estrutura tais como: íons, solventes e etileno glicol.

A cromatografia de troca iônica não depende somente da carga da proteína mas também da carga total da sua distribuição de cargas. É intuitiva a observação de que quanto mais carregada a proteína mais forte será sua ligação com a resina. O mesmo vale para a resina: quanto maior for a carga da resina trocadora mais efetiva será a captura de proteínas.

A carga da resina é também afetada pelo pH. Sendo assim, a variação de pH pode alterar tanto as propriedades da proteína quanto da resina.

O pH é sem dúvida uma das variáveis mais importantes na cromatografia de troca iônica. Por ser uma variável que altera o processo, há um valor ótimo para cada aplicação específica. Proteínas em pH longe de seu pI se ligam fortemente à resina e podem não desorver. Por outro lado, em valores próximos ao pI, pode não haver adsorção. Scopes (1987) recomenda a faixa de 0,5 a 1,0 unidade de pH longe do pI da proteína.

A classificação das resinas trocadoras de íons em fortes e fracas não está relacionada à força de ligação entre a proteína e a resina, mas sim ao grau de ionização dos grupos ligantes (carga) da resina. Trata-se de uma analogia à classificação química quanto ao pKa de ácidos e bases em fortes e fracos. Resinas trocadoras fortes são aquelas carregadas em uma ampla faixa de pH, enquanto as fracas são carregadas em uma faixa mais estreita de pH. Por apresentarem uma faixa maior de operação, trocadores fortes são preferíveis em detrimento de trocadores fracos.

Todas as resinas trocadoras fracas apresentam um valor limite de pH para sua utilização, sendo que os trocadores aniônicos apresentam um limite superior de pH enquanto que os trocadores catiônicos apresentam um limite inferior de operação. Já em relação às resinas fortes, somente as trocadoras de cátions apresentam limite inferior de pH, pois as resinas aniônicas fortes se apresentam protonadas para qualquer que seja o pH.

Os grupos trocadores mais utilizados são aminas (trocadores aniônicos) e ácidos carboxílicos (trocadores catiônicos). A Tabela 2.2 apresenta os grupos mais comuns presentes em resinas trocadoras de íons:

Tabela 2.2 – Grupos funcionais usados em trocadores de íons (dados compilados da literatura dos fabricantes) Jan e Rydén (1989).

Nome	Designação	Estrutura
<b>Trocadores de ânion</b>		
Diethyl aminoetil	DEAE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
Trimetil hidroxipropil	QA	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

Aminoetil quaternário dietil – 2- hidroxipropil-aminoetil	QAE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$
Aminoetil quaternário	Q	$-\text{OCH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Trietil aminoetil	TEAE	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
Trietilaminopropil	TEAP	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$

### ***Trocadores de cátions***

Metacrilato		$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ (polimerizado)
Carboximetil	CM	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$
Ortofosfato	P	$-\text{OPO}_3\text{H}_2$
Sulfonato	S	$\text{OCH}_2\text{SO}_3\text{H}$
Sulfoetil	SE	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$
Sulfopropil	SP	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$

Os grupos funcionais (ligantes) apresentados na Tabela 2.2 são suportados pela matriz constituinte da resina trocadora. Os tipos de matriz mais utilizados para a obtenção de resinas trocadoras de íons são:

- matriz hidrofóbica de poliestireno cruzado
- matriz parcialmente hidrofóbica de metilmetacrilato
- matriz hidrofílica (celulose, dextrana, agarose)
- matriz de sílica Gel

De forma geral, resinas trocadoras de íons são mais substituídas que os demais tipos de adsorventes utilizados em cromatografia. A capacidade de captura de uma proteína de uma dada resina é definida como sendo a quantidade de proteína que pode ser ligada a

um determinado volume (ou massa) de resina. Esta capacidade depende de vários fatores tais como:

- das condições operacionais do processo (temperatura e pH, por exemplo)
- da porosidade da matriz
- da quantidade de grupos carregados
- massa molar da proteína

A escolha da matriz da resina é tão importante quanto a escolha do pH e do grupo funcional. As resinas com base em poliestireno e polimetilmetacrilato são pouco indicadas para a cromatografia de proteínas, pois apresentam baixa capacidade devido ao pequeno tamanho de seus poros e adsorção irreversível devido a interações hidrofóbicas. Entretanto, estas matrizes são indicadas para a separação de aminoácidos e peptídeos. Já as matrizes a base de celulose são indicadas para a purificação de proteínas neutras e ácidas (maioria das proteínas). Estas resinas são comercializadas das mais diversas formas, tais como: fibrosa e microgranular. Resinas a base de dextranas e agarose apresentam poros grandes, sendo que as resinas a base de agarose são mais porosas que as a base de dextrana, sendo indicadas para cromatografia de proteínas grandes (Jan e Rydén, 1989).

Vale ressaltar que a capacidade da resina diminui exponencialmente com o aumento da massa molar da proteína. A Tabela 2.3 apresenta a variação da capacidade da resina CM-Celulose para algumas proteínas:

Tabela 2.3 - Capacidade da resina CM-celulose microgranular em pH 6,0 e força iônica de 0,01M (Jan e Rydén, 1989).

Proteína	massa molar (Da)	mg/ml	μmol/ml
Lisozima de clara de ovo	14300	130	9,00
Kinase fosfoglicerato	45000	70	1,55
Mutase fosfoglicerato	60000	40	0,67

Kinase creatina	82000	35	0,43
Enolase	88000	48	0,55
Lactate dehidrogenase	140000	21	0,15
Gliceraldeidofofato dehidrogenase	145000	26	0,18
Aldolase	160000	22	0,14
Piruvato kinase	228000	12,5	0,06

Os dados da Tabela 2.3 estão apresentados na forma de gráfico na Figura 2.2:

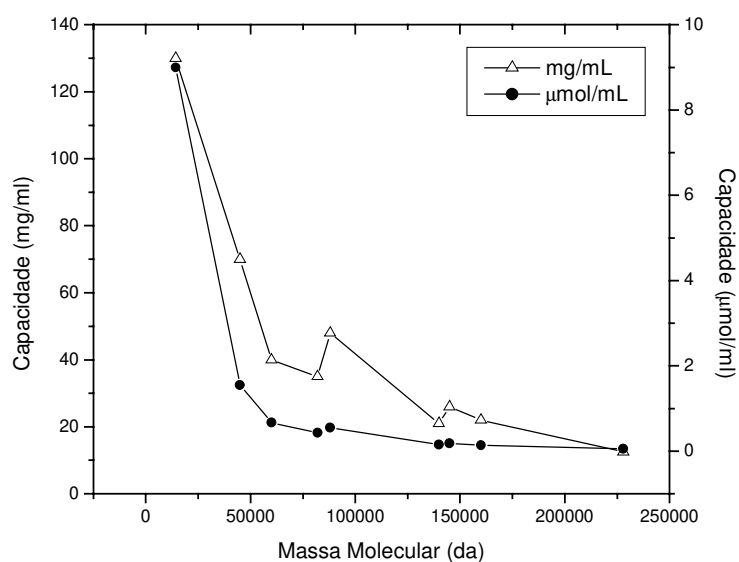


Figura 2.2 – Capacidade da resina CM –celulose microgranular em função da massa molar da proteína (dados da Tabela 2.3)

Observa-se através do gráfico da Figura 2.2, que quanto maior a massa molar da proteína, menor é a capacidade da resina, sendo a diminuição desta capacidade exponencial.

Em muitos casos de cromatografia de troca iônica, uma pequena variação no pH ou na concentração do tampão pode significar a diferença entre o sucesso e o fracasso da técnica. A escolha adequada de tampões é de suma importância durante a adsorção de proteínas e normalmente a concentração salina dos tampões é baixa (de 0,01 a 0,05 M).

O sal tamponante deve apresentar pKa próximo ao valor de pH no qual a cromatografia será realizada e o íon tamponante não deve se ligar à resina. Para trocadores de ânions, deve-se utilizar um íon tamponante positivo tais como Tris (pKa 8,20) e um negativo como contra íon. Já para resinas trocadoras de cátions, o íon tamponante deve ser negativo e o contra íon deve ser positivo.

Outro fator importante que deve ser levado em consideração na escolha do tampão é a possibilidade de sua interferência em análises ou procedimentos de purificação posteriores. O NaCl é geralmente empregado como eluente em resinas trocadoras de ânions e sua ação se baseia no aumento da força iônica.

A presença de aditivos, geralmente utilizados para estabilizar ou aumentar a solubilidade da proteína, especialmente aqueles que podem diminuir as interações hidrofóbicas, tais como etileno glicol, etanol, uréia e detergentes podem diminuir a capacidade de adsorção de proteínas onde este tipo de interação seja importante no processo de adsorção.

## **2.9 – Cromatografia de permeação em gel (GPC)**

A cromatografia de permeação em gel é uma técnica bastante utilizada para determinação de massas molares de proteínas e outros polímeros (naturais e sintéticos). Seu princípio de separação é baseado no tamanho da molécula em solução (volume hidrodinâmico, no caso de soluções diluídas). A amostra é conduzida através da coluna juntamente com a fase móvel (solvente). A separação ocorre devido à diferença de tamanho entre o analito e os poros do gel (recheio). As moléculas grandes são eluídas mais rapidamente, pois não conseguem penetrar nos poros do gel. Já as moléculas menores conseguem penetrar nos poros do gel e são portanto retardadas apresentando um tempo maior de eluição.

Os géis utilizados neste tipo de cromatografia são geralmente constituídos de macromoléculas com grande afinidade pela fase móvel utilizada, as quais são polimerizadas através de ligações cruzadas, o que torna o suporte insolúvel. Ao entrar em contato com a



fase móvel, a matriz polimérica incha e captura um grande volume de líquido no interior de seus poros.

Por se basear nas diferenças de tamanho das moléculas de uma solução complexa, todos os constituintes da amostra devem ser eluídos da coluna entre dois pontos bem estabelecidos. Estes pontos são denominados volume de exclusão total ( $V_o$ ), que corresponde ao espaço intersticial entre as partículas do recheio e volume de permeação total ( $V_t$ ), que corresponde ao volume total de líquido estagnado no interior dos poros do recheio. A separação propriamente dita ocorre entre  $V_o$  e  $V_t$ .

Para muitos grupos de substâncias, a correlação entre as massas molares e seu comportamento na eluição é muito próxima, sendo assim o volume de eluição é inteiramente determinado pela massa molar do analito através de uma curva de calibração.

A curva de calibração é construída por padrões da substância que se deseja analisar, embora em muitos casos seja possível utilizar padrões secundários (outra substância que não a de interesse), esta prática não traz resultados absolutos (Grigolon, 2001). A função de calibração é o polinômio apresentado na Equação 2.11:

$$\log M = a_0 + a_1 V_e + a_2 V_e^2 + \dots + a_n V_e^n \quad (2.11)$$

Onde:

$a_0 - a_n$  constantes específicas do sistema cromatográfico utilizado

$V_e$  volume de eluição em ml

$M$  massa molar dos padrões

A curva  $\log M$  em função do volume (ou tempo) de retenção fornece a curva de calibração do sistema através de regressão linear, pois é na faixa linear que irá ocorrer a separação. A Figura 2.3 apresenta uma curva de calibração típica para GPC:

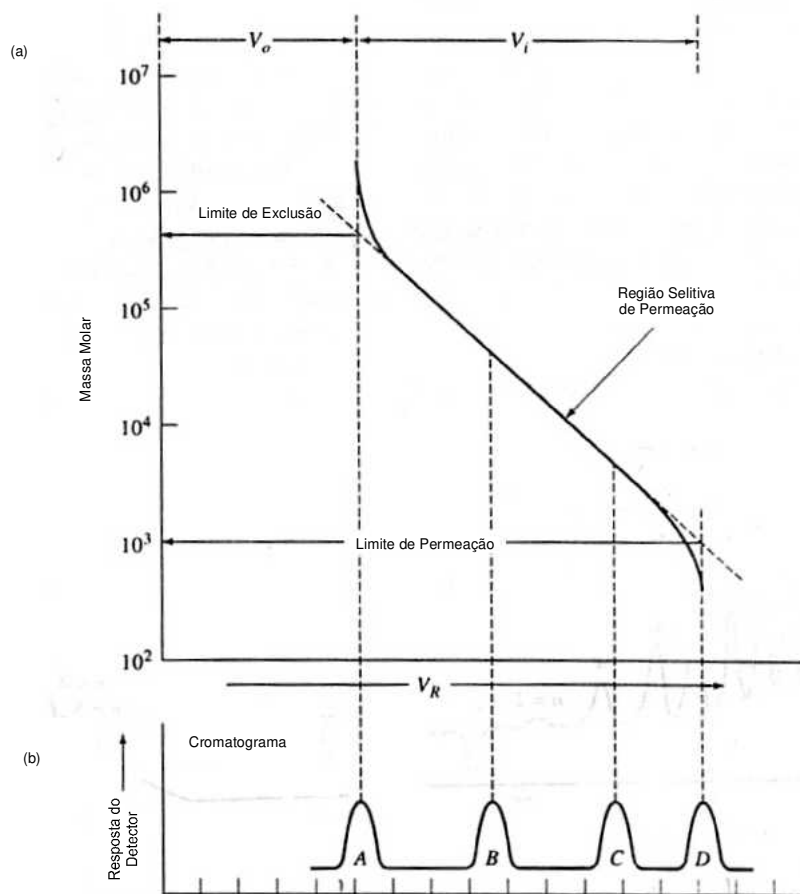


Figura 2.3 – Curva de calibração característica de GPC

A massa molar de substâncias simples é bem definida. Já a massa molar de substâncias poliméricas ou macromoléculas não apresenta um valor definido, mas sim uma distribuição de massas molares, pois polímeros são substâncias polidispersas.

A relação entre a massa molar de compostos poliméricos e o comportamento de eluição em colunas de GPC torna possível a determinação das massas molares bem como da curva cumulativa de forma rápida. A curva cumulativa informa a quantidade de material presente no analito. Esta quantidade é calculada através da área em baixo da curva gerada pelo cromatograma e significa a quantidade total de analito injetado na coluna. Através dessa informação, é possível calcular a fração de um determinado analito (polímero correspondente a uma dada massa molar). O cálculo é realizado a partir da área sob a curva,

que corresponde a quantidade total do analito injetado na coluna. A Figura 2.4 apresenta uma curva de distribuição cumulativa :

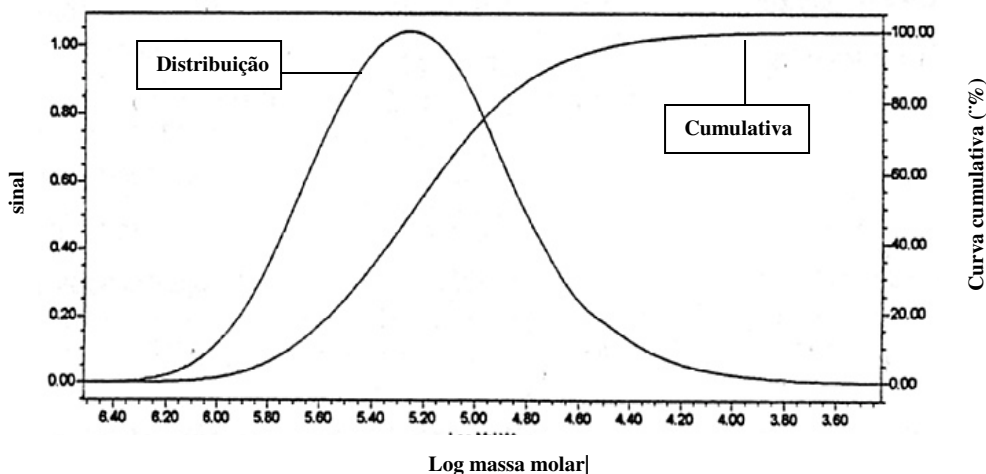


Figura 2.4 – Curva de distribuição cumulativa.

As relações de massas médias molares, que caracterizam o polímero, é dada pela forma genérica da Equação 2.12:

$$M^* = \frac{\sum n_i M_i^c}{\sum n_i M_i^{c-1}} \quad (2.12)$$

Onde:

C	M*
1	Massa molar média numérica ( $\overline{M}_n$ )
2	Massa molar média ponderal ( $\overline{M}_w$ )
3	Massa molar média Z
4	Massa molar média Z+1

## 2.10 - Predição da Massa molar

Uma substância química simples, constituída de uma única molécula, tem sua massa molar bem definida. Já para um polímero, cuja cadeia é constituída de várias unidades menores denominadas monômeros, a massa molar depende da quantidade de unidades monoméricas presentes em cada cadeia. Sendo assim, um polímero não tem sua massa molar bem definida, visto que a quantidade de unidades monoméricas pode variar em cada uma das cadeias presentes em uma determinada massa de polímero. Dessa forma, materiais poliméricos são caracterizados em termos de distribuição de sua massa molar, através de suas curvas de distribuição. Estas curvas de distribuição são histogramas que descrevem a distribuição de certa propriedade global das cadeias em função de uma determinada variável, podendo apresentar valores diferentes em uma faixa especificada.

O título genérico distribuição de massa molar engloba uma série de distribuições diferenciais, que tomam por base as propriedades do polímero, dentre as quais as mais importantes são: a distribuição do número de macromoléculas em função do número de monômeros que contém em sua estrutura (distribuição em número do tamanho de cadeia) e a distribuição da massa total das macromoléculas em função do número de monômeros presentes nas mesmas (distribuição em peso do tamanho de cadeia). As curvas de distribuição podem ser consideradas funções discretas, visto que o número de monômeros existentes em uma macromolécula só pode assumir valores inteiros e positivos, enquanto a massa das macromoléculas só pode assumir valores múltiplos da massa molar do monômero. Entretanto, é comum representar as distribuições de massa molar através de curvas contínuas, como se fossem distribuições diferenciais (*Ray, 1972*).

A modelagem matemática é uma ferramenta poderosa para o projeto e otimização de reatores. O modelo matemático deve englobar os principais fenômenos do processo estudado e ser baseado em dados cinéticos consistentes para permitir que condições ótimas de operação do reator sejam determinadas. Tendo em vista que as propriedades de um polímero estão diretamente relacionadas à sua distribuição da massa molar, a inclusão das curvas de distribuição da massa molar (*MWD – Molecular Weight Distribution*) nos modelos fenomenológicos de reatores de polimerização é uma etapa fundamental no desenvolvimento do modelo. Um modelo tal qual descrito permite a otimização do reator não somente em termos de rendimento e produtividade, mas também do produto final obtido que atenda as propriedades desejadas.

Existem diversos métodos reportados na literatura para a obtenção da distribuição de massa molar de polímeros. Apesar dos métodos datarem da década de 50, a complexidade dos cálculos aliada ao grande número de equações envolvidas nos modelos só tornou possível a utilização dos mesmos à partir da década de 90, com o avanço e a popularização do uso de computadores. Os métodos são baseados em estatística probabilística sendo que os mais difundidos e utilizados atualmente são o método dos momentos e método instantâneo.

As etapas básicas numa reação de polimerização são: iniciação, propagação e terminação da cadeia, que pode ocorrer por desproporcionamento ou combinação. Estas etapas podem ser representadas pelas equações genéricas, a seguir:

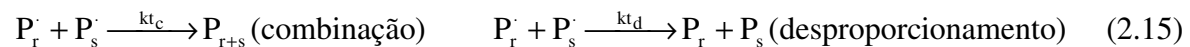
Iniciação



Propagação



Terminação



Onde:

I iniciador

$P_n$  cadeia de polímero de tamanho  $n$

M monômero

Para um reator batelada, tem-se o seguinte balanço de massa:

Para o radical gerado na iniciação  $(P_1 \cdot)$ ,

$$\frac{d[P_1 \cdot]}{dt} = 2kd[I]f - kp'[P_1 \cdot][M] + kt'[P_1 \cdot][P] \quad (2.16)$$

Para o polímero em crescimento

$$\frac{d[P \cdot]}{dt} = 2kd[I]f - kt[P \cdot]^2 \quad (2.17)$$

Para o monômero:

$$\frac{d[M]}{dt} = -kp[M][P \cdot] \quad (2.18)$$

Para o polímero morto

$$\frac{d[D]}{dt} = kp[M][P \cdot] \quad (2.19)$$

Onde

$$[P \cdot] = \sum_{n=1}^{\infty} [P_n \cdot]$$

f eficiência do iniciador

OBS:  $kp'$  e  $kt'$  podem ter um valor ligeiramente diferente de  $kp$  e  $kt$  respectivamente, para reações envolvendo cadeias curtas. Para  $n \geq 5$   $kp' = kp$  e  $kt' = kt$ .

A integração simultânea das Equações de 2.16 a 2.19, com  $n$  variando de 1 até um número suficientemente grande, resulta no perfil de concentração de cadeias poliméricas com  $n$  unidades monoméricas ( $P_n$ ) e de monômero com o tempo. A determinação das massas molares pode ser obtida através de métodos como o “instantâneo” ou dos momentos. O primeiro apresenta a vantagem de fornecer a distribuição das massas molares,

além das massas molares médias ( $\overline{Mn}$  e  $\overline{Mw}$ ). Entretanto, este método só é aplicável para cadeias lineares. O método dos momentos gera apenas os valores médios de massa molar numérica e ponderada, podendo ser usado tanto para polímeros lineares como ramificados.

Muitas vezes é impossível conhecer a forma completa das curvas de distribuição da massa molar, ou é desnecessário conhecê-las. Na maioria das vezes, poucas grandezas relacionadas à distribuição de massas molares (*MWD*), como a massa molar média e o índice de polidispersão, são suficientes para descrever as características do material polimérico. Estas grandezas, que também permitem uma descrição aproximada da *MWD* original, estão diretamente relacionadas aos momentos da curva de distribuição.

O momento '*k*' de uma curva de distribuição discreta é definido por:

$$\mu_k = \sum_{n=1}^{\infty} n^k \cdot f_n \quad (2.20)$$

Onde:

- $f_n \rightarrow$  representa a frequência com que a espécie '*n*' ocorre.

O entendimento do termo momento pode ser facilitado pela introdução do conceito da *esperança matemática* de uma variável aleatória *x*. A *esperança matemática* nada mais é que o valor esperado para a ocorrência de um determinado evento (*x*) em uma distribuição de probabilidades. A esperança matemática é definida por:

$$E(x) = \sum xP(x) \quad (2.21)$$

Onde:

$P(x)$      probabilidade de ocorrência do evento *x*

Entretanto a probabilidade exata da ocorrência de um determinado evento muitas vezes não é conhecida. Dessa forma, faz-se necessário sua estimativa. A estimativa da probabilidade de um evento em uma distribuição discreta é dada pela frequência do evento dividida pelo somatório das frequências da distribuição, ou seja pela frequência relativa, conforme Equação 2.22:

$$f_r = \frac{f_i}{\sum f_i} \quad (2.22)$$

A esperança matemática é uma medida de posição do valor central equivalente à média, ou seja mede a posição central de um conjunto de dados (Leme, 1967). Sendo assim, a esperança matemática de uma distribuição é nada mais que a média, ou seja valor com maior probabilidade de ocorrência. Fazendo uma analogia entre a Equação 2.18 e 2.19 observa-se que a *esperança matemática* nada mais é que o primeiro momento ( $k=1$ ), e sendo que  $P(x)$  é a frequência da ocorrência.

Outra medida característica de uma distribuição é a variância. Em termos de *esperança matemática*, a variância é definida pela Equação 2.23:

$$E(\sigma^2) = \sum (x - \bar{x})^2 P(x) \quad (2.23)$$

Onde:

$\bar{x}$       média da distribuição

$(x - \bar{x})$     desvio

O desvio padrão é uma medida de dispersão e nada mais é que a soma dos quadrados dos desvios individuais multiplicados pela sua probabilidade de ocorrência em relação a um determinado valor da distribuição. Vale ressaltar que o desvio médio não pode ser utilizado para caracterizar a variabilidade de uma distribuição pois sua *esperança*



*matemática* é identicamente nula, sendo assim toma-se o seu quadrado que independe do sinal. Comparando-se a Equação 2.23 com a Equação 2.21 observa-se que o segundo momento é a esperança matemática da variância.

Os conceitos apresentados até então não constituem por si só a descrição do método dos momentos utilizado para estimativa da distribuição de massa molar em reatores poliméricos, entretanto contribuem bastante para seu entendimento. Antes da definição do método propriamente dito, convém definir as propriedades que caracterizam um polímero seja ele natural ou sintético, que são: massa molar média numérica ( $\overline{Mn}$ ), massa molar média ponderal ( $\overline{Mw}$ ) e índice de polidispersidade (PDI), segundo definições a seguir:

Massa molar média numérica ( $\overline{Mn}$ ): massa total da amostra dividido pelo número total de moléculas na amostra:

$$\overline{Mn} = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \sum x_i M_i$$

Onde:

$N_i$  = número de moléculas

$M_i$  = massa molar do monômero (gMol)

$x_i$  = fração molar

Massa molar média ponderal ( $\overline{Mw}$ ): é a média ponderada da massa de cada espécie na amostra.:

$$\overline{Mw} = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i} = \sum w_i M_i$$

Onde:

$C_i$  massa total das moléculas  $N_i$

$W_i$  fração mássica

Índice de polidispersidades (PDI): razão entre  $\overline{M_w}$  e  $\overline{M_n}$ . É uma medida de homogeneidade do polímero e quanto mais próximo da unidade mais homogêneo é o polímero.

Ray (1972) mostrou que qualquer curva de distribuição pode ser completamente caracterizada por seus infinitos momentos. Considerando que:

- $\mu_1/\mu_0 \rightarrow$  representa o número médio de unidades monoméricas na cadeia, ou grau de conversão médio numérico
- $\mu_2/\mu_1 \rightarrow$  representa o número médio ponderal das unidades monoméricas na cadeia, ou grau de conversão médio ponderal.
- $M_w \rightarrow$  massa molar do monômero.

As variáveis estatísticas associadas às curvas de distribuição, como médias, desvio padrão, assimetria, variância, também são determinadas pelas relações entre os momentos.

$$\overline{X} = \frac{\mu_1}{\mu_0} \quad (2.24)$$

A variância pode ser obtida pela relação:

$$\sigma^2 = \frac{(\mu_2 \cdot \mu_0 - \mu_1^2)}{\mu_0^2} \quad (2.25)$$

Índice de polidispersidade:

$$PDI = 1 + \frac{\sigma^2}{\bar{X}^2} \quad (2.26)$$

O índice de polidispersão é uma propriedade dos polímeros que fornece informações sobre a dispersão do tamanho de cadeia, ou uniformidade do polímero, cujo menor valor é '1', em sistemas monodispersos.

Para um sistema polimérico, o momento de ordem zero do polímero ( $k = 0$ ) representa o número total de cadeias poliméricas existentes em um determinado volume (soma das probabilidades ou frequências). O momento de ordem um ( $k = 1$ ) representa o número total de monômeros que constituem macromoléculas (número total de monômeros polimerizados). Assim, a massa molar média numérica ( $\overline{Mn}$ ) pode ser descrito por:

$$\overline{Mn} = \frac{\mu_1}{\mu_0} \cdot Mw \quad (2.27)$$

O momento de ordem dois ( $k = 2$ ) representa a soma dos pesos de cada macromolécula em função da quantidade de monômero contida em cada uma. Logo, a massa molar média ponderal ( $\overline{Mw}$ ) é dada por :

$$\overline{Mw} = \frac{\mu_2}{\mu_1} \cdot Mw \quad (2.28)$$

Em sistemas de polimerização existem dois “tipos” de polímero no meio reacional: o polímero vivo (cadeia crescente) e o polímero morto (cadeia com crescimento encerrado). Sendo assim, é útil definir momentos para estes dois “tipos” de polímero:

- momento 'k' do polímero vivo:  $\lambda_k = \sum_{n=1}^{\infty} n^k \cdot [P_n \cdot]$  (2.29)

- momento 'k' do polímero morto:  $\mu_k = \sum_{n=1}^{\infty} n^k \cdot [D_n]$  (2.30)

Segundo *Ray* (1972), às vezes, momentos de ordem elevada são interessantes para descrever determinada propriedade, porém a obtenção destes é mais difícil. Em sistemas poliméricos, normalmente os três primeiros momentos são suficientes para descrever o polímero.

Com a aplicação desta técnica, as grandezas características e mais importantes da curva de distribuição original podem ser calculadas com um número reduzido de equações, facilitando a solução do problema.

Uma boa discussão sobre a aplicação do método dos momentos em sistemas poliméricos pode ser encontrada em *Ray* (1972), que também inclui uma discussão da aplicação em sistemas de copolimerização.

Neste trabalho o método dos momentos foi aplicado à síntese enzimática de dextrana, para o estudo da possibilidade de obtenção de dextrana de baixa massa molar sem a necessidade da etapa de hidrólise.



## Capítulo 3

### **Materiais e métodos**

---

Devido ao grande número de procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, este Capítulo abordará somente os métodos analíticos empregados, sendo os demais métodos devidamente descritos nos Capítulos correspondentes.

#### **3.1 - Determinação de açúcares redutores pelo método de DNS**

Todos os mono e dissacarídeos, excetuando-se a sacarose, são açúcares redutores (Morrison e Boyd, 1972). A determinação de açúcares redutores pelo método de DNS foi utilizada neste trabalho para a medida da atividade enzimática da dextrana-sacarase do *Leuconostoc mesenteroides* B512F. A enzima obtida deste microorganismo apresenta um alto teor de dextrana ligada ao seu sítio ativo. A presença de dextrana acelera a reação, sendo liberada uma grande quantidade de frutose durante a análise. Dessa forma, foi necessário a utilização de um método adequado para altas concentrações de açúcar redutor.

Para isso foi utilizado o método de Miller (1959), o qual consiste na reação da amostra com reagente de DNS. O aquecimento da amostra de açúcar redutor à 100°C por 5 minutos altera a coloração amarelo-alaranjada inicial do DNS, para uma escala cromática que vai do amarelo ao marrom dependendo da concentração de açúcar redutor na amostra. Para a determinação das concentrações de açúcares na amostra deve ser feita uma curva padrão de calibração através de soluções de padrão em concentrações conhecidas (faixa de 0,2 a 3,0 g/l). Esta curva de calibração é uma reta passando pela origem dos eixos, cuja equação é determinada através de regressão linear.

A determinação da curva de calibração foi feita adicionando-se 0,5 ml de cada solução padrão em um tubo de ensaio contendo 0,5 ml da solução de DNS. A mistura foi aquecida à 100°C por 5 minutos e resfriada posteriormente em banho de gelo. Após atingir

a temperatura ambiente, a mistura foi diluída com água destilada (fator de diluição 10,4) e a leitura da absorvância à 540 nm foi realizada em espectrofotômetro GBC UV/VIS 911A .

O reagente de DNS foi preparado dissolvendo-se 10,60g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 19,80g de NaOH, 8,3g de bissulfito de sódio em 1000 ml de água destilada. Após a dissolução total dos reagentes sólidos, foi adicionado à mistura 7,6 ml de fenol fundido e o volume foi completado para 1400 ml. A solução foi armazenada na geladeira em um frasco âmbar envolvido com papel alumínio para evitar decomposição de seus componentes por ação do calor e da luz. À uma alíquota de 100 ml desta solução foram adicionados 30,6 g de tartarato duplo de sódio e potássio. Após a dissolução completa do sólido o volume foi completado para 140 ml. A curva de calibração foi construída utilizando-se o reagente contendo o tartarato.

Segundo o trabalho de Miller (1959), a função do tartarato duplo de sódio e potássio é estabilizar a cor desenvolvida pela reação do DNS com o açúcar redutor. Sua adição pode ser realizada antes ou depois do aquecimento. No caso da adição após o aquecimento, esta deve ser realizada imediatamente após o aquecimento que deve ter sua duração estendida a 12 minutos para desenvolvimento completo da cor. Já o bissulfito de sódio é adicionado ao reagente para evitar sua degradação. Entretanto, a adição do tartarato ao reagente torna-o instável enquanto que o reagente sem o tartarato, somente com o bissulfito, pode ser estocado por longos períodos de tempo. Neste trabalho, optou-se pela preparação de uma grande quantidade de reagente, sendo adicionado o tartarato a pequenas porções do reagente estocado antes de sua utilização. Dessa forma, evita-se a degradação pois o volume final de reagente (140 ml) é rapidamente consumido e pode-se preparar uma grande quantidade do reagente sem tartarato para estocagem. Deve-se construir uma curva de calibração toda vez que uma solução nova de DNS contendo tartarato for preparada.

### **3.2- Determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase pelo método de DNS**

A curva cinética de atividade da enzima dextrana-sacarase é um hipérbole cuja parte linear vai de zero até aproximadamente 4 horas, conforme ilustrado na Figura 3.1:

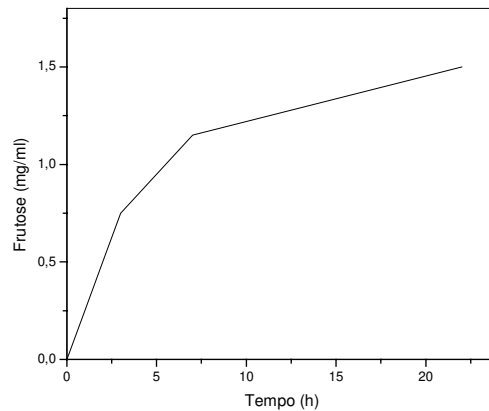


Figura 3.1 – Cinética enzimática da dextrana-sacarase de *L. mesenteroides* B512F, a 30°C na presença de 10/ml dextrana nativa (adaptação de Kobayashi e Matsuda, 1980).

A atividade enzimática foi determinada em termos de unidade de dextrana-sacarase (UDS/ml) a 30°C e pH 5,2, valores nos quais a enzima é estável e apresenta atividade máxima (Mibieli, 2001). A UDS nada mais é que a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana a 30 °C liberando 0,52 mg de frutose em 1 hora. Entretanto não é necessário que a cinética seja determinada no período de 1 hora, pois trata-se de uma reta. Pode-se relacionar a atividade enzimática em UDS/ ml à liberação de frutose através da seguinte relação:

$$\text{Atividade (UDS/ ml)} = \frac{1}{\alpha_1} \frac{\beta_1}{0,52} 60 d \quad (3.1)$$

Onde:

$\alpha_1$  coeficiente angular da curva de calibração de DNS (mg/ABS.ml)

$\beta_1$  coeficiente angular da reta da curva cinética (ABS/min)

60 conversão do tempo de minutos para hora

$d_1$  diluição da amostra



Para determinação da atividade da dextrana-sacarase foram preparados 100 ml de uma solução reativa contendo 18,2 ml de uma solução estoque de sacarose (600 g/l) em tampão acetato de sódio 20mM com 0,05 g/L de CaCl<sub>2</sub>, pH 5,2 e 4,5 ml de solução tampão de acetato de sódio 20 mMol com 1,2 g/l de CaCl<sub>2</sub>. Uma alíquota de 455 µL desta solução de atividade foi adicionada a dois tubos de ensaio e incubada por 5 minutos a 30°C. Uma alíquota de 45 µL da amostra foi adicionada a cada tubo de ensaio (d =11,11). Foi então adicionado 0,5 ml do reagente de DNS a cada um dos tubos nos tempos 0 e 10 minutos respectivamente. Os tubos foram então aquecidos por 5 minutos a 100°C, resfriados à temperatura ambiente em banho de gelo. A cada um dos tubos foram adicionados 9 ml de H<sub>2</sub>O destilada (mesmo fator de diluição da curva de calibração). Os tubos foram homogeneizados e a leitura foi realizada a 540 nm contra o branco da solução de atividade. Todas as amostras foram realizadas em duplicata sendo considerado um desvio máximo de leitura de 0,050 nos valores de absorvância em relação à media entre os dois valores. O zero do equipamento foi realizado através de solução contendo 0,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada e 0,5 ml da solução de DNS a um tubo de ensaio ao qual foram adicionados 9 ml de H<sub>2</sub>O destilada. O coeficiente angular da curva é calculado da seguinte forma:

$$\beta = \frac{\overline{ABS}_{10} - \overline{ABS}_0}{10} \quad (3.2)$$

$\overline{ABS}_{10}$  valor médio das leituras de absorvância no tempo 10 minutos

$\overline{ABS}_0$  valor médio das leituras de absorvância no tempo zero

Para se construir a curva cinética, um método muito utilizado é a adição de uma amostra da enzima em reator tanque agitado termostatizado com a retirada de amostras em intervalos regulares de tempo. Através da determinação da quantidade de açúcar redutor nas amostras, a curva é construída e tem seu coeficiente angular determinado por regressão linear dos pontos. Entretanto esta metodologia é demorada e consome uma quantidade muito grande de enzima e reagentes. Como a forma da curva é conhecida (uma reta até 4 horas), pode-se determinar o coeficiente angular da reta com apenas dois pontos, conforme

procedimento apresentado. O Apêndice 1 traz maiores detalhes sobre a escolha desta metodologia.

### **3.3 – Determinação de proteínas**

Para determinação da massa proteica total foi utilizado o método de Bradford (1976), que consiste na reação da proteína com o corante Coomassie Brilliant Blue G250. Para isso foi preparada uma solução contendo 0,06 % de Coomassie Brilliant Blue G250 em 1,5 % HCl (p/v), a qual foi posteriormente filtrada em papel de filtro Whatman n° 1. Uma curva padrão com albumina bovina (BSA) foi preparada conforme procedimento a seguir:

- 1) soluções estoques de BSA de 10 a 200 µg/ml foram preparadas utilizando-se água como solvente
- 2) foram adicionados a tubos de ensaio 100µl de cada solução estoque, 1400µl de H<sub>2</sub>O e 1500µl do Coomassie, a adição é seguida de agitação
- 3) um tubo contendo 1500µl de H<sub>2</sub>O destilada e 1500µl do Coomassie, que corresponde ao branco da enzima, foi preparado
- 4) após cinco minutos\*, leituras das absorbâncias em dois comprimentos de onda (595 e 465 nm) contra a água foram feitas
- 5) a razão das absorbâncias a 595 nm/465 nm foi *plotada* em função da massa de BSA e a equação da reta foi obtida por regressão linear dos pontos

\* a leitura deve ser realizada decorrido um tempo mínimo de 5 e máximo de 20 minutos, pois nesse período a coloração é estável (Bradford, 1976).

**Ensaio:**

- 1) 100µl da amostra, 1400µl de H<sub>2</sub>O e 1500 µl do Coomassie foram adicionados à um tubo de ensaio, o qual foi agitado imediatamente após a adição dos reagentes
- 2) após 5 minutos, a leitura da absorbância a 595 e 465 nm contra a água foi realizada
- 3) com a média das razões das absorbâncias, a massa de proteína através da curva padrão foi calculada
- 4) os ensaios foram realizados em duplicata

**3.4 - Determinação da massa seca celular**

O monitoramento do crescimento celular nas etapas de ativação do *Leuconostoc mesenteroides* B512 e sua fermentação para obtenção da enzima foi realizado através de leitura a 590 nm em espectrofotômetro GBC UV/VIS 911A. O procedimento consiste em diluir uma alíquota da suspensão contendo as células em H<sub>2</sub>O destilada e realização da leitura da absorbância a 590 nm contra um branco com o caldo de fermentação na mesma diluição. Para se correlacionar a absorbância com a massa seca celular, foi construída uma curva de calibração através da determinação do peso seco das células, seguido de diluição

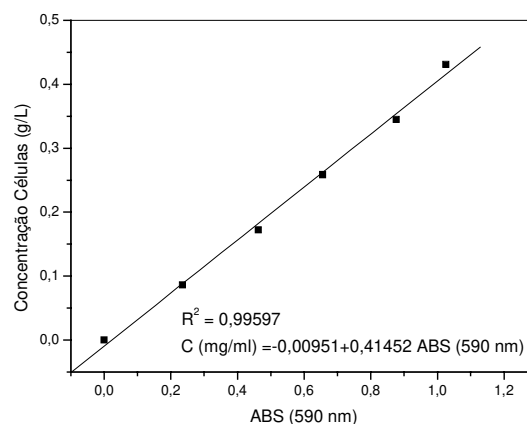


Figura 3.2 – Curva padrão de massa celular (*L. mesenteroides* B512F).

### 3.5 - Determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B 512 FMC

A atividade enzimática da enzima obtida através do *L. mesenteroides* B512 FMC não pode ser determinada através do método de DNS, uma vez que esta enzima é obtida sem dextrana contaminante. Dessa forma, o método de DNS não apresenta sensibilidade suficiente para a determinação da atividade enzimática através da medida da liberação de frutose (açúcar redutor).

Para esta enzima, foi utilizado o método absoluto de determinação da atividade enzimática, através da medida da incorporação de C<sup>14</sup> na cadeia de dextrana proveniente da sacarose-C<sup>14</sup> (Sigma S.A) medidos em um espectrômetro de cintilação.

#### *Ensaio*

- 1) Preparar 10 mL de tampão piridina/ácido acético 20 mM (pH 5,2) através da diluição de solução estoque contendo 500 mmoles de piridina e 500 mmoles de ácido acético
- 2) Preparar 2 mL de uma solução de sacarose 200 mM a partir da solução estoque 600 mM em tampão piridina/acetato 20 mM (pH 5,2) – *Solução A*
- 3) Adicionar 0,2 µCi de sacarose-C<sup>14</sup> (Sigma Co.) à solução preparada no item 2
- 4) Incubar 100 µL da *Solução A* a 30 °C por 10 minutos
- 5) Diluir 10 µL da enzima dextrana-sacarase pura, concentrada, em 1 mL do tampão preparado no item 1 (*Solução B*)
- 6) Adicionar, imediatamente após o preparo, 100 µL da *Solução B* à solução radioativa de sacarose (*Solução A*) já incubada a 30 °C e agitar (vórtex).

- 7) Retirar uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  imediatamente após a adição da enzima e transferir para um pedaço quadrado de papel de filtro Whatman 3 MM de dimensões 1,5 x 1,5 cm
- 8) Mergulhar o papel do item 7 em um béquer contendo metanol
- 9) Retirar alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  nos tempos 5, 10, 20 e 30 minutos após a adição da enzima e adicionar imediatamente a um pedaço quadrado de papel de filtro Whatman 3 MM de dimensões 1,5 x 1,5 cm
- 10) Mergulhar o papel de filtro contendo a amostra imediatamente em um béquer contendo 200 mL de metanol
- 11) Após a adição de todas as amostras trocar o metanol e agitar por 10 minutos
- 12) O procedimento do item 11 deve ser repetido por 3 vezes, quando os papéis devem ser secos por 30 minutos sob luz infravermelha e mergulhados no coquetel de cintilação
- 13) Contar a quantidade de  $\text{C}^{14}$  incorporada na cadeia de dextrana (CPM) em um espectrofotômetro de cintilação (*Liquid Scintillation Analyser* –Packard TRICarb 1600 TR).

#### ***Determinação da quantidade de $\text{C}^{14}$ no digestor***

No item 7 do ensaio foi retirada uma amostra da solução de sacarose radioativa. Esta amostra é utilizada para a determinação da radioatividade inicial da solução por  $\mu\text{mol}$  de glicose na solução de atividade através da seguinte relação:

$$R_1 = \frac{\text{CPM} \cdot d_2}{\mu\text{moles de Sacarose}} [\text{CPM} / \mu\text{mol Sac}] \quad (3.3)$$

$$R_2 = \frac{R_1}{2} = [\text{CPM} / \mu\text{mol glicose}] \quad (3.4)$$

Onde

- $R_1$  radioatividade da solução de atividade para determinação da atividade da dextranase
- $R_2$  radioatividade da solução de atividade (*Solução A*) com base no número de moles de glicose
- $d_2$  fator de diluição da amostra de sacarose radiotativa

### ***Cálculo da atividade enzimática***

A atividade enzimática é calculada em unidades internacionais (UI), sendo que 1 UI é definida como a quantidade de enzima que incorpora 1  $\mu\text{mol}$  de glicose na cadeia de dextrana em 1 minuto, à temperatura e concentração de substrato do ensaio. Sabendo-se a quantidade de  $C^{14}$  adicionada ao digestor para a determinação da atividade enzimática ( $R_2$ ), é possível determinar a quantidade de glicose incorporada à cadeia de dextrana em função do tempo. A contagem da incorporação de  $C^{14}$  na cadeia de dextrana é realizada em CPM. A atividade enzimática é então determinada através da seguinte relação:

$$\text{Atividade} = \frac{\alpha_2}{R_2} \cdot \frac{d_3}{V_1} \cdot d_4 \quad (3.5)$$

Onde:

- $\alpha_2$  coeficiente angular da reta (CPM/min)
- $d_3$  fator de diluição da amostra de 25  $\mu\text{L}$
- $d_4$  fator de diluição da enzima (item 5)
- $V_1$  volume de enzima adicionado ao digestor (mL)

Por se tratar de um método absoluto de análise, a determinação da atividade enzimática através da incorporação de  $C^{14}$  da sacarose- $C^{14}$  não requer curva de calibração.

### 3.6 – Quantificação dos carboidratos envolvidos na síntese enzimática de dextrana

Para a determinação da taxa de formação dos produtos do acceptor foram realizadas diversas sínteses enzimáticas variando-se a concentração de maltose e sacarose. Amostras de 1 mL foram retiradas do digestor em intervalos regulares de tempo. A estas amostras foram adicionados 2 mL de etanol absoluto. A adição do etanol visa não somente interromper a reação enzimática através da desnaturação da enzima, mas também precipitar a dextrana formada separando-a do sobrenadante contendo os produtos do acceptor, frutose e substratos não consumidos.

A dextrana precipitada foi então centrifugada por 3 minutos em centrífuga comum de bancada da marca “International Clinical Centrifuge” (*International Equipment Co., Boston, Mass – USA*). O sobrenadante foi reservado para posterior análise. A dextrana foi então lavada por duas vezes com 2 mL de etanol 67 % para remoção de açúcares residuais eventualmente presentes no precipitado. O etanol utilizado para a lavagem do precipitado foi misturado ao sobrenadante rico nos carboidratos envolvidos na síntese.

Os produtos do acceptor foram separados e quantificados através de cromatografia de camada delgada (CCD), em placas de sílica gel da marca Whatman, sendo utilizadas placas tipo K6 (sílica gel 60 A) tanto para a separação dos produtos do acceptor (séries homólogas) como para a quantificação da frutose liberada, sacarose e maltose não consumidas durante a reação. Em ambos os casos foi utilizada a técnica de múltiplas ascensões, que permite uma melhor separação dos produtos de interesse, e placas de dimensões de 20 x 20 cm permitindo a corrida de aproximadamente 15 amostras simultâneas (Robyt, 2000). Para a separação dos produtos do acceptor (séries isólogas) foi utilizado o sistema acetonitrila/acetato de etila/1-propanol/água (85:20:50:90), sendo realizadas duas ascensões, enquanto que para a separação da frutose, sacarose e maltose foi utilizado o sistema acetonitrila/água (85:15), sendo realizadas três ascensões. Para cada sistema de

solvente foi utilizada uma nova placa. Ao término de cada ascensão a placa era seca com secador de cabelos no interior de uma capela para remoção completa da fase móvel.

Como sistema de detecção, foi utilizada uma solução constituída de 0,3 % (p/v) de 1-naftiletilenodiamina e 5 % (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em metanol. Ao término da última ascensão, as placas eram removidas da câmara de desenvolvimento, secas conforme procedimento descrito acima, e mergulhadas rapidamente no reagente de detecção. Após secagem natural em capela (à temperatura ambiente e sem uso do secador de cabelos), as placas eram colocadas em um forno a 120 °C por 10 minutos para revelação das manchas.

O sistema de detecção utilizado é bastante sensível, permitindo a detecção de carboidratos na faixa de 50 a 2000 ng diretamente na placa através de identificação visual dos compostos de interesse. Para quantificação dos carboidratos de interesse foi construída uma curva de calibração utilizando-se a placa K6, tendo-se como padrões soluções de glicose, frutose e sacarose. Para as análises, as amostras devem ser diluídas adequadamente e estarem dentro da faixa de calibração.

Após diluição adequada, as amostras foram aplicadas na borda inferior da placa à uma distância de 1,5 cm da borda. Foram aplicados 5 µL de cada uma das amostras e mais os padrões de isomaltodextrinas (séries homólogas contendo de 1 a 15 unidades de glicose), frutose, sacarose e glicose e panose para identificação das respectivas manchas. Para aplicação correta das amostras, foram utilizadas microseringas de cromatografia e um amostrador semi-automático (TIC – *multispotter*), ambos da marca *Analytical Instruments Specialities (Ais)*.

A concentração dos carboidratos é relacionada através da curva de calibração à densidade da mancha correspondente a cada um dos produtos de interesse. Por serem constituídos exclusivamente de unidades de glicose, os produtos do acceptor são quantificados pela curva de calibração da glicose (calibração indireta). Após a detecção das manchas e resfriamento das placas à temperatura ambiente, a aquisição da imagem da placa e a análise de densidade de volume das manchas foram realizadas em um densitômetro de imagem da marca BioRad modelo GS670 e do software *Molecular Analyst*, também da marca BioRad, versão 1.0 (1991). As curvas de calibração utilizadas para quantificação dos carboidratos analisados são apresentadas nas Figuras de 3.3 a 3.5:



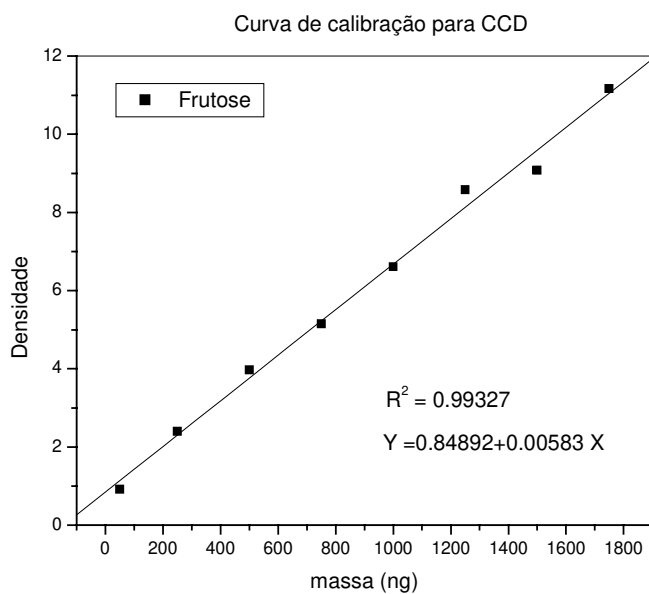


Figura 3.3 – Curva de calibração para quantificação da frutose através da análise de densidade em cromatografia de camada delgada (CCD).

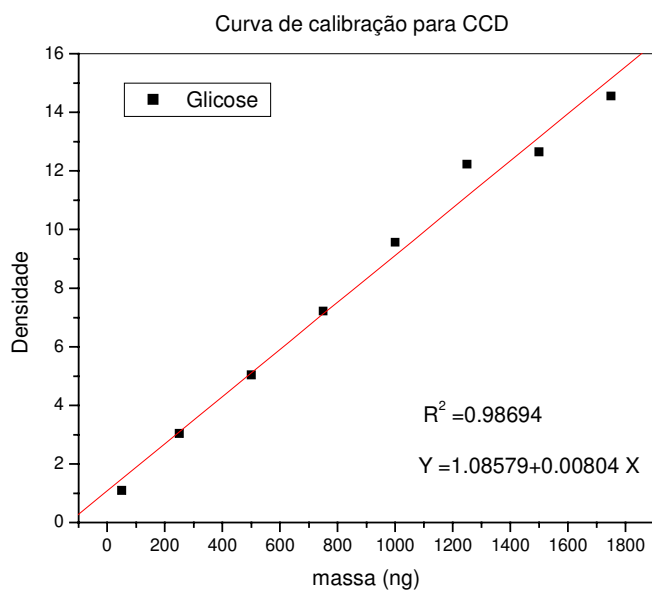


Figura 3.4 – Curva de calibração para quantificação da glicose, produtos do aceptor e maltose, através da análise de densidade em cromatografia de camada delgada (CCD).

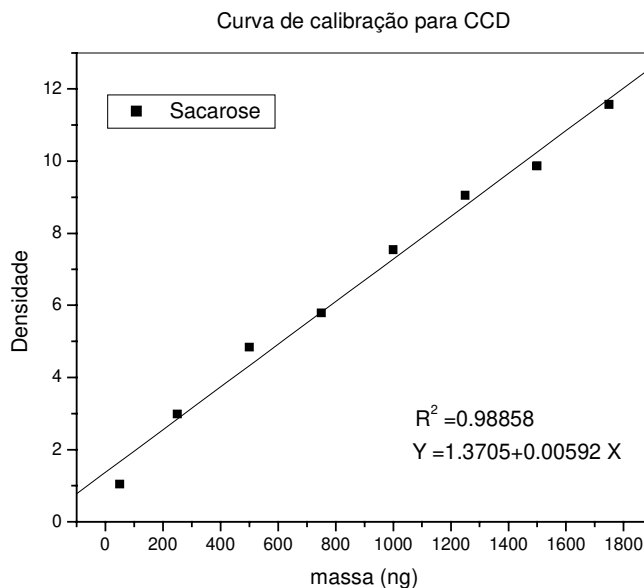


Figura 3.5 – Curva de calibração para quantificação da sacarose através da análise de densidade em cromatografia de camada delgada (CCD).

### 3.7 - Determinação da quantidade de dextrana em função do tempo

Paralelamente à determinação da concentração dos produtos do acceptor e demais carboidratos envolvidos na síntese, foi determinada a quantidade de dextrana formada.

#### *Determinação da quantidade de dextrana formada na síntese*

Para determinação da quantidade de dextrana formada durante a síntese enzimática em função do tempo, foi utilizado método fenol-ácido sulfúrico para a determinação da quantidade total de carboidratos na amostra (Fox e Robyt, 1991).

O procedimento consiste em adicionar 25 µL da amostra contendo de 10 a 200 µg/mL de carboidrato e 25 µL de fenol 5 % (p/v) aos interstícios de uma microplaca (96-well microplate). A placa deve ser então agitada a uma baixa velocidade em um vórtex

adaptado por 30 segundos. Em seguida a placa é colocada em um banho de gelo e 125  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado é adicionado à cada amostra.

A placa é então novamente agitada por 30 segundos, coberta com papel Saran<sup>1</sup>, e incubada a 80°C por 30 minutos. Após o resfriamento da placa à temperatura ambiente é realizada a leitura da absorbância da amostra à 490 nm (Microplate –Bio-Kintics Reader da marca BioTek-Instruments modelo EL312e). A quantidade total de carboidratos na amostra é então calculada através de uma curva de calibração utilizando maltose como padrão conforme apresentado na Figura 3.6:

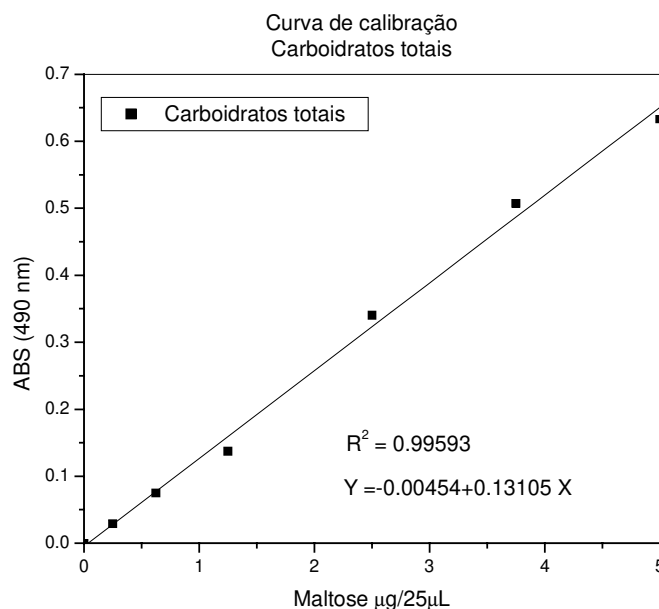


Figura 3.6 – Curva de calibração para a determinação da quantidade total de carboidratos na amostra de dextrana através do método fenol- ácido sulfúrico.

<sup>1</sup>papel saran consiste em uma marca comercial de filme plástico utilizado para conservação de alimentos  
Sueli Rodrigues/ Tese de Doutorado (FEQ/DPQ/UNICAMP)/ Outubro de 2003

## Capítulo 4

### Ativação do microrganismo e produção da enzima

---

#### 4.1 - Introdução

Neste trabalho, foi utilizada a enzima dextrana-sacarase proveniente de dois microrganismos diferentes, a saber: *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F e B512FMC. O primeiro (*L.mesenteroides* B512 F) foi obtido junto ao banco de microrganismos do Departamento Estadual de Agricultura dos EUA (*United State Department of Agricultural, Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection*), sendo um microrganismo de domínio público. Já o segundo (*L.mesenteroides* B512 FMC) trata-se de mutante constitutivo do primeiro, obtido por Kitaoka e Robyt (1998 b). A espécie nativa foi obtida liofilizada. Existem algumas diferenças entre as duas bactérias utilizadas que merecem ser ressaltadas. As características dos dois microrganismos estão apresentadas na Tabela 4.1:

Tabela 4.1 – Algumas características dos microrganismos utilizados neste trabalho

<i>Lmesenteroides</i> B512 F	<i>L. mesenteroides</i> B512FMC
cresce em glicose e em sacarose	cresce em glicose e em sacarose
produz a enzima dextrana-sacarase somente em meio contendo sacarose como fonte de carbono	produz a enzima dextrana-sacarase tanto em meio contendo glicose como em meio contendo sacarose como fonte de carbono
há produção simultânea de dextrana durante a fermentação para produção da enzima, devido à presença de sacrose	quando cultivado em meio contendo glicose como fonte de carbono, não há formação simultânea de dextrana e a purificação da enzima é facilitada

Além das características apresentadas na Tabela 4.1, o microrganismo mutante (B512 FMC) apresenta uma produtividade enzimática da ordem de 100 vezes a obtida com a espécie nativa (B 512F).

**4.2 - Ativação do espécie nativa liofilizada (*L.mesenteroides B512F*)****4.2.1- Materiais e métodos**

O crescimento da cepa liofilizada foi realizado com o meio padrão otimizado por Guimarães *et al.* (1999), o qual é descrito na Tabela 4.2:

Tabela 4.2- Meio padrão otimizado (Guimarães *et al.*, 1999)

Reagente	Concentração (g/L)
Sacarose	50,0
Extrato de levedura	20,0
Fosfato de potássio dibásico	20,0
Sulfato de magnésio	0,20
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01

As soluções salinas foram preparadas separadamente em concentrações superiores (soluções estoque), sendo posteriormente diluídas para preparação do meio padrão de forma a atingirem as concentrações da Tabela 4.2. Foram dissolvidas 62,5 g de sacarose e 25,0 g de extrato de levedura em 900 ml de água destilada, sendo adicionadas à esta solução alíquotas adequadas das soluções salinas, excetuando-se o fosfato de potássio, de forma que, após a adição deste, as respectivas concentrações da Tabela 4.2 fossem atingidas. As massas de sacarose e extrato de levedura foram calculadas considerando a diluição causada pela adição da solução de fosfato e os sucessivos repiques. O pH foi ajustado para 6,7 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado e o meio foi dividido em erlenmeyers contendo alíquotas de 80 ml, cada um, os quais foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Um erlenmeyer contendo 80 ml do meio e 10 ml de água destilada foi preparado para a inoculação do microrganismo liofilizado.

A solução de fosfato bibásico foi preparada separadamente à uma concentração de 200 g/l. O pH desta solução foi ajustado para 6,7 com ácido fosfórico concentrado sendo posteriormente dividida em tubos de ensaios com tampa contendo alíquotas de 10 ml cada um, para serem adicionados aos erlenmeyers contendo o meio de cultura, após esterilização e resfriamento à temperatura ambiente.

O microrganismo liofilizado foi então inoculado no meio, contendo fosfato, e cultivado em *shaker* rotatório a 27°C com agitação de 150 rpm, sendo realizados repiques de 10 % a cada 6 horas. Após o crescimento, o microrganismo foi congelado em tubos criogênicos contendo 4,5 ml cada em ultrafreezer (- 80°C) em solução de glicerol 10 % (v/v) para ser usado como inóculo da pré-fermentação.

### **4.3 - Ativação do microrganismo nativo (*L.mesenteroides B512F*) congelado: pré-fermentação**

#### **4.3.1 Materiais e métodos**

Para a ativação do microrganismo, foi inoculado um tubo de cultura estoque (congelada a -80 °C) em 100 ml do meio padrão otimizado por Guimarães *et al.* (1999), esterilizado e já contendo fosfato, em um erlenmeyer de 500 ml. A propagação de células foi realizada em *shaker* rotatório à 27°C e 150 rpm. A cada seis horas, 10% do volume total foi repicado. Este procedimento deveria ser realizado até que fosse atingida a atividade de 20 UDS/ml no caldo bruto, sendo considerada esta atividade um parâmetro a ser seguido para a inoculação no fermentador (Mibielli, 2001). Entretanto após 4 dias de sucessivos repiques, não foi encontrada a referida atividade apesar de ser notado um crescimento significativo do microrganismo (perceptível pelo turvamento do meio de cultura). Foi verificado também que o pH final do meio estava em um patamar muito próximo de 4,0. Neste valor de pH, a enzima poderia estar desnaturada, sendo esta a razão de não ser encontrada a atividade desejada.

A atividade enzimática depende não somente da concentração das células mas também do pH e da temperatura. Com objetivo de monitorar o crescimento do microrganismo, a atividade enzimática, o pH e a concentração celular (peso seco) foram monitorados em intervalos de 1 hora para concentrações de fosfato de 0,1 M (20 g/l) e 0,3 M no meio de cultura. O monitoramento foi realizado até o quarto repique, sendo determinados também em intervalos de 1 hora a concentração de açúcar redutor além dos parâmetros anteriormente citados.

Para se evitar contaminação do meio de cultura devido à manipulação excessiva, já que para cada amostragem seria necessária abertura do erlenmeyer, visto não haver

amostrador neste aparato, o meio inoculado foi subdividido em 6 erlenmeyers de 50 ml, cada um contendo 10 ml do meio com inóculo de forma a se manter a proporção entre o volume do frasco e o volume do meio. Sendo assim, cada um desses erlenmeyers constituía uma amostra. Outra inoculação foi realizada em um erlenmyer de 500 ml com 100 ml do meio para controle e para possibilitar e facilitar o repique. Este monitoramento foi realizado a partir do crescimento do microrganismo até o terceiro repique, ou seja 24 horas com repique de 6 em 6 horas

A atividade enzimática e a concentração de açúcar redutor foram determinadas através do método de Miller (1959), enquanto que a concentração de células foi determinada através da leitura de absorbância a 590 nm, sendo posteriormente correlacionado à curva de calibração do peso seco do microrganismo, apresentada no Capítulo 3. Os resultados deste estudo são apresentados nos gráficos a seguir:

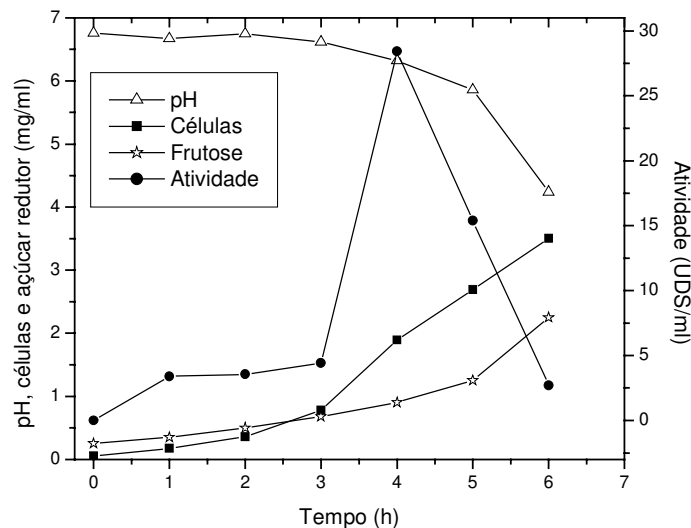


Figura 4.1 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,1 M de  $K_2HPO_4$  - inóculo do microrganismo congelado

De acordo com os dados da Figura 4.1, nota-se que quanto maior a concentração de células presentes no caldo bruto mais baixo é o pH do meio. Isso se deve ao fato de que a bactéria produz metabólitos ácidos, principalmente ácido lático, durante seu crescimento e manutenção celular (Kitaoka e Robyt, 1998a). Já em relação à atividade enzimática,

percebe-se um pico de atividade após decorridas quatro horas da inoculação do microrganismo quando este se encontra em sua fase log de crescimento. Após este pico o pH cai bruscamente para valores inferiores a 4,5.

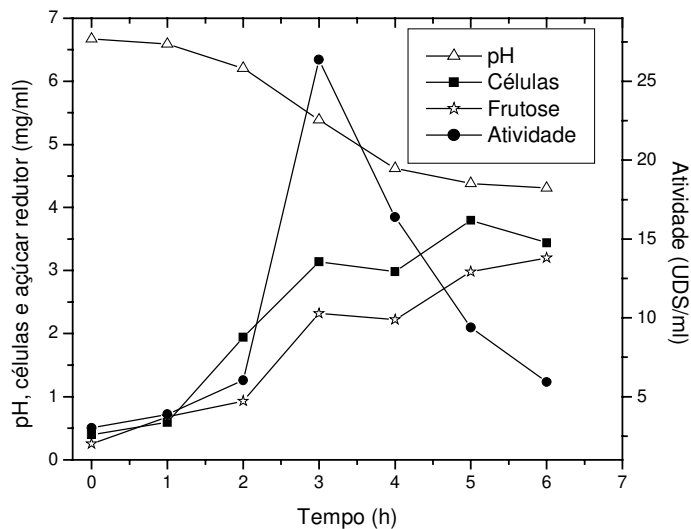


Figura 4.2 - Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,1 M de  $K_2HPO_4$  – primeiro repique.

Na Figura 4.2, verifica-se novamente a queda do pH em função do crescimento celular, o qual atinge valores inferiores à 4,5 decorridas 4 horas após o repique. Observa-se ainda que há uma ligeira queda na concentração celular no final do primeiro repique. Quanto à atividade, nota-se um pico no tempo de 3 horas e um rápido decréscimo posterior. Observam-se também valores ligeiramente superiores de concentração celular e queda mais brusca dos valores de pH para o primeiro repique ao se comparar as Figuras 4.1 e 4.2.



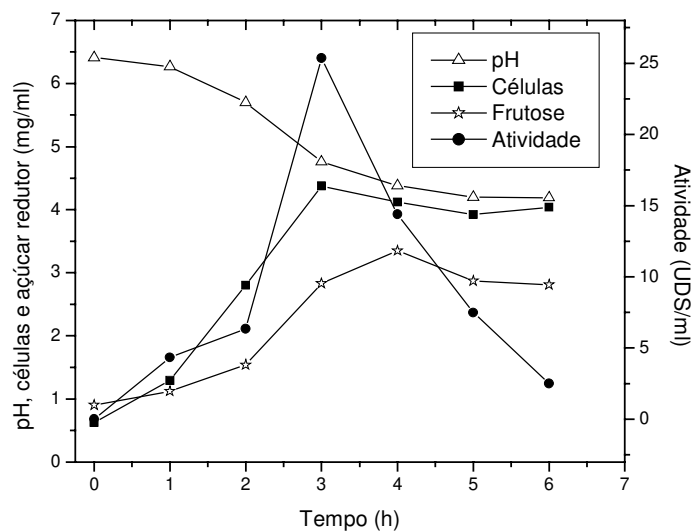


Figura 4.3 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,1 M de  $K_2HPO_4$  – segundo repique.

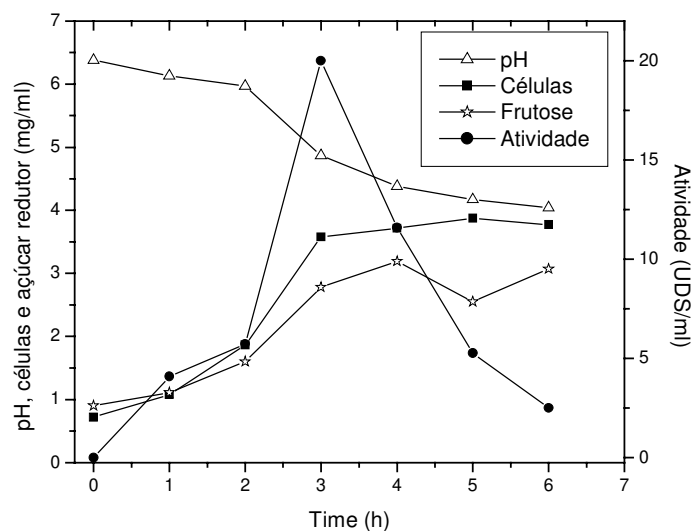


Figura 4.4 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,1 M de  $K_2HPO_4$  – terceiro repique.

De acordo com os resultados das Figuras 4.3 e 4.4, nota-se que ocorre a produção da enzima associada ao crescimento, e que no final do crescimento exponencial a atinge-se atividade máxima. Após esse período tanto o pH como a atividade decrescem rapidamente.

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras de 4.1 a 4.4, nota-se que a concentração de fosfato bibásico de 0,1 M (~20 g/l) não é capaz de tamponar o meio de cultura, mantendo o pH em valores superiores a 5,0, no qual a enzima é estável à temperatura de 27°C. A queda do pH para valores inferiores a 5,0 causa rápida desnaturação da enzima. Nota-se nos dois últimos repiques (Figuras 4.3 e 4.4) que a queda do pH para valores inferiores a 5,0 ocorre para intervalos de tempo menores que 3 horas após efetuado o repique. Sendo assim, a atividade enzimática sozinha não constitui um bom parâmetro para se determinar o melhor momento para a interrupção dos repiques e inoculação no fermentador. Poderia ser ainda utilizada a concentração celular como parâmetro, entretanto para a utilização deste parâmetro deve-se levar em consideração que todas as células são viáveis e inocular sempre a mesma quantidade de microrganismo. Sendo assim, seria mais interessante aliar a determinação da atividade enzimática à concentração de células e pH do meio. Dessa forma, a força tamponante foi aumentada para 0,3 M de  $K_2HPO_4$ , e o ensaio foi repetido. Os resultados são apresentados nas Figura de 4.5 a 4.8:

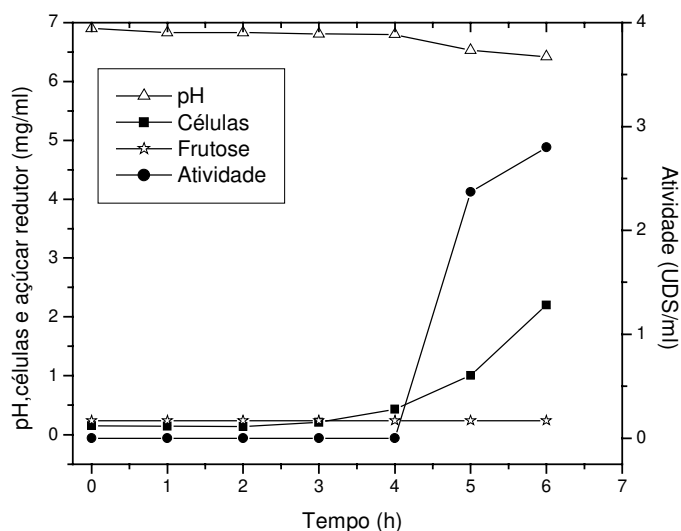


Figura 4.5 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,3 M de  $K_2HPO_4$  – inóculo congelado.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4.5, nota-se que a taxa de crescimento do microrganismo congelado é menor em meio contendo 0,3 M de  $K_2HPO_4$

quando comparada com o crescimento em meio com 0,1 M  $K_2HPO_4$  (Figura 4.1). Observa-se também que há pouca queda nos valores do pH.

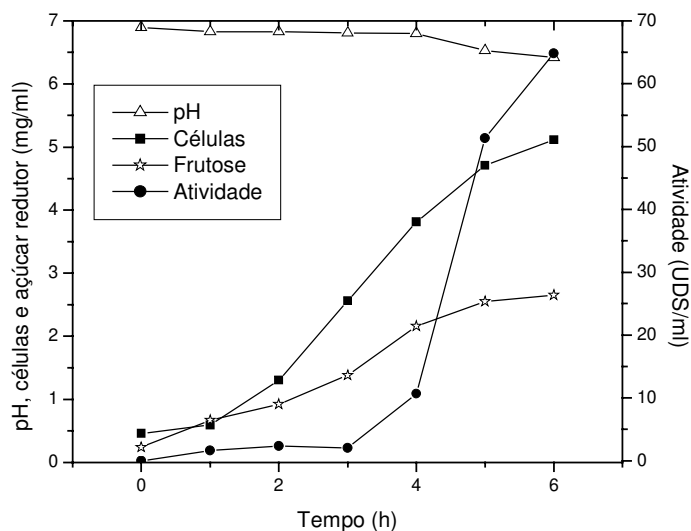


Figura 4.6 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,3 M de  $K_2HPO_4$  – primeiro repique.

De acordo com os resultados da Figura 4.6, nota-se que a fase lag é bem menor que a da Figura 4.5 e a concentração celular no meio é bastante superior à obtida para força tamponante de 0,1 M (Figura 4.2). Isso se deve ao fato de o fosfato não constituir apenas um tamponante do meio, mas também um nutriente relacionado com a respiração celular. Ao se comparar as Figuras 4.2 e 4.6, nota-se que quando a concentração de fosfato é de 0,3 M a atividade enzimática é bem maior. Observa-se ainda que a queda nos valores de pH é igualmente suave quando comparada com a Figura 4.5, não sendo observada queda na atividade enzimática.

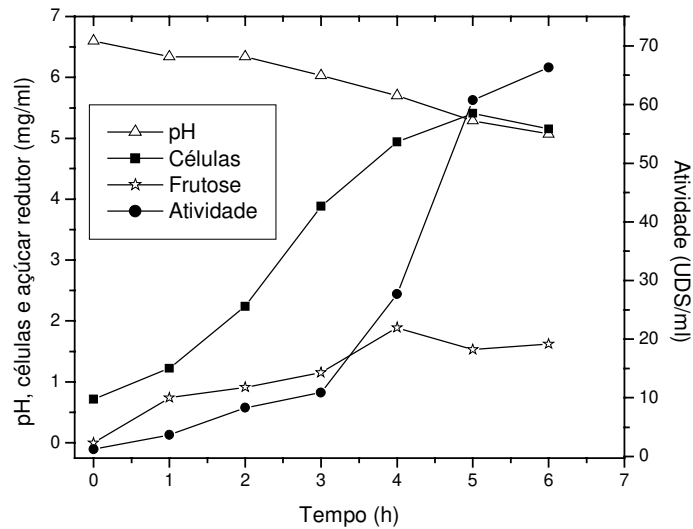


Figura 4.7 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,3 M de  $K_2HPO_4$  – segundo repique.

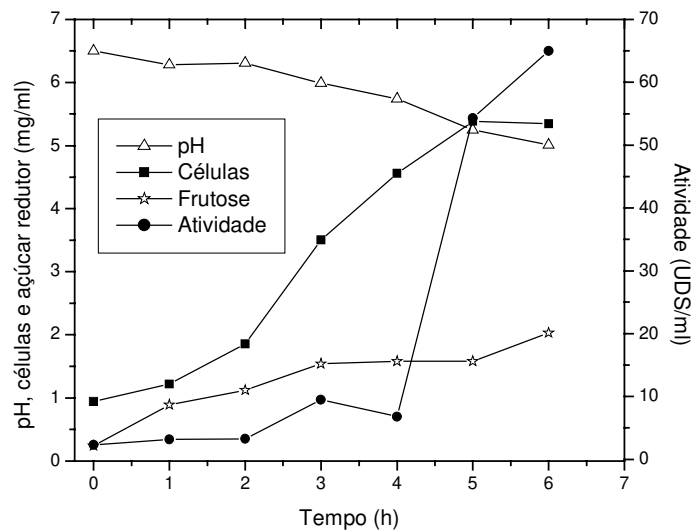


Figura 4.8 – Monitoramento do crescimento celular do microrganismo *L.mesenteroides* B512F em meio padrão com 0,3 M de  $K_2HPO_4$  – terceiro repique.

Os resultados apresentados na Figura 4.7 apresentam um comportamento semelhante ao encontrado para o segundo repique para uma concentração de fosfato de

Sueli Rodrigues/ Tese de Doutorado (FEQ/DPQ/UNICAMP/ Outubro de 2003)

0,1M (Figura 4.3), entretanto com a elevação da concentração de fosfato, a quantidade de açúcar redutor produzida é menor enquanto que a concentração celular no meio e a atividade enzimática são bastante superiores. Observa-se ainda que a queda do pH é suave, não sendo atingidos valores inferiores a 5,0. Não é observada queda na atividade enzimática. Os resultados apresentados na Figura 4.8 são similares aos da Figura 4.7, valendo para estes as mesmas observações referentes à Figura 4.7.

De acordo com o estudo do efeito da concentração de fosfato na propagação celular do *L.mesenteroides* B512F apresentado nas Figuras de 4.1 a 4.8, pode-se concluir que a concentração de fosfato de 0,1 M não é suficiente para manter o meio em valores de pH superiores a 5,0, no qual a enzima, é estável à temperatura do ensaio (27°C). A queda do pH para valores inferiores à 5,0 em um tempo inferior ao final da fase log, onde ocorre a maior liberação da enzima causa desnaturação da enzima e pode comprometer a utilização do parâmetro atividade enzimática como indicação do momento de inoculação do microrganismo no fermentador. Já a utilização de uma concentração de fosfato de 0,3 M, além de contribuir para a elevação do número de células contribui para o aumento da produção de enzima e diminuição da produção de dextrana, o qual pode ser indiretamente associado à produção de uma menor quantidade de açúcar redutor no meio (considerando que todo açúcar redutor é frutose liberada na síntese de dextrana). Dessa forma, a utilização da concentração de fosfato de 0,3 M ao invés de 0,1 M como reportado no meio padrão (Guimarães *et al.*, 1999) é mais indicada não só por permitir o monitoramento da atividade enzimática, mas também por proporcionar um maior crescimento celular.

Com base no exposto, neste trabalho foi utilizada uma concentração de fosfato de 0,3 M no meio de cultura para a propagação celular na pré-fermentação do *L.mesenteroides* B512F, sendo dois repiques suficientes para obtenção de uma grande quantidade de células viáveis, indicada pela atividade enzimática e concentração celular.

Sendo assim, o seguinte procedimento foi adotado para obtenção do inóculo de pré-fermentação:

- 1) Esterilizar separadamente a 121°C por 15 minutos 2 alíquotas de 10 ml de solução de fosfato bibásico (2,85 M) acondicionadas em tubos de ensaio com tampa

- 2) Esterilizar 2 alíquotas de 80 ml de meio de cultura padrão (Guimarães *et al.*, 1999), sendo que a uma delas deve ser adicionado 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- 3) Após resfriamento das soluções, mistura-las em um erlenmeyer de 500 ml
- 4) Inocular o microrganismo congelado no erlenmeyer contendo H<sub>2</sub>O destilada
- 5) Incubar em *shaker* rotatório a 150 rpm e 27 °C por 6 horas
- 6) Repicar 10 % para o segundo erlenmeyer e incubar novamente sob as condições do item 6
- 7) Esterilizar separadamente a 121°C por 15 minutos 1 alíquota de 30 ml de solução de fostato bibásico (2,85 M) e 120 ml de meio padrão
- 8) Resfriar as soluções e mistura-las em um erlenmeyer de 500 ml
- 9) Repicar 15 % do inóculo do primeiro repique neste último erlenmeyer e incubar por 6 horas sob as condições do item 6
- 10) Checar a concentração celular e a atividade enzimática, estando ambos os parâmetros satisfatórios, inocular, no fermentador

#### **4.4 - Fermentação do *L.mesenteroides* B512F para produção da enzima dextrana-sacarase**

Após a obtenção de uma quantidade adequada de células viáveis conforme procedimento apresentado no item 4.3 deste Capítulo, a fermentação foi então procedida. A fermentação foi realizada com a utilização do processo de batelada alimentada reportado por Bazán (1993), sendo consideradas as modificações das soluções concentradas indicadas por Guimarães *et al.* (1999). A alimentação do fermentador é constituída de uma solução concentrada de NaOH contendo sacarose. O NaOH é utilizado para manter o pH do meio na faixa ótima de crescimento do microrganismo (6,7) enquanto que a adição de sacarose visa aumentar o rendimento e evitar a falta deste nutriente. A preparação da solução de alimentação é descrita a seguir:

### ***Alimentação***

- 1) Preparar 500 ml de solução de sacarose a 300 g/L
- 2) Preparar 250 ml de solução de NaOH a 120g/L
- 3) Esterilizar as soluções separadamente a 121°C por 15 min
- 4) Esperar que as soluções esfriem e misturá-las, para se obter uma solução final com 200g/L de sacarose e 40g/L de NaOH

A fermentação foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química (LEB/DPQ/UNICAMP) em um Fermentador BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co.) de 3,0 L de capacidade contendo 1,5 L de meio padrão estéril, sendo seguido o mesmo procedimento reportado em Mibielli (2001), o qual é descrito a seguir:

### ***Fermentação***

- 1) Adicionar 150 ml de inóculo pré-fermentado (obtido conforme item 4.3)
- 2) Proceder a fermentação a 27 °C com aeração de 0,5 L/min e agitação mecânica de 150 rpm
- 3) Manter o pH em  $6,7 \pm 0,1$  através da adição de solução alcalina de sacarose (sacarose com NaOH à concentração de 1 mol/L) através de uma bomba peristáltica comandada por um controlador automático de pH
- 4) Após 6 horas de fermentação, interromper alimentação para a queda do pH e da concentração residual de sacarose
- 5) Encerrar a fermentação quando o pH atingir o valor de 5,2 (o tempo máximo de fermentação é 8,5 horas)
- 6) Retirar uma amostra de 10 ml do meio de cultura, centrifugar e determinar a atividade enzimática do sobrenadante

Encerrada a fermentação, as células foram removidas através de centrifugação do caldo a 10000 rpm em centrífuga por 10 minutos a 4°C (centrífuga Jouan MR1812). Dessa forma, a enzima bruta (contida no sobrenadante) é separada das células.

Para síntese de dextrana, pode ser utilizada a enzima bruta ou a parcialmente purificada, entretanto os rendimentos obtidos com enzima parcialmente purificada são bastante superiores aos obtidos com a enzima bruta (Mibielli, 2001). A purificação parcial da enzima foi realizada, segundo procedimento descrito a seguir:

### ***Purificação parcial da enzima***

A purificação parcial da enzima é realizada através da precipitação da enzima através da adição de polietileno glicol (PEG). Esta técnica é denominada purificação parcial pois juntamente com a enzima há precipitação de dextrana pois segundo Lopretti *et al.* (1999), ocorre uma partição entre a dextrana produzida, sendo parte precipitada junto com a enzima e a parte remanescente no caldo bruto da fermentação.

- 1) Adicionar lentamente ao concentrado uma solução de polietileno glicol (PEG) a 50 % de mesmo volume
- 2) Centrifugar a mistura a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C
- 3) Resuspender o precipitado (fase rica em dextrana-sacarase) em tampão acetato de sódio 20mM com pH ajustado para 5,2, contendo 0,05 g/L de CaCl<sub>2</sub>

A enzima obtida foi estocada congelada em ultrafreezer à -80° C.

### **4.5 - Conclusões e comentários**

O fosfato é um componente essencial para as atividades metabólicas e crescimento celular. O aumento da concentração deste componente na fermentação do *L.mesenteroides* B512F (nativo) foi capaz de manter o pH em valores em torno do valor de máxima estabilidade da enzima, bem como foi capaz de estimular o crescimento celular, o que acarretou uma maior produtividade enzimática. Sendo assim, para a obtenção do inóculo de pré-fermentação, foi utilizado um meio contendo 0,3 M de fosfato dibásico.



Já para a fermentação da espécie nativa, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no trabalho de Mibielli (2001), não sendo alterada a concentração de fosfato do caldo, pois durante a fermentação o controle do pH é realizado mediante a alimentação de solução alcalina contendo sacarose com aeração. A atividade enzimática do caldo bruto da fermentação (enzima bruta), foi de 90 UDS/ ml, já a atividade da enzima parcialmente purificada foi de 350 UDS/ ml.

O estudo da influência da concentração de fosfato no crescimento celular e produção da enzima a partir da espécie nativa aponta a possibilidade da obtenção da enzima através da fermentação em *shaker*, com rendimentos superiores à obtida com o meio padrão (em *shaker*) sem perda da atividade no final da fermentação. Esta alternativa é de grande valia para laboratórios que não possuem fermentador.

Vale ressaltar que a denominação enzima parcialmente purificada, obtida da espécie nativa, visa indicar que a purificação da enzima não foi completa, tendo sido apenas realizada uma precipitação do polímero com PEG 1500, não seguido de tratamento algum. Neste procedimento há a precipitação simultânea de dextrana, produzida durante a fermentação e PEG. A remoção destes contaminantes envolve o uso de dextranases e cromatografia de permeação em gel, que são procedimentos caros e demorados.

O estudo do efeito da concentração de fosfato no crescimento celular e produção da enzima a partir o *L.mesenteroides* B512F foi aceito para publicação no periódico *Bioprocess and Biosystems Engineering*:

- **S. Rodrigues, L.M.F. Lona and Telma T.Franco.** Phosphate effect on production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B512F. *Bioprocess and Biosystem Engineering* (no prelo).

## Capítulo 5

# Modelagem e simulação da síntese enzimática de dextrana

### 5.1 - Modelo cinético e mecanismo da reação

O principal produto reacional da enzima dextrana-sacarase com o substrato sacarose é a dextrana. Entretanto, uma série de outras reações secundárias podem ser potencializadas quando além da sacarose, o meio contém outro carboidrato. Estas reações são denominadas reação do aceptor e consistem basicamente na transferência da unidade glicosídica para a extremidade do aceptor ao invés da cadeia de dextrana. Os aceptores assim formados podem agir também como um aceptor, formando uma série homóloga conforme esquema a seguir:

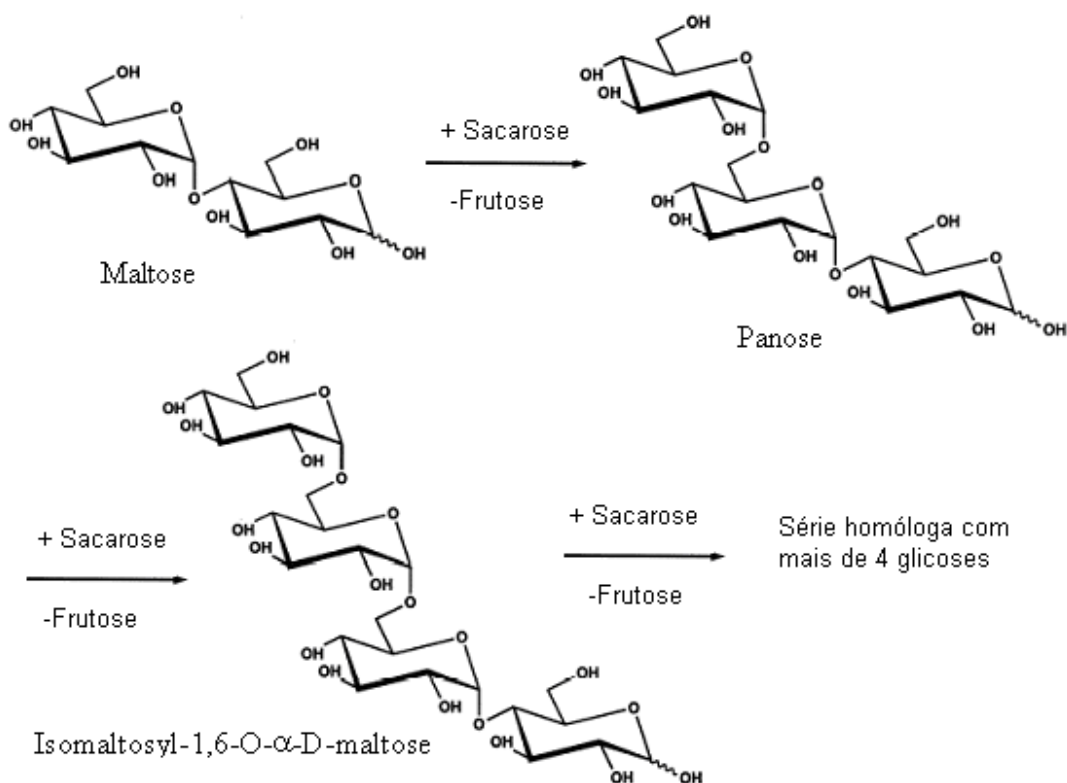
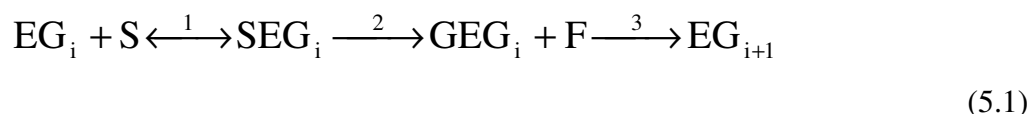


Figura 5.1 – Síntese dos produtos do aceptor a partir da maltose.

Existem vários tipos de carboidratos que podem agir como acceptor tais como: frutose, glicose, rafinose e maltose, sendo este último o mais forte deles. O uso de aceptores tem sido estudado como uma alternativa para controlar a massa molar da dextrana. Além disso, esta reação secundária é de interesse técnico para a obtenção de oligossacarídeos de interesse comercial e de difícil síntese química tais como panose (Heincke *et al.*, 1999). Estes oligossacarídeos podem ser empregados como adoçantes na indústria alimentícia.

A enzima dextrana sacarase apresenta atividade ótima em pH na faixa de 5,0 a 5,5 e à temperatura de 30°C, entretanto a estabilidade da enzima é maior a temperaturas menores. A redução da temperatura também favorece a reação dos aceptores em detrimento da formação da dextrana. A utilização de modelos permite otimizar a configuração do reator para a obtenção da produtividade e atividade enzimática maximizadas.

Heincke *et al.* (1999) desenvolveram um modelo cinético com base no mecanismo de inserção proposto por Robyt *et al.* (1974) o qual é constituído de 47 etapas e 86 parâmetros. O estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver um modelo matemático para modelagem e simulação de um reator batelada para produção de panose, a partir da sacarose, utilizando a enzima dextrana-sacarase como catalisador e tendo maltose como acceptor. A modelagem matemática do balanço de massa para o reator batelada é constituída de um sistema de quatro equações cujas variáveis são as concentrações de reagentes e produtos. Os parâmetros cinéticos do modelo, treze ao todo, foram obtidos através do ajuste às taxas iniciais de reação pelo método dos mínimos quadrados, tendo sido para isto realizados ensaios para três meios reacionais distintos, sendo que o primeiro deles continha somente sacarose e enzima, o segundo frutose como acceptor e o terceiro maltose, que é um excelente acceptor para a reação e forma panose, que é um trissacarídeo de interesse técnico. Os ensaios foram realizados a 25 °C e pH 5,4. O modelo foi validado e apresentou boa concordância com os dados experimentais, o que indica que a utilização do mecanismo cinético proposto por Heincke *et al.* (1999) para a modelagem e simulação de reatores para síntese enzimática de dextrana é adequado. A reação global para a síntese de dextrana a partir da sacarose tendo a dextrana-sacarase como promotora da síntese é apresentada a seguir:



Onde:

E = enzima	G = glicose	S = sacarose	F = frutose
------------	-------------	--------------	-------------

De acordo com o mecanismo de inserção proposto por Robyt *et al.* (1974) e do mecanismo de inserção proposto por Robyt e Walseth (1978), o crescimento da cadeia ocorre na extremidade redutora, sendo que a unidade de glicosil é adicionada entre a enzima e a cadeia crescente de polímero. Conforme apresentado na Equação 5.1, apenas a etapa 1 é reversível, sendo que após a sacarose ter se ligado ao sítio ativo da enzima a reação segue o curso desejado no sentido de produzir dextrana através do crescimento da cadeia. Entretanto, a cadeia pára de crescer em um determinado momento, de forma que no final da síntese seja obtido um produto final com uma determinada distribuição de cadeias de comprimento diferente e conseqüentemente massa molar diferente. A presença de aceptores, tais como maltose, pode ainda desviar o curso da reação fazendo com que o produto final apresente produtos secundários tais como leucrose e panose e até mesmo glicose além da frutose, subproduto natural da síntese. Estes fenômenos são esquematizados na Figura 5.1, a seguir:

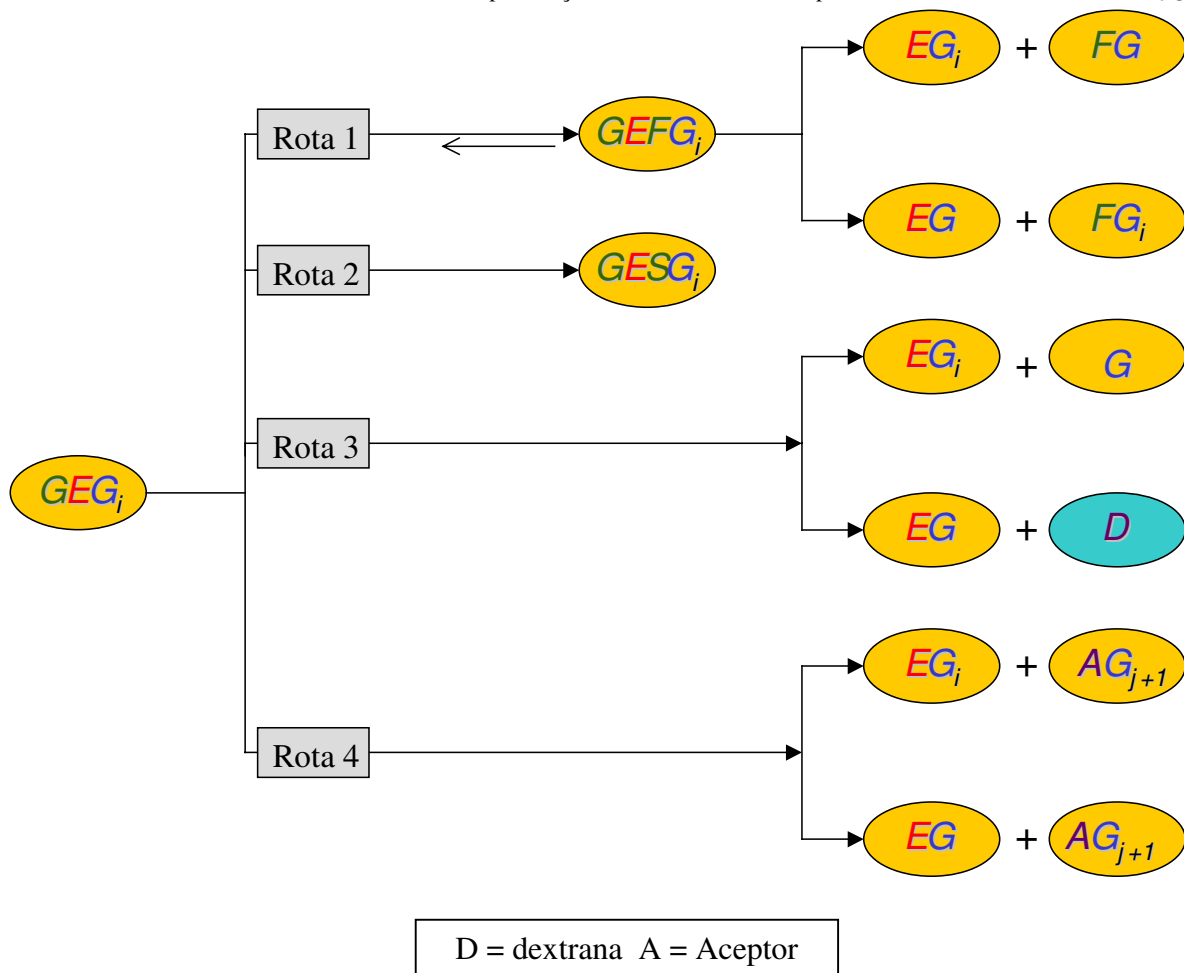


Figura 5.1 – Fluxograma elucidativo do mecanismo da rota bioquímica da dextransacarase na presença de sacarose e aceptores ( $i > 2$ ;  $0 \leq j \leq 2$ ). Adaptação de Heincke *et al.* (1999).

A Figura 5.1 apresenta as possíveis rotas que podem ser seguidas após a formação do complexo enzima-glicose e início do crescimento da cadeia de dextrana através do mecanismo de inserção. De acordo com a *Rota 1*, o crescimento da cadeia é interrompido pela ação da frutose como acceptor. Ainda de acordo com essa rota, pode haver a liberação da cadeia e a formação de um novo complexo enzima-glicose, que dá início ao crescimento de uma nova cadeia de dextrana. A *Rota 2* indica a terminação da cadeia pela ação da sacarose como acceptor. Já a *Rota 3* apresenta o curso normal da formação de dextrana. A *Rota 4* apresenta a reação do acceptor (maltose).

De acordo com o trabalho de Heincke *et al.* (1999), a maltose tem um efeito acelerativo e inibitivo da reação. A aceleração da reação na presença de aceptores se deve ao fato de a reação com o acceptor ser mais rápida que a de crescimento da dextrana pelo mecanismo de inserção. Já a inibição a altas concentrações de maltose se deve à inibição competitiva entre a maltose e a sacarose. Isso significa que tanto a formação de dextrana como as outras reações secundárias podem ser suprimidas em altas concentrações de maltose. A influência da concentração de sacarose na ausência de qualquer acceptor já havia sido estudada por diversos autores. A reação segue a equação de Michaelis-Menten até concentrações de 200 a 250 mmol/L, sendo que em concentrações mais altas ocorre inibição pelo substrato. Para os experimentos onde a concentração de maltose foi mantida constante e a de sacarose foi variada, os autores observaram o comportamento característico da equação de Michaelis-Menten, não sendo observada inibição para concentrações superiores a 200 mmol/L de sacarose. Sendo assim, inibição pelo substrato é suprimida pela presença do acceptor.

Os fenômenos de inibição pelo substrato e eliminação dessa inibição na presença de aceptores pode ser explicada pelo modelo mecanístico. O modelo propõe a existência de um sítio de ligação separado para o acceptor entre os dois sítios ativos da dextrana-sacarase (Robyt, 1995). A ocupação desse sítio por uma molécula de acceptor ou de sacarose impede a formação de dextrana pelo mecanismo de inserção, devido ao impedimento estérico gerado pela ocupação do sítio do acceptor. Conseqüentemente a ligação da sacarose ao sítio do acceptor provoca a inibição pelo substrato, visto que a sacarose não pode agir como acceptor. Quando além de sacarose há um acceptor no meio reacional, há a competição entre acceptor e substrato pela ocupação do sítio ativo intermediário. A porcentagem de sítios do acceptor bloqueada pelo substrato (sacarose) vai diminuir à medida que a concentração do acceptor aumenta. Dessa forma, a taxa máxima de reação global ocorre a altas concentrações iniciais de sacarose com o aumento da concentração inicial de acceptor. Todas as reações possíveis indicadas pelas rotas esquematizadas na Figura 5.1, inclusive a de formação de dextrana, se tornam importantes com o aumento da razão entre a concentração de substrato e de acceptor (sacarose/maltose).

As equações constituintes do modelo proposto por Heincke *et al.* (1999) para reator batelada e também utilizadas para a estimativa dos parâmetros cinéticos são apresentadas a seguir:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{E \cdot S(p_{24} + p_{70} \cdot F + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.2)$$

$$\frac{dF}{dt} = +\frac{E \cdot S(p_{24} + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.3)$$

$$\frac{dM}{dt} = -\frac{p_{71} E \cdot S \cdot M}{N} \quad (5.4)$$

$$\frac{dP}{dt} = +\frac{E \cdot S(p_{71} \cdot M - p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.5)$$

Onde

$$N = 1 + p_{42}S + p_{43}M + p_{46}F + p_{47}SF + p_{53}SM + p_{54}M^2 + p_{55}MP + p_{59}SP + p_{68}S^2 \quad (5.6)$$

A estimativa dos parâmetros cinéticos da reação foi realizada por Heincke *et al.* (1999) com base na medida das concentrações de sacarose, panose, frutose e maltose. As seguintes hipóteses foram consideradas:

- a reação dos subprodutos da reação dos aceptores (séries homólogas) foram desconsideradas, pois a concentração dos mesmos se mostrou muito baixa

- a formação de leucrose e a inibição pela panose foram desprezadas, pois não têm efeito significativo nas condições de síntese

Os parâmetros  $p_{24}, p_{42}, p_{46}, p_{47}, p_{68}, p_{70}$ , os quais descrevem o consumo de substrato e reação de frutose como acceptor foram obtidos de trabalhos anteriores. Já dos sete parâmetros remanescentes ( $p_{43}, p_{53}, p_{54}, p_{55}, p_{59}$  e  $p_{71}$ ), somente seis foram obtidos diretamente dos dados cinéticos da reação, tendo maltose como acceptor através do método simplex (Heincke *et al.*, 1999). O parâmetro 43 é dependente de outros parâmetros, como pode ser visto pela definição a seguir:

$$p_{43} = \frac{p_{24}p_{54}}{p_{71}} + \frac{p_{74}}{p_{24}} \quad (5.7)$$

Com a otimização do erro médio entre os valores experimentais e simulados, os seguintes valores foram reportados no trabalho de Heincke *et al.* (1999):

$$p_{53} = 6,66 \cdot 10^{-4} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{24} = 3,50 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})$$

$$p_{54} = 2,84 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{70} = 4,76 \cdot 10^{-8} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{55} = 2,28 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{42} = 1,45 \cdot 10^{-2} (\text{L} / \text{mmol})$$

$$p_{59} = 1,06 \cdot 10^{-4} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{46} = 2,56 \cdot 10^{-3} (\text{L} / \text{mmol})$$

$$p_{71} = 1,06 \cdot 10^{-6} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{47} = 5,81 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{72} = 3,52 \cdot 10^{-6} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{68} = 3,16 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

A unidade de tempo, embora não apresentada nos parâmetros estimados, é o minuto (comunicação pessoal do autor). O erro médio para o cálculo da concentração de



substrato, do acceptor e dos produtos é 4,5 mmol/L. Este erro pode ser atribuído à dispersão dos dados experimentais, não sendo portanto um erro sistemático do modelo. Dessa forma, o modelo juntamente com os parâmetros calculados possibilita a predição do curso da reação.

Utilizando o modelo para o cálculo das taxas iniciais, é possível reconhecer a inibição causada pela maltose na taxa global da reação bem como a inibição pelo substrato encontrada para baixas concentrações de maltose, tal qual encontrado experimentalmente. A concordância do modelo com os dados experimentais evidencia ainda a supressão da inibição pelo substrato a altas concentrações de substrato.

## **5.2 - Discussão dos parâmetros selecionados para cálculo**

De acordo com a definição dos parâmetros e a Equação 5.4, pode-se demonstrar que o parâmetro  $p71$  é um novo critério universal para a força do acceptor (Heincke *et al.*, 1999), visto se tratar do parâmetro que descreve a taxa de reação da maltose como acceptor. Para a panose, de acordo com a Equação 5.5, o parâmetro correspondente é  $p72$ . Comparando os valores destes dois parâmetros, pode-se dizer que a panose é um acceptor mais forte que a maltose, com uma eficiência relativa de 194 %. Dessa forma, vale ressaltar que a síntese de panose deve ser evitada para obtenção de altos rendimentos de dextrana.

## **5.3 - Seletividade da formação de panose**

A seletividade do acceptor está relacionada com a supressão das reações secundárias (formação de dextrana por exemplo) além de se obter uma alta taxa da reação do acceptor. A seletividade do acceptor (definida por Heincke *et al.*, 1999), pode ser expressa como a razão entre a taxa de reação do acceptor e a taxa global de reação:

$$Sel_0 = \frac{\left(\frac{dM}{dt}\right)_{t=0}}{\left(\frac{dS}{dt}\right)_{t=0}} \quad (5.8)$$

Onde:

$$\left(\frac{dM}{dt}\right)_{t=0} \Rightarrow \text{taxa inicial do consumo de acceptor (taxa inicial de formação de panose)}$$

$$\left(\frac{dS}{dt}\right)_{t=0} \Rightarrow \text{taxa inicial do consumo de substrato (taxa de formação de frutose)}$$

Substituindo a equação diferencial da taxa inicial global e da reação do acceptor, a seletividade é dada por:

$$Sel_0 = \frac{p_{71}M}{p_{24} + p_{71}M} \quad (5.9)$$

De acordo com o modelo da reação, a seletividade da formação de panose deve ser função apenas da concentração inicial de maltose ( $M \gg p_{24}/p_{71}$ ). O cálculo da seletividade através da Equação 5.9 apresentou boa concordância com os resultados experimentais, considerando o erro experimental na determinação das taxas iniciais e a propagação do erro. A seletividade atinge um valor ótimo a altas concentrações de maltose, e não apresentou dependência com a concentração de sacarose. Para aplicações práticas na obtenção de panose, a concentração de maltose deve ser mantida acima de 400 mmol/L (Heincke *et al.*, 1999)

Sendo assim, quando o produto desejado é a dextrana, e não a panose, conclui-se que a concentração de maltose (quando utilizada como acceptor) deve ser inferior a 400 mmol/L.

#### 5.4 - Modelagem matemática de reatores contínuos para síntese enzimática de dextrana.

Além do modelo batelada, para síntese enzimática de dextrana foram também considerados dois reatores contínuos, sendo que para todos os modelos a concentração de enzima é considerada constante, o que pode ser obtido através da reposição com o auxílio de uma corrente de alimentação enzimática adjacente à alimentação de substratos. Os reatores contínuos considerados são CSTR e PFR. A Figura 5.2, a seguir, apresenta um esquema dos reatores:

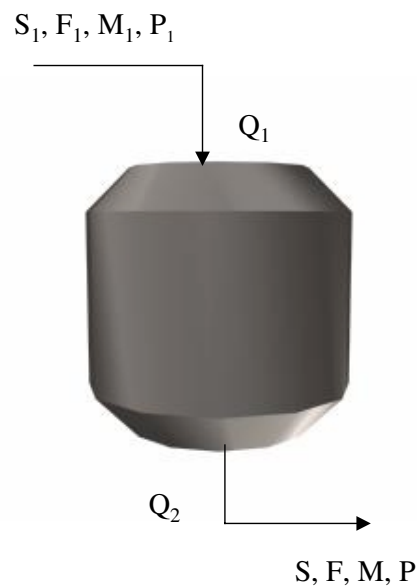


Figura 5.2 – Esquema de um reator contínuo para síntese enzimática de dextrana.

Para modelagem do reator CSTR foi considerado o modelo cinético proposto por Heincke *et al.* (1999) e as seguintes hipóteses:

- reator perfeitamente agitado  $\Rightarrow$  a concentração de cada espécie na corrente de saída é igual à concentração no reator (CSTR)
- alimentação contínua de enzima e substrato (sacarose)
- remoção contínua do produto

- sistema isotérmico (25°C)
- concentração de enzima constante no interior do reator (250 UI/L)

O modelo dinâmico proposto para o reator CSTR consiste na incorporação das vazões de alimentação ao modelo batelada proposto por Heincke *et al.* (1999), além de uma equação que descreve a variação de volume do reator. O sistema de equações\* utilizado para as simulações é apresentado a seguir:

$$\frac{dV}{dt} = Q_1 - Q_2 \quad (5.10)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q_1 S_1 - Q_2 S}{V} - \frac{E \cdot S(p_{24} + p_{70} \cdot F + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.11)$$

$$\frac{dF}{dt} = \frac{Q_1 F_1 - Q_2 F}{V} + \frac{E \cdot S(p_{24} + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.12)$$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{Q_1 M_1 - Q_2 M}{V} - \frac{p_{71} E \cdot S \cdot M}{N} \quad (5.13)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Q_1 P_1 - Q_2 P}{V} + \frac{E \cdot S(p_{71} \cdot M - p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.14)$$

\* as unidades do modelo são: concentração de sacarídeos (mmol/L), concentração de enzima (UI/L), vazão (L/min), tempo (min)

Já para o modelo PFR, foi considerado o modelo de parâmetro distribuído dado pela Equação 5.15, a seguir:

$$D \frac{\partial^2 C}{\partial Z^2} - U \frac{\partial C}{\partial Z} = \frac{\partial C}{\partial t} \quad (5.15)$$

Considerando regime estacionário e a taxa de reação, o balanço de massa fica:

$$D \frac{d^2 C}{dZ^2} - U \frac{dC}{dZ} + r_A = 0 \quad (5.16)$$

Para reator ideal (PFR) a dispersão axial é nula. Aplicando a equação genérica, Equação (5.16), para cada componente do sistema, o modelo do reator PFR é dado pelas Equações de 5.17 a 5.21:

$$\frac{dS}{dZ} = - \frac{1}{U} \frac{E \cdot S(p_{24} + p_{70} \cdot F + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.17)$$

$$\frac{dF}{dZ} = \frac{1}{U} \frac{E \cdot S(p_{24} + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.18)$$

$$\frac{dM}{dZ} = - \frac{1}{U} \frac{p_{71} E \cdot S \cdot M}{N} \quad (5.19)$$

$$\frac{dP}{dZ} = \frac{1}{U} \frac{E \cdot S(p_{71} \cdot M - p_{72} \cdot P)}{N} \quad (5.21)$$

## 5.5 - Simulação dos modelos

Para a resolução dos modelos foi utilizado o método de Runge-Kutta de quarta ordem. As simulações foram realizadas variando-se a concentração inicial de maltose e sacarose no reator batelada, a concentração destes substratos na corrente de alimentação do

reator CSTR e na entrada do PFR. Para a variação das concentrações em estudo, foi realizado um planejamento fatorial em estrela (Barros Neto *et al.*, 1995), sendo utilizados dois níveis e duas variáveis (concentração inicial de sacarose e maltose). Este planejamento foi utilizado para a simulação dos três reatores. O tempo de batelada necessário para o consumo de toda a sacarose foi considerado como tempo de residência utilizado no cálculo da vazão de alimentação do reator CSTR ( $V = 1000 \text{ L}$ ). Para o reator PFR, foi considerado o mesmo tempo de residência e volume do CSTR, sendo considerado um reator de 40 cm de diâmetro e 8 metros de comprimento. As concentrações iniciais de frutose e panose, bem como as respectivas concentrações desses sacarídeos na corrente de alimentação e na entrada do reator CSTR foram consideradas nulas. A concentração de enzima no sistema foi considerada constante e igual a 250 UI/L para todos os reatores estudados. Para o reator CSTR, foi considerado volume constante de  $1\text{m}^3$  (1000L) de volume útil, sendo considerado este mesmo volume para o reator batelada. As respostas às simulações foram analisadas através de superfícies de resposta em função das concentrações de sacarose e maltose do Quadro 5.1:

Quadro 5.1 – Nível das variáveis estudadas

	Sacarose (mmol/L)	Maltose (mmol/L)
Nível - $\alpha$	150,0	0,0
Nível -1	201,0	59,0
Nível 0	325,0	200,0
Nível +1	449,0	341,0
Nível + $\alpha$	500,0	400,0

Os dados do Quadro 5.1 foram obtidos através da técnica de planejamento fatorial, sendo considerado o planejamento em estrela para duas variáveis (concentração de sacarose e maltose). Observa-se que a concentração de maltose não ultrapassa os 400, considerando-se as concentrações após o sistema atingir o estado estacionário, caso do reator CSTR e após consumo total da sacarose, para reator batelada. Para o cálculo da vazão de

alimentação, foi considerado o tempo de residência necessário para o consumo total de sacarose em reator batelada de mesmo volume.

A concentração inicial de sacarose e maltose foi considerada igual à da corrente de alimentação. A Tabela 5.1 apresenta as concentrações iniciais e da corrente de alimentação, bem como o tempo de residência e vazão utilizados nas simulações.

Tabela 5.1 – Dados utilizados para a simulação de acordo com o planejamento experimental completo apresentado no Quadro 5.1.

Simulação	$S_1$ (mmol/L)	$M_1$ (mmol/L)	$\tau$ (min)	Q (L/min)
1	201	59	295	3,39
2	449	59	577	1,73
3	201	341	533	1,88
4	449	341	600	1,67
5	150	200	374	2,67
6	500	200	574	1,74
7	325	0	423	2,36
8	325	400	600	1,67
9	325	200	545	1,83

Os resultados são expressos em termos de rendimento e produtividade, cujas equações para o cálculo são apresentadas no Apêndice 2. Os perfis de concentração em função do tempo, obtidos com a simulação são apresentados no Apêndice 3.

## 5.6 - Resultados para o modelo batelada

O modelo para o reator batelada é constituído das Equações de 5.2 a 5.5, sendo considerado sistema isotérmico, sem alimentação e volume constante. Os resultados das simulações para o reator batelada são apresentados em termos de rendimento de dextrana (RD) e panose (RP), sendo considerado como tempo da batelada o tempo necessário para o consumo total da sacarose inicial no reator. Não faz sentido calcular a produtividade do reator batelada pois se o consumo de sacarose é total, a produtividade será a máxima possível, já que não há corrente de alimentação alguma no modelo, entretanto vale ressaltar que este parâmetro é facilmente obtido através da divisão da concentração do componente de interesse pelo tempo da batelada. O Apêndice 3 traz os perfis de concentração de produtos e substratos obtidos e as superfícies de resposta para o reator batelada são apresentadas a seguir:

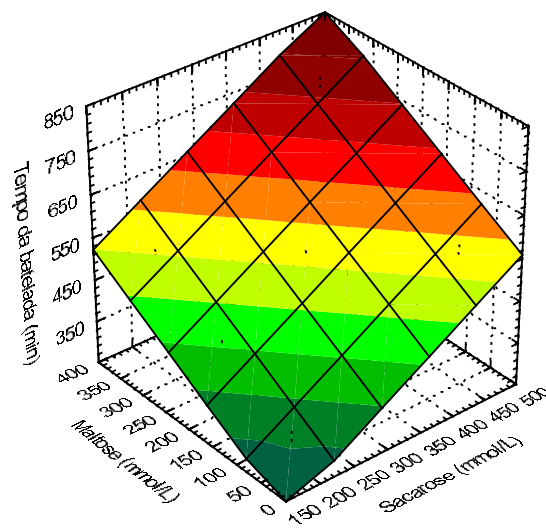


Figura 5.3 – Tempo da batelada.



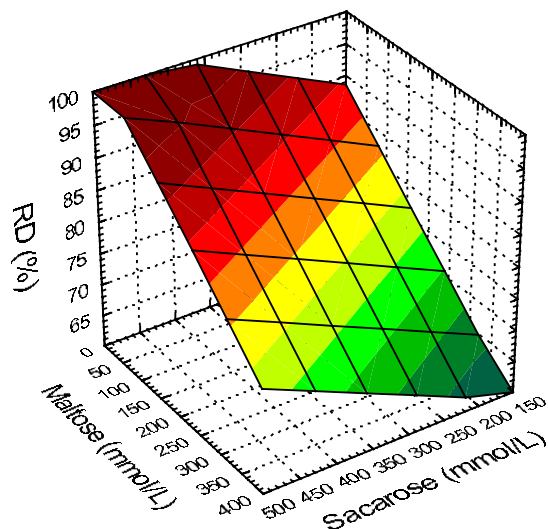


Figura 5.4 - Rendimento em termos de porcentagem de dextrana produzida (reator batelada).

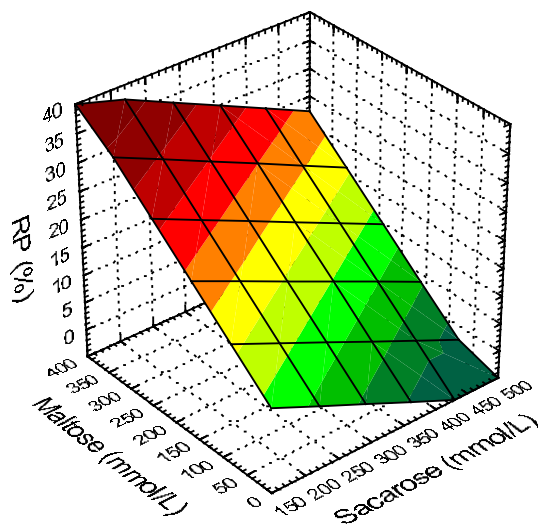


Figura 5.5 – Rendimento em termos da porcentagem de panose produzida (reator batelada).

De acordo com a Figura 5.3, quanto maior a concentração de sacarose e maltose maior será o tempo para o consumo total de sacarose. De acordo com as Figuras 5.4 e 5.3, o aumento da concentração maltose diminui o rendimento em dextrana e eleva o rendimento em panose. Observa-se ainda que, para a faixa estudada, o rendimento em panose é muito

inferior que o em dextrana, como pode ser observado comparando-se os valores numéricos apresentados nos gráficos das Figuras 5.4 e 5.5.

### 5.7 – Resultados para o modelo CSTR

Para o reator CSTR foi considerado um reator de volume constante e igual a  $1 \text{ m}^3$ . A vazão foi calculada tomando-se como tempo de residência médio do reator o tempo obtido para o reator batelada (Figura 5.3). Para o reator CSTR foram analisadas as respostas: consumo de sacarose (RS), rendimentos em termos da porcentagem de dextrana (RD) e panose (RP) produzidas. Também foi calculada a produtividade em dextrana (PD) e panose (PP). A produtividade foi calculada em g/L.h não somente por se tratar de uma grandeza mais palpável que a concentração molar, mas principalmente porque não se conhece a massa molar média da dextrana obtida. Entretanto, é possível calcular a concentração de dextrana em g/L através do balanço de massa no sistema. As respostas obtidas com a simulação do reator CSTR, após atingir o regime estacionário, são apresentadas nas Figuras de 5.6 a 5.10, a seguir:

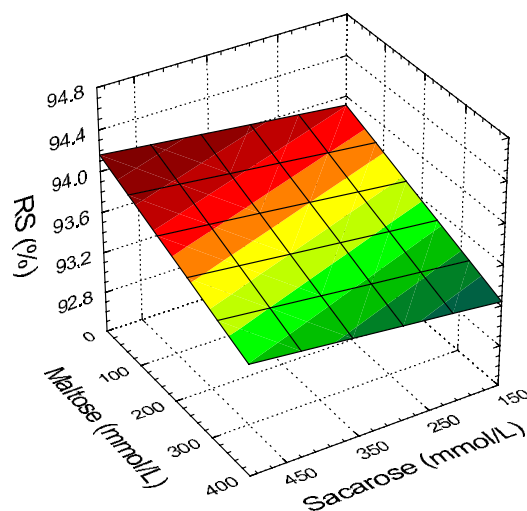


Figura 5.6 – Consumo de sacarose (CSTR).

De acordo com o gráfico da Figura 5.6, altas concentrações de maltose diminuem o consumo da sacarose. Observa-se também que a sacarose alimentada não é completamente consumida no reator CSTR. Esse fato se deve à perda contínua na corrente de saída do reator.

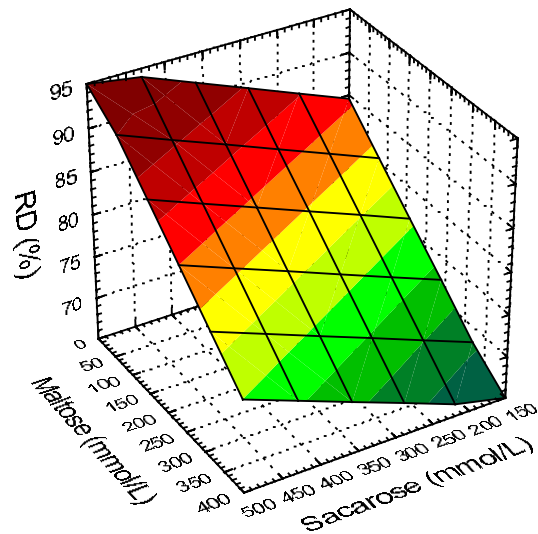


Figura 5.7 – Rendimento em termos de dextrana produzida (CSTR).

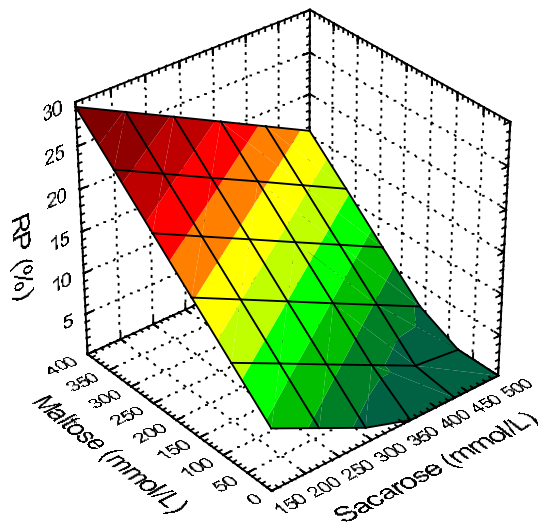


Figura 5.8 - Rendimento em termos de panose produzida (CSTR).

As Figuras 5.7 e 5.8 evidenciam um comportamento semelhante entre o reator CSTR e batelada no tocante ao rendimento de dextrana e panose. O aumento da concentração de maltose na corrente de alimentação diminui o rendimento em dextrana e favorece o rendimento em panose. Observam-se menores rendimentos, tanto para a panose como para a dextrana, para o reator CSTR em relação ao batelada, o que pode ser atribuído ao menor consumo de sacarose devido à perda contínua do substrato não consumido.

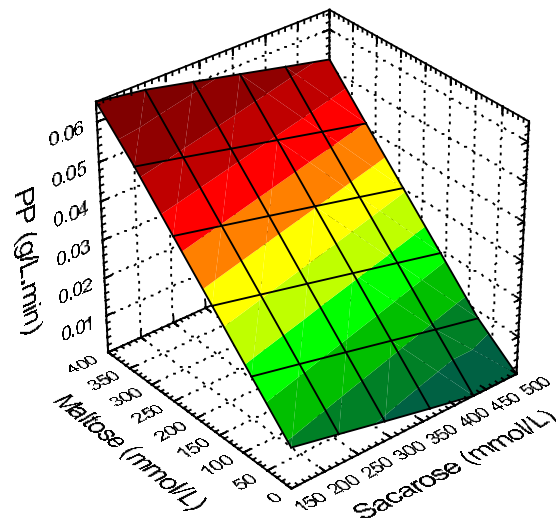


Figura 5.9 – Produtividade em termos de panose produzida (CSTR).

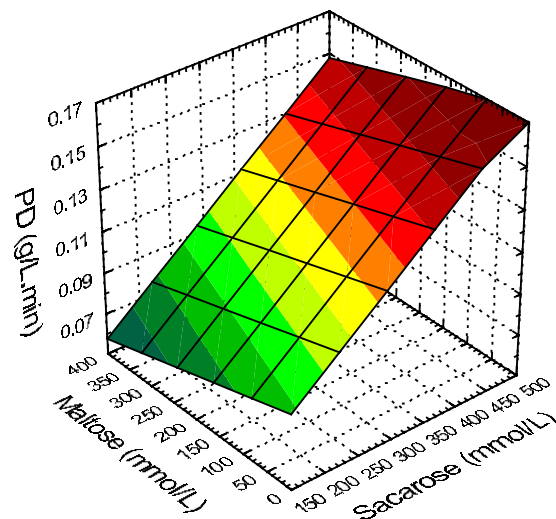


Figura 5.10 - Produtividade em termos de dextrana produzida (CSTR).

Observa-se nos gráficos das Figuras 5.9 e 5.10 que o aumento da concentração de maltose favorece a produtividade de panose e desfavorece a produtividade de dextrana.

### 5.8 - Resultados para o modelo PFR

Para o reator PFR foi considerado regime estacionário. O tempo de residência foi considerado idêntico ao reator CSTR e as mesmas respostas foram analisadas (consumo de sacarose, rendimentos e produtividades). As superfícies de respostas obtidas são apresentadas nas Figuras de 5.11 a 5.15, a seguir:

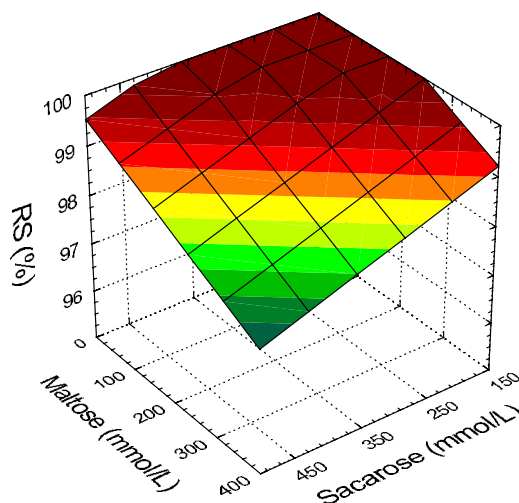


Figura 5.11 – Consumo de sacarose para o reator PFR.

Observa-se através da Figura 5.11 que a concentração de maltose influencia o consumo de sacarose no reator PFR da mesma forma que nos reatores batelada e CSTR, pois o consumo só é afetado para altas concentrações de sacarose e maltose

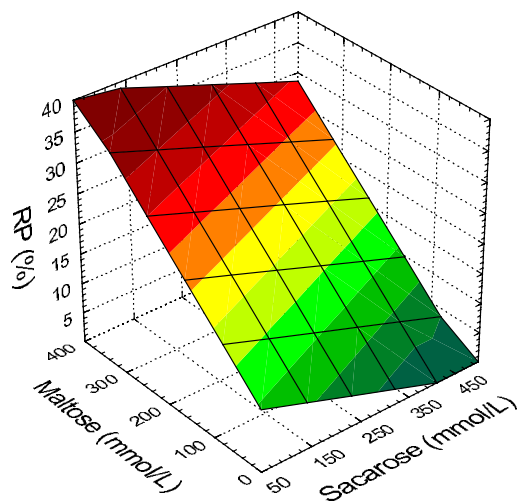


Figura 5.12 - Rendimento em termos de porcentagem de panose produzida (PFR).

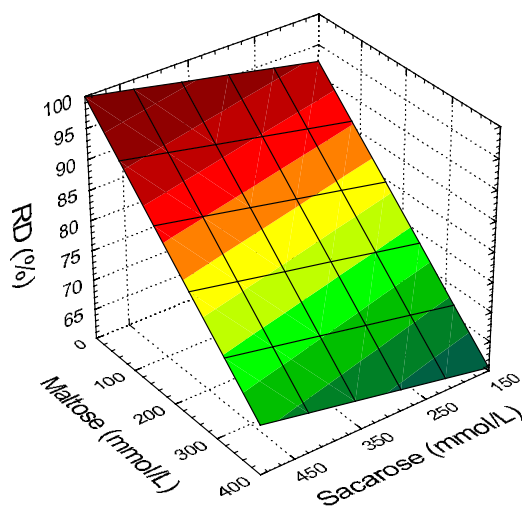


Figura 5.13 – Rendimento em termos de porcentagem de dextrana produzida (PFR).

Conforme os gráficos das Figuras 5.12 e 5.13, o reator PFR apresenta um comportamento igual ao batelada no tocante aos rendimentos em dextrana e panose, apresentando inclusive o mesmo patamar em relação a panose, como já era de se esperar.

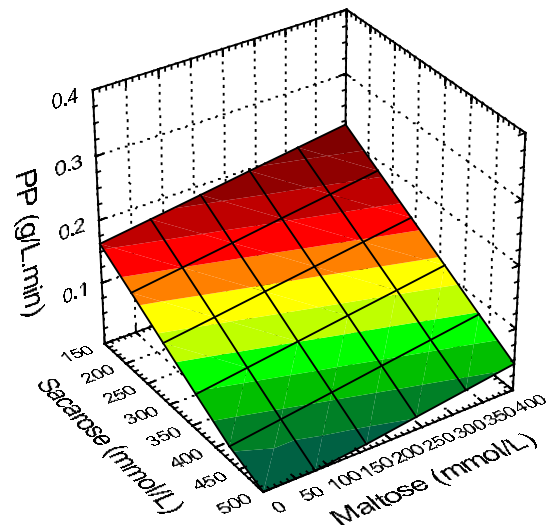


Figura 5.14- Produtividade em termos da porcentagem de panose produzida (PFR).

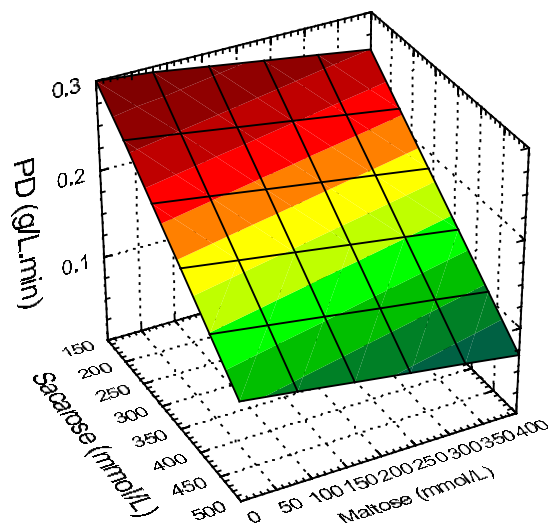


Figura 5.15 - Produtividade em termos da porcentagem de dextrana produzida (PFR).

De acordo com as Figuras 5.14 e 5.15, observa-se que altas concentrações de maltose e sacarose diminuem a produtividade em termos de dextrana no reator PFR, enquanto que a produtividade de panose é favorecida pelo aumento da concentração de maltose e diminuição da concentração de sacarose.

## 5.9 Análise dos efeitos das concentrações iniciais de maltose e sacarose nos rendimentos dos reatores estudados

Utilizando-se o software Statística 5.0, foi realizada uma análise dos principais efeitos das concentrações iniciais de maltose e sacarose no rendimento em dextrana e panose dos reatores estudados (Figuras 5.4 e 5.5 – reator batelada; Figuras 5.7 e 5.8 – reator CSTR; Figuras 5.12 e 5.13 – reator PFR). De acordo com os resultados obtidos, somente a variável concentração de maltose apresentou efeito significativo para um intervalo de confiança de 99 %, modelo linear, nas respostas em questão. Este efeito é apresentado na Figura 5.16:

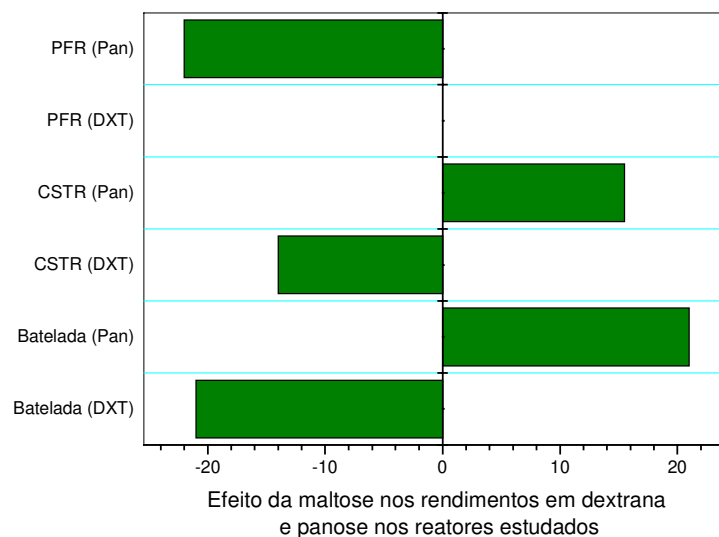


Figura 5.16 – Efeito da concentração de maltose no rendimento em dextrana e panose para os reatores estudados.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.16 o efeito da maltose é sempre negativo em relação ao rendimento em dextrana, não sendo significativo para o reator PFR e sendo mais significativo para o reator batelada, quando comparado com o CSTR. Já em relação ao rendimento em panose, a concentração de maltose apresentou efeitos positivos para os reatores CSTR e negativo para o reator PFR.



### 5.10 – Rendimentos de dextrana e panose com base no consumo de maltose

Além dos rendimentos de dextrana e panose com base no consumo de sacarose, foram também considerados para fins de análise os rendimentos obtidos com base no consumo de maltose, dado este componente participar da reação do acceptor. As Figuras de 5.17 a 5.20 apresentam os rendimentos de dextrana e panose para os reatores CSTR e PFR com base na incorporação de maltose nos respectivos produtos:

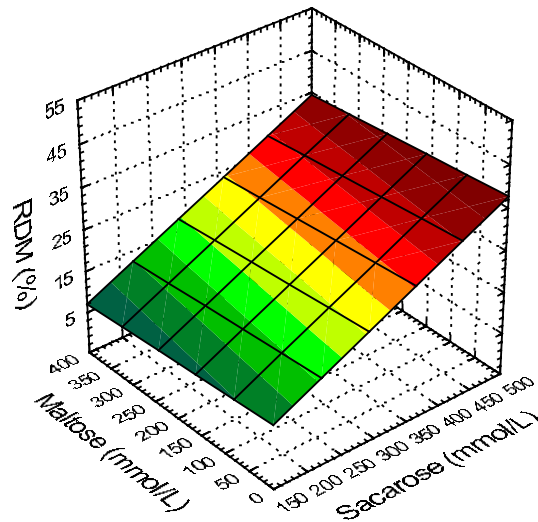


Figura 5.17– Rendimento em dextrana com base no consumo de maltose (CSTR).

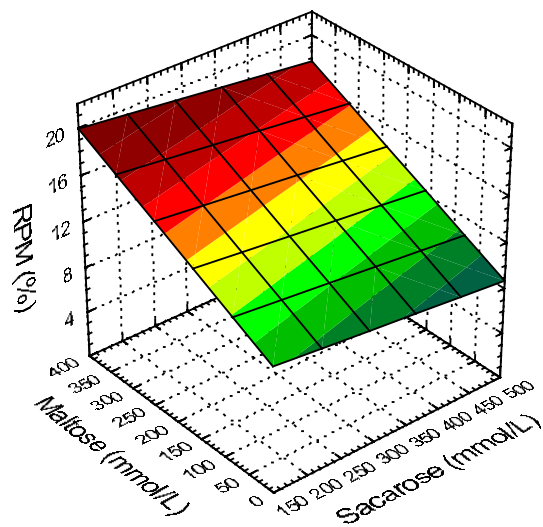


Figura 5.18 – Rendimento em panose com base no consumo de maltose (CSTR).

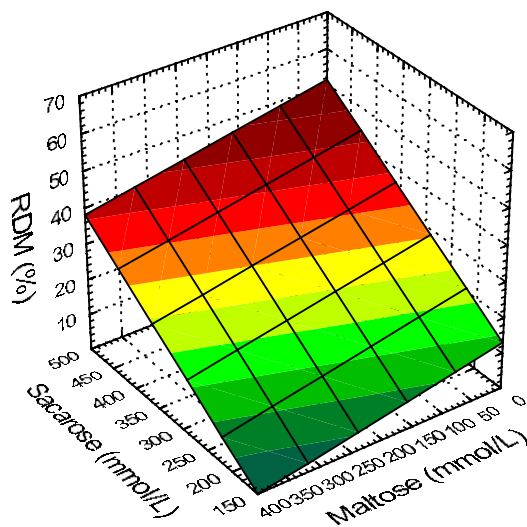


Figura 5.19– Rendimento em dextrana com base no consumo de maltose (PFR).

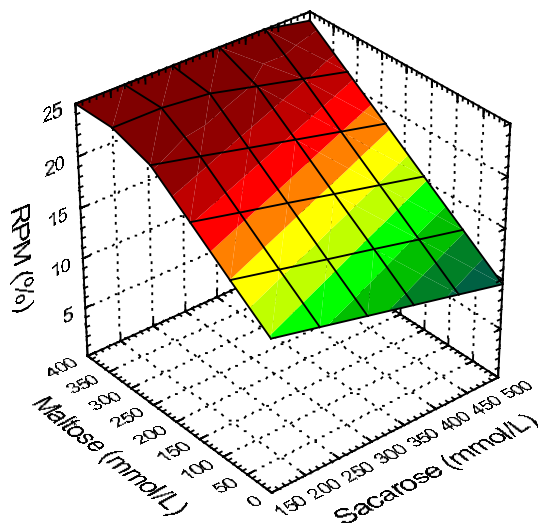


Figura 5.20 – Rendimento em panose com base no consumo de maltose (PFR).

Analisando-se os gráficos das Figuras de 5.17 a 5.20, nota-se que a incorporação da maltose na cadeia de dextrana é maior no reator PFR. Observa-se também para este reator, um maior rendimento em relação ao consumo de maltose tanto para a produção de panose como de dextrana. Dessa forma, pode-se dizer que há um forte indicativo de formação de dextrana de baixo peso molecular quando se utiliza o reator PFR, visto que a incorporação de maltose na cadeia de dextrana diminui o seu tamanho (reação do acceptor).

## 5.11 - Conclusões

Em termos de consumo de substrato, todos os reatores estudados podem ser considerados equivalentes. Dentre os reatores contínuos, o reator PFR foi o que apresentou maior produtividade em relação à dextrana. Já o reator CSTR, apesar de apresentar menor produtividade para a dextrana quando comparado com o reator PFR, apresenta baixa produtividade e baixos rendimentos para a panose, tornando sua utilização interessante do ponto de vista da obtenção de baixas quantidades de panose. O CSTR pode ser considerado o mais adequado quando se trata da obtenção de altos rendimentos com produtividade razoável e baixas concentrações de panose. Entretanto estas observações só são válidas

quando a massa molar do produto desejado não é levada em consideração. O controle da massa molar é de grande valia na produção de produtos poliméricos ou biopoliméricos, como é o caso da dextrana, uma vez que a aplicação destes produtos depende fortemente desta propriedade. De acordo com os resultados obtidos, pode-se dizer que existe uma tendência de uma maior incorporação da maltose como acceptor na cadeia de dextrana no reator PFR. Sendo assim, em tese, o reator CSTR seria preferível para síntese de dextrana de alta massa molar, enquanto o PFR seria preferível para síntese de dextrana de baixa massa molar. Entretanto estas hipóteses necessitam de um estudo mais detalhado em termos de distribuição de massa molar (Capítulo 9).

Vale ainda ressaltar que a utilização de reatores contínuos, tais como CSTR e PFR só é possível mediante a recuperação da enzima, visto a mesma constituir o fator econômico limitante. Uma alternativa à recuperação da enzima é sua adsorção em leitos, técnica bastante utilizada para recuperação e purificação de bioprodutos. Um sistema alternativo para a recuperação da enzima através da adsorção em leitos fluidizados, bem como a determinação dos parâmetros cinéticos da adsorção e dessorção são apresentados no Capítulo 6.

O trabalho desenvolvido neste Capítulo foi apresentado e publicado nos Anais no XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2002).

- **Rodrigues S., Lona L.M.F. and Franco T. Telma.** Influência do reator na síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2002), Natal – RN, 2002.



## Capítulo 6

### Adsorção da enzima obtida do *L. mesenteroides* B512F

---

#### 6.1 - Introdução

Uma alternativa à recuperação da enzima para alimentação contínua nos reatores estudados no Capítulo 5 seria a utilização de um sistema de dois leitos fluidizados operando alternadamente para adsorção e dessorção da enzima. O sistema ficaria então com a configuração a seguir:

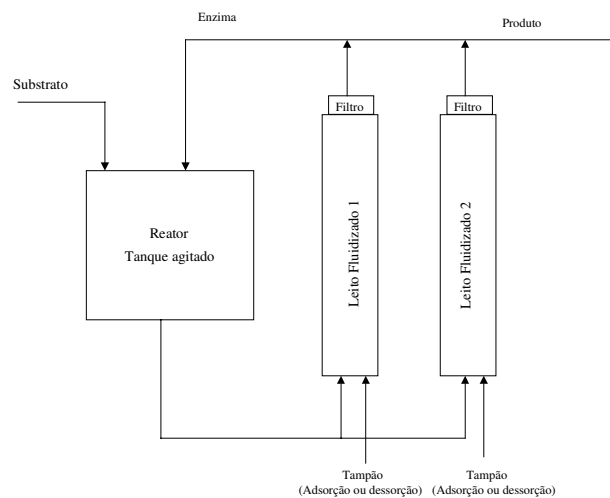


Figura 6.1 – Sistema contínuo para produção de dextrana com recuperação e reaproveitamento da enzima.

A modelagem e simulação do sistema apresentado na Figura 6.1 permite a determinação de sua viabilidade e condições ótimas de operação. Para que isto possa ser realizado, deve-se conhecer além dos parâmetros cinéticos da reação da síntese enzimática da dextrana, a cinética e a isoterma de adsorção da enzima na temperatura de síntese (25° C). Currelero *et al.* (1998) e Souza (1993) estudaram a adsorção da dextrana-sacarase em DEAE-Celulose (resina trocadora de ânions), para sua posterior utilização no processo

CARE Pungor *et al.*, 1987), o qual é constituído de dois tanques perfeitamente agitados onde a enzima é adsorvida em um dos tanques e dessorvida no outro. O sistema proposto na Figura 6.1 visa eliminar os problemas de transporte hidráulico da resina de um tanque a outro na utilização do processo CARE, substituindo os tanques agitados utilizados para a adsorção e dessorção da enzima por leitos fluidizados, eliminando com isso o transporte de sólidos. Entretanto, a resina DEAE-Celulose fibrosa utilizada por Souza (1993) e Currello *et al.* (1998) não é adequada à operação em leitos expandidos. Dessa forma, fez-se necessário a determinação da isoterma de adsorção da enzima em uma resina adequada à operação em leitos expandidos. A resina escolhida foi a DEAE-Streamline e sua escolha foi baseada no fato de esta resina possuir o mesmo grupo trocador que a DEAE-Celulose, já estudada em trabalhos anteriores, ser adequada à operação em leitos expandidos e ter suas propriedades hidrodinâmicas determinadas por Santos (2001).

## 6.2 – Determinação da isoterma de adsorção da enzima em DEAE-Streamline

Primeiramente foram determinadas duas isotermas de adsorção utilizando-se a enzima, da espécie nativa, congelada obtida conforme procedimento descrito no Capítulo 3. Para isso a atividade da enzima foi determinada sendo preparada uma solução mãe (100 UDS/ml) através da diluição da enzima concentrada em tampão acetato pH 5,2. Esta solução mãe foi utilizada para as demais diluições para a obtenção da isoterma. A atividade das diluições obtidas e utilizadas para a obtenção da isoterma é apresentada na Tabela 6.1, assim como os resultados de adsorção.

Tabela 6.1 – Atividade das soluções utilizadas para obtenção da primeira isoterma.

Ponto	Atividade Calculada (UDS/mL)	Atividade Inicial (UDS/mL)	Atividade Final (UDS/ mL)	Enzima adsorvida (UDS/mL resina)	% de enzima retida
1	100	126,9*	98,44	426,90	22,43
2	90	80,54	56,86	355,20	29,40
3	80	70,54	53,43	256,65	24,26
4	60	51,59	37,64	209,25	27,04
5	50	35,53	22,90	189,45	35,55
6	30	15,53	9,48	90,75	38,96
7	20	13,95	4,46	4,24	68,03

\* atividade da solução mãe

Observa-se pelos dados da Tabela 6.1 que a atividade medida nas soluções utilizadas para a obtenção da isoterma é bastante diferente da calculada (princípio da diluição), apesar de terem sido tomados os devidos cuidados de homogeneização da amostra e pipetagem.

Durante a realização dos experimentos, foi constatada uma dificuldade muito grande em se trabalhar com a enzima dextrana-sacarase. A enzima apresenta uma alta afinidade com a dextrana, que também é produzida durante a fermentação do *L. mesenteroides* B512F. A técnica de precipitação da enzima com PEG 1500 e re-suspensão em tampão, utilizada neste trabalho, é uma técnica de purificação parcial, pois além da enzima (dextrana-sacarase) são obtidas também proteínas contaminantes e dextrana, sendo que no caso da dextrana ocorre uma partição entre a dextrana que permanece no sobrenadante e a precipitada juntamente com a massa protéica (Lopretti *et al.*, 1999). Além do mais, o PEG não é facilmente removido da proteína, e por ser um polímero não é possível realizar uma diálise rápida do sobrenadante. A separação convencional em Sephadex-25 pode não ser boa, especialmente para PEG com massa molar superior a 20.000.000 de daltons. Entretanto, um pequeno resíduo de PEG junto à proteína não impede a realização de procedimentos padrão para purificação de proteínas tais como: cromatografia de afinidade, de troca iônica ou filtração em gel (Scopes, 1987)

A presença de dextrana na solução enzimática é benéfica quando se leva em consideração a estabilidade da enzima, visto que o polissacarídeo age como estabilizante. Entretanto, a solução obtida apresenta uma alta viscosidade e baixa homogeneidade fazendo com que a diluição não seja linear como ocorre com soluções homogêneas (soluções salinas por exemplo). Além do mais, a dextrana é um polímero e sendo assim espera-se o mesmo comportamento que o PEG quando ligada à enzima. A presença de outras proteínas e de dextrana na solução enzimática inviabiliza a determinação da massa protéica utilizando-se o método de leitura em UV-280 nm. Dessa forma, as isotermas foram obtidas através da determinação da atividade no sobrenadante, conforme Apêndice 4. A resina foi então equilibrada em tampão acetato 50 mM pH 5,2, por 24 horas. A isoterma foi obtida utilizando-se 15 mL das soluções enzimáticas da Tabela 6.1 e 1 mL de resina em erlenmeyers de 50 mL em banho termostatizado com agitação, sendo considerado um tempo de 3 horas para atingir o equilíbrio. Os resultados são apresentados na Figura 6.2:



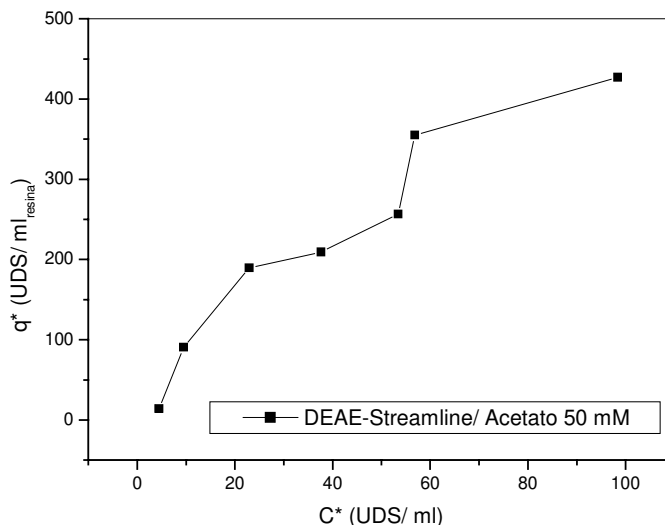


Figura 6.2 –Isoterma de adsorção da dextrana-sacarase parcialmente purificada em DEAE-Streamline com tampão acetato de sódio 50 mM a pH 5,2.

De acordo com o gráfico da Figura 6.2, a isoterma obtida parece não seguir o modelo de Langmuir. Comparando-se a curva obtida com a classificação de isotermas apresentada na revisão bibliográfica (Figura 2.1), percebe-se que o gráfico da Figura 6.2 sugere uma isoterma do tipo IV e não do tipo I (Langmuir). Os erros experimentais, não ultrapassam 10 % dos valores medidos.

A isoterma do tipo IV é um indicativo de adsorção multicamada ou adsorção competitiva. Segundo Anspach *et al.* (1996), no caso da obtenção de isotermas que não sigam o modelo de Langmuir, deve-se primeiramente tentar o ajuste do modelo de Bilangmuir (Equação 2.8) e caso não seja obtido um bom ajuste, deve-se tentar o modelo de adsorção multicamada (Equação 2.9). Para a isoterma da Figura 6.2, ambos os ajustes foram tentados através do método simplex, com auxílio do Microsoft Origin 6.0. Por se tratarem de modelos com mais de dois parâmetros, os dados experimentais não seriam suficientes para o ajuste aos referidos modelos. Dessa forma, através de interpolação dos dados foram inferidos mais pontos à curva da Figura 6.2, para que o aplicativo pudesse ser utilizado. Apesar disto, não foi possível a obtenção do ajuste aos modelos devido à

complexidade do sistema, não tendo sido encontrada boa concordância entre os dados experimentais e os obtidos com os modelos testados.

Para se obter um bom ajuste é necessário além da escolha do modelo adequado, um conjunto de bons dados experimentais. Dessa forma, o ensaio foi repetido sendo utilizados os dados da Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Repetição da primeira isoterma de adsorção

Ponto	Atividade Calculada (UDS/mL)	Atividade Inicial (UDS/mL)	Atividade Final (UDS/mL)	Enzima adsorvida (UDS/mL resina)	% enzima retida
1	50	58,70	46,67	180,45	79,51
2	40	35,62	24,81	162,15	69,65
3	30	27,64	22,87	71,55	82,44
4	25	21,37	18,06	49,65	84,51
5	20	15,68	12,54	47,10	75,18
6	15	10,26	8,38	28,25	81,88
7	10	4,94	4,56	5,70	74,70
8	5	1,42	1,25	2,55	88,03

As mesmas proporções de resina e solução enzimática foram utilizadas. Observa-se pela Tabela 6.2 que as soluções utilizadas para obtenção da segunda isoterma apresentam atividade menor que as utilizadas para a obtenção da isoterma da Figura 6.2. A utilização de uma faixa de soluções mais diluídas foi realizada na tentativa da obtenção de uma isoterma que mais se assemelhasse ao modelo de Langmuir, pois de acordo com a curva da Figura 6.2, desprezando-se os pontos para concentrações acima de 60 UDS/ ml, a curva é bastante próxima à isoterma de Langmuir. A isoterma obtida com os dados da Tabela 6.2 é apresentada no gráfico da Figura 6.3:

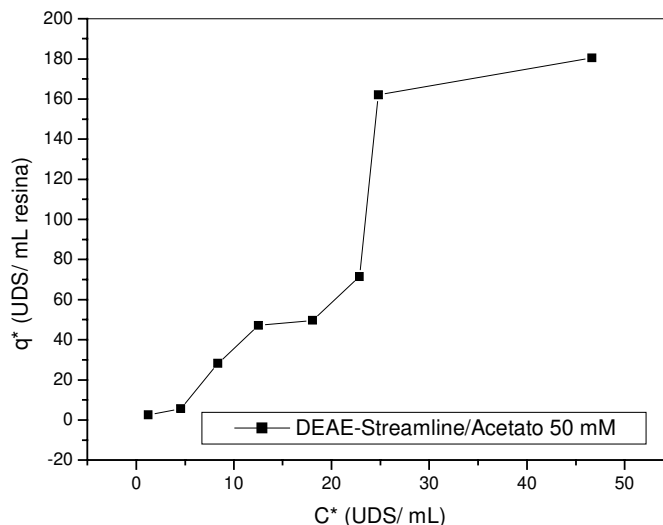


Figura 6.3 – Isoterma de adsorção para a dextrana-sacarase em DEAE-Streamline em tampão acetato 50mM a pH 5,2 (Tabela 6.2).

Embora tenham sido utilizadas soluções mais diluídas, observa-se novamente o mesmo tipo de gráfico obtido na Figura 6.2, uma isoterma do tipo IV (Ruthven, 1984).

Foi observada uma dificuldade muito grande em se trabalhar com a dextrana-sacarase parcialmente purificada. A primeira dificuldade encontrada foi a não homogeneidade da solução de enzima obtida após a precipitação e re-suspensão em tampão acetato 50 mM, pH 5,2. Isso pode ser notado pela diferença entre a atividade calculada pela regra da diluição e a obtida após a diluição da solução enzimática concentrada.

Novamente não foram obtidos ajustes satisfatórios para a isoterma da Figura 6.3, não tendo sido encontrada boa concordância entre os dados experimentais e os obtidos com os modelos testados.

Nota-se ainda que a quantidade de enzima adsorvida, medida pela perda de atividade no sobrenadante para as mesmas faixas de atividade, comparando-se a última coluna das Tabelas 6.1 e 6.2, apresenta também grande variabilidade, apesar de em ambos os ensaios a proporção resina/sobrenadante ser idêntica, o que enfatiza a dificuldade de reprodução dos dados experimentais para o sistema em estudo.

### **6.3 - Estudo da influência do pH na estabilidade da enzima**

Segundo Jan e Rydén (1989), é recomendável a captura de proteínas em resinas trocadoras de íons em valores de pH de no mínimo 0,5 e no máximo 1,5 unidades longe do ponto isoelétrico (pI) da proteína. A utilização de resinas trocadoras de íons em valores de pH muito próximos ao pI da proteína pode fazer com que não ocorra a adsorção (proteína não carregada). Já quando se utiliza valores de pH muito distantes do pI da proteína, a ligação entre a proteína e a resina pode ser tão forte que a dessorção não seja obtida. A enzima dextrana-sacarase apresenta pI por volta de 4,5 (Souza, 1993). Sendo assim, de acordo com Jan e Rydén (1989) sua captura através da utilização de resinas de troca aniônica deve ser feita na faixa de pH de 5,0 a 6,0.

A cromatografia de troca iônica é influenciada por diversos fatores tais como: pH, concentração da enzima, força iônica, íon tamponante e tipo de resina trocadora (fraca ou forte). A resina DEAE-Streamline é uma resina fraca e que se encontra completamente carregada em valores de pH abaixo de 5,0. Entretanto, neste pH a enzima não é muito estável, não sendo recomendado seu uso. Isso também não significa que a resina não tenha capacidade de capturar proteínas em valores de pH acima de 5,0.

O tampão utilizado para a obtenção das isotermas das Figuras 6.2 e 6.5 não é também o mais recomendado para resinas trocadoras de ânions, visto ser o íon tamponante (acetato) um íon negativo que se liga a resina. Sendo assim, foi alterado o tampão de acetato para histidina. A possibilidade da alteração do pH e da resina também foi levada em consideração. Entretanto, para que a alteração do pH fosse feita com segurança, foi realizado um estudo da estabilidade da enzima a 25 °C na faixa de pH de 5,0 a 6,0. Estes ensaios foram realizados utilizando soluções tampões de histidina (pKa 6,0), um tampão mais adequado à operação com resina trocadoras de ânions (Scopes, 1987).

Para isso, foi realizada uma nova fermentação onde parte do precipitado protéico foi re-suspensa em tampões de histidina na faixa de pH de 5,0 a 6,0. A força iônica também foi alterada para 10 mM ao invés de 50mM tal como utilizado para a obtenção das isotermas das Figuras 6.2 e 6.3. O seguinte procedimento foi adotado:

- 1) Preparação de 500 ml de uma solução 10 mM de histidina em H<sub>2</sub>O destilada
- 2) Acerto do pH de várias alíquotas desta solução com uma solução de NaOH concentrado para os valores de pH desejados
- 3) Fermentação para produção com posterior precipitação da enzima com PEG 1500
- 4) Diluição de uma porção do precipitado nas soluções preparadas no item 2
- 5) Preparação de soluções de atividade contendo 100 g/l de sacarose e 0,05 g/l de CaCl<sub>2</sub> para cada pH em estudo (utilizando os tampões preparados no item 2).
- 6) Determinação da atividade à 25 °C das soluções do item 4 utilizando-se as soluções de atividade preparadas no item 5
- 7) Remoção de amostras para cada valor de pH em estudo e determinação de sua atividade à 25 °C a cada meia hora até o tempo final de 2 horas e meia utilizando as respectivas soluções para atividade

Os resultados do estudo da estabilidade da enzima na faixa de pH de 5,0 a 6,0 é apresentado na Figura 6.4:

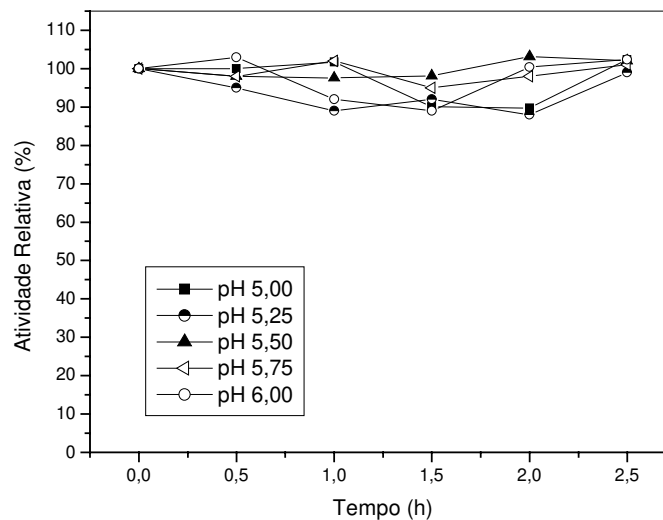


Figura 6.4 - Estabilidade da enzima dextrana-sacarase de *L. mesenteroides* B512F em função do pH e do tempo em tampão histidina.

O desvio médio percentual dos resultados apresentados na Figura 6.4 é de 4,5 %. De acordo com os resultados apresentados no gráfico acima, a enzima apresenta boa estabilidade na faixa de pH estudada. Para alguns valores de pH, ocorrem desvios maiores que o médio, entretanto estes desvios não ultrapassam 10 %. Dessa forma, pode-se concluir que qualquer valor de pH da faixa considerada para obtenção das isotermas de adsorção, a princípio, poderia ser utilizado. A atividade relativa apresentada no gráfico da Figura 6.4 se refere à percentagem de atividade da solução enzimática em relação à atividade inicial ( $t=0$ ) para cada valor de pH considerado. Um estudo similar foi realizado por Kim e Robyt (1994), onde a estabilidade da enzima pura, obtida a partir da espécie mutante (*L. mesenteroides* B512FMC), é estudada à 4 e 21°C, não tendo sido encontrada perda significativa de atividade na mesma faixa de pH aqui considerada em um período de 30 dias.

#### **6.4 – Influência do pH na adsorção da enzima**

Sabendo que a enzima não sofre desnaturação considerável na faixa de pH estudada, é interessante verificar o efeito do pH na adsorção da enzima na resina. Para este estudo foram utilizadas as mesmas soluções enzimáticas preparadas no item 6.3. Os testes foram realizados em Ependorffs de 2,0 ml sendo consideradas as resinas DEAE-Streamline (fraca) e Q-Sepharose (forte). A cada Ependorff foi adicionado 0,5 ml da resina, a qual foi equilibrada por 24 h com 1 ml dos tampões preparados no item 6.3. A solução tampão foi então substituída pelas respectivas soluções enzimáticas sendo agitadas por 2 horas e meia em *shaker* rotatório à 150 rpm. Os resultados obtidos são apresentados no gráfico da Figura 6.5.

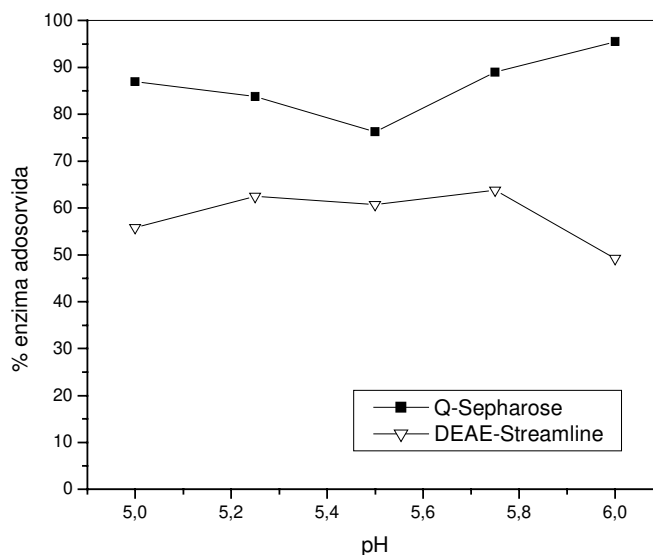


Figura 6.5 – Adsorção da dextrana-sacarase de *L. mesenteroides* B512F parcialmente purificada em função do pH (histidina) para as resinas Q-Sepharose e DEAE-Streamline

De acordo com a Figura 6.5, de forma geral a resina Q-Sepharose apresentou uma maior capacidade de adsorção que a DEAE-Streamline, o que já era esperado dado ao fato da Q-Sepharose ser uma resina forte e a DEAE-Streamline fraca (menor capacidade). Verifica-se ainda que o pH tem pouca influência na quantidade de enzima adsorvida pelas duas resinas, considerando um desvio médio de 10 %.

### 6.5 – Cinética de adsorção

Com base nos resultados obtidos nas seções 6.4 e 6.3, foi escolhido o pH de 5,5 para determinação da cinética de adsorção da enzima em ambas as resinas devido ao fato de a cinética enzimática (síntese de dextrana) utilizada neste trabalho apresentar constantes ajustadas para o pH de 5,4, valor próximo ao escolhido. Para isso, uma nova fermentação foi realizada sendo a enzima precipitada com PEG 1500 e re-suspensa em histidina 10 mM pH 5,5. A solução concentrada foi diluída na proporção de 1:2 em tampão histidina pH 5,5 e esta solução teve sua atividade determinada.

Para obtenção da curva cinética foram utilizados 20 ml da solução enzimática diluída e 4 ml de resina previamente equilibrada com o tampão histidina (10 mM, pH 5,5). A cinética foi realizada transferindo-se a resina para um béquer de 100 ml sendo removido o excesso de tampão e adicionada a solução enzimática diluída ao béquer. O ensaio foi realizado à temperatura constante de 25 °C com agitação em shaker rotatório à 150 rpm. Alíquotas de 100 µl do sobrenadante foram retiradas com o auxílio de uma seringa descartável de (1 ml graduada) em intervalos adequados de tempo até um tempo máximo de 40 minutos. Para evitar que a resina fosse removida juntamente com o sobrenadante, na ponta da seringa foi colocada lã de vidro, a qual funciona como um filtro. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.6:

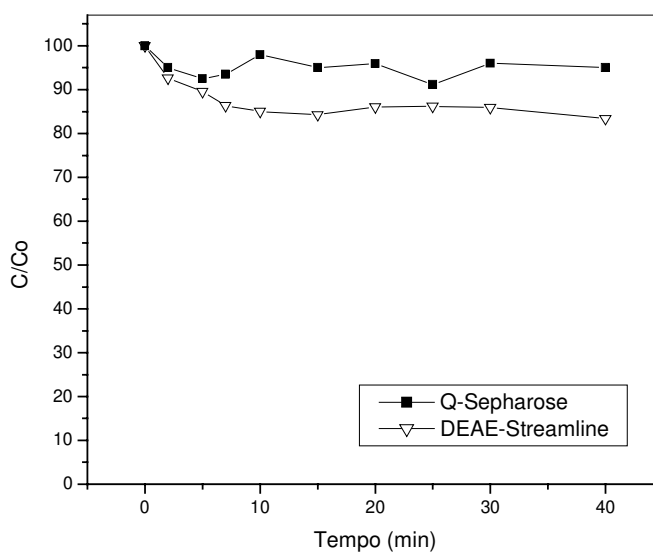


Figura 6.6 – Curva cinética de adsorção da dextrana-sacarase em histidina pH 5,5 a 25 °C.

Observa-se que as curvas obtidas são bastante próximas sendo que apesar de ter sido utilizada uma quantidade bem alta de resina, a quantidade adsorvida é bem pequena. Ao contrário do que se esperava, a quantidade de enzima adsorvida pela Q-Sepharose é ligeiramente menor que a adsorvida pela DEAE-Streamline. Observa-se ainda que o equilíbrio é atingido em aproximadamente 10 minutos. A figura 6.5 apresenta uma quantidade bem maior de enzima adsorvida, entretanto a quantidade de resina utilizada é



muito maior que a utilizada para a curva cinética. Com a finalidade de comparar a influência do tampão na cinética de adsorção, foi obtida uma curva cinética para a resina DEAE-Stremline de forma análoga às obtidas para histidina com o tampão acetato de sódio 20 mM a pH 5,5. Os resultados são apresentados na Figura 6.7:

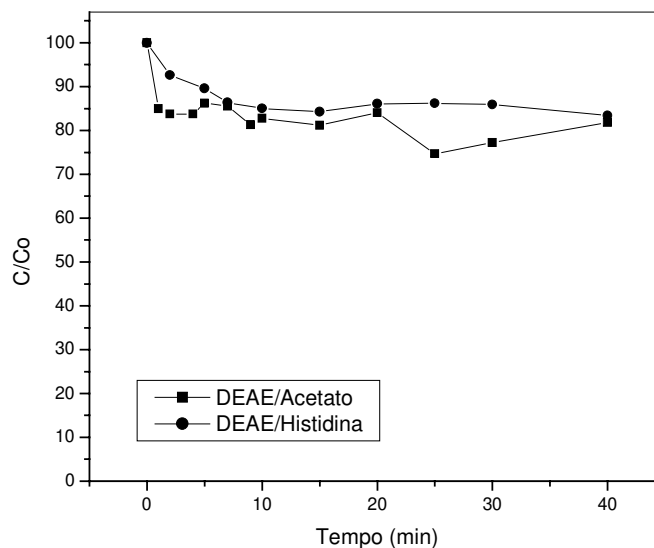


Figura 6.7 – Comparação da cinética de adsorção a 25 °C da dextrana-sacarose em DEAE-Streamline utilizando-se tampão histidina (10 mM) e acetato (20mM), ambos com pH 5,5.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6.7, nota-se que não há muita diferença entre os valores obtidos com os dois tampões estudados. Sendo assim, pode-se concluir que o tampão acetato, ao contrário do que se pensava, não interfere tanto na quantidade de enzima adsorvida. Vale ainda ressaltar que a histidina utilizada nos experimentos reportados neste capítulo trata-se da histidina monoclorada. Sendo assim, este aminoácido apresenta íons cloreto em solução aquosa que podem interferir por se tratarem de um contra-íon para eluição de proteínas em resinas trocadoras de ânions. Por este motivo, o tampão foi preparado no limite inferior usualmente recomendado para cromatografia de troca iônica. Por razões econômicas, o tampão acetato é preferível em relação à histidina pois seu custo é bastante inferior ao do aminoácido.

## 6.6 – Dessorção da enzima

A desorção da enzima foi realizada em Ependorrfs utilizando como eluente soluções salinas (NaCl) de concentrações 0,25 e 0,50 M em pH 5,5. Os testes foram realizados em Ependorrfs de 2,0 ml contendo 0,5 ml de resina (DEAE-Streamline) previamente equilibrada com tampão acetato pH 5,5 20 mM. O tampão foi substituído por 1,0 ml de solução ezimática e agitado em *shaker* rotatório à 150 rpm por 20 minutos. A resina foi então decantada, o sobrenadante removido e a sua atividade foi determinada. Conhecendo-se a atividade da solução enzimática inicial e o atividade restante no sobrenadante, é possível calcular a atividade retida na resina, a qual dever ser recuperada ao menos parcialmente com a desorção.

À resina contendo a enzima adsorvida, foi adicionado 1,0 ml de NaCl 0,25 M e o Ependorff foi agitado em *shaker* rotatório à 150 rpm por 1 hora, sendo retiradas amostras para determinação da atividade a cada 15 minutos. Não foi encontrada atividade em nenhuma das amostras analisadas. O ensaio foi repetido, utilizando-se NaCl 0,5 M para a desorção tendo sido encontrada uma atividade de 3,66 UDS/ml, o que significa menos de 5% da atividade enzimática retida pela resina (88 UDS/ ml).

Estes resultados indicam, que mesmo que a enzima seja adsorvida, através da utilização de grandes quantidades de resina, pouca enzima é desorvida em sua forma ativa.

## 6.7 – Conclusões e comparação com outros trabalhos de adsorção da dextrana-sacarase

Os resultados obtidos e apresentados nas seções anteriores indicam a dificuldade de adsorção da enzima em resinas de troca iônica. A “adsorção” de grandes quantidades de enzima só foi possível quando uma grande quantidade de resina (50 % do volume de líquido) é utilizada e mesmo assim, a desorção da enzima não foi conseguida. Este fato

pode ter ocorrido devido a uma desnaturação da enzima quando em contato com a resina ou ao fato de a força iônica utilizada não ser suficiente para promover a dessorção. Isto poderia ser confirmado com a determinação da concentração protéica, entretanto os interferentes inviabilizaram este tipo de análise (Apêndice 4).

Devido à presença de dextrana contaminante na preparação enzimática, as isotermas obtidas não seguem o modelo de Langmuir, tal como reportado em trabalhos anteriores (Souza, 1993 e Currello *et al.*, 1998). Isso pode ser atribuído ao fato de estes trabalhos terem utilizado o método de UV-280 nm para determinação da massa total de proteína, a qual é utilizada na determinação das isotermas. Realmente medindo-se somente a concentração através da diferença de absorvância obtida à 280 nm é possível obter uma isoterma do tipo Langmuir (Apêndice 5), entretanto essa técnica é inadequada e não permite estudar a seletividade do adsorvente em relação à proteína de interesse (enzima).

A cadeia de dextrana ligada à enzima pode diferir em tamanho, bem como em quantidade a cada preparação da enzima, o que impossibilita a reprodutibilidade dos resultados e esclarece o fato das constantes da isoterma de Langmuir obtidas por Currello *et al.* (1998) e Souza (1993) serem tão diferentes (Apêndice 5). Por ser grande e estar ligada à enzima, a dextrana pode causar um impedimento estérico, fazendo com que a enzima não consiga se aproximar dos sítios ativos da resina, sendo assim, a capacidade de adsorção da resina fica reduzida. Esta hipótese também explica o isoterma do tipo IV apresentada nas Figuras 6.2 e 6.3, pois proteínas menores podem ter mobilidade suficiente e se ligar à resina nos sítios onde a enzima não chega devido à influência da cadeia de dextrana.

A presença de dextrana na amostra pode aumentar ou diminuir a atividade, dependendo de sua concentração e distribuição de massa molar, como também influencia na quantidade de enzima adsorvida (Kim e Robyt, 1994). Essa interferência pode inclusive influenciar na dessorção da enzima. Se ao se ligar na resina a enzima se desprender da cadeia de dextrana e esta permanecer no sobrenadante, ao se dessorver a enzima através das soluções salinas (NaCl) a atividade real da enzima sem interferência da dextrana pode ser tão pequena que não seja mensurável pela técnica utilizada. Como não se conhece a quantidade de dextrana ligada à enzima e tão pouco sua distribuição de massa molar, é difícil quantificar sua influência real nos resultados obtidos. Sob este ponto de vista, os

resultados obtidos com a enzima na presença de dextrana proveniente do meio de cultura não poderiam ser reproduzíveis, já que não só a concentração de dextrana produzida, como também sua distribuição de massa molar variam a cada fermentação para obtenção da enzima.

Quando o sistema foi concebido não se imaginava que havia dextrana como contaminante, pois o protocolo de purificação utilizado neste trabalho, e descrito neste trabalho (Capítulo 4), como purificação parcial da enzima, vinha sido referenciado na literatura consultada como uma técnica de purificação total da enzima. Após a percepção desta falha, a nomenclatura foi corrigida no Capítulo 4. O sistema proposto na Figura 6.1 foi baseado em trabalhos anteriores, cujos resultados deste trabalho contradizem, que apontavam para a possibilidade da recuperação da enzima através da adsorção em resinas de troca iônica.

Tendo em vista o exposto, o primeiro passo é realizar os testes utilizando-se a enzima pura para se ter idéia da real capacidade de adsorção das resinas estudadas. Kim e Robyt (1994 ) realizaram um estudo da adsorção da enzima dextrana-scarase, totalmente purificada, obtida do *Leuconostoc mesenteroides* B512FMC (mutante) em diversas resinas Sephadex (afinidade) e verificaram que a presença de dextrana reduz em mais de 90 % a capacidade de adsorção da dextrana-sacarase nas resinas estudadas. Esses resultados indicam a inviabilidade da recuperação da enzima contendo dextrana através de técnicas cromatográficas convencionais utilizadas para purificação de proteínas. De acordo com os resultados apresentados neste a recuperação da enzima através de cromatografia de troca iônica não é viável.

Devido à constatação da presença de dextrana na enzima obtida do microrganismo nativo (B512F), foi considerado o uso da enzima proveniente da espécie mutante (B512FMC), a qual não possui dextrana, conforme já mencionado. Para que isso fosse possível foi necessário o ajuste das constantes cinéticas do modelo estudado no Capítulo 5 para a enzima da espécie nativa. Foi também necessária a incorporação da equação de formação do produto terciário do acceptor (P4) ao modelo matemático, uma vez que este composto foi produzido em quantidade suficiente para ser considerado no modelo.

O estudo da síntese enzimática de dextrana com a enzima obtida da espécie mutante, bem como o ajuste das constantes cinéticas do modelo é apresentado no Capítulo 7.

## Capítulo 7

### *Obtenção dos perfis de carboidratos e dextrana envolvidos na síntese com a enzima obtida do *L. mesenteroides* B512FMC*

---

#### 7.1 - Introdução

Para a utilização do modelo de Heincke *et al.* (1999) para a simulação de um reator para a síntese enzimática de dextrana a partir da enzima dextrana-sacarase obtida da espécie mutante, primeiramente foi necessária a determinação dos parâmetros cinéticos envolvidos no modelo. Para isso diversas sínteses enzimáticas variando-se a concentração de maltose e sacarose no reator foram realizadas. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Química dos Carboidratos e Enzimologia, no Departamento de Bioquímica, Biofísica e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Iowa (*Iowa State University, Ames –IA-USA*), durante estágio de doutoramento no exterior.

#### 7.2 - Determinação da atividade enzimática

Para as sínteses enzimáticas realizadas neste trabalho foi utilizada uma preparação enzimática previamente preparada e estocada a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , desde 1996. Antes da utilização da enzima, a qual se encontrava totalmente pura em tampão acetato pH 5,2, sua atividade enzimática foi determinada através da medida da incorporação de  $\text{C}^{14}$  na cadeia de dextrana conforme procedimento descrito no Capítulo 3. A Figura 7.1 apresenta os pontos experimentais obtidos, bem como a regressão linear dos referidos dados, para a determinação da incorporação de glicose radioativa (glicose- $\text{C}^{14}$ ) proveniente da sacarose- $\text{C}^{14}$  adicionada ao digestor:

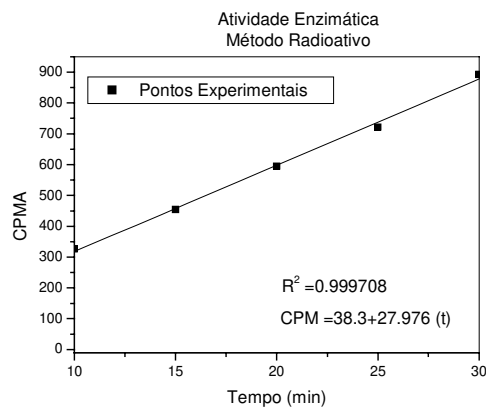


Figura 7.1 – Dados experimentais referentes à contagem de  $C^{14}$  incorporados à cadeia de dextrana durante o ensaio para determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC (método radioativo).

Utilizando o procedimento descrito no Capítulo 3 (item 3.5) e as equações de 3.3 a 3.5, foram obtidos os dados apresentados na Tabela 7.1:

Tabela 7.1 – Dados obtidos na determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase através da incorporação de  $C^{14}$  na cadeia de dextrana.

<i>Determinação da atividade enzimática</i>	
Radioatividade inicial no digestor	3350 CPM
Fator de diluição da amostra do item 7 ( $d_1$ )	200
(Capítulo 3, seção 3.5)	
Radioatividade inicial no digestor por $\mu\text{mol}$ de sacarose ( $R_1$ )	1675 CPM/ $\mu\text{mol}$ de sacarose
Radioatividade inicial no digestor por $\mu\text{mol}$ de glicose ( $R_2$ )	838 CPM/ $\mu\text{mol}$ de glicose
Coeficiente angular da reta ( $\alpha$ )	28 CPM/min
Volume de enzima ( $V_1$ )	0,1 mL
Fator de diluição das amostras ( $d_2$ )	8
Fator de diluição da enzima ( $d_3$ )	100
Atividade enzimática	267 UI/mL

### 7.3- Síntese enzimática de dextrana

Para a determinação das taxas de formação dos produtos do aceptor (séries homólogas) foi considerado um planejamento experimental onde a concentração de sacarose foi mantida constante em dois níveis (200 e 100 mM) e a concentração de maltose foi variada. A Tabela 7.2 apresenta o planejamento experimental utilizado neste trabalho:

Tabela 7.2 – Planejamento experimental para síntese enzimática de dextrana a partir da dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC, mantendo-se a sacarose constante em dois níveis e variando-se a concentração de maltose.

Corrida	Código	Sacarose (mM)	Maltose (mM)	Razão (S/M)
1	A	200	0	*
2	B	200	200	1
3	C	200	100	2
4	D	200	50	4
5	E	100	0	*
6	F	100	100	1
7	G	100	50	2
8	H	100	25	4

Foi considerado um estudo utilizando-se o planejamento experimental acima à temperatura de 25 °C e pH 5,2 (condições ótimas de síntese). As sínteses enzimáticas foram realizadas em um tubo plástico de capacidade de 50 mL, com tampa, contendo 15 mL de meio reacional. Foi utilizada uma atividade enzimática de 1,5 UI/mL e tampão piridina/ácido acético pH 5,2. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos regulares de tempo considerando o tempo de reação máximo de 270 minutos.

As amostras foram transferidas imediatamente a um tubo de centrífuga com tampa contendo 2 mL de etanol anidro para interrupção da reação e precipitação da dextrana formada. A dextrana precipitada foi centrifugada e então lavada por duas vezes com etanol 67 % para remoção de possíveis carboidratos contaminantes, sendo o etanol utilizado para a lavagem adicionado ao sobrenadante. A dextrana precipitada foi re-suspensa em água destilada, e aquecida à 80 °C por 10 minutos para completa solubilização. As amostras foram então analisadas quanto à formação de produtos do aceptor (CCD) e a quantidade dextrana formada conforme procedimentos descritos no Capítulo 3.



## 7.4 - Perfis de dextrana e carboidratos obtidos nas sínteses

### 7.4.1 Resultados obtidos com a análise da dextrana sintetizada em função do tempo

A Figura 7.2 (a) apresenta os perfis de dextrana obtida nas sínteses enzimáticas em termos de mg/mL de glicose incorporada na cadeia de dextrana para as concentrações de sacarose de 200 mM (corridas de 1 a 4 –Tabela 7.2), enquanto que a Figura 7.2 (b) apresenta o resultados obtidos para as concentrações de sacarose de 100 mM (corridas de 5 a 8 – Tabela 7.2):

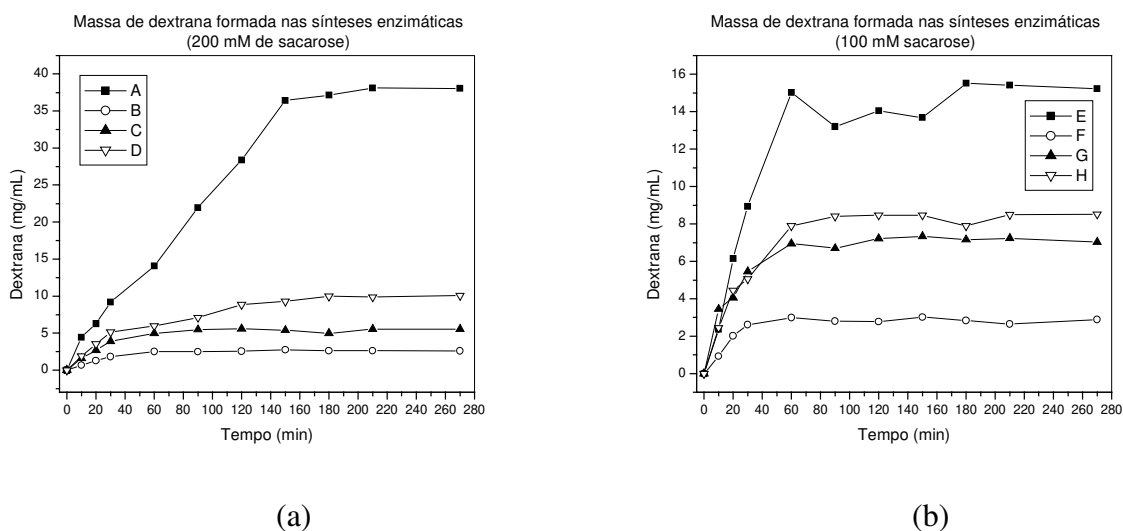


Figura 7.2 – Perfil de dextrana formada durante as corridas de 1 a 8.

A quantidade de dextrana formada durante a síntese foi monitorada através do método fenol- ácido sulfúrico, conforme descrito no Capítulo 3. De acordo com os perfis apresentados na Figura 7.2, a quantidade de dextrana formada durante a síntese diminui bastante com o aumento da quantidade de maltose adicionada ao digestor (a quantidade de maltose diminui da série B para a série D, e F para H, sendo que as séries A e E não contém maltose no meio reacional).

### 7.4.2 Perfis dos carboidratos obtidos na síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor

Os perfis de carboidratos foram obtidos através de cromatografia de camada delgada (CCD) conforme procedimento descrito no Capítulo 3. O desvio médio observado para as análises foi de aproximadamente 10 %. Os produtos secundário e terciário do acceptor (séries homólogas contendo 4 e 5 unidades de glicose) serão referidos neste trabalho como P4 e P5 respectivamente. A Figura 7.3 apresenta os perfis de frutose e sacarose para a série A (síntese sem maltose):

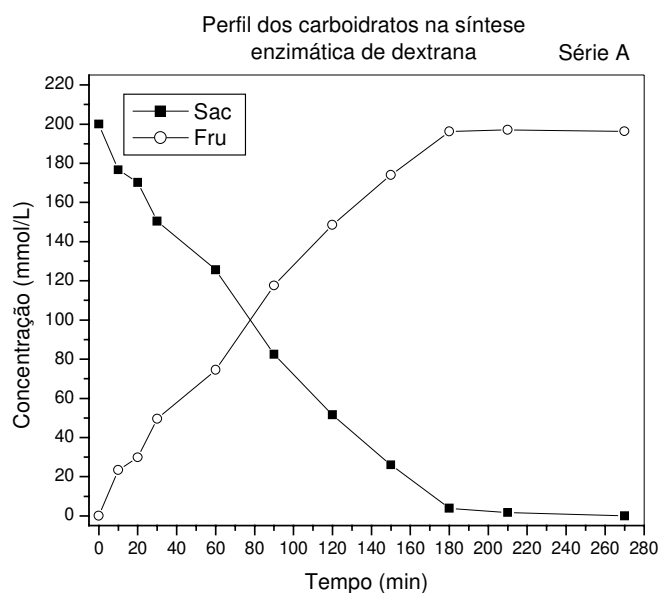


Figura 7.3 – Perfil da concentração de sacarose e frutose em função do tempo para a série A (200 mM de sacarose, sem maltose).

De acordo com os resultados obtidos apresentados na Figura 7.3, toda a sacarose é consumida em 180 minutos de reação, enquanto que a frutose é liberada em proporções quase equimolares ao consumo de sacarose. A Figura 7.4 apresenta o perfil dos carboidratos obtidos para a série B:

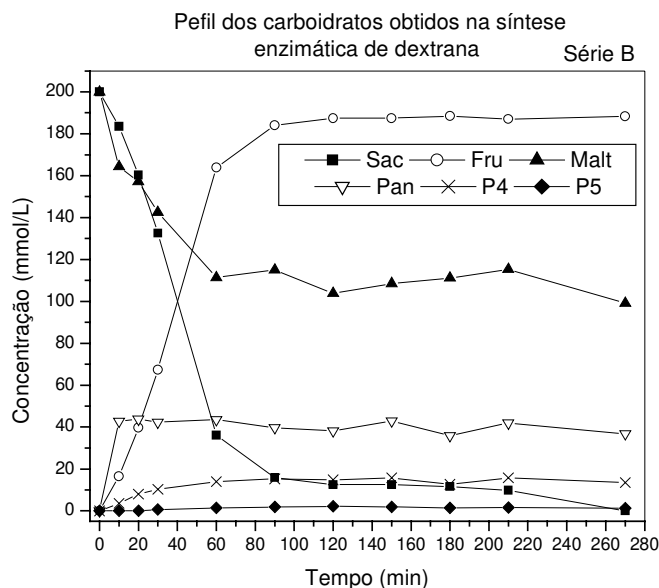


Figura 7.4 – Perfil de concentração dos carboidratos em função do tempo para a série B (200 mM de sacarose e 200 mM de maltose).

De acordo com a Figura 7.4, observa-se que a quantidade de sacarose diminui ao decorrer do tempo e a de frutose aumenta, conforme esperado. Observa-se ainda que grande parte da sacarose é consumida nos primeiros 90 minutos de reação. E que a panose é formada rapidamente no início da reação. A quantidade de P4 formada é menor que a de panose e a quantidade de P5 é nula ou desprezível em relação aos demais produtos formados. A Figura 7.5 apresenta o perfil dos carboidratos obtidos para a série C:

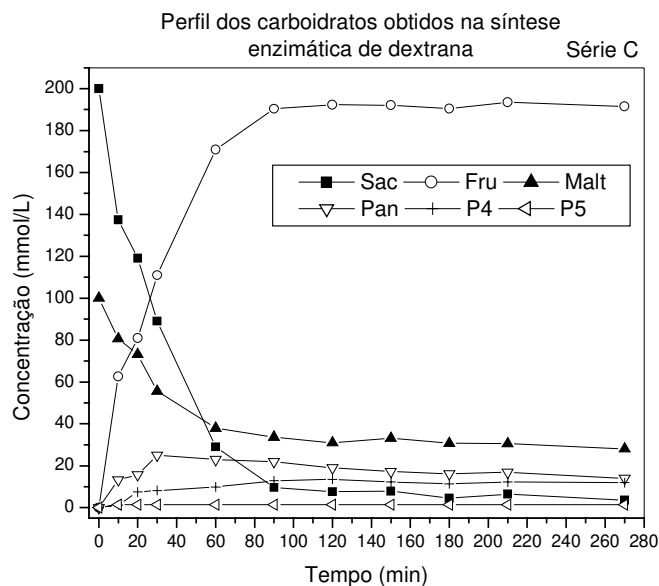


Figura 7.5 –Perfil de concentração dos carboidratos em função do tempo para a série C (200 mM de sacarose e 100 mM de maltose).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 7.5, novamente toda a sacarose é consumida e a frutose é liberada em proporções equimolares à sacarose consumida. Observa-se ainda que a quantidade de panose formada é bem menor que a obtida quando razões equimolares de maltose e sacarose são utilizadas. Por outro lado, a quantidade de P4 formada é bem mais próxima à de panose e a de P5 é novamente desprezível frente aos demais produtos. A Figura 7.6 apresenta o perfil dos carboidratos obtidos para a série D:

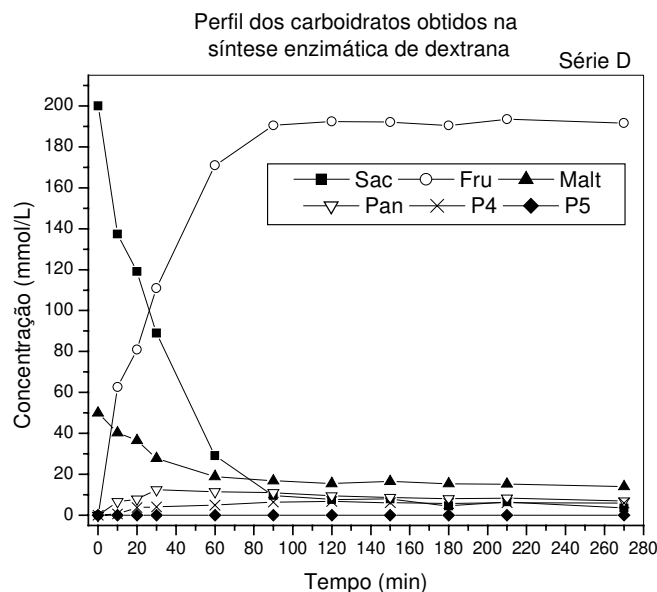


Figura 7.6 – Perfil da concentração de sacarose e frutose em função do tempo para a série D (200 mM de sacarose 50 mM de maltose).

De acordo com a Figura 7.6, a mesma tendência das figuras anteriores é observada, sendo que menores quantidades de panose e P4 são obtidas para esta série quando comparadas com as quantidades destes carboidratos obtidos nas sínteses anteriores, onde maiores quantidades de maltose estão presentes no início do síntese. A Figura 7.7 apresenta os perfis obtidos para a série E:

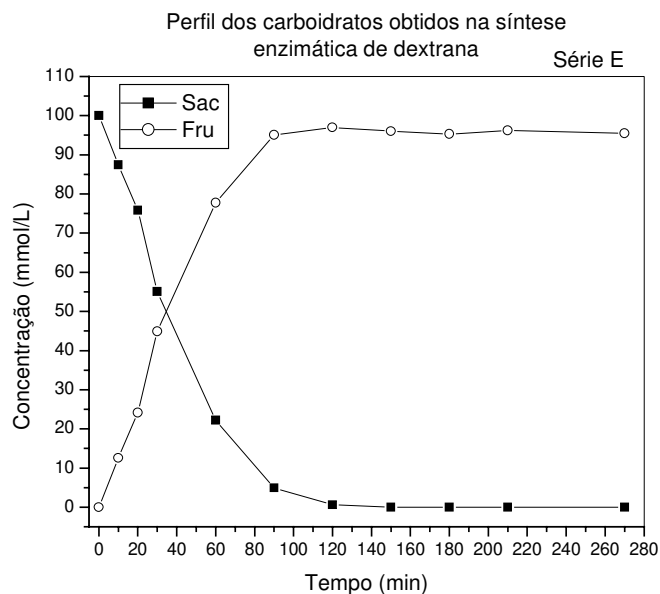


Figura 7.7 – Perfil da concentração de sacarose e frutose em função do tempo para a série E (100 mM de sacarose, sem maltose).

De acordo com a Figura 7.7, a sacarose é consumida mais rapidamente, sendo consumida na metade do tempo obtido para série A, onde a concentração de sacarose era o dobro, como era esperado uma vez que a atividade enzimática utilizada em ambas é a mesma. A Figura 7.8 apresenta o perfil dos carboidratos obtidos para a síntese enzimática obtidos para a série F:

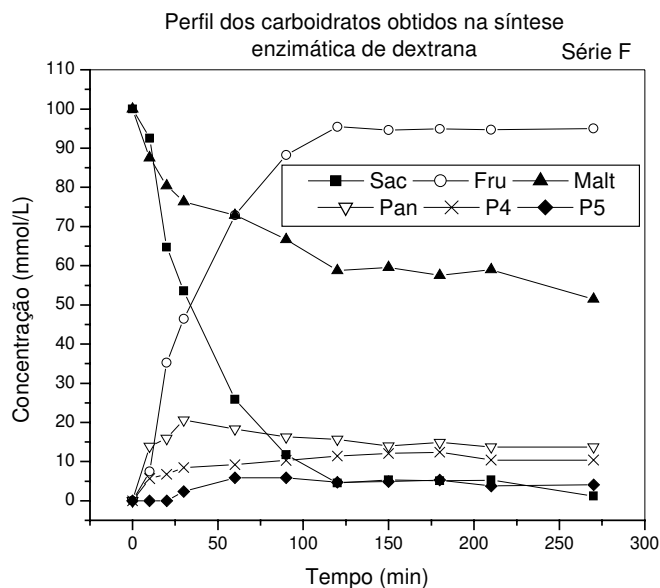


Figura 7.8 – Perfil da concentração de sacarose e frutose em função do tempo para a série F (100 mM de sacarose e 100 mM de maltose).

Para a Figura 7.8 valem os mesmos comentários da Figura 7.5, sendo que os valores de panose e P4 são menores que os apresentados na Figura 7.5. Esse comportamento evidencia que não somente a razão sacarose/maltose afeta a quantidade de produtos do acceptor formados mas também suas concentrações iniciais. As Figura 7.9 apresenta os resultados obtidos para a série G e a Figura 7.10 os resultados obtidos para a série H:

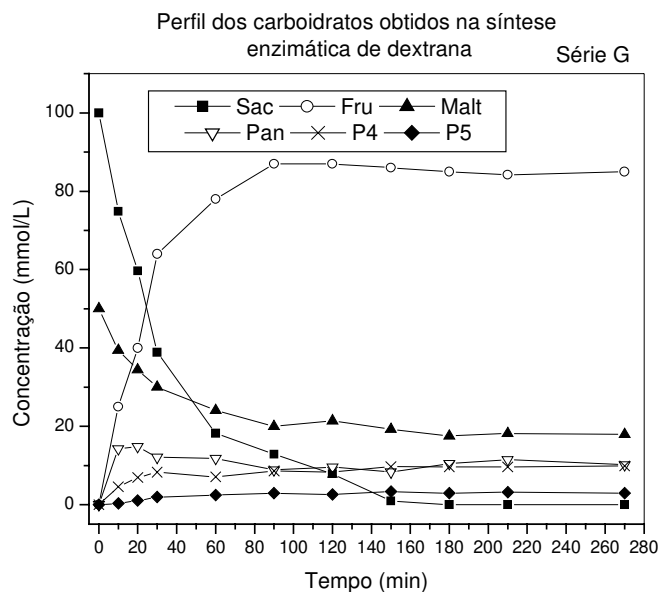


Figura 7.9 – Perfil da concentração de sacarose e frutose em função do tempo para a série F (100 mM de sacarose e 50 mM de maltose).

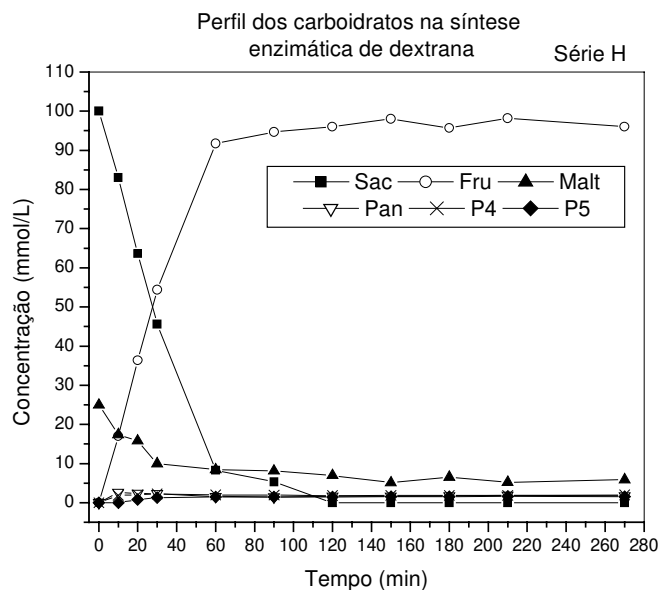


Figura 7.10 – Perfil da concentração de sacarose e frutose em função do tempo para a série H (100 mM de sacarose e 25 mM de maltose).



Comparando-se as Figuras 7.8 a 7.10 verifica-se que os valores obtidos para os produtos o acceptor diminuem com a diminuição da quantidade de maltose presente inicialmente no reator.

### 7.5 - Incorporação das constantes de formação dos produtos secundários e do acceptor no modelo matemático

De acordo com os resultados apresentados no item anterior, a concentração de P5 é muito pequena em relação à panose e à série homóloga P4. Dessa forma, foi considerada apenas a incorporação do segundo produto do acceptor (P4) na modelagem matemática. O modelo matemático proposto por Heincke *et al.* (1999) foi então acrescido de uma equação e os parâmetros do modelo foram ajustados para a síntese enzimática de dextrana com enzima dextrana-sacarase obtida a partir da espécie mutante. A definição dos parâmetros, bem como as etapas elementares do modelo mecanístico utilizado neste trabalho são apresentadas no Apêndice 6.

Para isso, foi utilizado o algoritmo de Marquardt baseado na minimização do erro entre os perfis experimentais e o previsto pelo modelo. O modelo acrescido da equação referente à formação de P4 é apresentado nas Equações de 7.1 a 7.7:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{E \cdot S(p_{24} + p_{70} \cdot F + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P + p_{73} \cdot P4)}{N} \quad (7.1)$$

$$\frac{dF}{dt} = +\frac{E \cdot S(p_{24} + p_{71} \cdot M + p_{72} \cdot P + p_{73} \cdot P4)}{N} \quad (7.2)$$

$$\frac{dM}{dt} = -\frac{p_{71} E \cdot S \cdot M}{N} \quad (7.3)$$

$$\frac{dP}{dt} = +\frac{E \cdot S(p_{71} \cdot M - p_{72} \cdot P)}{N} \quad (7.4)$$

$$\frac{dP4}{dt} = +\frac{E \cdot S(p_{83} \cdot P - p_{73} \cdot P4)}{N} \quad (7.5)$$

O valor das constantes cinéticas ajustadas para a enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC são apresentados a seguir:

$$p_{24} = 2,33 \cdot 10^{-6} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{55} = 6,0 \cdot 10^{-6} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{42} = 1,52 \cdot 10^{-2} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{59} = 1,86 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{43} = 1,50 \cdot 10^{-2} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{68} = 5,54 \cdot 10^{-6} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{46} = 4,49 \cdot 10^{-4} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{70} = 8,35 \cdot 10^{-9} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{47} = 1,02 \cdot 10^{-5} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{71} = 3,49 \cdot 10^{-7} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{53} = 1,17 \cdot 10^{-4} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{72} = 9,88 \cdot 10^{-7} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

$$p_{54} = 4,98 \cdot 10^{-6} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

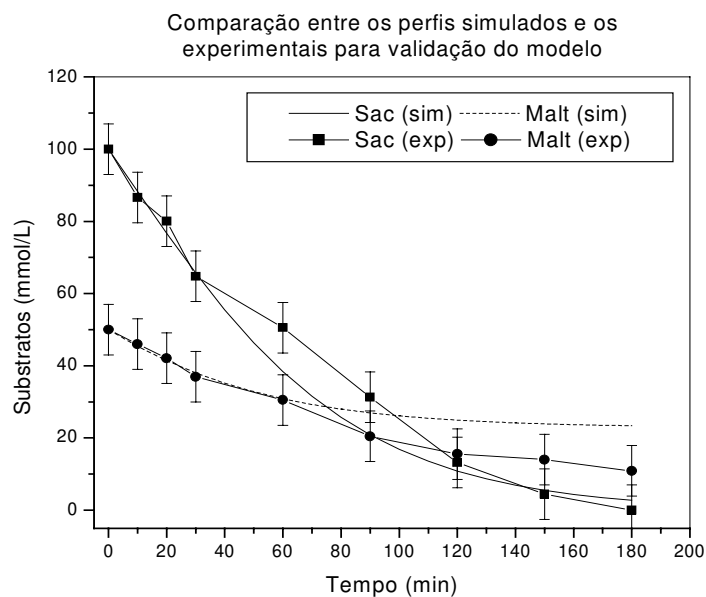
$$p_{73} = 5,23 \cdot 10^{-7} (\text{L} / \text{mmol})^2$$

O ajuste dos parâmetros apresentou um erro médio de 7 mM, um pouco superior ao obtido por Heincke *et al.* (1999), que segundo os autores é de 4,5 mM. A comparação entre os perfis gerados pelo modelo com as constantes ajustadas para a enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC e os perfis experimentais é apresentada no Apêndice 7.

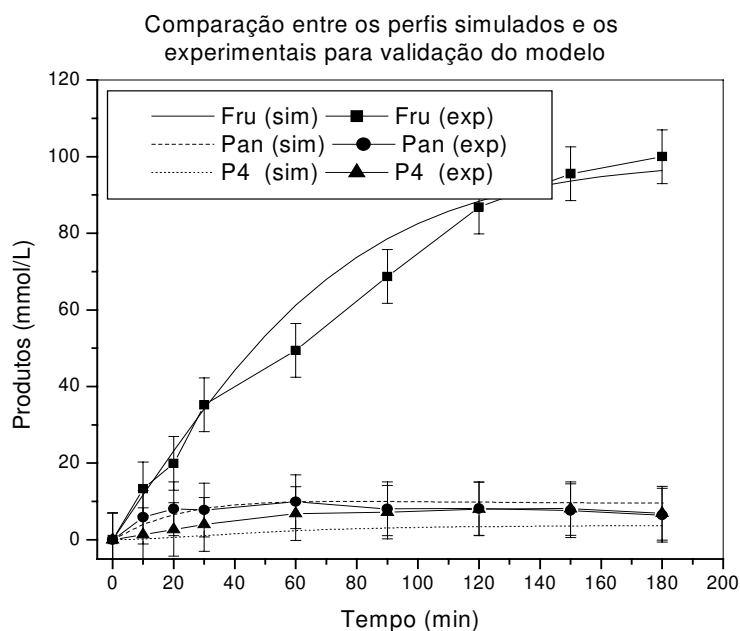
## **7.6 - Validação do modelo matemático para a enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC**

Para validação do modelo apresentado nas equações de 7.7 a 7.11, com os parâmetros ajustados para a enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC, foram realizadas duas sínteses com atividade enzimática diferentes da utilizada para o ajuste dos parâmetros envolvidos no modelo. Estas sínteses foram realizadas utilizando-se concentrações iniciais de 100 mM e 50 mM de sacarose e maltose respectivamente, e atividade enzimática de 750

e 375 UI/L. A comparação entre os perfis dos carboidratos obtidos através da simulação com o modelo e os perfis experimentais são apresentados nas Figuras 7.11 e 7.12, a seguir:



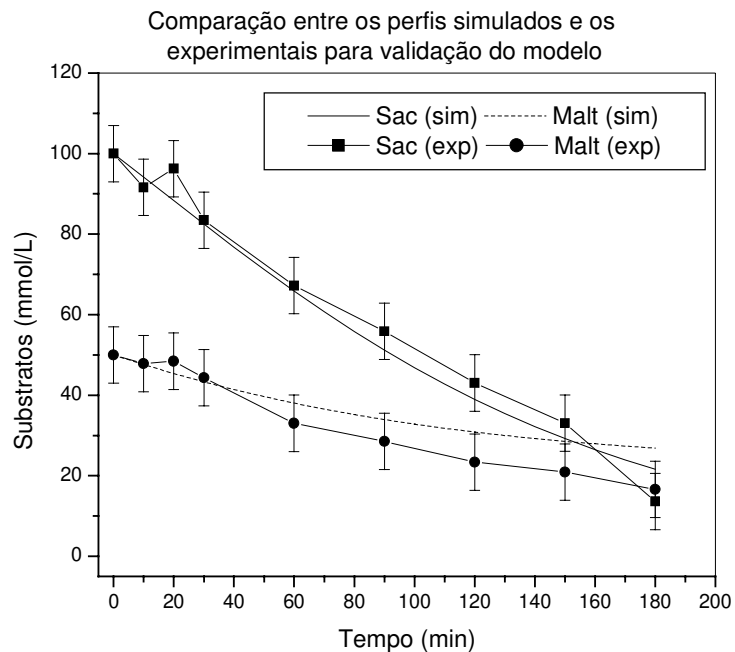
(a)



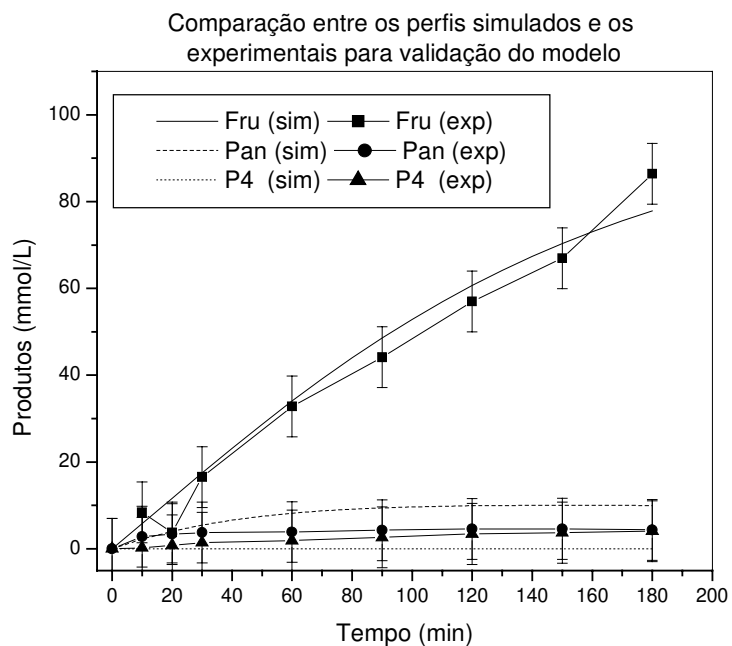
(b)

Figura 7.11 – Perfis dos carboidratos formados e consumidos durante a síntese de dextrana . Comparação entre os perfis simulado com o modelo e as constantes ajustadas para enzima

dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC e os perfis experimentais: (a) substratos, (b) produtos (25 °C, pH 5,2 e atividade enzimática de 750 UI/L).



(a)



(b)

Figura 7.12 – Perfis dos carboidratos formados e consumidos durante a síntese de dextrana. Comparação entre os perfis simulados com o modelo e as constantes ajustadas para enzima

dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC e os perfis experimentais: (a) substratos, (b) produtos (25 °C, pH 5,2 e atividade enzimática de 375 UI/L).

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 7.11 e 7.12, pode-se concluir que os parâmetros do modelo estão bem ajustados, uma vez que as diferenças entre os perfis simulados e experimentais estão dentro do erro envolvido na estimativa dos parâmetros. Dessa forma, conclui-se que o modelo matemático descreve bem os perfis dos carboidratos envolvidos na síntese enzimática de dextrana a partir da enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC e pode ser utilizado para a otimização de reatores enzimáticos utilizando-se esta enzima.

## 7.7 - Conclusões

Neste Capítulo foram apresentados os perfis de carboidratos e dextrana obtidos durante as sínteses enzimáticas de dextrana na presença e na ausência de maltose no meio reacional, utilizando-se a enzima dextrana-sacarase obtida a partir da espécie mutante (*L. mesenteroides* B512FMC). De acordo com os resultados obtidos, foi observado que a quantidade de produtos do aceptor depende não somente da razão sacarose/maltose, mas também de suas concentrações iniciais. De forma geral, pode-se dizer que a concentração de P5 é muito pequena quando comparada às dos demais produtos, ficando em todos os casos abaixo do erro médio do método de análise. Foi ainda observado que quantidade dextrana diminui drasticamente com o aumento da quantidade de maltose no meio reacional.

Ainda em relação à maltose, foi observado que esta não é totalmente consumida durante a síntese e sua presença acelera a reação uma vez que o tempo necessário para o consumo total de sacarose é bem menor nos casos onde há maltose presente no meio reacional. Não foram observados quantidades mensuráveis das séries homólogas superiores à P5 em nenhuma das sínteses realizadas. Vale ainda ressaltar que não foram encontradas quantidades mensuráveis de leucrose em nenhuma das sínteses.

O modelo com as constantes ajustadas para a enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512 FMC foi validado quando utilizando-se duas concentrações

enzimáticas diferentes daquelas utilizadas para a obtenção das constantes. A comparação entre os perfis experimentais e os simulados apresentou boa concordância (desvios dentro do erro médio obtido para o ajuste das constantes cinéticas). Dessa forma, conclui-se que o modelo mecanístico utilizado neste trabalho descreve bem a formação e o consumo de carboidratos na síntese enzimática de dextrana.

Dando prosseguimento à busca de um processo para obtenção de dextrana de massa molar controlada no Capítulo 8 é apresentada a aplicação do método dos momentos à síntese enzimática de dextrana (desenvolvimento de um modelo para predição da massa molar de dextrana).



## **Capítulo 8**

### **Aplicação do método dos momentos para estimativa da massa molar da dextrana**

---

#### **8.1 - Introdução**

O método dos momentos foi proposto em meados de 1950 para predição da massa molar de polímeros. O método é baseado em cálculos estatísticos de distribuição de frequências e na esperança matemática de um dado evento aleatório. Devido à complexidade e ao número elevado de equações envolvidas no cálculo, o método passou a ser utilizado mais intensamente somente a partir da década de 90, quando a popularização dos computadores pessoais e a melhora no tempo de processamento das máquinas tornou viável sua utilização. Uma introdução aos fundamentos do método foi apresentada na revisão bibliográfica deste trabalho (Capítulo 2).

Embora o método tenha sido bastante utilizado para predição de massas molares de polímeros químicos, não foram encontrados registros de sua utilização para biopolímeros, como é o caso da dextrana. Para utilização do método, o mecanismo detalhado da reação e suas etapas, destacando-se as etapas de iniciação, propagação e terminação das cadeias devem ser bem conhecidos. No caso de biopolímeros, além das etapas comuns às reações de polimerização, ocorrem também fenômenos típicos de reações enzimáticas tais como: inibição pelo substrato ou pelo produto, reações secundárias que promovem a síntese de oligossacarídeos e séries homólogas, além de apresentar etapas em equilíbrio, que não ocorrem em polimerizações químicas. Para utilização do método, todas as etapas reacionais que descrevam fenômenos importantes que possam afetar a massa molar do produto devem ser conhecidas e ter suas constantes determinadas experimentalmente.

Neste capítulo é abordada a utilização do método para predição da massa molar de dextrana obtida via síntese enzimática. A aplicação do método para a predição da massa



molar de dextrana tornou-se viável a partir da publicação de um mecanismo detalhado da rota bioquímica da enzima (Heicke *et al.*, 1999).

O trabalho de Heincke *et al.* (1999) apresenta um mecanismo detalhado de reação da enzima dextrana-sacarase com a sacarose e maltose para produção de panose, baseado no mecanismo de inserção proposto e validado por Robyt e Walseth (1978) e no esquema da rota bioquímica da enzima na presença de aceptores apresentada por Robyt (1995). Embora a panose não seja o produto de interesse neste trabalho, a síntese enzimática deste oligossacarídeo é também promovida pela dextrana-sacarase em meio contendo sacarose e maltose como acceptor. No caso da síntese de panose, uma grande quantidade de maltose é adicionada ao meio reacional de forma a inibir a síntese de dextrana. Entretanto, em tese a utilização de uma quantidade adequada de maltose pode reduzir a massa molar da dextrana, pois este dissacarídeo participa da síntese atuando como acceptor. Dessa forma, um modelo matemático que possa estimar a massa molar de dextrana, na presença ou ausência de maltose, tal como o apresentado neste capítulo, pode constituir uma ferramenta poderosa para a síntese de dextrana de massa molar controlada, eliminando assim a etapa de hidrólise, utilizada tradicionalmente para obtenção de dextranas de baixa massa molar.

## 8.2- Mecanismo detalhado da síntese enzimática de dextrana

A reprodução de todas as etapas propostas pelos autores bem como a definição das constantes são apresentada no Apêndice 6. O modelo cinético foi validado pelos autores para a enzima obtida a partir da espécie nativa e apresentou boa concordância com os dados experimentais. Neste trabalho, o mesmo modelo mecanístico foi utilizado para determinação das constantes para a síntese enzimática de dextrana a partir da enzima obtida da espécie mutante, sendo o modelo também validado conforme apresentado no Capítulo 7. A Figura 8.1 apresenta o esquema completo estudado da síntese enzimática de dextrana na presença de aceptores:

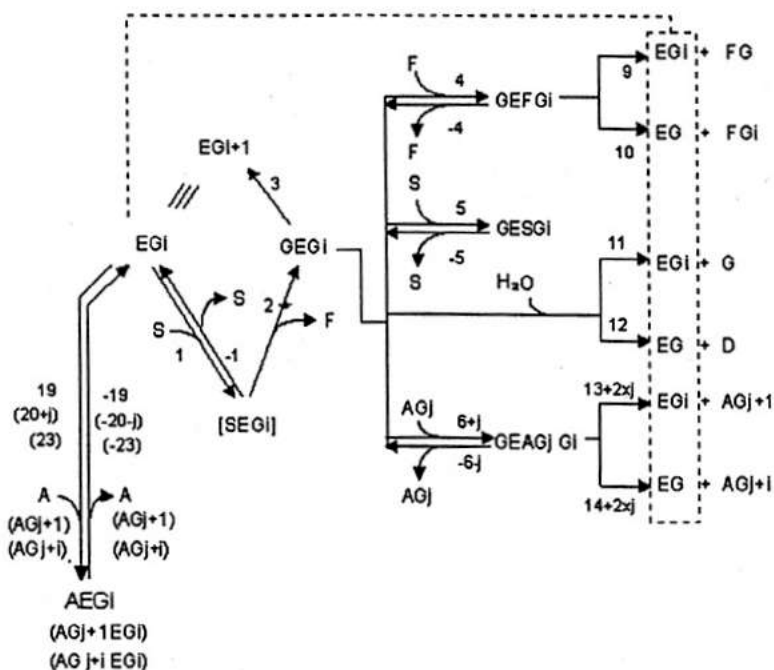


Figura 8.1 – Modelo cinético para a catálise da dextrana-sacarase (índices  $i \geq 2$  e  $0 \leq j \leq 3$ ) Heincke *et al.* (1999).

De acordo com o esquema apresentado, o mecanismo de inserção compreende as etapas de 1 a 3. Já as etapas de 4 à 14 são referentes à reação com aceptores e as etapas de 14 em diante se referem à formação de séries homólogas dos produtos do acceptor (maltose). Dentre as reações de acceptor as etapas 10 e  $14+2xj$  são referentes à terminação da cadeia. Já a etapa 12 se refere à terminação de cadeia pela transferência de cadeia ao solvente ( $H_2O$ ). Segundo os autores (Heincke *et al.*, 1999), a sacarose não pode ser considerada como acceptor.

O mecanismo de inserção na presença de aceptores proposto por Robyt e Walseth (1978) é apresentado na Figura 8.2 :

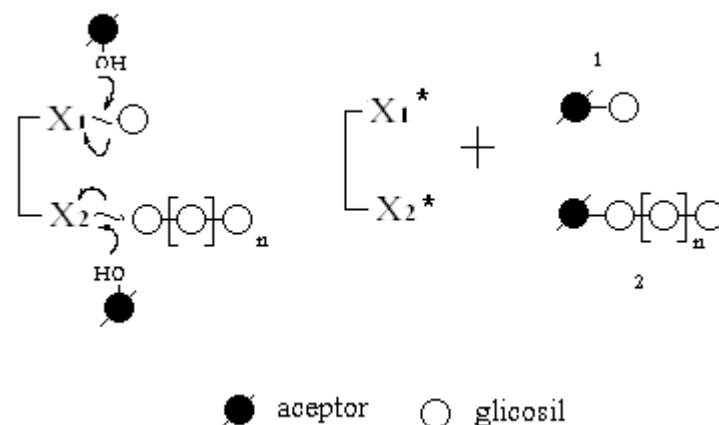


Figura 8.2 – Mecanismo de inserção para a síntese dextrana na presença de aceptores: (1) produto do aceptor, (2) cadeia de dextrana com o aceptor ligado em sua extremidade reductora ( $X_1$  e  $X_2$  são os sítios ativos da enzima).

De acordo com o mecanismo de inserção, apresentado na Figura 8.2, a terminação da cadeia de dextrana se dá devido ao ataque nucleofílico do aceptor ao complexo dextrana-enzima. Segundo este mecanismo, o aceptor é inserido na extremidade reductora da cadeia fazendo com seu crescimento seja interrompido e o sítio ativo da enzima seja liberado para o início de uma nova cadeia. De acordo com o mecanismo apresentado na Figura 8.2, a presença de aceptores no meio reacional pode limitar o crescimento da cadeia, reduzindo assim a massa molar do produto formado.

### 8.3 - Aplicação do método dos momentos à síntese enzimática de dextrana

As principais propriedades que descrevem um polímero são sua massa molar média numérica ( $\overline{M}_n$ ), sua massa molar média ponderal ( $\overline{M}_w$ ) e seu índice de polidispersidade. A modelagem matemática é uma ferramenta bastante poderosa para o projeto e otimização de reatores. No caso de reatores poliméricos, além das características do processo é importante que o modelo seja capaz de prever ou ao menos estimar a massa

molar do produto, uma vez que as aplicações de produtos poliméricos são absolutamente dependentes de sua massa molar.

A dextrana é um polímero de glicose obtido a partir da sacarose, tendo como promotora da síntese a enzima dextrana-sacarase. Sendo assim, a dextrana é denominada um biopolímero e suas aplicações, conforme descrito no Capítulo 2, são também totalmente dependentes de sua massa molar. Dessa forma, a estimativa da massa molar da dextrana em reatores enzimáticos é uma melhoria necessária aos modelos, que até então são baseados em rendimentos em termos do consumo de sacarose.

O mecanismo de síntese da dextrana a partir da sacarose tendo a dextrana-sacarase como promotora da síntese segue o mecanismo de inserção (Robyt e Walseth, 1978). O mecanismo de inserção é similar à polimerização por coordenação em sistemas químicos. Dessa forma, o método dos momentos (Ray, 1972) para polimerização química foi adaptado para a modelagem de um reator batelada para estimativa da massa molar da dextrana. O modelo final é constituído das equações para o balanço de massa do reator batelada apresentadas no trabalho de Heincke *et al.* (1999), acrescidas das equações diferenciais para cálculo da massa molar do produto. A maltose é utilizada como acceptor para controle da massa.

Considerando uma reação genérica de polimerização em um reator batelada tem-se:



A etapa de iniciação é dada por:

$$\frac{d[P_1 \cdot]}{dt} = -k_p [M_m] \cdot [P_1 \cdot] \quad (8.2)$$

A etapa de propagação é dada por:

$$\frac{d[P_n \cdot]}{dt} = -k_p [M_m] \cdot ([P_n \cdot] - [P_{n-1} \cdot]) \quad (8.3)$$

O consumo de monômero é dado por:

$$\frac{d[M_m]}{dt} = -k_p \cdot [M_m] \sum_{n=1}^{\infty} [P_n \cdot] \quad (8.4)$$

Por definição, a massa molar média numérica ( $\overline{Mn}$ ) em uma distribuição polimérica é a quantidade de unidades monoméricas polimerizadas dividido pelo número total de cadeias dentro do sistema. Em termos de momentos da distribuição a massa molar média numérica é dada por:

$$\overline{Mn} = \frac{\mu_1}{\mu_0} Mw \quad (8.5)$$

Onde:

$\mu_1 / \mu_0$  = número médio de unidades monoméricas polimerizadas na cadeia polimérica

Mw = massa molar do monômero

A massa molar média ponderada ( $\overline{Mw}$ ) é obtida pelo somatório da quantidade de unidades monoméricas polimerizadas multiplicadas respectivamente pelo número de unidades monoméricas presentes em cada cadeia dividido pela soma total de unidades monoméricas polimerizadas. Pela definição, do método dos momentos a massa molar média ponderada é dada por:

$$\overline{M_w} = \frac{\mu_2}{\mu_1} M_w \quad (8.6)$$

Onde:

$\mu_2/\mu_1$  = média ponderada de unidades monoméricas polimerizadas

A massa molar média numérica e ponderada de um sistema polimérico pode ser obtida usando os três primeiros momentos da distribuição, incluindo o momento de ordem zero. Para se obter cada um dos momentos é necessário conhecer o mecanismo cinético da polimerização. O mecanismo utilizado neste trabalho é apresentado na Figura 8.1. Como a dextrana é um biopolímero, sua síntese é realizada em condições isotérmicas e pH controlado. Para este modelo foram consideradas as condições para as quais as constantes cinéticas foram obtidas: pH 5,4 à 25°C para enzima obtida da espécie nativa (Heincke *et al.*, 1999) e pH 5,2 e à 25 °C para a enzima obtida da espécie mutante (Capítulo 7).

Neste trabalho foram utilizadas as constantes cinéticas obtidas por Heincke *et al.* (1999) para a enzima obtida da espécie nativa e a as constantes apresentadas no Capítulo 7, para a enzima obtida a partir da espécie mutante. O mecanismo completo proposto por Heincke *et al.* (1999) é constituído de 86 constantes cinéticas. Algumas delas podem ser inter-relacionadas enquanto outras não.

Neste trabalho, as etapas de terminação e propagação da síntese de dextrana foram cuidadosamente estudadas com base no mecanismo proposto por Heincke *et al.* (1999) e no mecanismo de inserção na presença de aceptores, apresentado na Figura 8.2. Este estudo cuidadoso visava a identificação e aplicação das etapas necessárias para a predição da massa molar de dextrana em um reator batelada, utilizando maltose como acceptor para controlar a massa molar do produto.

De acordo com o mecanismo de inserção, a cadeia de dextrana cresce segundo os seguintes passos:



Onde:

EG<sub>i</sub>= complexo enzima cadeia crescente

F = frutose

Conforme a reação se processa, a quantidade de frutose aumenta no reator. Apesar de ser um acceptor fraco, ao atingir concentrações elevadas, a frutose pode agir como acceptor.

De acordo com a Figura 8.1, o complexo enzima-dextrana pode reagir com a frutose, a sacarose, a H<sub>2</sub>O e aceptores. Exceto para a sacarose (etapa 5), em todas as outras reações o complexo EG<sub>i</sub> pode ser formado novamente e a cadeia de dextrana continua seu crescimento. No caso da água, a reação pode ser terminada pela transferência de cadeia para o solvente. Nos outros casos, os produtos formados (FG e AG<sub>j+1</sub>) são classificados como produtos do acceptor. No processo estudado, o acceptor utilizado é a maltose e seu produto principal é a panose (AG). Embora, segundo o trabalho de Heincke *et al.* (1999), a formação do produto secundário do acceptor (P4) não seja considerada, para os estudos realizados com a enzima obtida da espécie mutante este produto atinge concentrações mensuráveis e deve ser considerado no modelo conforme equacionamento apresentado no Capítulo 7.

Para a modelagem do reator batelada com predição da massa molar de dextrana as seguintes hipóteses foram consideradas:

- Mistura perfeita (reator homogêneo)
- Só há formação de panose e P4 como produtos do acceptor, sendo que para a enzima obtida a partir da espécie nativa só há formação de panose
- Reação isotérmica (25 °C)
- Atividade enzimática constante
- Frutose, maltose, panose e P4 agindo como aceptores

Para aplicar o método dos momentos em um reator batelada para síntese enzimática de dextrana é importante ressaltar que em um sistema polimérico dois tipos de cadeia polimérica podem estar presente: cadeias de polímero “vivo”, que são as cadeias que estão crescendo no sistema através da incorporação de unidades monoméricas ( $Y_n$ ) e as cadeias de polímero “morto”, que são aquelas que o crescimento foi interrompido ( $D_n$ ). No modelo são consideradas as contribuições do polímero vivo e morto na massa molar do produto. De forma genérica, as contribuições do polímero vivo e morto são dadas pelas equações a seguir:

*Momentos para o polímero vivo*

$$Y_k = \sum_{n=1}^{\infty} n^k \cdot [P_n \cdot] \quad (8.9)$$

*Momentos para o polímero morto*

$$D_k = \sum_{n=1}^{\infty} n^k \cdot [D_n] \quad (8.10)$$

Em reações de polimerização por adição, a contribuição dos momentos descritos pelas equações 8.9 e 8.10 são:

$$\frac{dY_0}{dt} = 2k_i[I] \quad (8.11)$$

$$\frac{dY_1}{dt} = 2k_i[I] + k_p[S]Y_0 + k_{tr}[T](Y_0 - Y_1) \quad (8.12)$$



$$\frac{dY_2}{dt} = k_{rt} Y_0 [T] + 2k_i [I] + k_p [S] (2Y_1 + Y_0) + k_{rt} [T] (Y_0 - Y_1) \quad (8.13)$$

$$\frac{dD_0}{dt} = k_{rt} Y_0 [T] \quad (8.14)$$

$$\frac{dD_1}{dt} = k_{rt} Y_1 [T] \quad (8.15)$$

$$\frac{dD_2}{dt} = k_{rt} Y_2 [T] \quad (8.16)$$

Onde:

T = F, H<sub>2</sub>O ou AG<sub>j+1</sub>

I = iniciador

Na síntese enzimática de dextrana, o uso de iniciadores não é necessário e a energia requerida para iniciar a polimerização é fornecida pela quebra da sacarose promovida pela ação da dextrana-sacarase. Dessa forma, a concentração do iniciador é nula e portanto a equação 8.11 é também nula. Entretanto, isso não significa que o momento zero seja também nulo. No caso de polimerização por coordenação, o momento zero é igual à concentração de catalisador, que no caso da síntese enzimática de dextrana é a concentração de enzima.

De acordo com as equações 8.11 e 8.12, o primeiro e o segundo momento do polímero vivo são influenciados pela taxa de iniciação ( $k_i$ ), taxa de propagação ( $k_p$ ) e a taxa de terminação ( $k_t$ ). A terminação, ou interrupção do crescimento da cadeia de dextrana ocorre devido à transferência da cadeia para a molécula  $T$ . A taxa de iniciação é nula. A taxa de propagação envolve as etapas apresentadas nas equações 8.7 e 8.8. A taxa de

terminação envolve as demais etapas apresentadas na Figura 8.1 e pode ocorrer pela transferência de cadeia para H<sub>2</sub>O, frutose, aceptores ou produtos do acceptor (AG<sub>j+1</sub>).

Quando o método dos momentos é aplicado a um polímero químico, todas as taxas envolvidas (iniciação, propagação e terminação) são consideradas separadamente tal como apresentado nas equações de 8.11 a 8.16. Entretanto, no caso da síntese enzimática de dextrana, há um equilíbrio entre a taxa de propagação (etapas de 1 a 3 nas equações 8.7 e 8.8) e as etapas de terminação. Dessa forma, a taxa global deve ser levada em consideração. A contribuição dos momentos apresentada nas equações de 8.11 à 8.16 para a síntese enzimática de dextrana são apresentados a seguir:

$$\frac{dY_0}{dt} = \frac{dE}{dt} = 0 \quad (8.17)$$

$$\frac{dY_1}{dt} = \frac{Y_0 \cdot p_{24} \cdot S}{(p_{70} \cdot S \cdot F + p_{71} \cdot S \cdot M + p_{72} \cdot S \cdot P + p_{73} \cdot S \cdot P_4 + p_{24} \cdot p_{12} \cdot S)} \quad (8.18)$$

$$\frac{dY_2}{dt} = \frac{p_{24} \cdot S \cdot (2 \cdot Y_1 + Y_0)}{(p_{70} \cdot S \cdot F + p_{71} \cdot S \cdot M + p_{72} \cdot S \cdot P + p_{73} \cdot S \cdot P_4 + p_{24} \cdot p_{12} \cdot S)} \quad (8.19)$$

$$\frac{dD_0}{dt} = p_{24} \cdot p_{12} \cdot S \cdot Y_0 + p_{70} \cdot S \cdot F \cdot Y_0 + p_{71} \cdot S \cdot M \cdot Y_0 + p_{72} \cdot S \cdot P \cdot Y_0 + p_{73} \cdot S \cdot P_4 \cdot Y_0 \quad (8.20)$$

$$\frac{dD_1}{dt} = p_{24} \cdot p_{12} \cdot S \cdot Y_1 + p_{70} \cdot S \cdot F \cdot Y_1 + p_{71} \cdot S \cdot M \cdot Y_1 + p_{72} \cdot S \cdot P \cdot Y_1 + p_{73} \cdot S \cdot P_4 \cdot Y_1 \quad (8.21)$$

$$\frac{dD_2}{dt} = p_{24} \cdot p_{12} \cdot S \cdot Y_2 + p_{70} \cdot S \cdot F \cdot Y_2 + p_{71} \cdot S \cdot M \cdot Y_2 + p_{72} \cdot S \cdot P \cdot Y_2 + p_{73} \cdot S \cdot P_4 \cdot Y_2 \quad (8.22)$$

Onde:

$$Y_0 = E$$

Nas equações de 8.18 a 8.22 as constantes, exceto  $p_{12}$  já foram apresentadas nos Capítulos 5 e 7, para ambas as enzimas utilizadas neste trabalho. De acordo com a Figura 8.1 a constante  $p_{12}$  é a taxa de terminação para a transferência de cadeia para o solvente ( $H_2O$ ). Entretanto não apenas este tipo de terminação foi considerado no modelo, sendo consideradas também a terminação por transferência de cadeia para o acceptor (maltose) e para o produto primário do acceptor (panose). Estas considerações não estão muito claras nas equações de 8.17 a 8.22, onde são utilizados parâmetros agrupados. As definições das constantes cinéticas encontradas no trabalho de Heincke *et al.* (1999) ajudam a compreender as etapas de transferência de cadeia para a maltose e para a panose e  $P_4$ . Estas definições são apresentadas a seguir:

$$p_{70} = p_{26} \cdot p_{41}$$

$$p_{26} = \frac{(p_9 + p_{10}) \cdot p_4}{(p_{-4} + p_9 + p_{10})}$$

$$p_{71} = p_{27} \cdot p_{41}$$

$$p_{27} = \frac{(p_{13} + p_{14}) \cdot p_6}{(p_{-6} + p_{13} + p_{14})}$$

$$p_{72} = p_{28} \cdot p_{41}$$

$$p_{28} = \frac{(p_{15} + p_{16}) \cdot p_7}{(p_{-7} + p_{15} + p_{16})}$$

$$p_{73} = p_{29} \cdot p_{41}$$

$$p_{29} = \frac{(p_{17} + p_{18}) \cdot p_8}{(p_{-8} + p_{17} + p_{18})}$$

$$p_{24} = \frac{p_1 \cdot p_2}{p_{-1} - p_2}$$

$$p_{41} = \frac{p_{24}}{p_{25}}$$

$$p_{25} = p_3 + (p_{11} + p_{12}) \cdot H_2O$$

A ação da frutose, da maltose e da panose como aceptores é descrita pelas constantes  $p_{70}$ ,  $p_{71}$  e  $p_{72}$  e  $p_{73}$  respectivamente. Estas constantes envolvem  $p_{26}$ ,  $p_{27}$ ,  $p_{28}$ ,  $p_{29}$  e  $p_{41}$  tal como apresentado acima. Dessa forma, a contribuição dos momentos do polímeros morto para a terminação das cadeias são: transferência para a água e

transferência para os aceptores (frutose, maltose e panose e P4). A constante  $p_{25}$  pode ser facilmente obtida utilizando as relações entre as 86 constantes definidas por Heincke *et al.* (1999) e seu valor é:  $2,54 \times 10^{-6}$  (l/mM), para a enzima obtida a partir da espécie nativa e  $4,46 \times 10^{-7}$  (l/mM), para a espécie mutante. Já a constante  $p_{12}$ , é uma porcentagem de  $p_{25}$ . Entretanto a constante  $p_{12}$  deve ser pequena para que dextrana possa ser produzida no sistema. O valor de  $p_{12}$  foi estimado em  $1,0 \times 10^{-8}$  (l/mM), uma vez que  $p_3$  deve ser grande, pois faz parte da constante de propagação e  $p_{11}$  pode ser considerado nulo (Kitaoka e Robyt, 1999).

Integrando as equações de 7.1 a 7.5 juntamente com as equações de 8.17 a 8.22 no tempo é possível resolver o sistema para  $\overline{Mn}$  e  $\overline{Mw}$  para a síntese enzimática de dextrana de acordo com:

$$\overline{Mn} = \frac{(Y_1 + D_1)}{(Y_0 + D_0)} MW \quad (8.23)$$

$$\overline{Mw} = \frac{(Y_2 + D_2)}{(Y_1 + D_1)} MW \quad (8.24)$$

Onde:

$$Mw = 162 \text{ g/mol}$$

A polidispersidade é dada por:

$$\lambda = \frac{\overline{Mw}}{\overline{Mn}} \quad (8.25)$$

## 8.4 - Resultados

O método dos momentos foi então aplicado a um reator batelada sendo utilizada as constantes obtidas por Heincke *et al.* (1999) para a síntese com a enzima obtida da espécie nativa e as constantes obtidas neste trabalho (síntese com a enzima da espécie mutante). O

modelo final é constituído das equações de 7.1 a 7.5 e 8.17 a 8.22, sendo que para a síntese enzimática com a enzima obtida a partir da espécie nativa a concentração de P4 é considerada nula. As condições iniciais dos momentos são dadas a seguir:

$$Y_0|_{t=0} = E$$

$$Y_1|_{t=0} = Y_2|_{t=0} = 0$$

$$D_0|_{t=0} = D_1|_{t=0} = D_2|_{t=0} = 0$$

A concentração inicial da enzima foi mantida constante e igual a 250 UI/L e 1500 UI/mL para as enzimas obtidas a partir da espécie nativa e a partir da espécie mutante, respectivamente. As concentrações iniciais de maltose e sacarose foram obtidas através de um planejamento fatorial completo em estrela considerando duas variáveis (maltose e sacarose) de acordo com a metodologia apresentada em Barros Neto *et al.* (1995). A concentração dos demais carboidratos (frutose, panose e P4) são nulas no início da batelada. Os níveis de maltose e sacarose utilizados nas simulações são apresentados na Quadro 8.1. Estes níveis foram utilizados por englobarem a faixa de concentrações estuda por Heincke *et al* (1999).

Quadro 8.1 – Nível das variáveis estudadas

Nível I	Sacarose (m Mol/l)	Maltose (m Mol/l)
- $\alpha$	150,0	0,0
-1	201,0	59,0
0	325,0	200,
+1	449,0	341,0
+ $\alpha$	500,0	400,0

Nove simulações foram realizadas utilizando o planejamento em estrela com os níveis apresentados na Quadro 8.1. As respostas do sistema foram analisadas através de gráficos de superfície de resposta, sendo analisadas as seguintes respostas: efeito da

concentração de maltose e sacarose na massa molar da dextrana e a polidispersidade do produto para a síntese com a enzima obtida a partir da espécie nativa e a obtida a partir da espécie mutante. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras de 8.3 a 8.6. O ponto do planejamento experimental, correspondente à síntese na ausência de maltose foi desconsiderado para a construção das superfícies de resposta. Isso foi feito porque a massa molar obtida pelo modelo para a dextrana, quando a síntese enzimática é realizada na ausência de maltose, é da ordem de  $10^6$ . A inclusão deste ponto, distorce o gráfico, comprometendo sua interpretação adequada.

A Figura 8.3 apresenta a massa molar média numérica para o final da síntese em função da concentração inicial de maltose e sacarose.

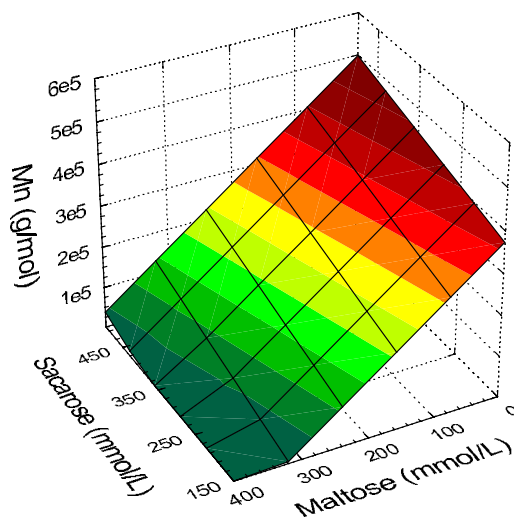


Figura 8.3 – Massa molar média numérica ( $\overline{Mn}$ ), no final da síntese, para síntese enzimática com a enzima obtida da espécie nativa (consumo total de sacarose).

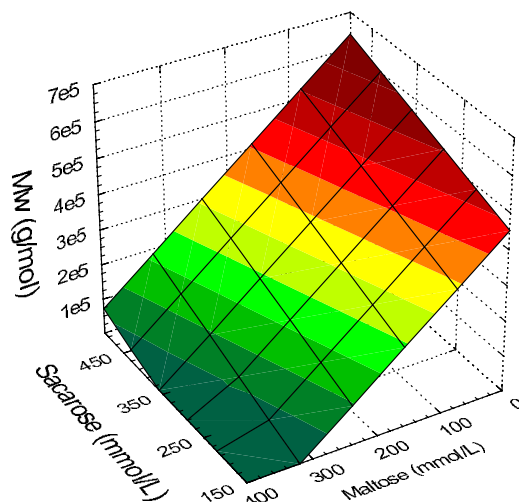


Figura 8.4 – Massa molar média ponderal ( $\overline{M}_w$ ), no final da síntese, para síntese enzimática com a enzima obtida a partir da espécie nativa (consumo total de sacarose).

De acordo com as Figuras 8.3 e 8.4, quanto maior a concentração de maltose, menor é a massa molar da dextrana produzida. Já com a diminuição da concentração inicial de maltose, a massa molar da dextrana aumenta. Este comportamento é esperado pois quanto maior a concentração maltose, maior a concentração de panose e outros oligossacarídeos produzidos. A Figura 8.5 apresenta a polidispersidade com função da concentração inicial de maltose e sacarose no reator:

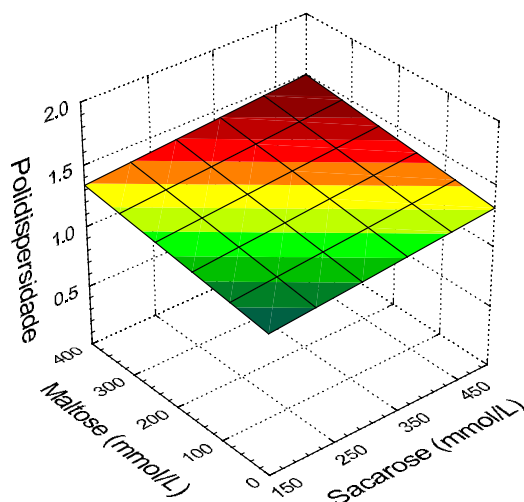


Figura 8.5 - Polidispersidade para a síntese enzimática a partir da enzima obtida com a espécie nativa.

De acordo com a Figura 8.5 quanto maior a concentração inicial de maltose maior a polidispersidade. Os valores de polidispersidade apresentados pelo modelo são satisfatórios (menores que 2) e estão de acordo com o esperado para a faixa de massa molar de dextrana prevista pelo modelo, segundo dados da *American Polymer Standard Corporation* (não apresentados). Os resultados obtidos com a simulação do modelo com as constantes cinéticas para síntese com a enzima da espécie mutante são apresentados nas Figuras de 8.6 a 8.8, a seguir:

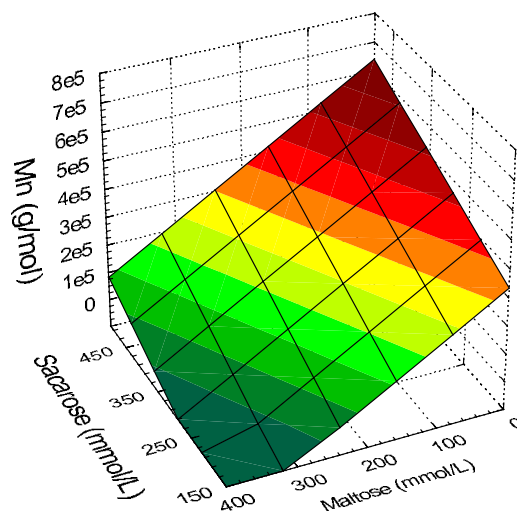


Figura 8.6 – Massa molar média numérica ( $\overline{M}_n$ ), no final da síntese, para síntese enzimática com a enzima obtida da espécie mutante (consumo total de sacarose).

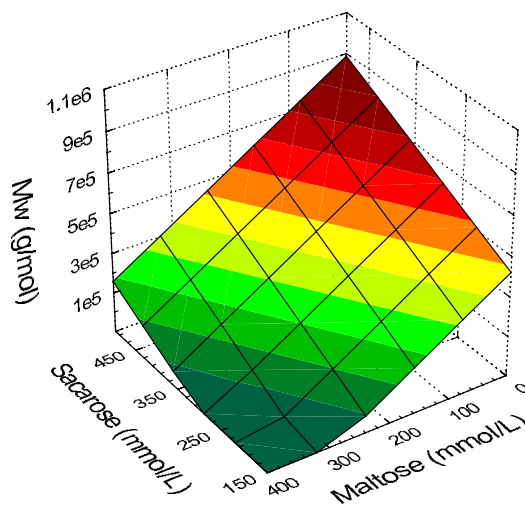


Figura 8.7 – Massa molar média ponderal ( $\overline{M}_w$ ), no final da síntese, para síntese enzimática com a enzima obtida da espécie mutante (consumo total de sacarose).



Os resultados apresentados nas Figuras 8.6 e 8.7 mostram um comportamento semelhante aos apresentados nas Figuras 8.3 e 8.4 (simulação com as constantes para a enzima da espécie nativa). Entretanto, observa-se que os valores de massa molar obtidos para simulação com as constantes cinéticas para a enzima da espécie mutante apresentam valores inferiores de massa molar para a mesma faixa de concentração de substratos. Esse comportamento pode ser atribuído à maior atividade enzimática utilizada nas simulações com as constantes cinéticas para a enzima da espécie mutante.

Observa-se ainda que quanto maior a razão maltose/sacarose menor o peso molecular da dextrana. A figura 8.8 apresenta a polidispersidade com função da concentração inicial de maltose e sacarose no reator:

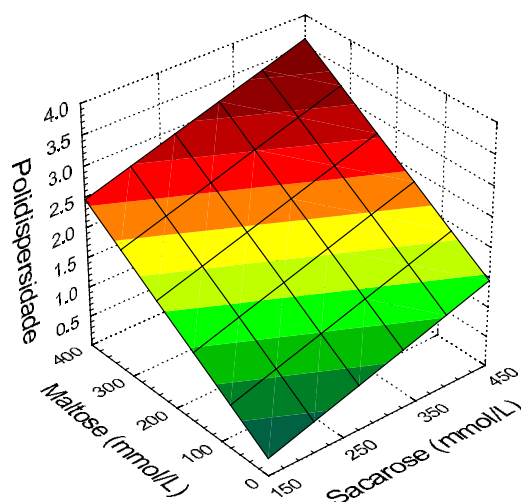


Figura 8.8– Polidispersidade para a síntese enzimática a partir da enzima obtida com a espécie mutante.

De acordo com a Figura 8.8 quanto maior a concentração inicial de maltose maior a polidispersidade. Os valores de polidispersidade obtidos com o modelo para a síntese com a enzima obtida a partir da espécie mutante são maiores que os obtidos com o modelo para síntese com a enzima obtida a partir da síntese com a espécie nativa (Figura 8.5).

## **8.5 - Conclusões**

Neste trabalho um modelo matemático com base no método dos momentos é proposto para a predição da massa molar de dextrana em sínteses enzimáticas. Algumas simulações foram feitas para estudar o comportamento do reator batelada. Diferentemente dos modelos utilizados para síntese de polímeros químicos, o desenvolvimento do modelo para uma síntese bioquímica requer a consideração do equilíbrio que ocorre entre taxa de propagação e terminação da síntese (Figura 8.1). Este tipo de equilíbrio não acontece em sistemas químicos. Dessa forma, a aplicação do método dos momentos para biopolímeros é mais complexa que para polímeros químicos, onde todas as etapas são irreversíveis.

Os resultados obtidos com a simulação de um reator batelada para síntese enzimática de dextrana (Figuras de 8.3 a 8.8) demonstram que o aumento da concentração de maltose (acceptor) causa uma diminuição na massa molar da dextrana. Esse resultado é consistente com o mecanismo de inserção na presença de aceptores (Figura 8.2), onde a terminação da cadeia se dá pelo ataque nucleofílico do acceptor, ou produto do acceptor, à extremidade redutora da cadeia de dextrana. Segundo esse mecanismo, o crescimento da cadeia é interrompido pelo desacoplamento da cadeia do sítio ativo da enzima, permitindo assim a formação de uma nova cadeia de dextrana. Dessa forma, de acordo com o modelo mecanístico utilizado neste trabalho, uma maior concentração de maltose aumentaria a taxa de terminação da polimerização, diminuindo assim a massa molar da dextrana.

O modelo desenvolvido neste capítulo, foi então utilizado para otimização das condições ótimas de síntese (via redes neurais). Dextrana de diversas massas molares foram sintetizadas sob condições otimizadas, sendo posteriormente caracterizadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) para validação do modelo matemático. Os resultados desta validação são apresentados no Capítulo 9.



## **Capítulo 9**

### **Validação do modelo quanto a distribuição da massa molar de dextrana**

---

#### **9.1 - Introdução**

O modelo apresentado no Capítulo 8 foi utilizado para gerar, a partir dos dados de entrada (concentração inicial de maltose e sacarose), os dados de saída ( $\overline{M_w}$  e  $\overline{M_n}$ ), os quais foram utilizados para treinar uma rede neural para obtenção das condições iniciais do reator de acordo com a especificação desejada do produto final ( $\overline{M_w}$  e  $\overline{M_n}$ ).

Redes neurais são métodos matemáticos baseados na estrutura neurológica do cérebro. Trata-se portanto de uma técnica de inteligência artificial, cuja característica é “aprender” a lógica existente em um determinado conjunto de dados e com isso prever valores diferentes daqueles utilizados para o treinamento da rede. O emprego de redes neurais, na predição de parâmetros envolvidos em processos de síntese, tem se desenvolvido recentemente. Esta ferramenta matemática permite a otimização com valores pontuais ao invés de faixas de operação, tal como é obtida com a otimização por análise de superfície de resposta.

A determinação de parâmetros através de redes neurais é de grande valia, pois permite, a partir de um conjunto de dados de entrada, prever os valores de saída, após o treinamento da rede.

Por ser baseada em um conjunto de dados de treinamento específico, uma rede neural só tem validade para condições nas mesmas faixas de operação utilizadas para a obtenção dos dados de treinamento. Visto que a maioria dos processos enzimáticos possuem condições operacionais bem determinadas, esse fato não inviabiliza a utilização de redes neurais em modelos híbridos.

O treinamento da rede é a parte mais trabalhosa, pois tanto a topologia da rede como também o ajuste de seus pesos, através do treinamento, são fatores fortemente

dependentes do conjunto de dados utilizados. Entretanto, uma vez treinada uma rede para uma determinada aplicação, a mesma pode ser acoplada a controladores ou instalada em uma calculadora (do tipo HP) possibilitando a tomada de decisão através de medidas diretas na linha de produção.

Após o treinamento da rede, esta foi utilizada para obtenção das condições iniciais do reator batelada para a síntese de dextrana com massa molar controlada. Foram realizadas duas sínteses utilizando-se a enzima obtida da espécie mutante (*L.mesenteroides* B512FMC) e três sínteses utilizando-se a enzima obtida a partir da espécie nativa (*L.mesenteroides* B512F). As sínteses foram realizadas em reator batelada em escala de bancada, sendo utilizado um reator de vidro encamisado de volume total de 250 mL. As sínteses foram realizadas a 25 °C (reator termostatizado), sendo o volume de síntese de 150 mL e pH 5,2, para as sínteses com a enzima da espécie mutante e pH 5,4 para as sínteses realizadas com a enzima da espécie nativa.

Durante as sínteses, foi observado que o meio reacional tornava-se turvo logo após a adição da enzima. Após o término da reação, as dextranas foram precipitadas utilizando-se dois volumes de etanol anidro e centrifugadas. Os precipitados apresentaram um aspecto de gel translúcido. A precipitação foi seguida de lavagem das amostras por duas vezes com etanol 67 %. Após a lavagem, foi adicionada acetona ao precipitado, o qual foi macerado em almofariz e seco em estufa a 60 °C até que toda a água fosse removida. Para todas as amostras foi obtido um precipitado branco, duro e de difícil maceração.

## 9.2 – Redes neurais

Conforme mencionado anteriormente, redes neurais são modelos computacionais que têm a capacidade de aprender ou adaptar-se. São baseadas no sistema neurológico humano e sua operação é baseada em processamento paralelo, derivado do modelo paralelo distribuído (PDP). Em uma rede artificial as unidades de processamento simples (neurônios) se comunicam entre si enviando sinais através de um grande número de pesos (conexões). A cada neurônio é atribuída uma ativação (saída); e para cada conexão é atribuído um peso, o qual determinará o efeito do sinal da unidade  $j$  (entrada) na unidade  $i$  (saída) através de uma regra de propagação.

A forma na qual as conexões são arrançadas e a natureza das conexões determinam

a estrutura da rede neural. Os pesos das conexões, por sua vez, são ajustados (ou treinados) para atingir os valores desejados e o ajuste destes pesos é dado pelo algoritmo de aprendizagem da rede. Dependendo de sua estrutura e do algoritmo de aprendizagem, a rede recebe uma denominação correspondente (Bulsari, 1995).

Dependendo de sua estrutura, as redes neurais podem ser divididas em redes *feedforward* e recorrentes (*recurrent*) (Pham, 1995).

**Redes feedforward:** neurônios são agrupados em camadas. O fluxo de informação entre os neurônios se dá de uma maneira unidirecional na direção da entrada para a saída. Este tipo de rede é bastante útil para predições nas quais os dados de saída em um dado instante são função somente dos dados de entrada em um dado instante.

**Redes recorrentes:** Neste tipo de rede alguns dados de saída são usados como entrada de alguns neurônios de camadas anteriores. Desta forma, o fluxo de informação pode seguir bidirecionalmente.

A forma com que a rede é treinada pode ser dividida em :

**Treinamento supervisionado:** O algoritmo ajusta os pesos de conexão entre os neurônios de acordo com a diferença entre os resultados esperados e os resultados preditos pela rede. Desta forma, necessita do provimento de dados de entrada e saída conhecidos.

**Treinamento não supervisionado:** este tipo de algoritmo não necessita de dados de saída conhecidos. Para o treinamento da rede, apenas os dados de entrada são apresentados à rede que automaticamente adapta os pesos das conexões entre os neurônios. Este tipo de rede não será abordado nesta tese e maiores detalhes podem ser obtidos em Pham (1995).

### 9.2.1 - Backpropagation

A técnica de *backpropagation* é uma das formas mais populares de treinamento de redes neurais, em especial de MLP's (*multi-layer perceptron*) (Tsaptsinos, 1995).

O MLP consiste de um certo número de neurônios (também chamados de nós, células ou unidades) distribuídos em camadas. Em um MLP do tipo *feed forward*, os neurônios de uma camada se conectam somente com os neurônios da camada seguinte, não havendo conexões recorrentes, saltos de camada e conexões entre neurônios de uma mesma camada. A função de cada neurônio é de receber, processar e transmitir informações relativas à correlação entre os dados de entrada e saída. A Figura 9.1 apresenta um esquema geral da função de um neurônio.

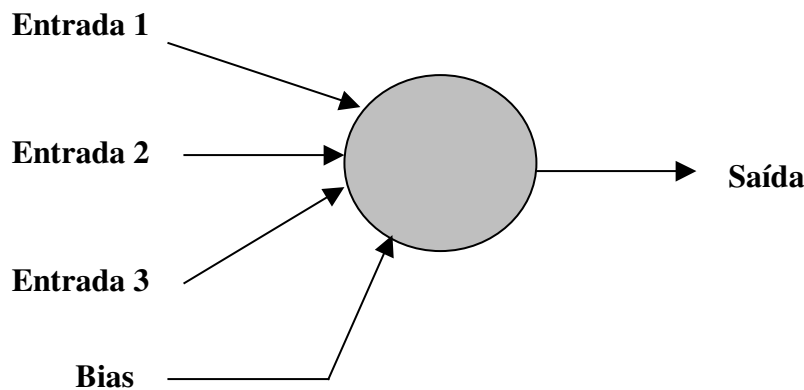


Figura 9.1 - Esquema geral da função de um neurônio.

O *bias* (tendência) é uma entrada adicional que possui valor fixo igual a 1. Os neurônios de entrada e de saída são neurônios que se comunicam com o “mundo exterior”, sendo que o primeiro recebe a informação e o outro transmite a informação final que é predita pela rede. Os neurônios das camadas ocultas (camadas entre as camadas de entrada e saída) não têm comunicação com o “mundo externo”. A Figura 9.2 mostra um esquema de uma rede neural com uma camada oculta.

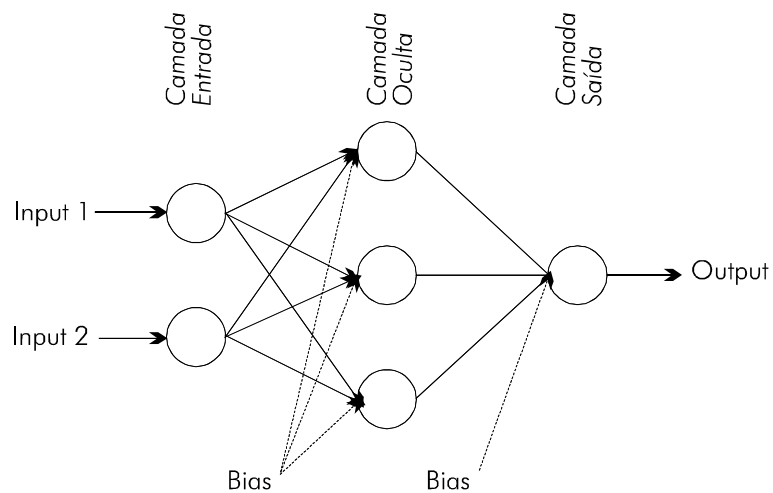


Figura 9.2. Esquema de uma rede neural com uma camada oculta.

A técnica de treinamento da rede em *backpropagation* é feita de forma supervisionada, sendo que devem ser fornecidos dados de entrada e saída para a rede para que o treinamento e o ajuste dos pesos de conexão entre os neurônios possa ser feito.

### 9.2.2 - Algoritmo de Backpropagation

O algoritmo de *backpropagation* aprende a reconhecer e reproduzir padrões entre os dados de entrada e saída, através de um processo iterativo no qual os pesos das conexões entre os neurônios são ajustados de forma a minimizar um certo critério de erro. As etapas básicas do algoritmo de *backpropagation* são apresentadas na Figura 9.3.



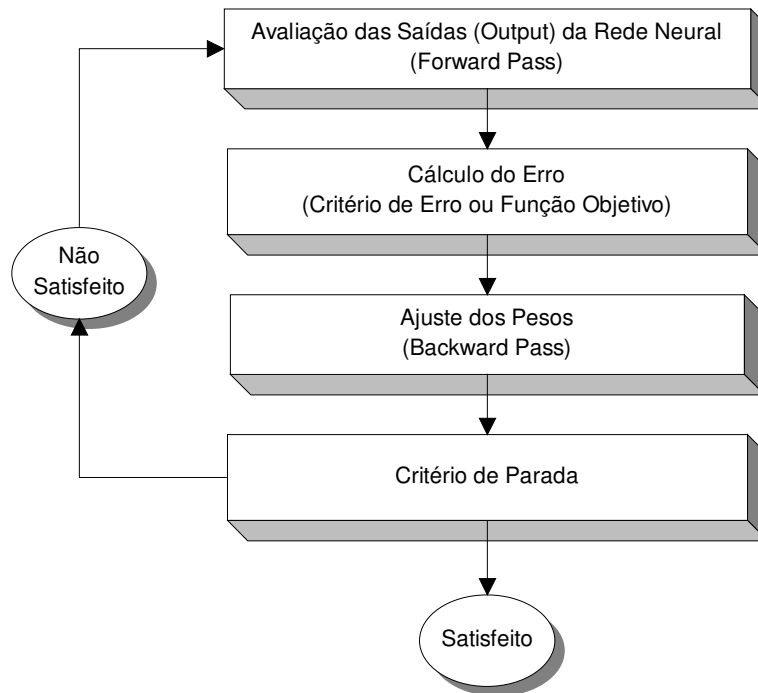


Figura 9.3 - Algoritmo geral para resolução de redes neurais.

A primeira etapa do treinamento da rede neural consiste na avaliação dos resultados preditos pela rede usando os dados de entrada fornecidos e os pesos das conexões entre os neurônios. Na primeira iteração, os pesos são iniciados randomicamente.

Na camada de entrada (entrada), os valores de saída para a primeira camada oculta é o próprio valor do dado de entrada, ou seja:

$$z_k = x \quad 9.1$$

Onde:

$x$  dado de entrada

$z_k$  neurônio da camada de entrada

O cálculo da saída de cada neurônio da camada oculta é gerado por uma transformação não-linear da soma de todos os produtos (entradas do neurônio multiplicados pelos pesos associados à cada entrada) mais o termo de *bias*.

$$z_l = \frac{1}{1 + \exp\left(-\sum_k z_k \cdot w_{kl} - \theta_l\right)} \quad 9.2$$

Onde

$z_l$  neurônio  $l$  da camada oculta

$w_{kl}$  peso da conexão entre o neurônio  $l$  da camada oculta e o neurônio  $k$  da camada de entrada

$\theta$  bias

No caso de redes com mais de uma camada oculta, as camadas ocultas seguintes são calculadas usando a Equação 9.2, usando o valor de  $z_l$  da camada anterior substituindo a variável  $z_k$ .

A predição gerada pela rede, na camada de saída (*saída*), é dada por uma relação análoga à Equação 9.2.

$$y_m = \frac{1}{1 + \exp\left(-\sum_l z_l \cdot w_{lm} - \theta_m\right)} \quad 9.3$$

Onde:

$y_m$  neurônio  $m$  da camada de saída

$w_{lm}$  peso da conexão entre o neurônio  $l$  da camada oculta e o neurônio  $m$  da camada de entrada

A segunda etapa consiste no cálculo do critério de erro entre os valores preditos pela rede e os resultados conhecidos. A Equação mais utilizada para o cálculo do erro é dado pelo somatório das diferenças ao quadrado entre os valores conhecidos e calculados.

$$\text{Err} = \frac{1}{2} \sum_m (d_m - y_m)^2 \quad 9.4$$

Onde:

$y_m$       valor predito pela rede

$d_m$       valor conhecido

Se o erro calculado está abaixo da tolerância requerida para o treinamento da rede, então o treinamento é terminado e os valores dos pesos entre os neurônios são salvos para posterior utilização quando do uso da rede para predição de dados.

Caso o erro não esteja abaixo da tolerância desejada, então novos valores dos pesos são determinados (fase de ajuste). O método gradiente é utilizado para ajustar propriamente os pesos e bias, sendo que os novos pesos são obtidos a partir da modificação dos mesmo por uma quantidade proporcional ao erro no peso, ou seja:

$$w^{i+1} = w^i + \nabla w^i \quad 9.5$$

$$\nabla w^i = -n \frac{\partial \text{Err}}{\partial w^i} \quad 9.6$$

Para a rede neural, os deltas são calculados de forma diferenciada para a camada de saída e para as camadas ocultas, seguindo as Equações 9.7 e 9.8, respectivamente para as camadas de saída e ocultas.

$$\delta_m = (d_m - y_m) \cdot y_m \cdot (1 - y_m) \quad 9.7$$

$$\delta_1 = z_1 \cdot (1 - z_1) \cdot \sum_m \delta_m \cdot w_{lm} \quad 9.8$$

A partir do cálculo dos deltas, os incrementos nos pesos e nos *bias* são calculados seguindo as relações:

$$\nabla w_{lm} = 2 \cdot \beta \cdot n \cdot \delta_m \cdot z_l \quad 9.9$$

$$\nabla w_{kl} = 4 \cdot \beta^2 \cdot n \cdot \delta_l \cdot z_k \quad 9.10$$

$$\nabla \theta_m = 2 \cdot \beta \cdot n \cdot \delta_m \quad 9.11$$

$$\nabla \theta_1 = 4 \cdot \beta^2 \cdot n \cdot \delta_1 \quad 9.12$$

Onde:

$\beta$  taxa de aprendizado

Os pesos são ajustados segundo a Equação 9.5.

### 9.2.3 - Resolução das redes neurais

Para a resolução das redes neurais usadas neste projeto, um programa em Fortran foi aperfeiçoado usando o algoritmo de *backpropagation*. O programa foi feito de forma a poder utilizar até 10 camadas ocultas e até 200 neurônios nas camadas de entrada, saída e ocultas (200 neurônios por camada).

### 9.3 - Treinamento da rede neural

Conforme mencionado anteriormente, para determinação das condições iniciais do reator (concentração de maltose e sacarose) foi utilizada uma rede neural cujos dados de treinamento foram obtidos a partir do modelo apresentado no Capítulo 8.

Neste trabalho, foi utilizada uma rede *backpropagation* (treinamento supervisionado), sendo utilizado o método de treinamento inverso utilizado por Fernandes (2002). Este procedimento visa possibilitar a obtenção dos dados de entrada do modelo (concentração inicial de maltose e sacarose) a partir dos dados de saída desejados: especificação do produto final ( $\overline{M_w}$  e  $\overline{M_n}$ ). A obtenção destes dados poderia também ser realizada através da simulação do modelo apresentado no Capítulo 8. Entretanto, através do uso de redes neurais é possível diminuir o tempo necessário para obtenção dos dados de entrada desejados, uma vez que simulações baseadas no procedimento de tentativa e erro são eliminadas. O esquema da Figura 9.4 elucida a utilização do modelo para obtenção dos pares de treinamento (dados de entrada e de saída) da rede neural:

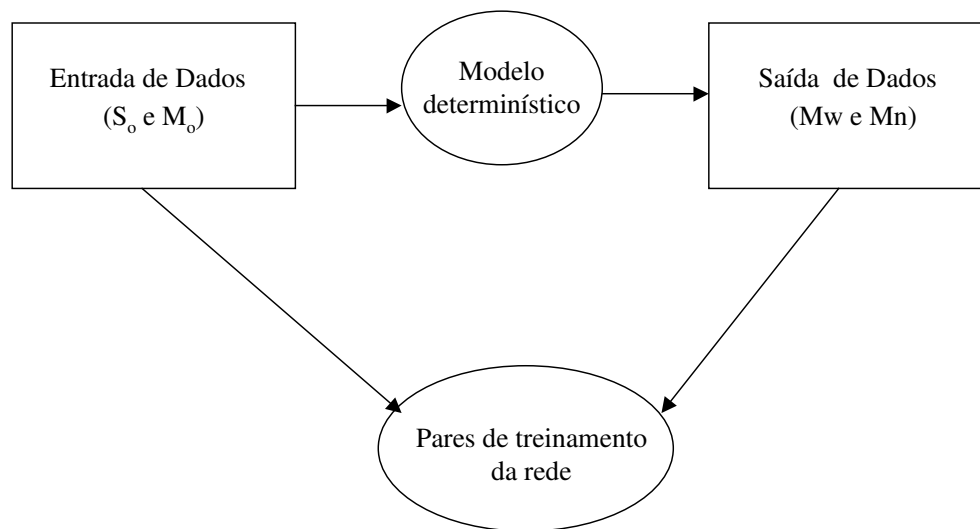


Figura 9.4 – Esquema da utilização do modelo determinístico para obtenção dos pares de treinamento da rede neural.

Neste trabalho os pares treinamento da rede são constituídos das massas molares de dextrana ( $\overline{Mw}$ ) e ( $\overline{Mn}$ ), que são o entrada da rede e das concentrações de sacarose ( $S_o$ ) e maltose ( $M_o$ ), que são o *saída* da rede. Uma rede neural é constituída de no mínimo três camadas:

<i>Entrada</i>	dados de entrada da rede (entrada)
<i>Ocultas</i>	camada intermediária onde são armazenados os pesos da rede (oculta)
<i>Saída</i>	dados de saída da rede ( <i>saída</i> )

O treinamento de uma rede neural consiste em determinar os pesos adequados para obtenção dos dados de saída através da apresentação à rede dos pares de entrada. A camada oculta nada mais é que uma função matemática que transforma os dados de entrada em saída.

Para o treinamento da rede são apresentados diversos pares de entrada e saída até que o erro no cálculo do saída esteja minimizado. É apresentado então à rede um conjunto de pares de teste onde tanto o entrada como o saída são conhecidos. Este conjunto deve ser diferente do utilizado para o treinamento da rede, uma vez que se deseja testar a rede através da comparação do saída fornecido pela rede com o saída esperado. Estando a rede bem treinada, não deve haver diferença significativa entre o saída fornecido pela rede e o esperado. Uma vez treinada a rede, esta pode ser utilizada para obtenção dos saídas a partir de um determinado conjunto de entradas. Neste trabalho, foi utilizada uma rede *backpropagation* com a seguinte topologia:

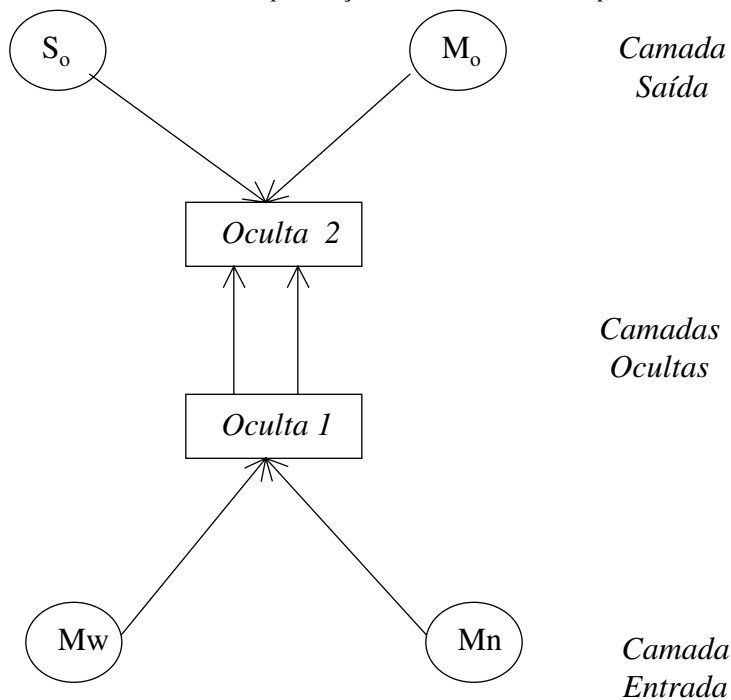


Figura 9.5 – Diagrama da rede neural utilizada neste trabalho para obtenção das condições operacionais do reator batelada para síntese enzimática de dextrana com massa molar controlada.

A topologia da rede foi escolhida com base no erro obtido para diversas topologias testadas com uma e duas camadas oculta e número de neurônios variando de 10 à 50 em cada camada. A rede que apresentou melhor treinamento (menor erro) foi a rede com 15 e 20 neurônios na primeira e na segunda camada oculta respectivamente, segundo esquema apresentado na Figura 9.5. Dessa forma, após o treinamento da rede esta foi utilizada para determinação das condições iniciais do reator batelada (concentração de sacarose e maltose), para obtenção de dextrana com a massa molar desejada.

Para verificação do treinamento da rede foram comparadas as saídas geradas pela rede com os resultados gerados diretamente pelo modelo para 5 massas molares diferentes. Os resultados são apresentados na Figura 9.6.

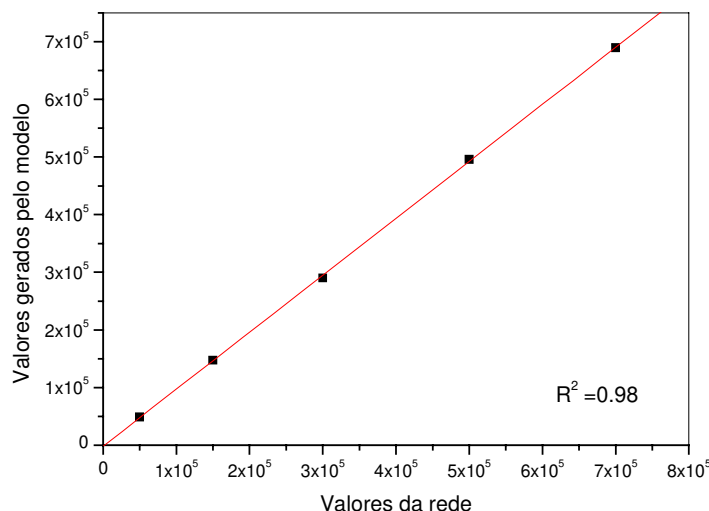


Figura 9.6 – Comparação entre os valores de massa molar alimentados na rede e os obtidos a partir do modelo matemático.

De acordo com o gráfico da Figura 9.6, pode-se considerar a rede bem treinada.

#### 9.4 - Síntese enzimática de dextrana

Como já mencionado, foram realizadas duas sínteses enzimáticas com a enzima obtida a partir da espécie mutante e três com a enzima obtida a partir da espécie nativa, sendo as sínteses com a enzima da espécie mutante realizadas no Laboratório de Química dos Carboidratos e Enzimologia, Departamento de Bioquímica e Biofísica da Universidade Estadual de Iowa (*Iowa State University – Estados Unidos*), enquanto que as sínteses com a enzima obtida da espécie nativa foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/DPQ/UNICAMP). A Tabela 9.1 apresenta as concentrações iniciais utilizadas nas referidas sínteses:



Tabela 9.1 –Dados obtidos pela rede neural para a síntese enzimática de dextrana

Código	So (mmol/L)	Mo (mmol/L)	Mw	Mn	PDI
A	100*	0	> 10 <sup>6</sup>	****	****
B	100 *	100	100000	92200	1,12
C	100 *	25	500000	477000	1,05
D	305	12	530000	490000	1,08
E	305	109	84500	71500	1,18
F	331	232	36000	29300	1,22

\* síntese realizadas com a enzima da espécie mutante.

Os dados da tabela 9.1 foram obtidos com a utilização da rede neural apresentada na Figura 9.2, após o treinamento da rede, sendo  $PDI = \overline{Mw}/\overline{Mn}$ . Com as condições iniciais (concentração de maltose e sacarose) apresentas na Tabela 9.1 foram realizadas sínteses enzimáticas de dextrana para validação do modelo matemático proposto no Capítulo 8. A atividade enzimática utilizada foi de 1500 UI/L para a enzima obtida a partir da espécie mutante e de 250 UI/mL para a enzima obtida a partir da espécie nativa. No final da síntese (consumo total de sacarose), a dextrana foi precipitada e analisada por cromatografia de permeação em gel.

### 9.5 - Validação do modelo

Para validação do modelo desenvolvido no Capítulo 8, foram utilizados cinco padrões obtidos junto à *American Polymer Standard Corporation*. Os padrões escolhidos englobam a faixa de massa molar de 11700 à 534000 ( $\overline{Mw}$ ), sendo consideradas as dextranas de baixa, média e alta massa molar. Os padrões da *American Polymer* são considerados adequados para a análise em questão, por trazerem três massas molares características do biopolímero ( $\overline{Mw}$ ,  $\overline{Mn}$  e  $\overline{Mp}$ ), o que permite utilizar a análise por GPC com calibração tipo *broad*, sendo possível identificar o biopolímero adequadamente. As amostras foram analisadas por cromatografia de permeação em gel (GPC). O equipamento utilizado era composto de duas bombas modelo 515, injetor automático de amostras modelo

715 plus e detector de índice de refração modelo 410, todos da marca Waters sendo utilizado o software Millenium®32 para aquisição dos dados e integração dos cromatogramas. O estojo de colunas utilizado era constituído das colunas Ultrahydrogel 1000 e Ultrahydrogel 500 da Waters, de polimetacrilato hidroxilado, com volumes de exclusão de  $1 \times 10^6$  e  $4 \times 10^5$  respectivamente, ligadas em série. O volume de amostra injetado foi de 150  $\mu$ L. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>O azida 0,02 %, preparada com azida sódica da Sigma e H<sub>2</sub>O deionizada, sendo utilizado um fluxo de 0,8 ml/ min e temperatura do detector de 40 °C.

Foram utilizados padrões de dextrana da *American Polymer Standard Corporation* com as seguintes massas molares:

Tabela 9.2 - Padrões de dextrana utilizados para construção da curva de calibração

Padrão	Mp	Mw	Mn	PDI
DXT11K	9900	11700	8000	1,46
DXT38K	32000	38200	29700	1,29
DXT72K	62900	72700	50700	1,43
DXT260K	234200	260600	148100	1,76
DXT530K	490000	534000	371000	1,44

Tantos os padrões como as amostras foram preparados em fase móvel H<sub>2</sub>O/azida 0,02% à uma concentração de 1 mg/mL. Os padrões foram filtrados para os vials de injeção utilizando-se membranas Millipore de 0,45  $\mu$ m de diâmetro. Já em relação às amostras de dextrana, somente as obtidas com a enzima da espécie mutante foram filtradas, uma vez que as amostras obtidas com a enzima obtida da espécie nativa apresentaram grande resistência à filtração.

Para a construção da curva de calibração, foram utilizados os padrões apresentados na Tabela 9.2. Foi utilizado o software Millenium®32 para integração dos cromatogramas obtidos na faixa de 11700 a 534000. Com a utilização do software, além da determinação das massas molares média é possível utilizar a curva cumulativa (gráfico percentual que apresenta a relação entre as massas molares e sua fração mássica). Uma vez construída a curva cumulativa, é possível calcular relativamente as massas molares características utilizando as equações apresentadas na seção 2.9. A Figura 9.7 apresenta os cromatogramas

obtidos com os padrões de dextrana, enquanto que a Figura 9.8 apresenta a respectiva curva de calibração.

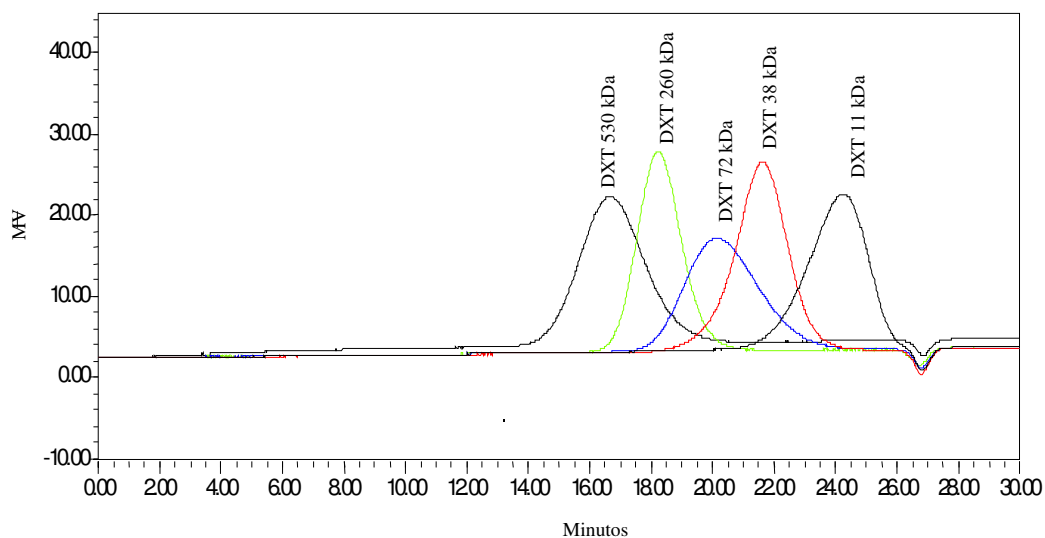


Figura 9.7 – Cromatograma dos padrões de dextrana.

**GPC Calibration Information**

Processing Method	curva1_PM	A	6.886040e+000	D	4.260295e-004
Fit Type	Cubic	B	2.110688e-001	E	0.000000e+000
Dist Name		C	-2.429425e-002	F	0.000000e+000
Order	3	R	0.999175	R <sup>2</sup>	0.998350

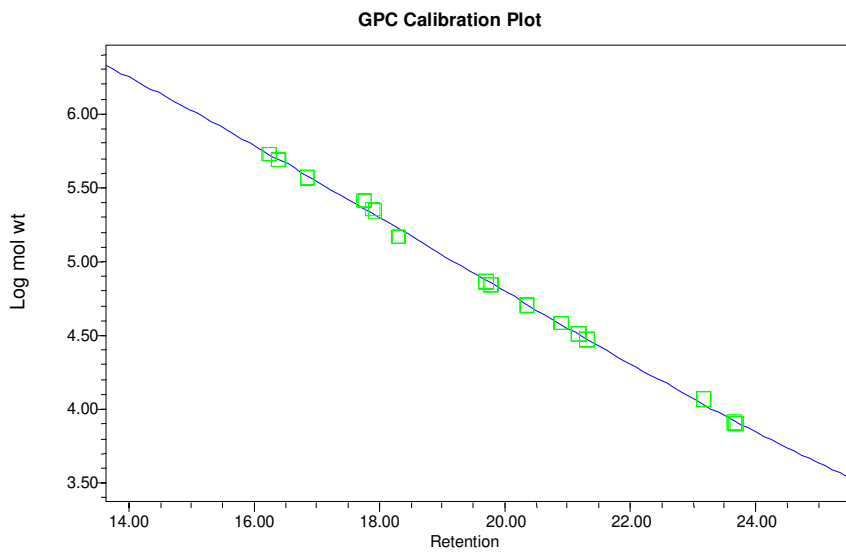


Figura 9.8 – Curva de calibração para os padrões de dextrana.

Observa-se que o estojo de colunas apresentou boa resolução para a faixa de massas molares dos padrões utilizados e que os padrões são eluídos entre 14 e 26 minutos. A calibração foi feita em triplicata.

Para se determinar o tempo de retenção para o limite de exclusão e permeação do jogo de colunas, foram injetadas amostras de glicose e de dextrana comercial de 2 milhões de Daltons, ambas da marca Sigma. A figura 9.9 apresenta os cromatogramas referentes à glicose e à dextrana de 2 milhões:

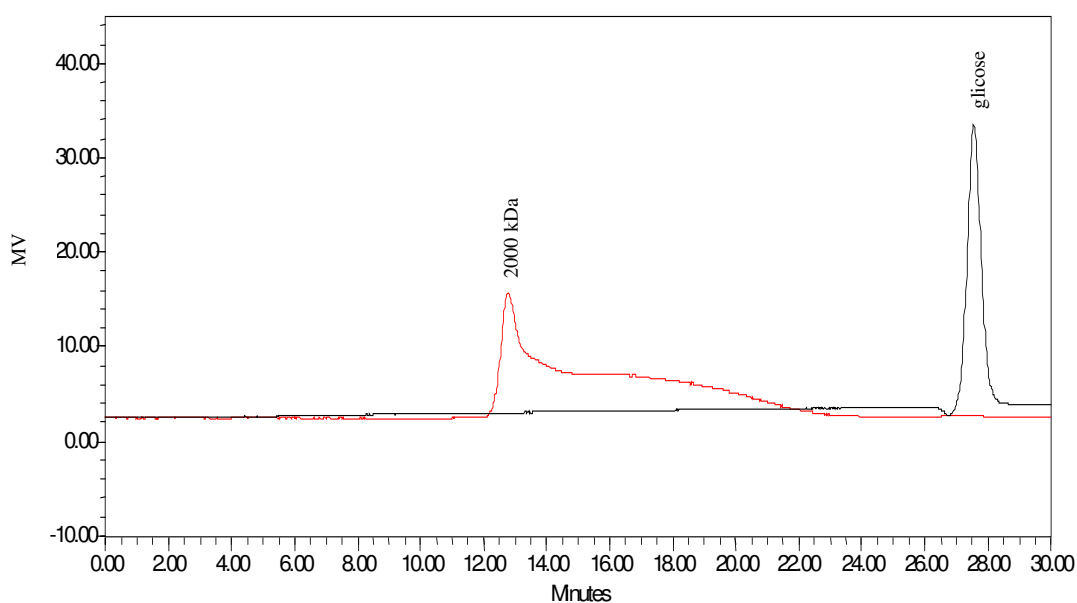


Figura 9.9 – Cromatogramas da glicose e dextrana comercial de 2 milhões de daltons.

Segundo a Figura 9.9, o pico referente ao limite de exclusão do estojo de colunas (dextrana de 2 milhões) ocorre em aproximadamente 13 minutos, enquanto que o pico referente ao limite de permeação do estojo de colunas ocorre em aproximadamente 27 minutos. Dessa forma, injeções de 30 minutos são suficientes para análise das amostras, uma vez que não há compostos de massa molar inferior à glicose na amostra. A Figura 9.10 apresenta os cromatogramas obtidos com as amostras nas condições de síntese apresentadas na Tabela 9.1, para as sínteses realizadas com a enzima da espécie mutante (A,B e C), bem como os cromatogramas dos padrões de dextrana:

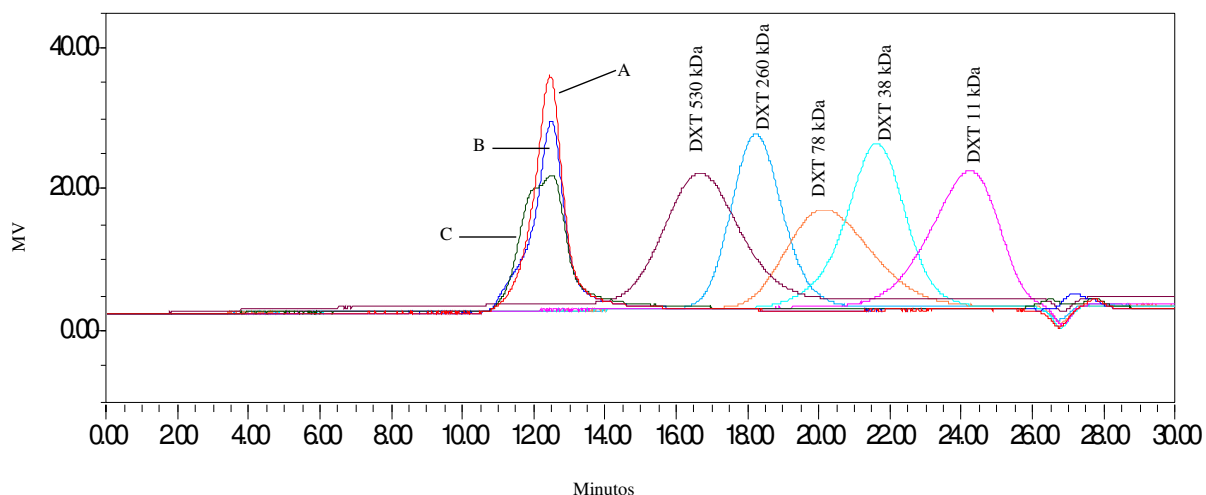


Figura 9.10 – Cromatograma das amostras de dextrana sintetizadas nas condições descritas pela Tabela 9.1 (síntese com a enzima da espécie mutante) e padrões de dextrana.

De acordo com a Figura 9.10, observa-se que todas as amostras são eluídas no mesmo tempo obtido para amostra de dextrana comercial de 2 milhões de daltons, o que indica que as amostras possuem massa molar superior à 1 milhão de daltons (limite teórico de exclusão da coluna Ultrahydrogel 1000). Dessa forma, as amostras estão fora da curva de calibração e não podem ser quantificadas.

Com o intuito de se verificar a massa molar da dextrana ao longo da síntese, as amostras obtidas durante as sínteses enzimáticas para determinação dos perfis de concentração dos carboidratos envolvidos na síntese de dextrana (Capítulo 7), foram também analisadas por GPC. Entretanto, todas as amostras, inclusive as amostras referentes ao início da síntese enzimática, estão fora da curva de calibração e foram eluídas no mesmo tempo da amostra de dextrana comercial de 2 milhões de daltons, o que indica que dextrana de alta massa molar é formada já no início da síntese, mesmo para a enzima livre de dextrana obtida através da fermentação com a espécie mutante (*L.mesenteroides* B512FMC). Os cromatogramas referentes às amostras de dextrana obtidas segundo planejamento experimental do Capítulo 7, são apresentados no Apêndice 8. A Figura 9.11 apresenta os cromatogramas obtidos com as amostras nas condições de síntese apresentadas

na Tabela 9.1, para as sínteses realizadas com a enzima da espécie nativa (D,E e F), bem como os cromatogramas dos padrões de dextrana:

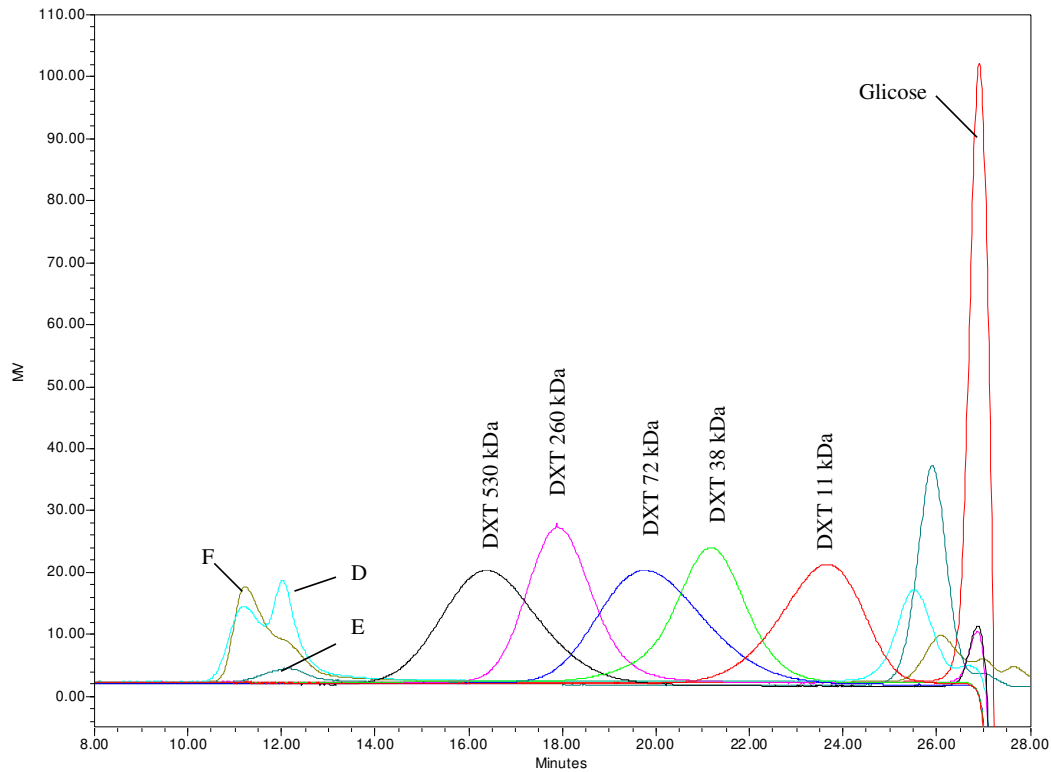


Figura 9.11 - Cromatograma das amostras de dextrana sintetizadas nas condições descritas pela Tabela 9.1 (síntese com a enzima da espécie nativa) e padrões de dextrana.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 9.11, observa-se que a distribuição é bimodal, tendo sido obtidos dois picos fora da curva de calibração dos padrões utilizados. Um dos picos se refere ao limite de exclusão da coluna, pois apresenta o mesmo tempo de retenção da dextrana comercial de 2 milhões de daltons. Já o outro pico, se situa entre o pico de glicose (limite de retenção) e do padrão de dextrana de 11 kDa, indicando assim a formação de oligodextranas de massa molar menor que 11 kDa. Vale ressaltar que este pico inferior a 11 kDa não aparece nos cromatogramas da dextrana obtida com a enzima da espécie mutante (Figura 9.10).

## **9.5 – Conclusões, discussão dos resultados e proposta de um novo mecanismo para a síntese de dextrana na presença de aceptores**

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o modelo apresentado no Capítulo 8 não é preditivo por estar baseado em um modelo mecanístico que não descreve bem a polimerização, uma vez que a maltose não reduz a massa molar da dextrana nem quando uma enzima livre de dextrana, tal qual a obtida com a espécie mutante, é utilizada. Este comportamento já havia sido observado para a síntese enzimática de dextrana utilizando-se glicose como acceptor e a enzima dextrana-sacarase do *L.mesenteroides* B512F, a qual contém uma grande quantidade de dextrana ligada à enzima (Pereira *et al.*, 1998).

Embora a glicose seja um acceptor bem mais fraco que a maltose, acreditava-se que o uso da enzima obtida a partir da espécie nativa, por conter uma grande quantidade de dextrana nativa, proveniente de sua produção em meio contendo sacarose como fonte de carbono, resultava em apenas transferência de cadeias pré-existentes e crescimento da dextrana já ligada à enzima, sendo a formação de oligossacarídeos atribuída a formação de novas cadeias após deslocamento da cadeia de dextrana do sítio ativo, segundo esquema do mecanismo de inserção apresentado no Capítulo 8.

Sendo assim, o uso de uma enzima de altíssima pureza, sem nenhum traço de dextrana, como a utilizada neste trabalho eliminaria o efeito das cadeias pré-existentes de dextrana da enzima proveniente da espécie nativa, permitindo assim que a massa molar da dextrana pudesse ser controlada com o uso de aceptores. Entretanto, os resultados obtidos contradizem esta hipótese, evidenciando que o uso de aceptores não permite o controle da síntese no que se refere a redução da massa molar de dextrana.

Dessa forma, conclui-se que o acceptor não age conforme o esquema apresentado no Capítulo 8, e se há transferência do acceptor para a cadeia de dextrana esta transferência é independente da concentração do acceptor e não contribui para o término da cadeia de dextrana, agindo como uma etapa de terminação propriamente dita, conforme se pensava.

Conforme já mencionado, o modelo proposto no Capítulo 8 foi baseado no mecanismo de inserção na presença de aceptores proposto por Robyt e Walseth (1978), que é o mecanismo mais aceito atualmente para a síntese enzimática de dextrana. De acordo com a hipótese de terminação da cadeia pela transferência do acceptor à extremidade

reduzida da cadeia de dextrana, acreditava-se que uma condição operacional adequada pudesse levar à obtenção de dextrana de baixa massa molar. O modelo foi construído baseado em um método aplicado com sucesso à polímeros químicos e num mecanismo que até então acreditava-se descrever a polimerização. Entretanto, os resultados experimentais contradizem a hipótese de terminação de cadeia proposta por Robyt e Walseth (1978).

Segundo um estudo mais recente realizado por Kitaoka e Robyt (1999), a síntese de dextrana a partir da enzima dextrana-sacarase do *L.mesenteroides* B512FMC, segue o modelo de Michaelis-Menten com inibição mista essencialmente não competitiva, o que sugere a existência de um sítio intermediário do acceptor. A existência desse sítio não é relatada no mecanismo de terminação da cadeia de dextrana proposto por Robyt e Walseth (1978) e apresentado no Capítulo 8, onde o ataque nucleofílico do acceptor seria responsável pela terminação da cadeia, promovendo assim a redução da massa molar de dextrana, conforme discutido anteriormente.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, e na hipótese de um sítio intermediário para o acceptor, o seguinte mecanismo de reação é proposto para explicar a síntese de oligossacarídeos e a não redução da massa molar de dextrana devido ao uso de aceptores:

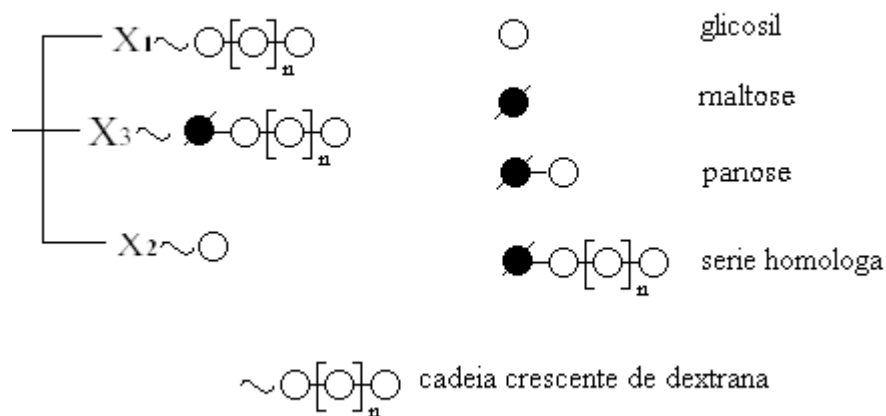


Figura 9.12 – Síntese de dextrana a partir da enzima dextrana-sacarase na presença de aceptores ( $X_1$  e  $X_2$  sítios ativos para a síntese de dextrana,  $X_3$  sítio ativo intermediário da reação do acceptor).



De acordo com o esquema apresentado na Figura 9.12, o acceptor se liga ao seu sítio intermediário, onde ocorre a síntese de oligosacáridos. Os produtos do acceptor são rapidamente formados desviando as unidades glicosídicas da formação de dextrana, diminuindo assim o rendimento da síntese em termos da quantidade de dextrana produzida. Entretanto, a síntese dos produtos do acceptor e da dextrana constituem-se em reações independentes, e portanto o acceptor não reduz a massa molar de dextrana mas somente sua quantidade formada. A hipótese de reações paralelas é condizente com os perfis apresentados no Capítulo 7, uma vez que a síntese de dextrana é encerrada antes do consumo de total da sacarose quando a síntese é realizada na presença do acceptor, sendo as unidades glicosídicas da sacarose então utilizadas para a obtenção dos produtos do acceptor, que segundo o esquema apresentado na Figura 9.12, está ligado em seu sítio intermediário.

Com os resultados obtidos neste trabalho, onde é demonstrado que a maltose não reduz a massa molar da dextrana juntamente com a hipótese de um sítio intermediário para o acceptor, conclui-se que a reação do acceptor independe da polimerização da dextrana e não ocorre a terminação da cadeia de dextrana pela transferência do acceptor à sua extremidade redutora, pelo menos não a uma taxa suficiente para redução da massa molar da dextrana. Dessa forma, deve-se estudar mais a fundo o mecanismo de polimerização da dextrana. O mecanismo de inserção e o modelo matemático apresentado nos Capítulos 5 e 7, descrevem bem o consumo de substratos e formação de aceptores e produtos do acceptor, entretanto falha no tocante à polimerização em si. Uma alternativa seria o estudo da polimerização considerando que não há terminação das cadeias. A partir daí o método dos momentos poderia ser aplicado, com base neste novo mecanismo. Entretanto, propor um novo mecanismo envolve a obtenção de muitos dados experimentais e a exploração de diversas outras rotas possíveis, o que demandaria também muito tempo.

No Capítulo 10 é feita uma conclusão e análise geral dos resultados obtidos no trabalho, bem como sugestões para futuros trabalhos na mesma área são apontadas.

## **Capítulo 10**

### **Conclusões e sugestões para trabalhos futuros**

---

Neste trabalho, foi proposto um modelo matemático baseado no método dos momentos aplicado à síntese de dextrana na presença de maltose como acceptor. O modelo é baseado no mecanismo de inserção, que é atualmente o mecanismo mais aceito para a síntese enzimática de dextrana. Segundo este mecanismo, a presença de aceptores tais como a maltose seria responsável pela terminação da cadeia de dextrana através do deslocamento da cadeia de seu sítio ativo na enzima. Esta terminação se daria através do ataque nucleofílico do acceptor, livre em solução, à extremidade redutora da cadeia, encerrando assim seu crescimento e liberando o sítio ativo para a formação de uma nova cadeia (conforme esquema apresentado no Capítulo 8).

A presença de maltose promove ainda a síntese de produtos secundários, denominados produtos do acceptor, cujo tamanho da cadeia pode variar entre 3 e 10 unidades de glicose. Estes produtos podem ser classificados como oligossacarídeos, uma vez que os mesmos contêm até 10 unidades de glicose (Su e Robyt, 1993).

Em tese, o uso de uma quantidade adequada de maltose poderia conduzir à formação de dextrana de baixa massa molar, bem como poderia proporcionar o controle da massa molar da dextrana. A princípio, esta relação poderia ser obtida através de procedimentos experimentais com base na tentativa e erro. Neste trabalho, foi desenvolvido um modelo matemático teórico baseado no método dos momentos, o qual é largamente empregado com sucesso para predição da massa molar de polímeros químicos, para simulação e otimização de um reator enzimático para síntese enzimática de dextrana com peso molecular controlado.

O desenvolvimento deste modelo visava o desenvolvimento de um processo de obtenção de dextrana de baixa massa molar através do ajuste das concentrações iniciais de maltose e sacarose no reator. Isto poderia eliminar a etapa de hidrólise, que é o processo atualmente utilizado para obtenção de dextrana de massa molar reduzida, reduzindo assim o custo de produção e purificação do produto. Para que este objetivo fosse alcançado, foi

necessário o estudo detalhado do mecanismo e de um modelo mecanístico detalhado, sendo que o único encontrado em literatura aberta foi o publicado por Heincke *et al.* (1999), apresentado no Apêndice 6. Neste estudo, foram identificadas as etapas de terminação e propagação da cadeia de dextrana de acordo com o mecanismo de inserção, no qual o modelo mecanístico é baseado.

O uso de uma enzima extremamente pura, livre de cadeias de dextrana ligadas à enzima no início da síntese, também foi de extrema importância uma vez que a pré-existência de cadeias poliméricas influi na distribuição da massa molar e também no curso da reação.

Foi ainda necessária a obtenção das constantes cinéticas referentes à síntese de dextrana com a enzima obtida a partir da espécie mutante (*L. mesenteroides* B512FMC), uma vez que as constantes cinéticas disponíveis em literatura aberta se referiam a enzima obtida a partir da espécie nativa (*L. mesenteroides* B512F), a qual contém dextrana.

O modelo foi então simulado e otimizado, e de acordo com os resultados do modelo seria possível a obtenção de dextrana com faixa de massa molar controlada. Entretanto, a validação do modelo quanto à massa molar da dextrana obtida nas condições ótimas de síntese demonstrou que a maltose não controla a massa molar de dextrana e o modelo não é preditivo, devido ao fato de estar baseado em um mecanismo que não condiz com a realidade, conforme demonstrado pelos resultados deste trabalho.

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho demonstram que o uso de maltose como acceptor não reduz a massa molar da dextrana, mas apenas sua quantidade, sendo toda a dextrana obtida de alta massa molar ( $> 10^6$ ), quando se utiliza a enzima obtida a partir da espécie mutante. Já quando a enzima parcialmente purificada, obtida da espécie nativa, é utilizada, foi observada uma distribuição bimodal (Figura 9.10), onde estão presentes dextranas de alta massa molar ( $>10^6$ ) além de oligodextranas ( $< 11$  kDa).

A diferença na distribuição de massas molares obtidas para as dextranas (Figuras 9.9 e 9.10), sintetizadas com as duas enzimas utilizadas neste trabalho, evidencia que a presença de dextrana ligada à enzima influi no curso da reação.

O modelo desenvolvido neste trabalho foi baseado na hipótese de terminação das cadeias de dextrana através da incorporação de um acceptor e ou produto do acceptor na

cadeia de dextrana, proposta por Robyt e Walseth (1978). Entretanto, neste trabalho as análises foram realizadas no final da síntese, e o não conhecimento da existência de um sítio intermediário para o acceptor fez com que os autores concluíssem que o acceptor livre em solução se ligava na cadeia de dextrana, liberando-a do sítio ativo e terminando assim a polimerização e produzindo oligossacarídeos.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a maltose altera o curso da reação somente no sentido de desviar as unidades de glicose da cadeia de dextrana para o acceptor. As reações do acceptor são independentes da polimerização da dextrana, não havendo transferência significativa tanto de acceptor, como de produtos do acceptor para a cadeia de dextrana. A síntese de oligossacarídeos e de dextrana constituem reações paralelas e independentes. O aumento da concentração de produtos do acceptor influi apenas no rendimento dos produtos envolvidos na síntese (dextrana e oligossacarídeos), não constituindo num mecanismo eficiente de terminação das cadeias. Este comportamento é consoante à existência de um sítio intermediário para o acceptor e da cinética de inibição mista, não competitiva verificada por Kitaoka e Robyt (1999).

Estas observações só puderam ser delineadas, a partir do monitoramento completo da síntese em função do tempo, até o consumo total de sacarose, e não apenas no ponto final da reação ou no início para determinação de taxas iniciais, como normalmente é realizado em estudos cinéticos. Durante este monitoramento, foi verificado que a dextrana de alta massa molar é obtida logo no início da síntese (Apêndice 8). Dessa forma, conclui-se ainda que o modelo mecanístico utilizado neste trabalho, descreve bem a formação de oligossacarídeos (produtos do acceptor) e consumo de substratos, mas não descreve bem a polimerização em termos de terminação das cadeias como se acreditava.

Foi ainda verificada a possibilidade da recuperação da enzima parcialmente purificada, obtida da espécie nativa, através da adsorção em resinas de troca iônica. Entretanto, a presença de dextrana ligada à enzima, resultou em um sistema complexo, para o qual não foram obtidos bons ajustes. Segundo um estudo realizado por Kim e Robyt (1994), a enzima livre de dextrana pode ser adsorvida em resinas de afinidade, entretanto quando dextrana é adicionada à enzima a quantidade de enzima adsorvida é reduzida em mais de 90 %. Sabendo-se que para a recuperação da enzima em sínteses enzimáticas não se pode descartar a presença de dextrana (produto), pode-se concluir que não é possível

recuperar a enzima através processos de adsorção. Esta afirmação contradiz estudos anteriores (Currello, 1993; Souza, 1993; Currello, 1998 e Rodrigues, 2000), onde a determinação da isoterma de adsorção foi realizada utilizando-se o método UV-280 nm, que apesar de muito difundido mostrou-se inadequado conforme discussão apresentada no Capítulo 6 e Apêndice 5.

À luz do exposto, as seguintes conclusões podem ser destacadas:

- O uso de aceptores não reduz a massa molar de dextrana e o mecanismo de terminação da polimerização necessita ser revisto para que o modelo desenvolvido neste trabalho seja reavaliado e corrigido de forma a se tornar preditivo
- A presença de dextrana ligada à enzima impede a sua adsorção em resinas trocadoras de íons, inviabilizando seu re-aproveitamento através de cromatografia de troca iônica
- O microrganismo mutante (B512FMC) produz uma enzima excelente para se estudar a síntese de dextrana, pois por não apresentar dextrana como contaminante permite o estudo da síntese com e sem dextrana, possibilitando o estudo da influência das cadeias pre-existentes no curso da reação
- A obtenção de produtos do acceptor em grandes quantidades é possível através da reação do acceptor, embora este processo necessite ainda ser otimizado
- Não se pode ainda afirmar que a síntese enzimática de dextrana não possa ser economicamente viável, para isso é necessária a compreensão completa do mecanismo de síntese

A utilização do método fenol-ácido sulfúrico para determinação da quantidade de dextrana formada durante a síntese, constitui uma excelente ferramenta para o monitoramento da formação do polissacarídeo que tradicionalmente é realizada através da determinação da sacarose consumida, método que não pode ser aplicado diretamente em sínteses na presença de aceptores, uma vez que a sacarose é também consumida para formação dos produtos do acceptor. O método é bastante interessante, pois trata-se de uma técnica simples e rápida e não requer o uso de equipamentos sofisticados.

Embora a síntese enzimática de dextrana, seja estudada desde a década de 50, ainda há muito o que o explorar. Dessa forma, os seguintes tópicos são sugeridos para futuros trabalhos:

- Revisão do mecanismo de inserção com vistas à polimerização da dextrana

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, o mecanismo de terminação de cadeia através do ataque nucleofílico do aceptor à cadeia crescente de dextrana, não se mostrou válido e nem eficiente. Dessa forma, é necessário que o mecanismo de síntese de dextrana seja revisto, com ênfase na etapa de terminação da cadeia de dextrana.

- Proposta de um novo mecanismo de polimerização onde não ocorra a terminação

Devido a alta massa molar da dextrana obtida, pode ser que a polimerização ocorra sem que haja uma etapa eficiente de terminação.

- Produção de produtos do aceptor a partir da reação do aceptor

Os produtos do aceptor são oligossacarídeos com aplicações potenciais na indústria alimentícia, podendo ser empregados como adoçantes. Neste trabalho foi evidenciada a possibilidade da obtenção destes produtos em larga escala, entretanto o processo necessita ainda de otimização. O modelo proposto nos Capítulos 5 e 7, pode ser utilizado para simulação e otimização de processos voltados à obtenção de panose ao invés de dextrana como foi realizado neste trabalho.



## Capítulo 11

### Bibliografia

---

- ALSOP, L. Industrial Production of Dextran. *Progress Ind. Microbiol.*, v.18, p.1-44, 1983.
- AMERICAN POLYMER STANDARD CORPORATION. Catálogo on line ([www.ampolymer.com](http://www.ampolymer.com))
- ANSPACH, F.B., PETSH, D. AND DECKWER, W.D. Purification of murine IgG1 on Group Specific Affinity Sorbents. *Bioseparation*. v. 6,n.3, p. 165-184, 1996.
- ARAÚJO, MARIANA DE OLIVEIRA DIAS. Adsorção de Albumina de Soro Bovino em Resinas Trocadoras de Íons. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 85 p. Tese (Mestrado).
- BARROS NETO, B, SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Campinas: Editora da UNICAMP, 1995, 299 p.
- BAZÁN, JUAN HERALDO VILOCHE. Estudo da Produção Enzimática de Dextrana Clínica. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993. 136 p.Tese (Mestrado).
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantitie of Protein Utilizing the Pricnciple of Protein-Dye Binding. *Analytical Chemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BULSARI, A.B., *Neural Networks for Chemical Engineers*, Ed. Elsevier Science, New York. 1995.
- BUSSO,E .M AND RESNICK, L.. Anti-human Imunodeficiency Virus Effects of Dextrans Sulfate and Strain Dependency and Synergistic or Antagonic when Dextran Sulfate is Given in Combination with Dideoxynucleosides. *Antimicorb. Ag. and Chemoth*, v.34 n.10, p. 1991-1995, 1990.
- CARRASCO,F.,CHORNET,E.,OVEREND,R.P. AND COSTA, J. Generalized Correlations for the Viscosity of Dextrans as a Function of Temperature,



Concentration and Molecular Weight at Low Shear Rates. *Journal of Applied Polymer Science*, v.37 n.8, p. 2027-2098, 1989.

CURRALERO, ISABEL CRISTINA BADDINI. Estudo da Produção de Dextrana de Baixo Peso Molecular por via Enzimática para Obtenção de Ferro-dextrana. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993. 172 p. Tese (Mestrado).

CURRALERO, I.C.B; MATSUBARA, S., RODRIGUES;M.I. e MAUGERI, F. Sistema bifásico para Síntese de Dextrana, In Congresso Brasileiro de Engenharia Química. XII, 1998, Porto Alegre – RS, Anais XII COBEQ, agosto 1998.

FERNANDES, FABIANO. Modelagem e Simulação de Reatores de Polimerização e Caracterização de Polímeros. Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 304 p. Tese (Doutorado).

FOX, J.D. AND ROBYT, J.F. Miniaturization of Three Carbohydrate Analyses Using a Microsample Plate Reader. *Analytical Biochemistry*, v.195, p. 93-96, 1991.

GIRAD, E. AND LEGOY, M.D. Activity and stability of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F in the presence of organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. v.24, p. 425-432, 1999.

GRIGOLON, LISANNE BEATRIZ. Modificação Enzimática de Polímeros de Quitosana e de Quitina. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 86 p. Tese (Mestrado).

GUIMARÃES, D.R.B.; COSTA, F. A.A., RODRIGUES, M.I., AND MAUGERI, F. Optimization of Dextran Synthesis and Acidic Hidrolisys by Surface Response Analysis. *Brazilian J. Chem. Eng.*, v.16, n.2, p.129-139, june 1999.

HEINCKE,C., DEMUTH, B., JÖRDENING, H.J., AND BUCHHOL, K. Kinetics of the Dextransucrase Acceptor with Maltose – experimental results and modeling., *Enzyme and Microbial Technology* , v.24, p. 523-534, 1999.

JAN ,C. RYDÉN, J.L. *Protein Purification : Principles, High Resolution Methods and Applications*, VHC Publishers, p. 107-148, 1989.

JEANES, A. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, v.4, p. 805-824, 1966.

KIM, D. AND ROBYT, J.F. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512-FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme and Microb. Technol.*, v 16, p. 1010-1015, December, 1994.

KITAOKA, M. AND ROBYT, J.F. Large-Scale Preparation of Highly Purified Dextransucrase from a High-Producing Constitutive Mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512-FMC. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p. 396-391, 1998a.

KITAOKA, M. AND ROBYT, J.F. Use of a microtiter plate screening method for obtaining *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrases. *Enzyme and Microbial Technology*, v.22, p.527-531, 1998b.

KITAOKA, M. AND ROBYT, J.F. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC dextransucrase: kinetics of the transfer of D-glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentration. *Carbohydrate Research*, v. 32, p. 183-191, 1999.

KOBAYASHI, M. AND MATSUDA, K. Characterization of the Multiple and main Component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.614, p. 42 - 62, 1980.

LEME, R.A.S. *Curso de Estatística- elementos*, Editora ao Livro Técnico, Rio de Janeiro,, 1967, 292 p.

LOPRETTI M.A., MARTINEZ A., TORRES L., PERDOMO R., SANTOS B. AND RODRIGUES A. E. Influence of nitrogen/carbon ratio and complementary sugars on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F. *Process Biochemistry*, v.34, p. 879-884, 1999

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L. AND RANDAL, R.J. Protein Measurements with the Foulting Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p. 265-275, 1951.

MIBIELLI, G.M. Síntese do Processo de Obtenção de Dextrana de Clínica e Frutose a partir de Sacarose. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001, Tese (Mestrado).

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n3, p. 426-428, march 1959.

MONSAN, P. AND LOPEZ, A. On Production of Dextran by Free and Immobilized Dextranase. *Biotechnology and Bioengineering*, v.23, p. 207- 2037, 1981

MORRISON, R.T e BOYD, R.N.. *Química Orgânica*, Lisboa Fundação Gulbenkian, 1972, 1394 p.

PEREIRA, A M, COSTA A. A., RODRIGUES M.I. AND MAUGERI F. In Vitro Synthesis of oligossacharides by accpetor reaction of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, v.20, n.4, p. 397-401, 1998.

PHAM, D.T. An introduction to Artificial Neural Networks. *Neural Networks for Chemical Engineers*. Elsevier, New York, p. 1-19, 1995.

PHARMACIA. Amersham Biosciences, Catálogo on line ([www.apbiotech.com](http://www.apbiotech.com))

PUNGOR, E.; AFEYAN, N.B, GORDON, N.F. AND COONEY, C.L, Continuous Affinity-Recycle Extraction: A Novel Protein Separation Technique. *Biotechnology*, v.5, p. 604-608, 1987.

RAY, W. On the Modelling of polymerization reactor. *Journal of Macromolecular Sciences -Revs. Macromol. Chem.* , V.C8,n.1,p. 1-56, 1972.

ROBYT, J.F., KIMBLE, B.K AND WALSETH, T.F. The mechanism of dextranase action: direction of dextran biosynthesis. *Biochemistry and Biophysics*, v.165, p. 634-640, 1974.

ROBYT, J.F. AND WALSETH, T.F. The Mechanism of Acceptor Reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B- 512F Dextranase. *Carbohydrate Research.*, v.61, p. 433-445, 1978.

ROBYT, J.F. AND WALSETH, T.F. Production Purification and Properties of Dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F, *Carbohydrate Research*, v. 68, p. 95-11, 1979.

ROBYT, J.F. Mechanisms in the glucanase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v.51, p. 133-168, 1995.

ROBYT, J.F. *Thin Layer Chromatography*, Encyclopedia of Separation Science, vol 5, p. 2235-2244, Editors I.D. Wilson , M. Cooke C.F, Poole, 2000.

RODRIGUES, SUELI. Modelagem e Simulação de um Processo Inovativo para Síntese Enzimática de Dextrana: verificação da aplicabilidade do processo para sistemas industriais. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. 163 p. Tese (Mestrado).

RUTHVEN, D.M. Principles of Adsorption and Desorption Process, John Wiley and Sons, 1984.

SANTOS, EVERALDO SILVINO. Recuperação e Purificação de Enzimas Usando Adsorção em Leito Expandido. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 152 p. Tese (Doutorado).

SCOPES, R.K. Protein Purification. Spring-Verlag, New York, 2<sup>nd</sup> edition, 1987, 328 p.

SOUZA, ELIANE APARECIDA. Modelagem e Simulação de um Reator Contínuo com Reciclo para Produção de Dextrana. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993. 149 p. Tese (Mestrado).

SU, D. AND ROBYT, J.F. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. *Carbohydrate Research*, v.248, p.339-348, 1993.

TAGLIARI, CRISTIANE VANESSA. Produção de Xilnases Alcalinas por *Bacillus pumillus* e sua Aplicação no Branqueamento de Polpas Kraft. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 71 p. Tese (Mestrado).

TANRISEVEN, A AND ROBYT. J.F. Interpretation of Dextransucrase Inhibition at High Sucrose Concentrations. *Carbohydrate Research.*, v. 245, p. 97-104, 1993.

TIRTAATMADJA,V., DUNSTAN,D.E. AND BOGER,D.V., Rheology of Dextran Solutions, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, v.97, p. 295-301, 2000.

TSAPTSINOS, D. Back-propagation and its Variations. *Neural Networks for Chemical Engineers*. Elsevier, New York, p. 34-98, 1995.

ZAFAR, I. AND BARKER, P.E. An Experimental and Computational Study of a Biochemical Polymerization Reactor in a Chromatographic Reactor Separator, *Chemical Engineering Science*, v.43, n. 9, p.2369 - 2375, 1988.

ZAIA,D. A. M., VERRI Jr., E. A. AND ZAIA, C.T.B. Determination of Total Protein in Several Tissues of Rat: a comparative study among spectrophotometric methods. *Microchemical Journal*, v.64, p. 235-239, 2000.

## **Apêndice 1**

### **Determinação da atividade enzimática**

---

Neste trabalho, optou-se por utilizar uma metodologia simplificada para determinação da atividade enzimática. Ao invés de construir a curva cinética completa com cinco ou mais pontos para obtenção do coeficiente angular da curva utilizado na Equação 3.1, neste trabalho são obtidos apenas dois pontos experimentais, sendo um em tempo igual a zero e outro em 10 minutos de reação. A metodologia é baseada no procedimento adotado por Tagliari (1999) para determinação da atividade xilanásica, com algumas modificações. Antes da adoção deste procedimento, alguns testes foram realizados para assegurar a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos.

Os testes consistiram na determinação da atividade de uma amostra da enzima dextrana-sacarase utilizando-se para tal a curva cinética determinada em reator tanque agitado, a curva cinética determinada em tubos de ensaio e o coeficiente angular da reta obtido utilizando-se apenas dois pontos desta curva. Os resultados foram então comparados entre si e os desvios avaliados.

#### ***Determinação da curva cinética em reator tanque agitado***

Em um reator encamisado à temperatura constante de 30°C, foram adicionados 2,0 ml de sacarose 600 g/l de uma solução estoque de sacarose (600 g/l) em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl<sub>2</sub>, pH 5,2 e 0,5 ml de tampão de acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/l de CaCl<sub>2</sub>, 8,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada e 1 ml da amostra enzimática. A cada três minutos, com tempo máximo de 15 minutos, foi retirada uma amostra de 1 ml do reator e a quantidade de frutose produzida foi determinada através do método de DNS (Miller, 1959). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Determinação da curva cinética em tubos de ensaio**

A determinação da curva cinética em tubos de ensaio foi realizada conforme procedimento descrito no Capítulo 3. Entretanto, para os testes de adequação do procedimento foram determinados seis pontos experimentais em intervalos de 3 minutos, tal qual realizado para a cinética em reator. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios da absorbância à 540 nm para determinação do coeficiente angular da curva cinética

ABS média (reator )	ABS média (tubos)
0,192	0,258
0,215	0,283
0,245	0,310
0,276	0,344
0,314	0,378
0,335	0,421

Observa-se pelos dados apresentados na Tabela 1, que os valores de absorbância obtidos para o ensaio realizado em tubos são superiores aos obtidos para o ensaio em reator. Os gráficos da curva cinética e respectivos ajustes por regressão linear estão apresentados na Figura 1:

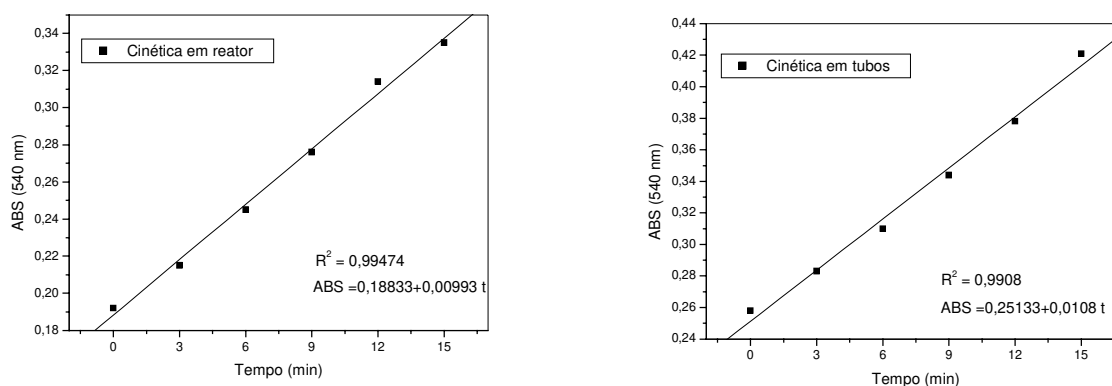


Figura 1 – Gráficos e ajuste por regressão dos dados da Tabela 1 (curva cinética).

Observa-se através dos gráficos da Figura 1 que o coeficiente angular da reta utilizado na Equação 3.1 para determinar a atividade da amostra não difere muito para os dois ensaios em estudo. Vale ainda ressaltar que o fator de diluição utilizado para ambos os ensaios é um pouco diferente. Os fatores de diluição e a atividade da amostra são apresentados no Quadro 1:

Quadro 1 – Comparação entre a atividade calculada para os dois ensaios

	Ensaio em reator	Ensaio em tubos
Fator de diluição (d)	12	11,11
Atividade (UDS/ml)	23,28	23,44

De acordo com as atividades calculadas e apresentadas no Quadro 1, os dois métodos estudados não diferem muito entre si, pois o desvio entre os resultados encontrados é menor que 1 %. Dessa forma, a medida de atividade em tubos é equivalente à realizada em reator agitado. Entretanto os resultados do Quadro 1 não afirmam a aplicabilidade do uso de dois pontos experimentais, conforme descrito no Capítulo 3, ao invés de 6. Sendo assim o coeficiente angular da reta, em relação ao ponto zero

$\left( \frac{\overline{ABS}_t - \overline{ABS}_0}{t} \right)$  e a atividade da amostra foram calculados para cada um dos tempos

utilizados no ensaio em tubos. Os resultados estão apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Coeficientes angulares e atividade para o ensaio com tubos

Tempo (min)	Coef. Angular (mg/ABS ml)	Atividade (UDS/ml)
3	$8,33 \times 10^{-3}$	18,08
6	$8,67 \times 10^{-3}$	18,82
9	$9,55 \times 10^{-3}$	20,73
12	$1,00 \times 10^{-2}$	21,70
15	$1,09 \times 10^{-2}$	23,59



De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, para valores iguais ou superiores a 9 minutos o valor do coeficiente angular obtido com dois pontos é muito semelhante ao obtido com 6 pontos (Figura 1). Dessa forma, considerando os desvios do método de análise e do ajuste por regressão linear, foi considerado 10 minutos como tempo padrão para obtenção do segundo ponto para obtenção do coeficiente angular da reta para determinação da atividade da dextrana-sacarase. Este tempo se mostrou adequado com a realização de outros testes (não apresentados).

O procedimento utilizado neste trabalho permite a determinação da atividade de amostras simultâneas de dextrana-sacarase, sem perda de precisão, além de se constituir em um método mais rápido e econômico.

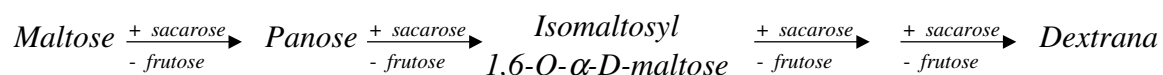
## Apêndice 2

### Cálculo do rendimento e produtividade para os reatores

---

#### Considerações sobre o cálculo do rendimento e produtividade

A enzima dextrana-sacarase em presença de maltose e sacarose não promove apenas a síntese de dextrana, mas também de panose, que é um trissacarídeo formado pela incorporação de uma unidade de glicose, proveniente da quebra da sacarose, em uma molécula de maltose, com a liberação de uma molécula de frutose (similar à síntese de dextrana). A maltose também pode ser incorporada na cadeia de dextrana, participando assim da reação como aceptor. Sendo assim, num meio reacional constituído de sacarose e maltose, na presença de dextrana-sacarase, ambos os substratos podem participar da síntese dos dois produtos. Dessa forma, o consumo de maltose se deve à reação de aceptor com a cadeia de dextrana e ao consumo como matéria prima para formação de panose. Já o consumo de sacarose é também dividido entre o crescimento da cadeia de dextrana e a formação de panose. A reação a seguir ilustra as reações possíveis:



Observa-se que tanto para a formação de panose como para a formação de dextrana, ocorre a quebra de uma molécula de sacarose com a liberação de uma molécula de frutose. Sendo assim pode-se concluir que:

- uma molécula de panose é constituída de uma maltose e uma glicose incorporada a partir da sacarose. Dessa forma, o número de moles de maltose consumidos na formação de panose é igual a número de moles do trissacarídeo formado

- número de moles de maltose incorporados na dextrana é igual ao número de moles de maltose consumidos menos o número de panose formado.
- o número de moles de frutose liberados devido à incorporação da glicose, proveniente da sacarose, na panose é igual ao número de moles de panose formada.
- número de moles de frutose liberados devido à incorporação da glicose proveniente da sacarose na cadeia de dextrana é igual ao número total de moles de frutose formada menos o número de moles de frutose liberados na formação de panose.

A porcentagem de sacarose consumida, bem como os rendimentos dos produtos (panose e dextrana) com base na quantidade inicial dos substratos (maltose e panose) podem ser calculados com base no número de moles de cada um dos substratos consumidos e o respectivo número de moles desses substratos incorporados em cada um dos produtos. Sendo assim tem-se:

***Porcentagem de sacarose consumida na síntese:***

$$\text{Sacarose Consumida} = \frac{(S_o - S_f)}{S_o} \times 100$$

$S_o$  = concentração inicial de sacarose

$S_f$  = concentração final de sacarose

***Rendimento em panose com base na sacarose consumida:***

$$Y_p = \frac{P_f}{S_o} \times 100$$

Onde:

$P_f$  = Frutose liberada na formação da panose

***Rendimento em panose com base na maltose:***

$$Y_{PM} = \frac{P_f}{M_o} \times 100$$

$M_o$  = concentração inicial de maltose

***Rendimento em dextrana com base na sacarose:***

$$Y_D = \frac{F_f - P_f}{S_o} \times 100$$

$F_f$  = frutose liberada na formação de dextrana

***O rendimento em dextrana com base na maltose:***

$$Y_D = \frac{F_f - P_f}{M_o} \times 100$$

Para sistemas contínuos (CSTR e PFR) além do rendimento é introduzida nas análises a produtividade. Entretanto a dextrana é um polímero e, portanto, apresenta uma distribuição de massa molar. Dessa forma, não há sentido em se calcular a produtividade da dextrana em base molar sem se conhecer a massa molar média do polissacarídeo. Sendo assim, num primeiro instante a produtividade será calculada em massa total, tanto para a panose como a para dextrana: As massas moleculares da sacarose, maltose, panose e frutose são conhecidas e bem definidas. A Tabela 1 apresenta estas massas:

Tabela 1- Massas molares de sacarídeos

Sacarídeo	Massa Molecular
Frutose	180 g/gmol
Maltose	342 g/ gmol
Panose	504 g/gmol
Sacarose	342 g/gmol

***Produtividade da panose:***

$$\text{Pr odut}_p = P_f \times 504 \times \frac{Q}{V}$$

***Produtividade da Dextrana:***

A produtividade da dextrana deve ser calculada com base no balanço de massa. Segundo o balanço de massa para as concentrações em (g/L) tem-se:

$$S_o + M_o - [S_f + M_f + P_f] = D_f$$

$$\text{Pr odut}_D = D_f \times \frac{Q}{V}$$

$M_f$  = concentração final de maltose

Fórmula geral da panose  $\Rightarrow C_{18}H_{32}O_{11}$

## Apêndice 3

### Perfis de concentração para os reatores estudados no Capítulo 5

Neste apêndice são apresentados os perfis da concentração de sacarose, maltose, panose e frutose bem como os de rendimentos, para as simulações dos reatores apresentada no Capítulo 5. São apresentados os perfis de concentração com o tempo para o reator batelada e CSTR e com o comprimento para o reator PFR, para as mesmas condições apresentadas na Tabela 5.1.

#### Reator batelada:

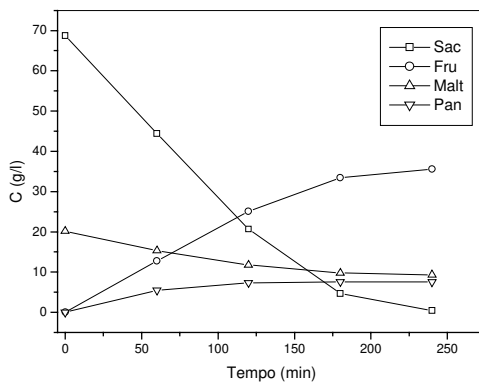


Figura 1 – Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 1

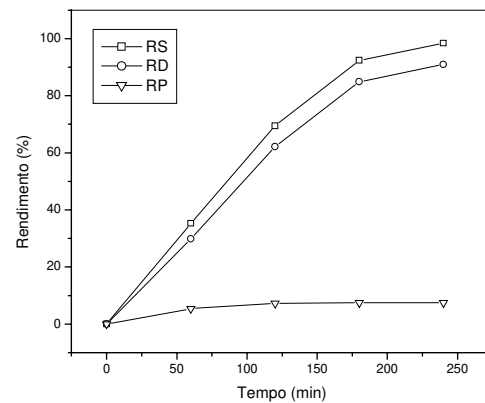


Figura 2 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 1

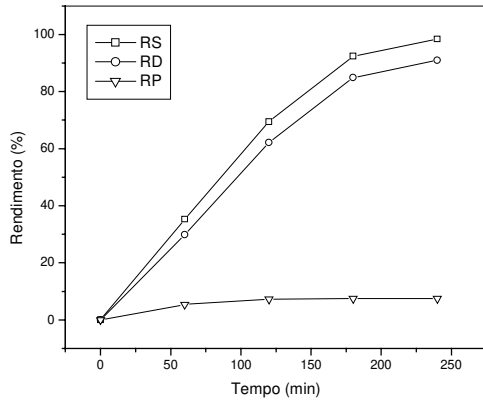


Figura 3 – Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 2

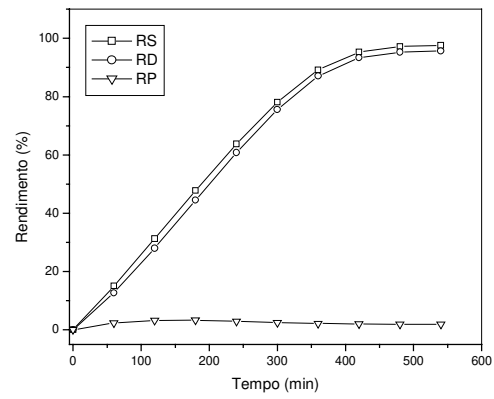


Figura 4 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 2

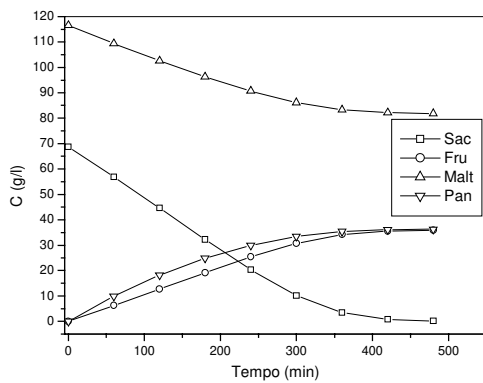


Figura 5 – Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 3

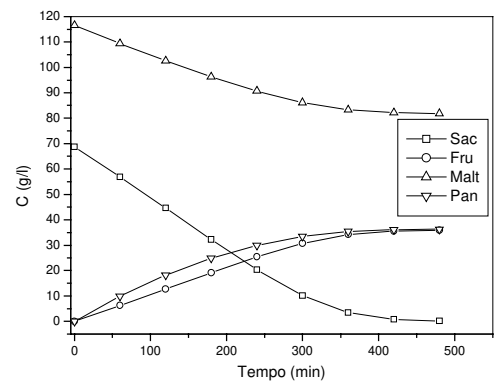


Figura 6 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 3.

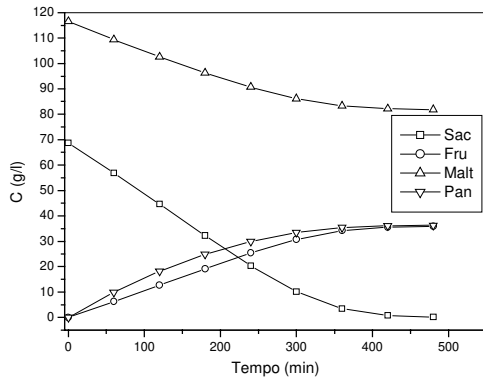


Figura 7 – Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 4

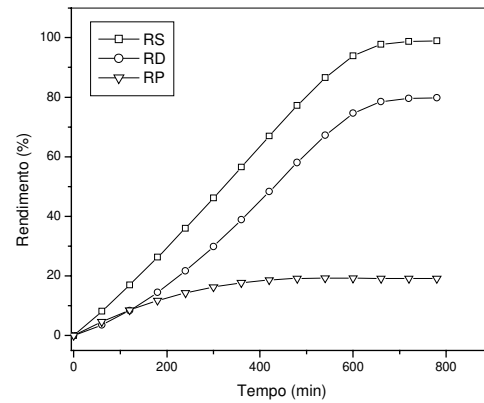


Figura 8 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 4

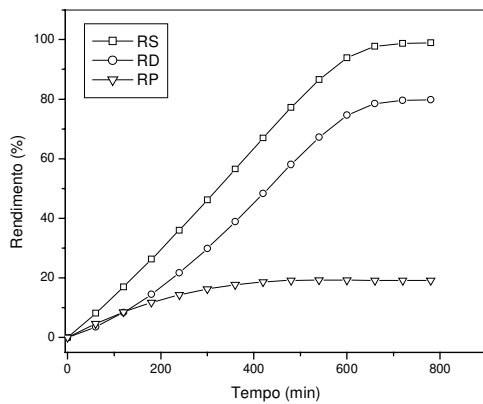


Figura 9– Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 5

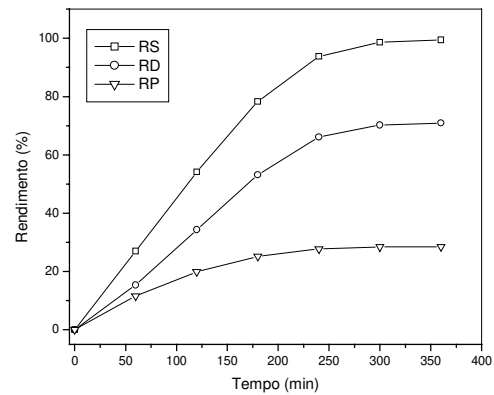


Figura 10 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 5



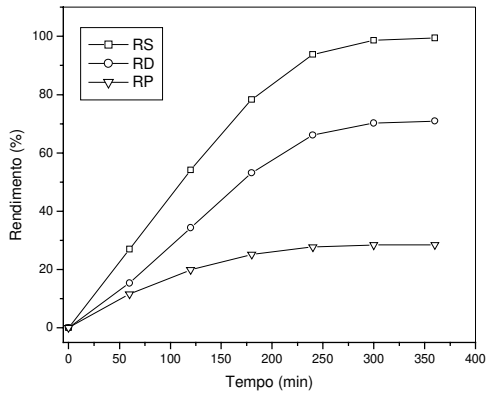


Figura 11– Perfis de concentração para o reator batelada – Simulação 6

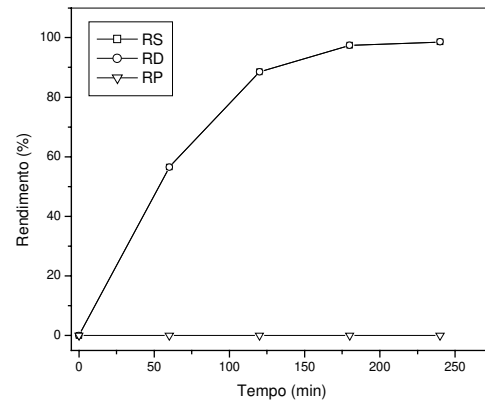


Figura 12 – Perfis de rendimento para o reator batelada – Simulação 6

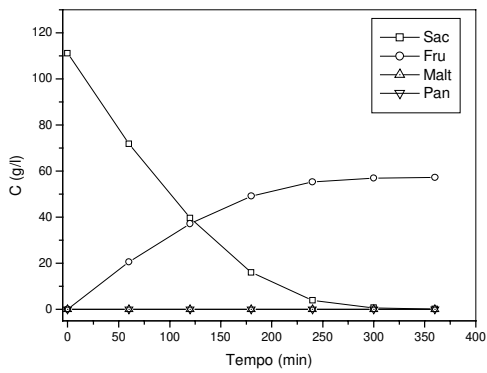


Figura 13– Perfis de concentração para o reator batelada – Simulação 7

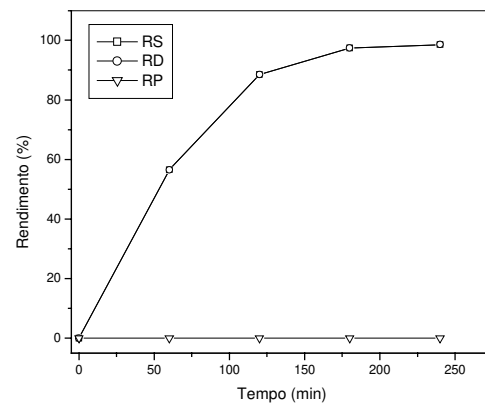


Figura 14 – Perfis de rendimento para o reator batelada – Simulação 7

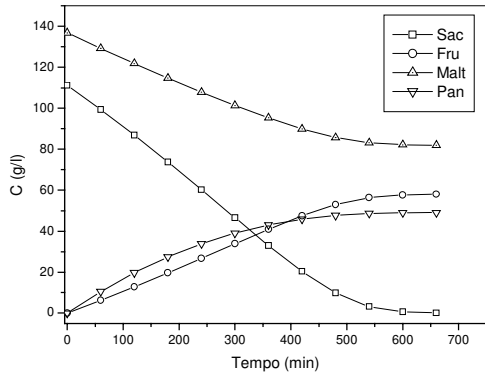


Figura 15– Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 8

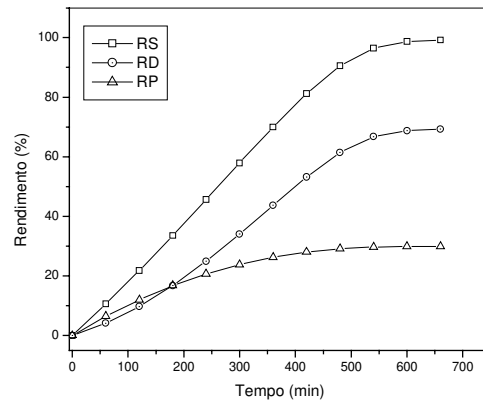


Figura 16 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 8

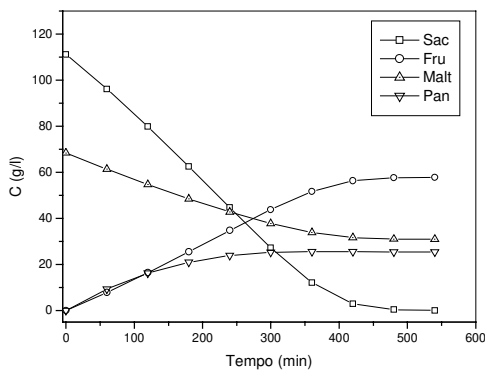


Figura 17– Perfis de concentração para o reator batelada –Simulação 9

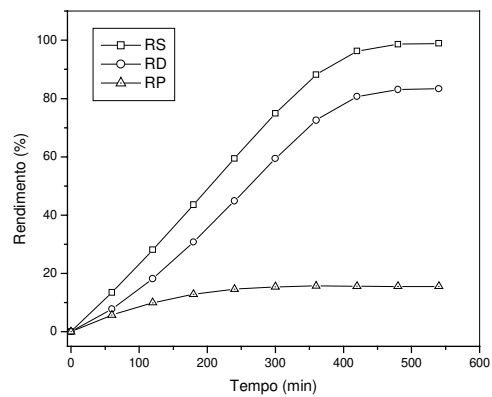


Figura 18 – Perfis de rendimento para o reator batelada –Simulação 9

Reator CSTR

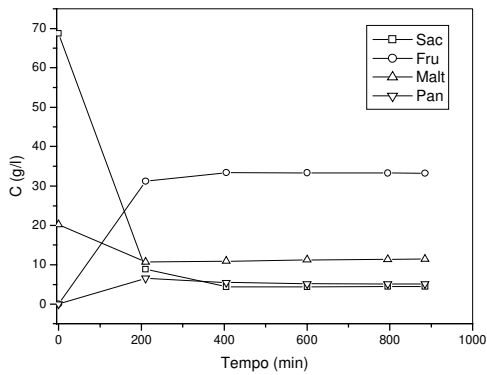


Figura 19– Perfis de concentração para o reator CSTR –Simulação 1

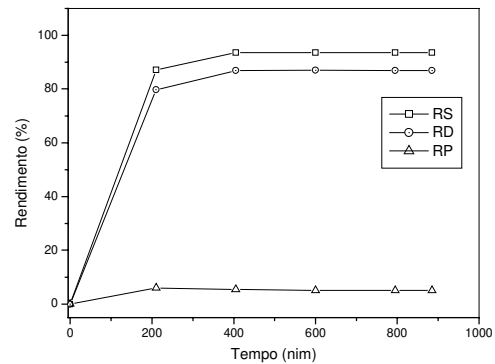


Figura 20– Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 1

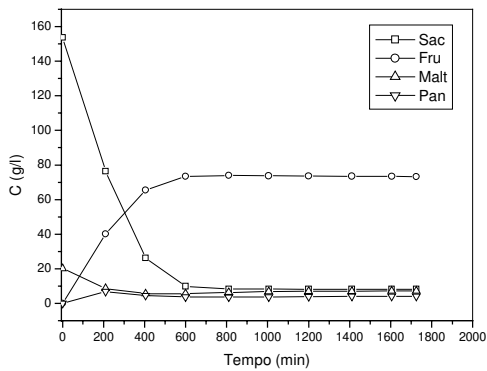


Figura 21 – Perfis de concentração para o reator CSTR –Simulação 2

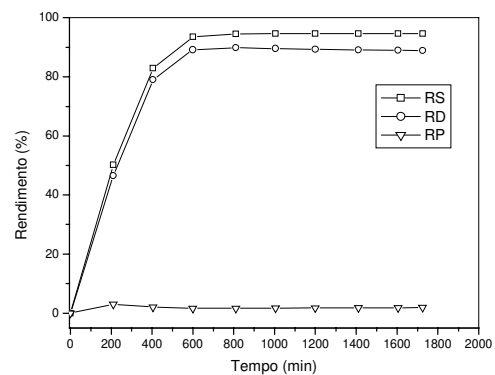


Figura 22– Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 2

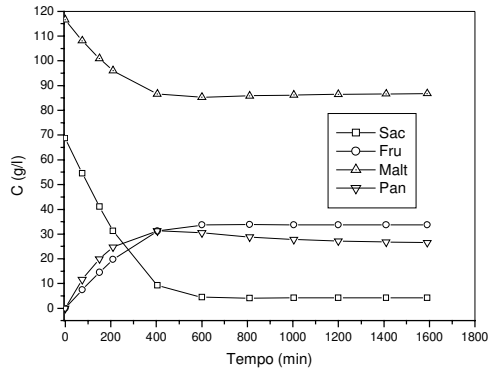


Figura 23– Perfis de concentração para o reator CSTR –Simulação3

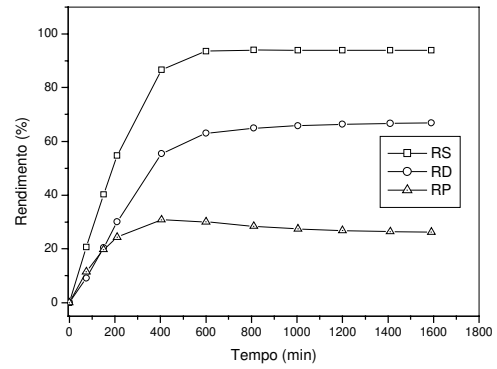


Figura 24– Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 3

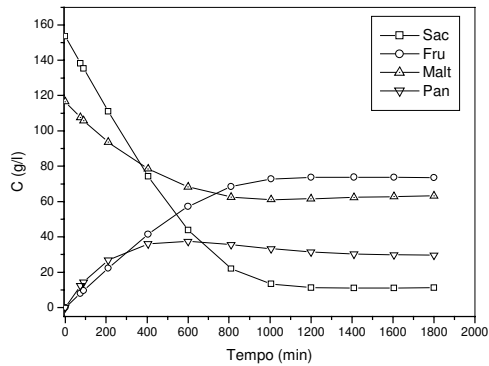


Figura 25– Perfis de concentração para o reator CSTR –Simulação 4

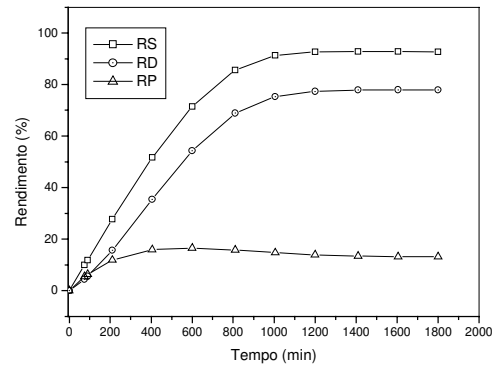


Figura 26– Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 4

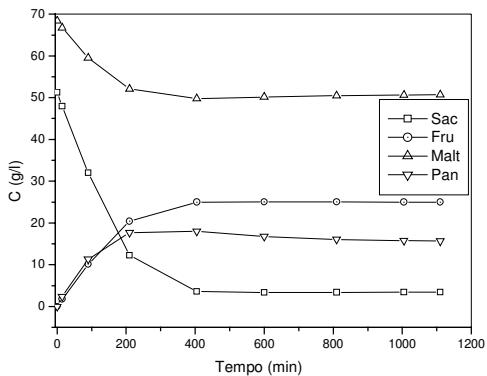


Figura 27 - Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 5

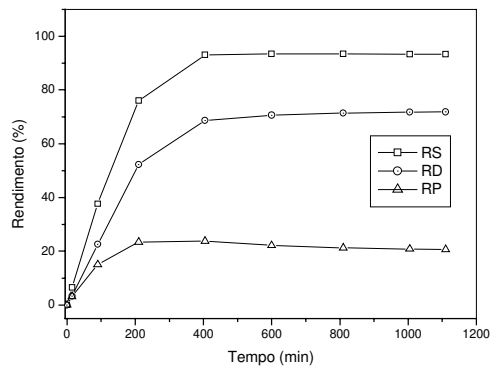


Figura 28– Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 5

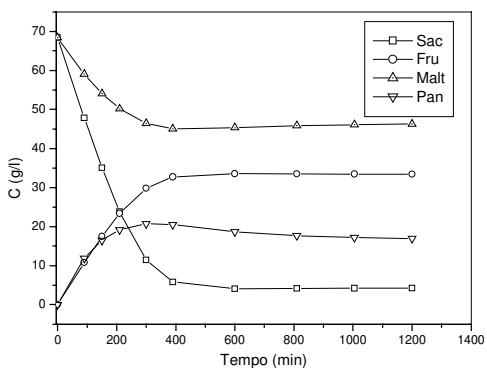


Figura 29 – Perfis de concentração para o reator CSTR –Simulação 6

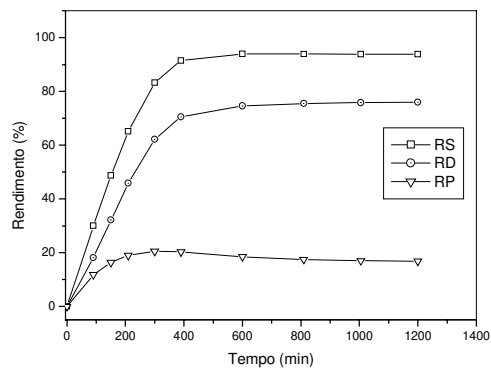


Figura 30– Perfis de rendimento para o reator CSTR –Simulação 6

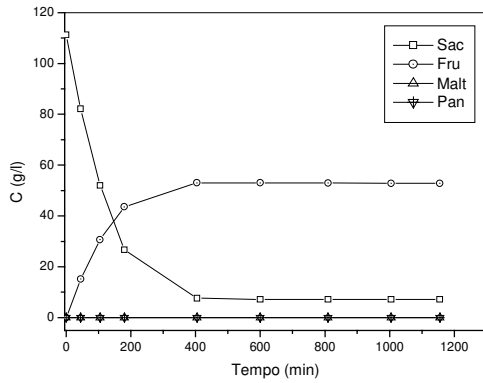


Figura 31 – Perfis de concentração para o reator CSTR – Simulação 7

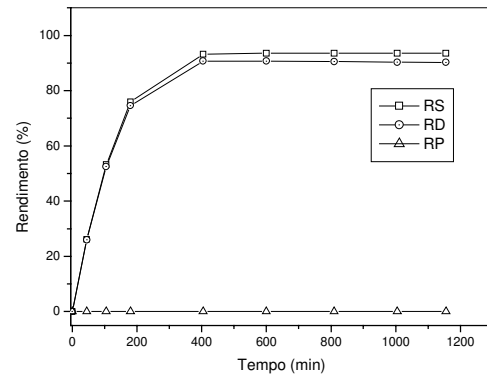


Figura 32 - Perfis de rendimento para o reator CSTR – Simulação 7.

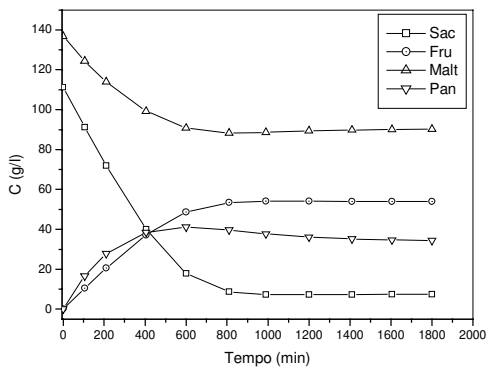


Figura 33 – Perfis de concentração para o reator CSTR – Simulação 8

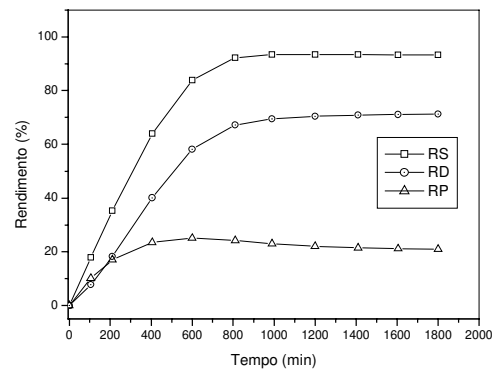


Figura 34– Perfis de rendimento para o reator CSTR – Simulação 8

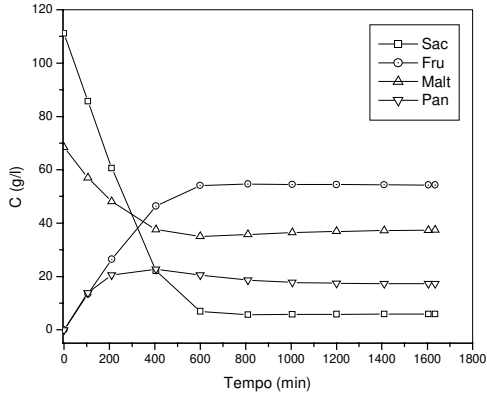


Figura 35 – Perfis de concentração para o reator CSTR – Simulação 9

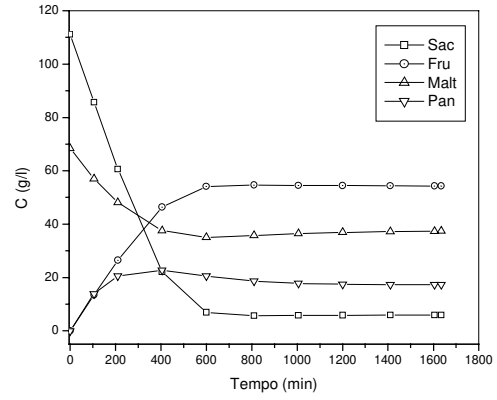


Figura 36 – Perfis de rendimento para o reator CSTR – Simulação 9

**Reator PFR**

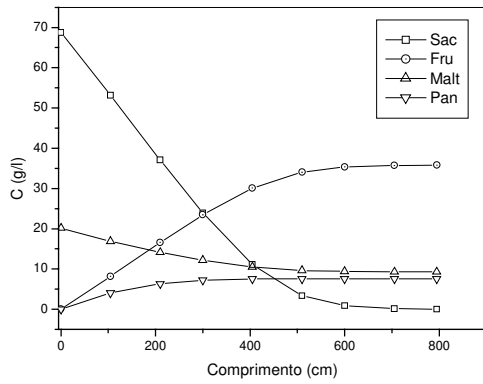


Figura 37 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 1

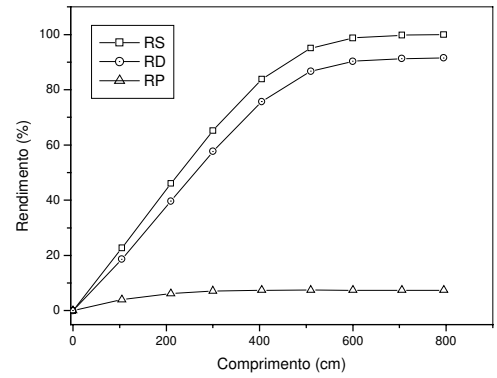


Figura 38 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 1

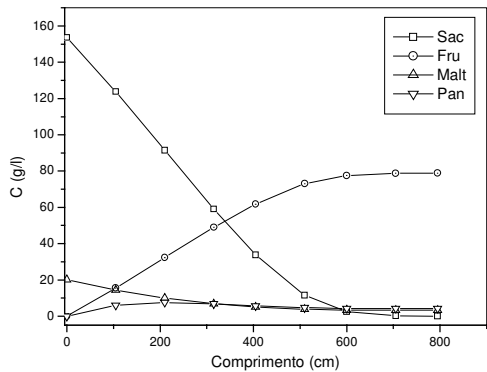


Figura 39 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 2.

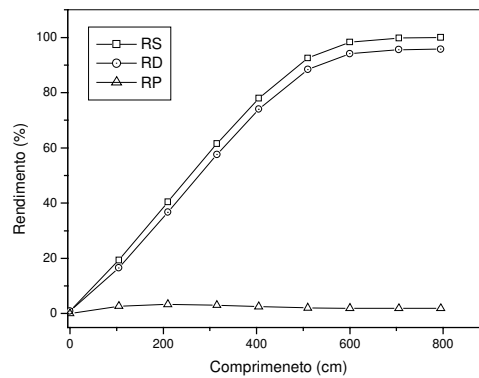


Figura 40 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 2.

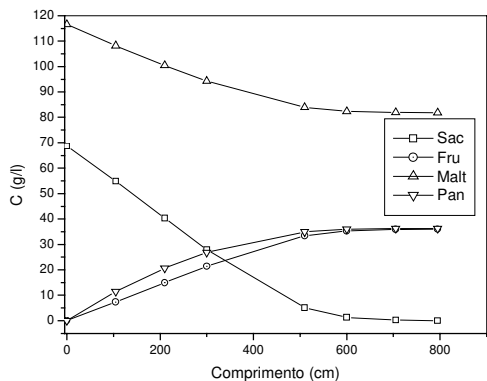


Figura 41 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 3.

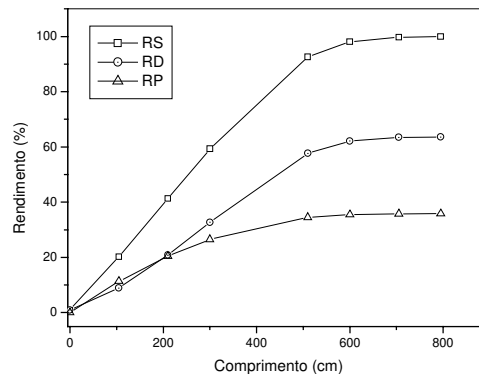


Figura 42 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 3.



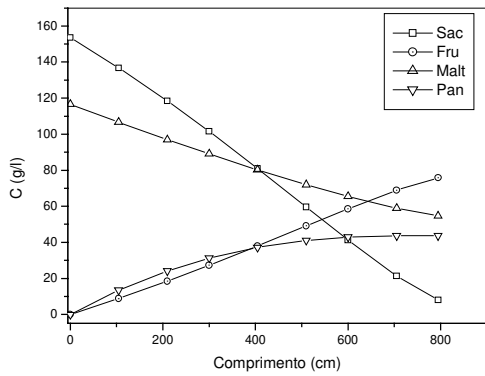


Figura 43 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 4.

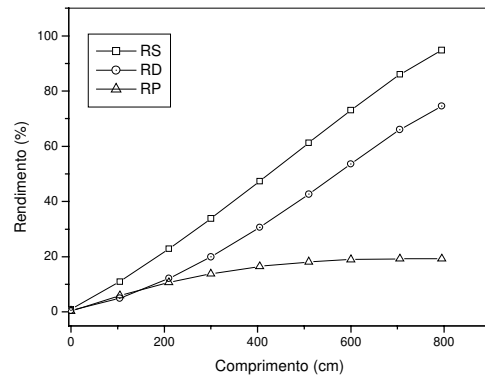


Figura 44 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 4.

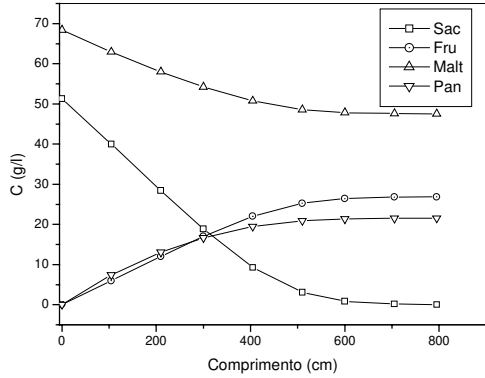


Figura 45 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 5.

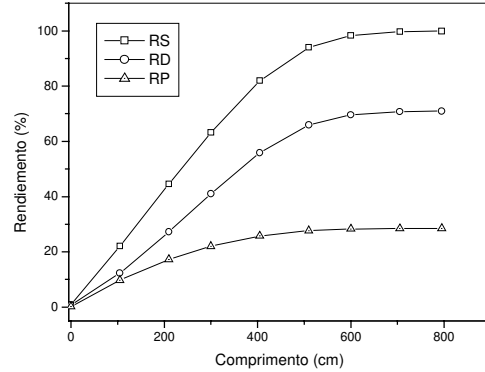


Figura 46 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 5.

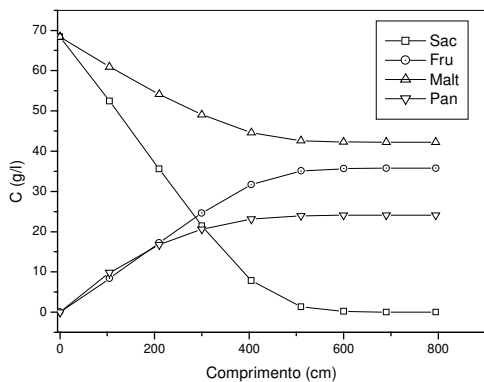


Figura 47 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 6.

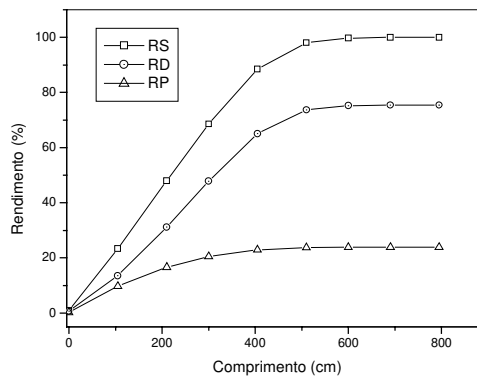


Figura 48 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 6.

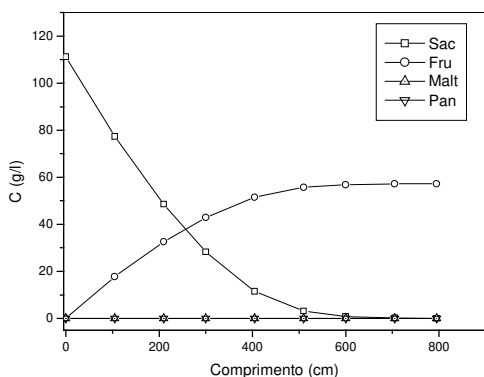


Figura 49 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 7.

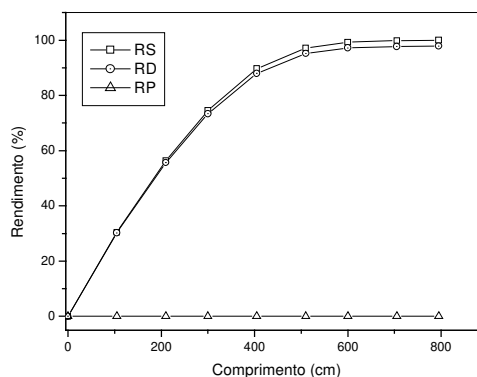


Figura 50 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 7.

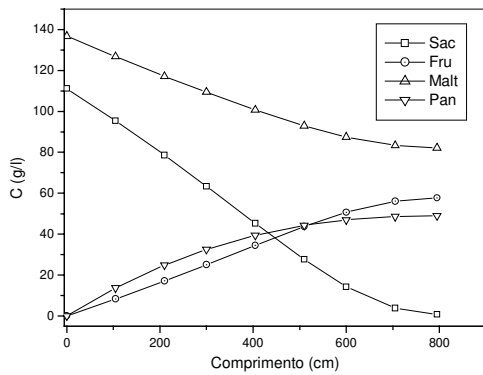


Figura 51 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 8.

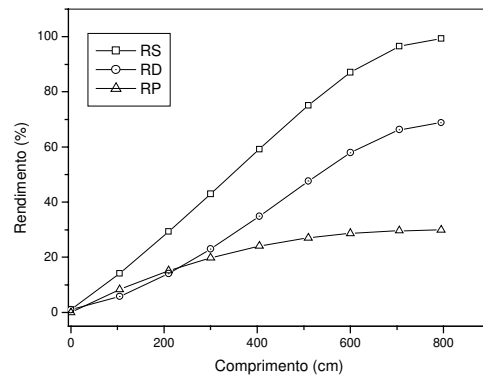


Figura 52 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 8.

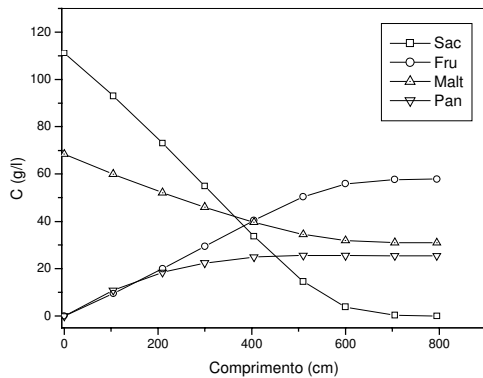


Figura 53 – Perfis de concentração para o reator PFR – Simulação 9.

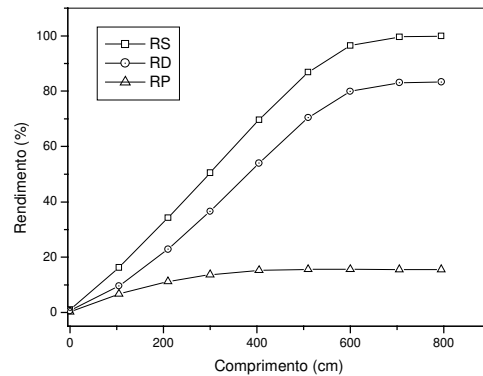


Figura 54 – Perfis de rendimento para o reator PFR – Simulação 9.

## **Apêndice 4**

### **Determinação da massa proteica da enzima obtida do *Leuconostoc mesenteroides* B512F**

---

Existem diversos métodos de determinação de massa proteica e sabidamente há diferenças entre a massa proteica total obtida com cada um deles. Zaia *et al.* (2000) estudaram cinco métodos espectrofotométricos (biuret, Lowry/Hartee, p-cloranil, ultravioleta a 280 nm (UV-280 nm) e ultravioleta à 260/280 nm (UV-260/280 nm)) para determinação de proteína total em diversos tecidos de rato sendo os resultados comparados entre si. Segundo os autores, os métodos de Lowry e p-cloranil são os mais sensíveis para as proteínas estudadas enquanto que os métodos UV-280 nm, UV-260/280 nm e o de biuret demonstraram a menor sensibilidade. Ainda de acordo com os autores, os métodos UV são os mais suscetíveis a interferências sendo que para os casos estudados os autores não recomendam o uso do método UV-280 nm.

Neste trabalho, foi realizado um estudo similar ao de Zaia *et al.* (2000) para a enzima dextrana-sacarase parcialmente purificada obtida do *L. mesenteroides* B512F sendo utilizados para isso os métodos UV-280 nm, Lowry (1951) e Bradford (1976). Para isso foram construídas curvas padrões para os métodos estudados utilizando-se a albumina bovina como proteína padrão. As curvas estão apresentadas nas Figuras 1, 2 e 3:

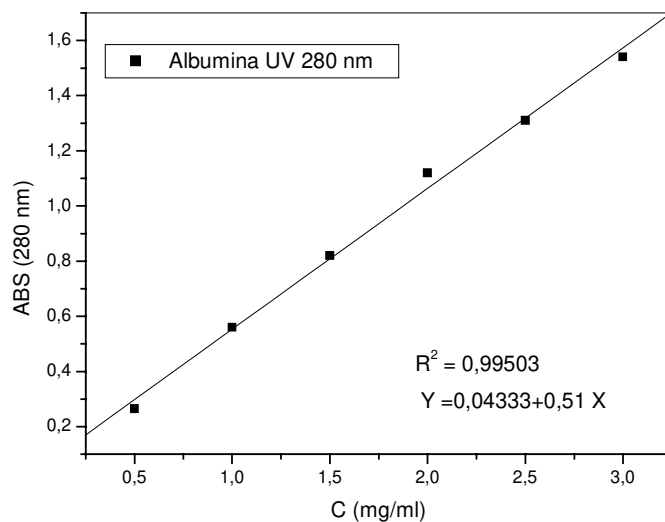


Figura 1 – Curva de padrão para albumina bovina, método UV-280 nm.

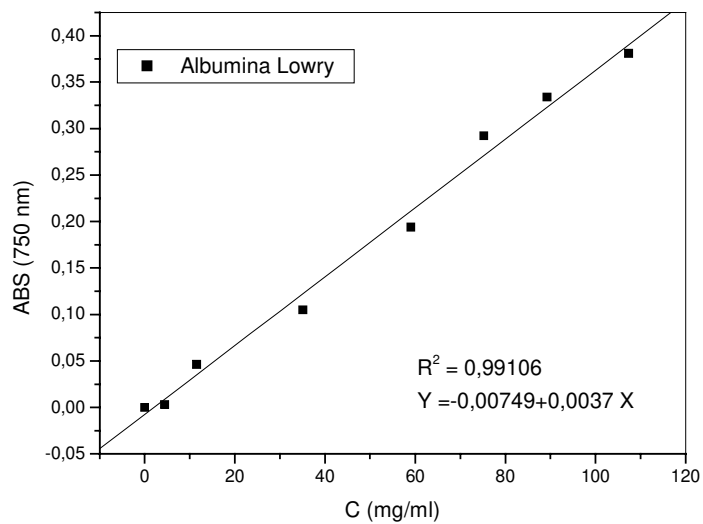


Figura 2 – Curva de padrão para albumina bovina, método Lowry.

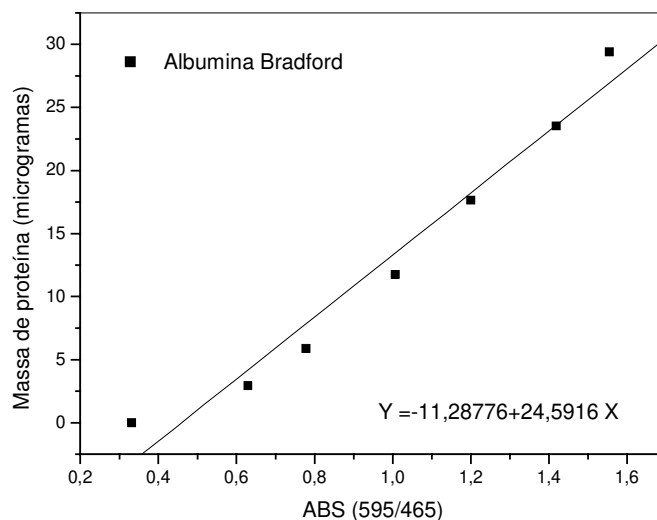


Figura 3 – Curva de padrão para albumina bovina, método Bradford.

A massa proteica total de uma amostra da enzima concentrada e precipitada com PEG 1500 e re-suspensa em acetato 50 mM, pH 5,2 teve sua massa determinada pelos métodos em estudo com o auxílio das respectivas curvas padrão apresentadas nas Figuras 1, 2 e 3. Um comparativo das massas obtidas é apresentado na Tabela 1 :

Tabela 1 - Massa proteica total da enzima concentrada

Método	Massa total de proteína
UV -280 nm	3,0 mg/ ml
Lowry	1,2 mg/ml
Bradford	70,17 µg/ ml

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, nota-se uma grande variação na massa proteica da amostra de acordo com o método utilizado. Entretanto é difícil saber qual o método mais adequado para a amostra em questão.

Durante a fermentação do *L. mesenteroides* NRRL B 512F para produção da enzima, em meio contendo sacarose como fonte de carbono, há produção simultânea de dextrana no meio de cultura. Na purificação parcial da enzima através da precipitação com

*Sueli Rodrigues/ Tese de Doutorado (FEQ/DPQ/UNICAMP)/ Outubro de 2003*

PEG, ocorre uma partição entre os dois polímeros, a dextrana formada durante a síntese e a enzima (Lopretti *et al.*, 1999). Sendo assim, pode-se concluir que a enzima obtida contém dextrana, que também absorve luz à 280 nm, constituindo portanto um interferente para o método.

O método até poderia ser utilizado, se fosse possível fazer um branco contendo dextrana, entretanto não são conhecidas a massa total de dextrana na amostra nem a sua distribuição de massa molar. Além do mais, a enzima contém além da dextrana uma pequena porção de PEG, cuja a massa também não é conhecida. Sendo assim, a determinação da massa proteica através do método de UV-280 nm não é adequada à enzima parcialmente purificada.

Apesar de mais trabalhosos, restam ainda os métodos de Lowry e Bradford. Por apresentar uma massa proteica maior tentou-se realizar uma eletroforese da proteína parcialmente purificada (SDS *page*) calculando-se a massa proteica a ser aplicada no gel a partir da concentração obtida pelo método de Lowry. A massa a ser aplicada no gel foi calculada de forma a se assegurar o valor mínimo para revelação com o corante Coomassie Blue R250 (40 µg de proteína por banda). O gel apresentou apenas uma banda bem clara em sua parte superior. Foi observado também que o *rf* desta banda (0,271) não condiz com as possíveis massa molares da enzima (60 a 180 kDa), indicando que a banda em questão pode ser dextrana. O ensaio foi então repetido utilizando-se a revelação com prata, método bem mais sensível que o anterior. Novamente as mesmas bandas foram obtidas. O teste foi repetido variando-se a concentração do gel e os padrões de proteínas, tendo sido o ensaio adequado à faixa de peso molecular de 20 a 190 kDa, pois de acordo com Kim e Robyt (1994), a massa molar da enzima pode variar de 60 a 190 kDa devido à sua agregação ou formação de trímeros. Entretanto, não foi obtida separação nítida na faixa de massa molar desejada para enzima dextrana-sacarase. A Figura 4 apresenta os resultados obtidos para a eletroforese em Gel de acrilamida 12 % revelada com Coomassie Blue R250.

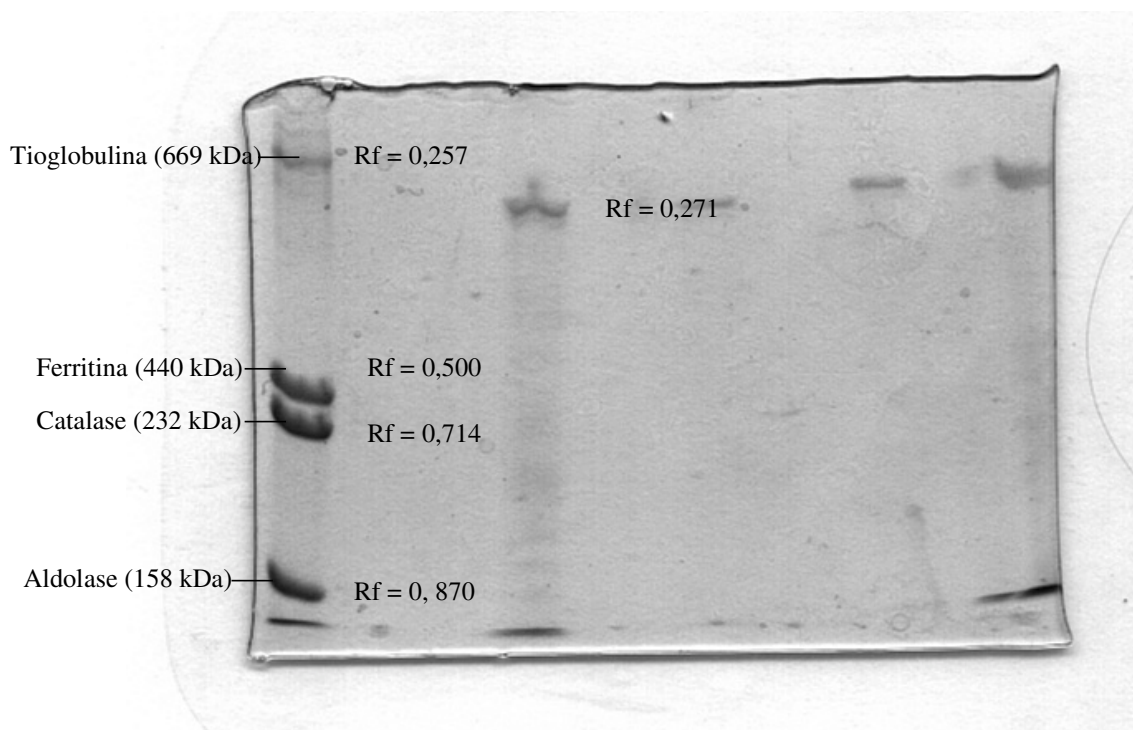


Figura 4 – Eletroforese da dextrana-sacarase em gel de acrilamida 12 % (SDS page).

Estes resultados são indicativos de que a massa proteica utilizada foi insuficiente para obtenção da coloração no gel, indicando que a massa proteica obtida para a amostra está acima da massa real de proteína. Dessa forma, pode-se concluir que o método de Lowry também não é adequado. A outra alternativa seria a utilização do método de Bradford, entretanto a massa obtida por este método para a enzima concentrada é baixa, sendo que as diluições para determinação da isoterma poderiam não apresentar massa suficiente para a utilização deste método.

A purificação total da enzima pode ser obtida utilizando-se dextranases para quebra da dextrana ligada à enzima, seguida de cromatografia de permeação em gel (GPC), o que encarece a obtenção da enzima totalmente purificada.

O objetivo da obtenção da cinética e da isoterma de adsorção de uma determinada proteína é determinar a capacidade de captura da proteína por uma determinada resina, e não somente a massa proteica total retida na resina. Os métodos de determinação de massa proteica UV-280nm, Lowry e Bradford medem a massa total de proteína e como a enzima parcialmente purificada contém outras proteínas contaminantes, nenhum destes métodos



seria totalmente adequados. Entretanto, a enzima retida pode ser quantificada através da determinação da atividade enzimática, Sendo assim, como o que interessa é determinar a quantidade de enzima retida pela resina e levando-se em conta que a atividade relativa (atividade por unidade de massa) é altamente dependente da preparação enzimática, optou-se pela medida da atividade enzimática na determinação das isothermas e cinéticas de adsorção neste trabalho.

## Apêndice 5

### Comparação entre as isotermas de Langmuir

---

Uma metodologia bastante utilizada na obtenção da cinética de adsorção de enzimas é a utilização de um sistema contínuo constituído de um reator termostatzado acoplado a um espectrofotômetro UV-Visível. A cinética é então determinada adicionando-se a solução enzimática ao reator contendo a resina. A solução enzimática é recirculada no sistema passando pelo espectrofotômetro onde é realizada a determinação da absorbância à 280 nm, continuamente. Um filtro acoplado à saída do reator garante que a resina não passe pelo espectrofotômetro, comprometendo com isso a leitura e o equipamento.

O sistema é esquematizado a seguir:

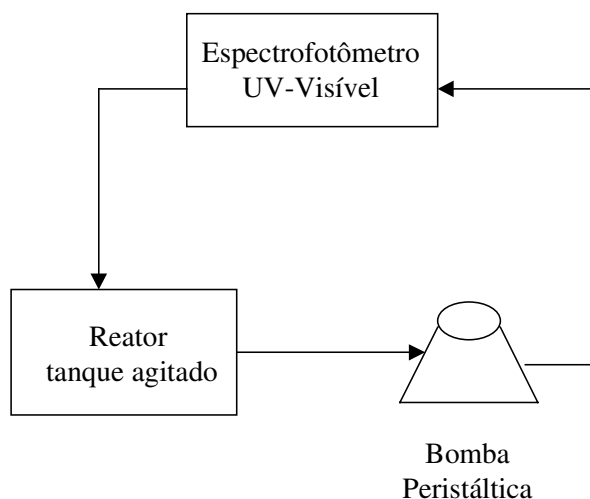


Figura 1 – Esquema de um sistema contínuo para determinação de cinética enzimática de proteínas através da absorbância à 280 nm.

Este tipo de sistema foi utilizado no trabalho de Souza (1993) e Currelero (1998) para determinar as isotermas e a cinética de adsorção da dextrana-sacarase. A princípio neste trabalho também seria utilizado o mesmo sistema. Entretanto, o equipamento estava danificado e, portanto, não foi possível a obtenção da cinética enzimática utilizando este

procedimento. Dessa forma, optou-se por determinar a atividade enzimática ao invés da massa proteica total pelo método UV-280 nm. O tipo de isoterma obtido levou a uma investigação mais detalhada do trabalho, que por sua vez conduziu a verificação da inadequação do método UV-280 nm para determinação da massa proteica da enzima parcialmente purificada obtida do *L. mesenteroides* B512F, conforme Apêndice 4.

Mesmo ciente da inadequação do método UV-280 nm para a enzima estudada, o método foi utilizado para obtenção de uma isoterma em DEAE-Streamline à 25 °C (tampão acetato 50 mM pH 5,2). Para a realização deste ensaio foram utilizados Erlenmeyers de 50 ml contendo 1 ml da resina DEAE-Streamline previamente equilibrada em tampão acetato 20 mM e pH 5,2. A cada Erlenmyer foram adicionados 15 ml de solução enzimática de diferentes concentrações. Os Erlenmeyers foram então mantidos à 25°C, sob agitação de 150 rpm em *shaker* rotatório. Foi considerado um tempo de 1 hora para atingir o equilíbrio. Este ensaio foi realizado com a finalidade de comparar os resultados obtidos com a resina DEAE-Streamline e a resina DEAE-Celulose utilizada por Souza (1993) e Currello (1998). A isoterma e seu ajuste são apresentados na Figura 2.

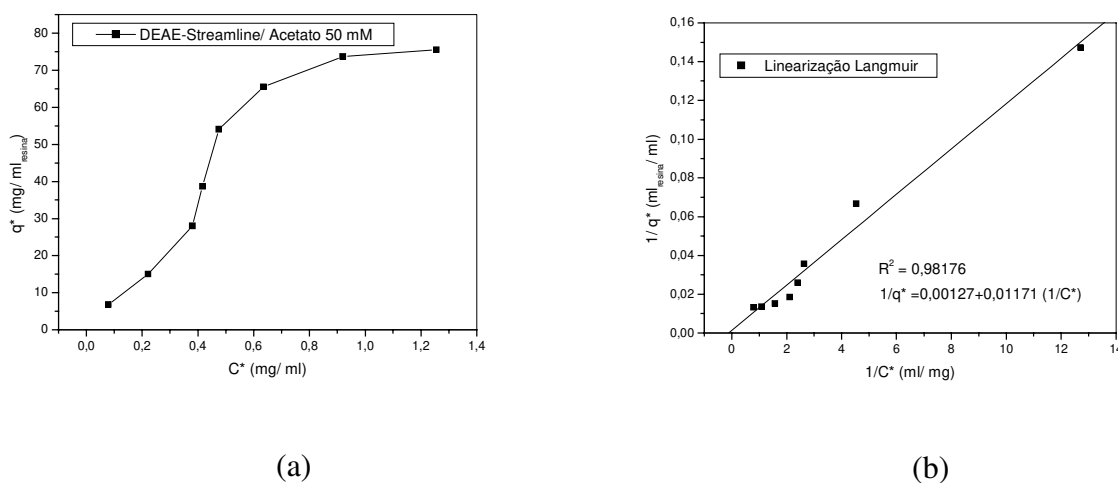


Figura 2 – (a) Isotherma de adsorção da dextrana-sacarase parcialmente purificada em DEAE-Streamline à 25 °C, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2.; (b) linearização e ajuste da isoterma segundo modelo de Langmuir .

Observa-se que a isoterma obtida através da determinação de massa proteica total pelo método UV-280 nm é bem mais próxima à isoterma de Langmuir que as obtidas

através da medida direta de atividade no sobrenadante. Sendo assim os resultados obtidos foram comparados com os obtidos por Souza (1993) e Currelero (1998) conforme apresentado na Tabela 1:

Tabela 1 – Comparação dos parâmetros da equação de Langmuir para isoterma obtida com o método UV-280 nm

Dados Experimentais	Kd (mg/ml)	qm (mg/ mg res)
Souza (1993)	0,4975	519,751
Currelero <i>et al.</i> (1998)	1,17	2830
Presente Trabalho *	30,56	2648

\* DEAE-Streamline e  $qm$  em ml/ ml<sub>resina</sub>

Comparando-se as constantes da equação de Langmuir obtidas neste trabalho com as obtidas em trabalhos anteriores (Souza, 1993 e Currelero, 1998) nota-se que os resultados são bastantes diferentes entre si. É compreensível que as constantes obtidas neste trabalho sejam diferentes, pois apesar de a resina utilizada possuir o mesmo grupo trocador, a matriz e a porosidade do suporte são diferentes. Já as constantes obtidas nos trabalhos de Souza (1993) e Currelero (1998) não deveriam diferir tanto entre si.

De acordo com o Capítulo 6, a isoterma não segue o modelo de Langmuir. Entretanto a isoterma apresentada na Figura 2, obtida através da determinação da diferença de absorbância à 280 nm, sugere uma isoterma de Langmuir tendo sido obtido um bom ajuste para este modelo. Entretanto, a utilização deste ajuste não é indicada pelos seguintes motivos:

- a utilização do método de UV-280 nm para determinação da massa proteica total não é adequada para a enzima dextrana-sacarase parcialmente purificada obtida de *L. mesenteroides B512F*

- a determinação de massa total proteica não permite o estudo da seletividade da adsorção da enzima em relação às proteínas contaminantes presentes na enzima parcialmente purificada
- a presença de dextrana na amostra torna as soluções enzimáticas não homogêneas, impossibilitando assim a reprodutibilidade do ensaio para cálculo de possíveis desvios experimentais
- a utilização de um modelo de adsorção não reprodutível torna a modelagem e simulação do sistema proposto na Figura 6.1 do Capítulo 6, um procedimento não preditivo e portanto sem nenhuma validade prática constituindo-se somente de especulação teórica sem valor científico
- há indicativos de que a adsorção da enzima na presença de dextrana não é viável (Kim e Robyt, 1994 ).

## Apêndice 6

### ***Equações diferenciais para o modelo cinético***

Neste apêndice as equações constituintes do modelo cinético estudado neste trabalho, foram propostas por Heincke *et al.* (1999). Estas equações se baseiam no mecanismo de inserção para a síntese de dextrana (Robyt *et al.*, 1974). Para melhor compreensão do modelo, o esquema cinético apresentado no trabalho de Heincke *et al.* (1999) é novamente reproduzido na Figura 1:

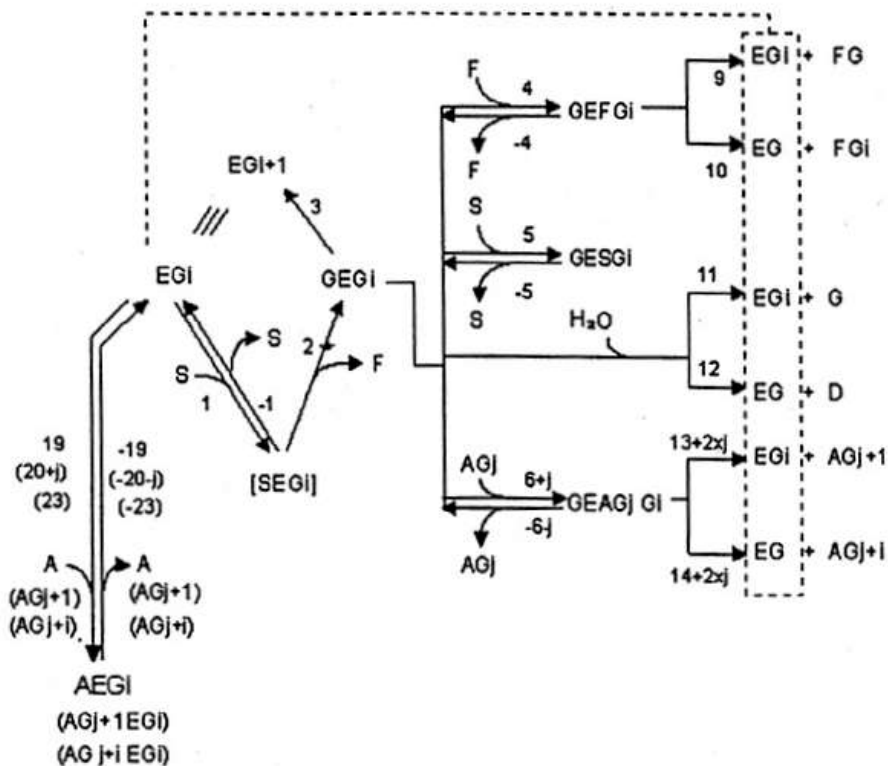


Figura 1– Modelo cinético para a catálise da dextrana-sacarase (índices  $i \geq 2$  e  $0 \leq j \leq 2$ ) Heincke *et al.* (1999).

**1. Equações diferenciais para o modelo cinético da dextrana-sacarase**

Consumo de sacarose (reação global)

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{p1 \cdot S \cdot EG_i}{-p_{-1}S \cdot EG_i + p5 \cdot S \cdot GEG_i - p_{-5}GESG_i} \quad (1)$$

Taxa de formação de frutose (reação global)

$$\frac{dF}{dt} = p2 \cdot SEG_i + p_{-4} \cdot GEFG_i - p4 \cdot F \cdot GEG_i \quad (2)$$

Taxa de consumo do Aceptor

$$-\frac{dA}{dt} = p6 \cdot A \cdot GEG_i - p_{-6}GEAG_i \quad (3)$$

*Taxa de formação dos produtos aceptores, incluindo a formação de leucrose*

Produto primário de acceptor

$$\frac{dAG}{dt} = p13 \cdot GAG_i + p_{-7} \cdot GEAGG_i - p7 \cdot GEG_i \cdot AG \quad (4)$$

Produto secundário de acceptor

$$\frac{dAG2}{dt} = p15 \cdot GEAGG_i + p_{-8} \cdot GEAG2G_i - p8 \cdot GEG_i \cdot AG2 \quad (5)$$

Produto terciário de acceptor

$$\frac{dGA3}{dt} = p17 \cdot GEAG2G_i \quad (6)$$

## Formação de leucrose

$$\frac{dFG}{dt} = p_9 \cdot GEFGi \quad (7)$$

**2. Equações diferenciais para os complexos enzimáticos intermediários (exceto: EGi e GEGi)**

$$\frac{dSEGi}{dt} = p_1 \cdot S \cdot EGi - (p_{-1} + p_2) \cdot SEGi \quad (8)$$

$$\frac{dGEFGi}{dt} = p_4 \cdot F \cdot GEGi - (p_{-4} + p_9 + p_{10}) \cdot GEFGi \quad (9)$$

$$\frac{dGESGi}{dt} = p_5 \cdot S \cdot GEGi - p_{-5} \cdot GESGi \quad (10)$$

$$\frac{dGEAGi}{dt} = p_6 \cdot A \cdot GEGi - (p_{-6} + p_{13} + p_{14}) \cdot GEAGi \quad (11)$$

$$\frac{dGEAGGi}{dt} = p_7 \cdot AG \cdot GEGi - (p_{-7} + p_{15} + p_{16}) \cdot GEAGGi \quad (12)$$

$$\frac{dGEAG2Gi}{dt} = p_8 \cdot AG2 \cdot GEGi - (p_{-8} + p_{17} + p_{18}) \cdot GEAG2Gi \quad (13)$$

$$\frac{dAEGi}{dt} = p_{19} \cdot A \cdot EGi - p_{-19} \cdot AEGi \quad (14)$$



$$\frac{dAGEGi}{dt} = p_{20} \cdot AG \cdot EG_i - p_{-20} \cdot AGEG_i \quad (15)$$

$$\frac{dAG2EG_i}{dt} = p_{21} \cdot AG_2 \cdot EG_i - p_{-21} \cdot AG2EG_i \quad (16)$$

$$\frac{dAG3EG_i}{dt} = p_{22} \cdot AG_3 \cdot EG_i - p_{-22} \cdot AG3EG_i \quad (17)$$

$$\frac{dAG_iEG_i}{dt} = p_{23} \cdot AG_i \cdot EG_i - p_{-23} \cdot AG_iEG_i \quad (18)$$

### 3. Balanço de enzima

$$E_o = EG_i + SEG_i + GEG_i + GEFG_i + GEAG_i + GEAGG_i + GEAG2G_i + GESG_i + AEG_i + AGEG_i + AG2EG_i + AG3EG_i + AG_iEG_i \quad (19)$$

Supondo estado estacionário para as equações de 8 a 18 tem-se:

$$SEG_i = \frac{p_1}{(p_{-1} + p_2) \cdot S \cdot EG_i} \quad (20)$$

$$GEFG_i = \frac{p_4}{(p_{-4} + p_9 + p_{10}) \cdot F \cdot GEG_i} \quad (21)$$

$$GESG_i = \frac{p_5}{p_{-5} \cdot S \cdot GEG_i} \quad (22)$$

$$GEAG_i = \frac{p_6}{(p_{-6} + p_{13} + p_{14}) \cdot A \cdot GEG_i} \quad (23)$$

$$GEAGGi = \frac{p7}{(p_{-7} + p15 + p16) \cdot AG \cdot GEGi} \quad (24)$$

$$GEAG2Gi = \frac{p8}{(p_{-8} + p17 + p18) \cdot AG2 \cdot GEGi} \quad (25)$$

$$AEGi = \frac{p19}{p_{-19} \cdot A \cdot EGi} \quad (26)$$

$$AGEGi = \frac{p20}{p_{-20} \cdot AG \cdot EGi} \quad (27)$$

$$AG2EGi = \frac{p21}{p_{-21} \cdot AG2 \cdot EGi} \quad (28)$$

$$AG3Gi = \frac{p22}{p_{-22} \cdot AG3 \cdot EGi} \quad (29)$$

$$AGiEGi = \frac{p23}{p_{-23} \cdot AGi \cdot EGi} \quad (30)$$

**4. Balanço de massa para o complexo enzimático intermediário EG<sub>i</sub> de acordo com o esquema**

$$\begin{aligned} \frac{dEGi}{dt} = & p_{-1} \cdot SEGi + p3 \cdot GEGi + (p9 + p10) \cdot GEFGi + (p11 + p12) \cdot H_2 \cdot GEGi \\ & + (p13 + 14) \cdot GEAGi + (p15 + p16) \cdot GEAGGi + (p17 + p18) \cdot GEAG2Gi \\ & + p_{-19} \cdot AEGi + p_{-20} \cdot AGEGi + p_{-21} \cdot AG2Gi + p_{-22} \cdot AG3Gi + p_{-23} \cdot AGiEGi \\ & + p1 \cdot S \cdot EG_i - p19 \cdot A \cdot EG_i - p21 \cdot AG2 \cdot EG_i - p23 \cdot AG_i \cdot EG_i \end{aligned} \quad (31)$$

Combinando as Equações (31) e (20) e substituindo na Equação (30) tem-se:

$$\frac{dEG_i}{dt} = -p_{24} \cdot EG_i \cdot S + GEG_i \cdot (p_{25} + p_{26} \cdot F + p_{27} \cdot A + p_{28} \cdot AG + p_{29} \cdot AG_2) \quad (32)$$

Substituindo pelas expressões das Equações de 20 a 30 tem-se:

$$E_o = EG_i \cdot (1 + p_{30} \cdot S + p_{31} \cdot A + p_{32} \cdot AG + p_{33} \cdot AG_2 + p_{34} \cdot AG_3 + p_{35} \cdot AG_i) + GEG_i \cdot (1 + p_{36} \cdot F + p_{37} \cdot S + p_{38} \cdot A + p_{39} \cdot AG + p_{40} \cdot AG_2) \quad (33)$$

Resolvendo a equação (32) para  $EG_i$  e substituindo na equação (33) e resolvendo-se para  $GEG_i$  tem-se:

$$GEG_i = p_{24} \cdot E_o \cdot S \cdot [(p_{25} + p_{26} \cdot F + p_{27} \cdot A + p_{28} \cdot AG + p_{29} \cdot AG_2) \cdot (1 + p_{30} \cdot S + p_{31} \cdot A + p_{32} \cdot AG + p_{33} \cdot AG_2 + p_{34} \cdot AG_3 + p_{35} \cdot AG_i) + (p_{24} \cdot S) \cdot (1 + p_{36} \cdot F + p_{37} \cdot S + p_{38} \cdot A + p_{39} \cdot AG + p_{40} \cdot AG_2)]^{-1} \quad (34)$$

Fazendo as multiplicações, tem-se a seguinte expressão para o denominador:

$$1 + p_{42} \cdot S + p_{43} \cdot A + p_{44} \cdot AG + p_{45} \cdot AG_2 + p_{34} \cdot AG_3 + p_{35} \cdot AG + p_{46} \cdot F + p_{47} \cdot F \cdot S + p_{48} \cdot F \cdot A + p_{49} \cdot F \cdot AG + p_{50} \cdot F \cdot AG_2 + p_{51} \cdot F \cdot AG_3 + p_{52} \cdot F \cdot AG_i + p_{53} \cdot A \cdot S + p_{54} \cdot A^2 + p_{55} \cdot A \cdot AG + p_{56} \cdot A \cdot AG_2 + p_{57} \cdot A \cdot AG_3 + p_{58} \cdot A \cdot AG_i + p_{59} \cdot AG \cdot S + p_{60} \cdot AG^2 + p_{61} \cdot AG \cdot AG_2 + p_{62} \cdot AG \cdot AG_3 + p_{63} \cdot AG \cdot AG_i + p_{64} \cdot AG_2 \cdot S + p_{65} \cdot AG_2^2 + p_{66} \cdot AG_2 \cdot AG_3 + p_{67} \cdot AG_2 \cdot AG_i + p_{68} \cdot S^2 \quad (35)$$

### 5. Equações diferenciais resultantes:

Consumo de sacarose:

Substituindo a equação (35) na (34) para  $GEG_i$  e combinado as equações (1), (20), (22), (33) tem-se:

*Estudo da síntese enzimática de dextrana na presença de maltose como acceptor* A.39

$$\frac{-dS}{dt} = \frac{p41 \cdot E_o \cdot S(p25 + p26 \cdot F + p27 \cdot A + p28 \cdot AG + p29 \cdot AG2)}{N} \quad (36)$$

ou

$$\frac{-dS}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot (p69 + p70 \cdot F + p71 \cdot A + p72 \cdot AG + p73 \cdot AG2)}{N} \quad (37)$$

Formação de frutose

$$\frac{dF}{dt} = \frac{p41 \cdot E_o \cdot S \cdot (p2 \cdot p30/p24 + (p25 + (p26 + p74) \cdot F + p27 \cdot A + p28 \cdot AG + p29 \cdot AG2))}{N} \quad (38)$$

ou

$$\frac{dF}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot (p75 + p76 \cdot F + p77 \cdot A + p78 \cdot AG + p79 \cdot AG2)}{N} \quad (39)$$

A partir das definições dos parâmetros é possível verificar que  $p76 = 0$ , então a equação (39) pode ser simplificada:

$$\frac{dF}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot (p75 + p77 \cdot A + p78 \cdot AG + p79 \cdot AG2)}{N} \quad (40)$$

A taxa de consumo do acceptor é dada por:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{p80 \cdot E_o \cdot A \cdot S}{N} \quad (41)$$

As taxas de formação dos produtos do acceptor (incluindo a formação de leucrose)

*Produto primário (panose)*

$$\frac{dAG}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot (p81 \cdot A - p82 \cdot AG)}{N} \quad (42)$$

Produto secundário (tetrassacarídeo)

$$\frac{dAG2}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot (p83 \cdot AG - p84 \cdot AG2)}{N} \quad (43)$$

Produto terciário (pentassacarídeo)

$$\frac{dAG3}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot (p85 \cdot AG2)}{N} \quad (44)$$

Formação de Leucrose

$$\frac{dFG}{dt} = \frac{E_o \cdot S \cdot F \cdot p86}{N} \quad (45)$$

## Definição dos parâmetros

$$p24 = \frac{p1 \cdot p2}{(p_{-1} + p2)}$$

$$p38 = \frac{p6}{(p_{-6} + p13 + p14)}$$

$$p25 = p3 + (p11 + p12) \cdot H_2O$$

$$p39 = \frac{p7}{(p_{-7} + p15 + p16)}$$

$$p26 = \frac{(p9 + p10) \cdot p4}{(p_{-4} + p9 + p10)}$$

$$p40 = \frac{p8}{(p_{-8} + p17 + p18)}$$

$$p27 = \frac{(p13 + p14) \cdot p6}{(p_{-6} + p13 + p14)}$$

$$p41 = \frac{p24}{p25}$$

$$p28 = \frac{(p15 + p16) \cdot p7}{(p_{-7} + p15 + p16)}$$

$$p42 = p30 + \frac{p24}{p25}$$

$$p29 = \frac{(p17 + p18) \cdot p8}{(p_{-8} + p17 + p18)}$$

$$p43 = p31 + \frac{p27}{p25}$$

$$p30 = \frac{p1}{(p_{-1} + p2)}$$

$$p44 = p32 + \frac{p28}{p25}$$

$$p31 = \frac{p19}{p_{-19}}$$

$$p45 = p33 + \frac{p29}{p25}$$

$$p32 = \frac{p20}{p_{-20}}$$

$$p46 = \frac{p26}{p25}$$

$$p33 = \frac{p21}{p_{-21}}$$

$$p47 = \frac{(p26 \cdot p30 + p24 \cdot p36)}{p25}$$

$$p34 = \frac{p22}{p_{-22}}$$

$$p48 = p46 \cdot p31$$

$$p35 = \frac{p23}{p_{-23}}$$

$$p49 = p46 \cdot p32$$

$$p50 = p46 \cdot p33$$

$$p36 = \frac{p4}{(p_{-4} + p9 + p10)}$$

$$p51 = p46 \cdot p34$$

$$p52 = p46 \cdot p35$$

$$p37 = \frac{p5}{p_{-5}}$$

$$p53 = \frac{(p27 \cdot p30 + p24 \cdot p38)}{p25}$$

$$p54 = \frac{p27 \cdot p30}{p25}$$

$$p55 = \frac{(p27 \cdot p32 + p28 \cdot p31)}{p25}$$

$$p56 = \frac{(p27 \cdot p33 + p29 \cdot p31)}{p25}$$

$$p57 = \frac{p27 \cdot p34}{p25}$$

$$p58 = \frac{p27 \cdot p35}{p25}$$

$$p59 = \frac{p28 \cdot p30}{p25}$$

$$p60 = \frac{p28 \cdot p32}{p25}$$

$$p61 = \frac{p28 \cdot p33}{p25}$$

$$p62 = \frac{p28 \cdot p34}{p25}$$

$$p63 = \frac{p28 \cdot p35}{p25}$$

$$p64 = \frac{(p29 \cdot p30 + p24 \cdot p40)}{p25}$$

$$p65 = \frac{p29 \cdot p33}{p25}$$

$$p66 = \frac{p29 \cdot p34}{p25} \quad p67 = \frac{p29 \cdot p35}{p25}$$

$$p68 = \frac{p24 \cdot p37}{p25} = p41 \cdot p37$$

$$p69 = p25 \cdot p41 = p24$$

$$p70 = p26 \cdot p41$$

$$p71 = p27 \cdot p41$$

$$p72 = p28 \cdot p41$$

$$p73 = p29 \cdot p41$$

$$p74 = \frac{p_{-4} \cdot p4}{(p_{-4} + p9 + p10)} - p4 = p26$$

$$p75 = \frac{p41 \cdot p2 \cdot p30 \cdot p25}{p24} = p24$$

$$p76 = p41 \cdot \frac{(p2 \cdot p30 \cdot p26)}{(p24 + p74)} = 0$$

$$p77 = \frac{p41 \cdot p2 \cdot p30 \cdot p27}{p24} = p71$$

$$p78 = \frac{p41 \cdot p2 \cdot p30 \cdot p28}{p24} = p72$$

$$p79 = \frac{p41 \cdot p2 \cdot p30 \cdot p29}{p24} = p73$$

$$p80 = p41 \cdot \left( \frac{p6 - p_{-6} \cdot p6}{(p_{-6} + p13 + p14)} \right) = p71$$

$$p81 = \frac{p41 \cdot p13 \cdot p6}{(p_{-6} + p13 + p14)} = \frac{p71 \cdot p13}{(p13 + p14)}$$

$$p82 = p41 \cdot \left( \frac{p7 - p_{-7} \cdot p7}{(p_{-7} + p15 + p16)} \right) = p72$$

$$p83 = \frac{p41 \cdot p15 \cdot p7}{(p_{-7} + p15 + p16)} = \frac{p72 \cdot p15}{(p15 + p16)}$$

$$p84 = p41 \cdot \left( \frac{p8 - p_{-8} \cdot p8}{(p_{-8} + p17 + p18)} \right) = p73$$

$$p_{85} = \frac{p_{41} \cdot p_{17} \cdot p_8}{p_{-8} + p_{17} + p_{18}} = \frac{p_{73} \cdot p_{17}}{p_{17} + p_{18}}$$

$$p_{86} = \frac{p_{41} \cdot p_9 \cdot p_4}{p_{-4} + p_9 + p_{10}} = \frac{p_{70} \cdot p_{10}}{p_9 + p_{10}}$$





## Apêndice 7

### **Comparação entre os perfis experimentais e obtidos pelo modelo matemático para a síntese com a enzima obtida com o *L. mesenteroides* B512FMC.**

Os perfis experimentais para os carboidratos envolvidos na síntese enzimática de dextrana apresentados no Capítulo 3 foram utilizados para o ajuste das constantes envolvidas no modelo matemático para determinação dos perfis dos carboidratos envolvidos na síntese enzimática de dextrana. As Figuras de 1 a 8 apresentam a comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação do modelo matemático apresentado no Capítulo 7 (equações de 7.1 a 7.5) com as constantes ajustadas para a enzima dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC.

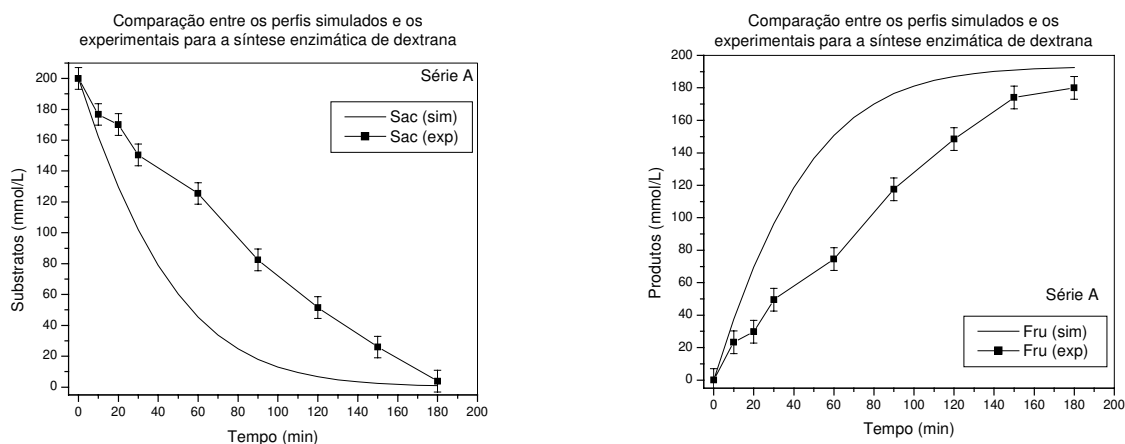


Figura 1 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteróides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série A).

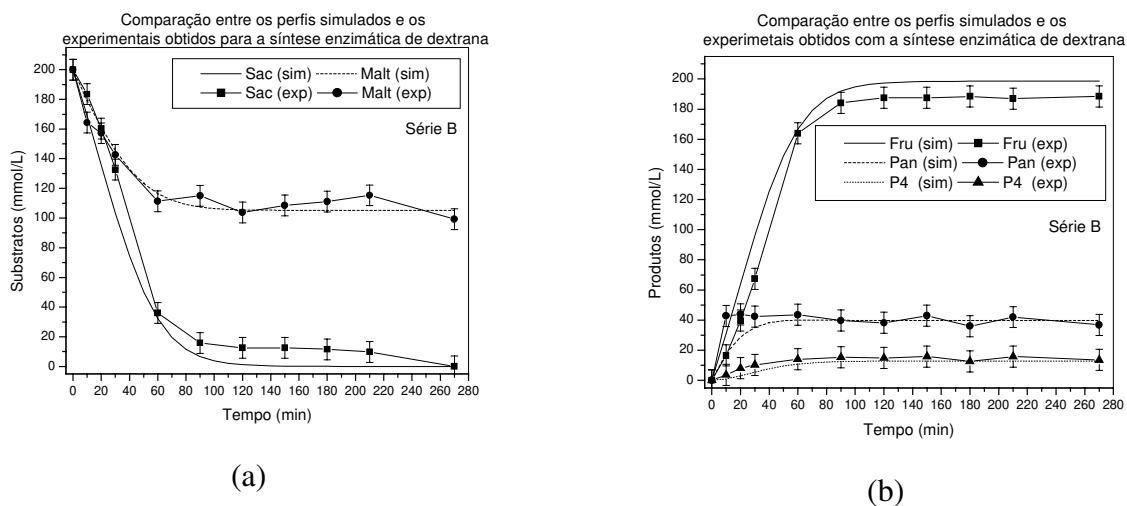


Figura 2 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série B).

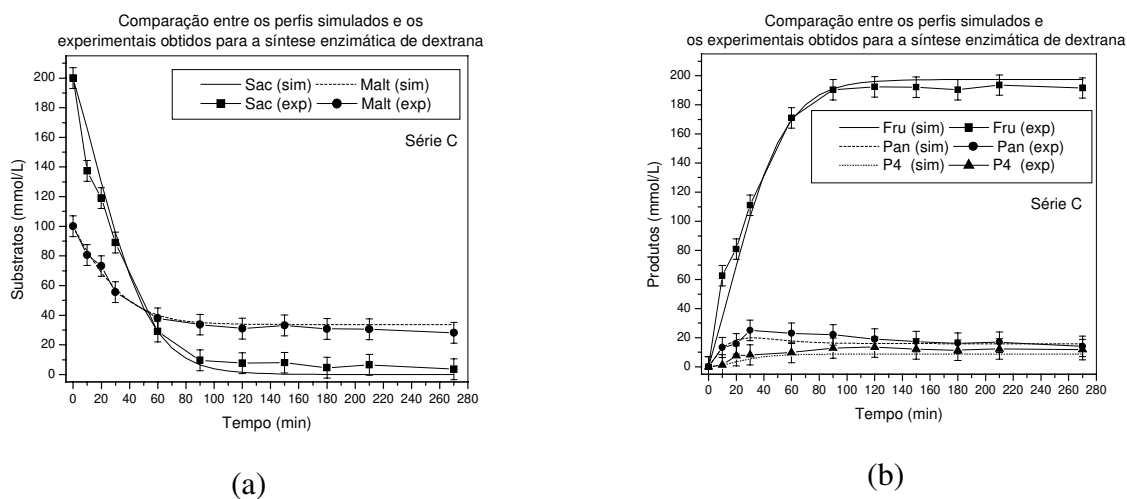


Figura 3 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série C).

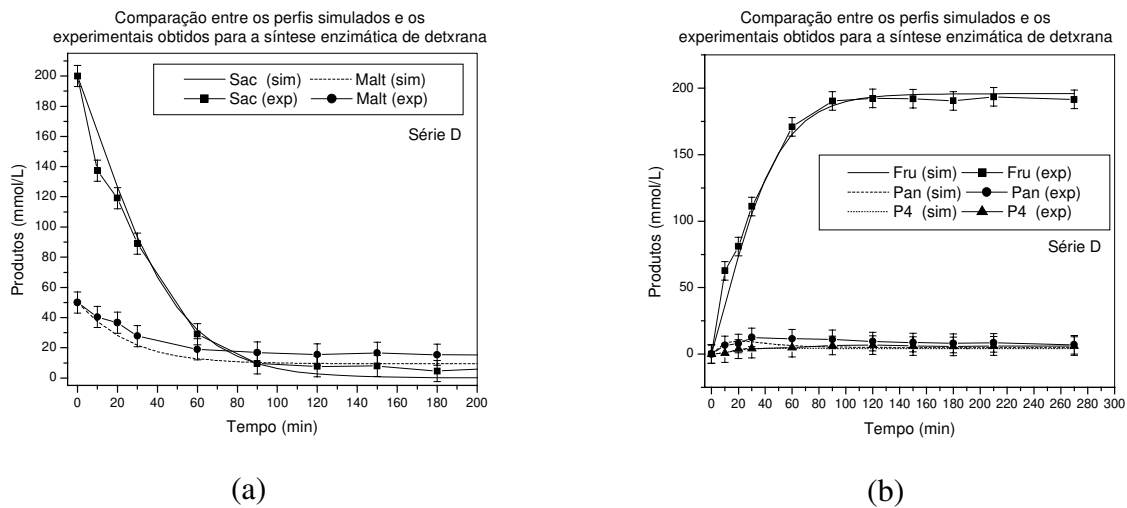


Figura 4 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série D).

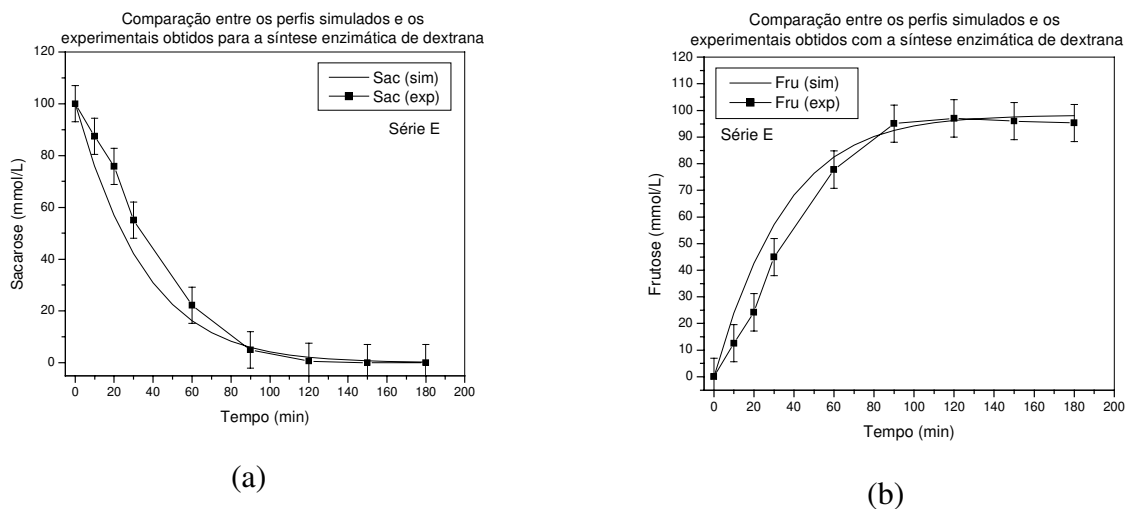


Figura A – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série E).

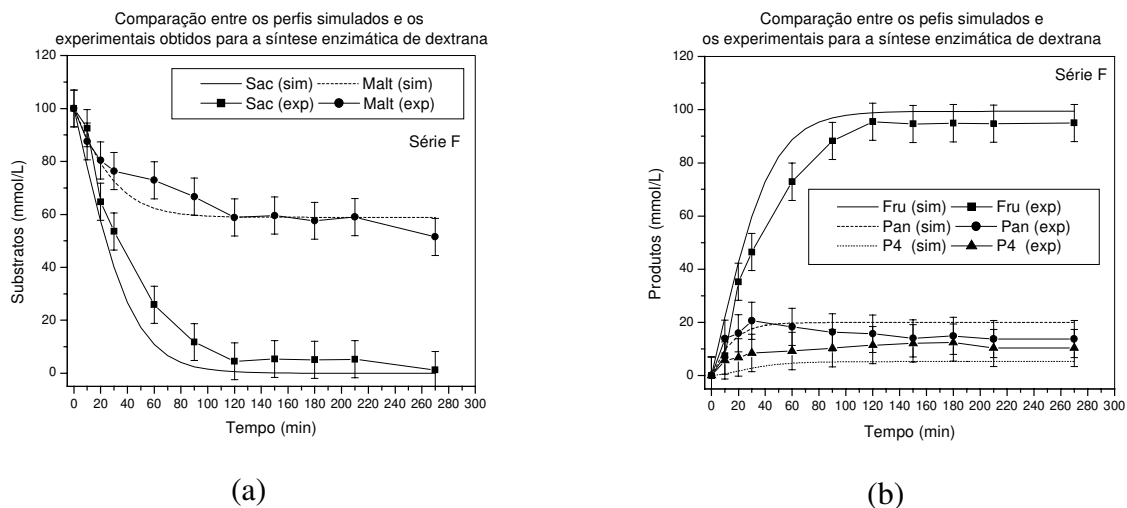


Figura 6 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série F).

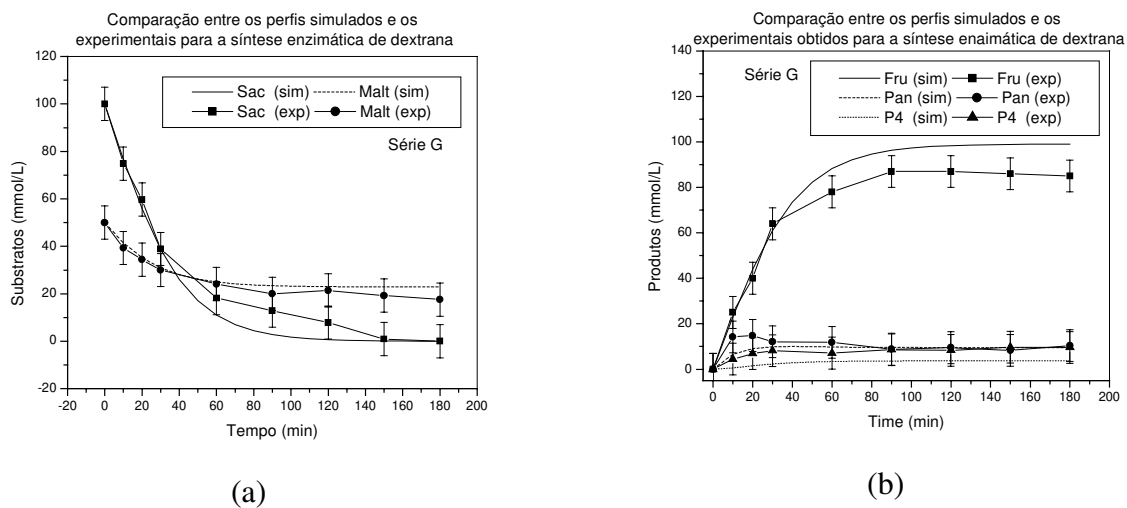


Figura 7 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série G).

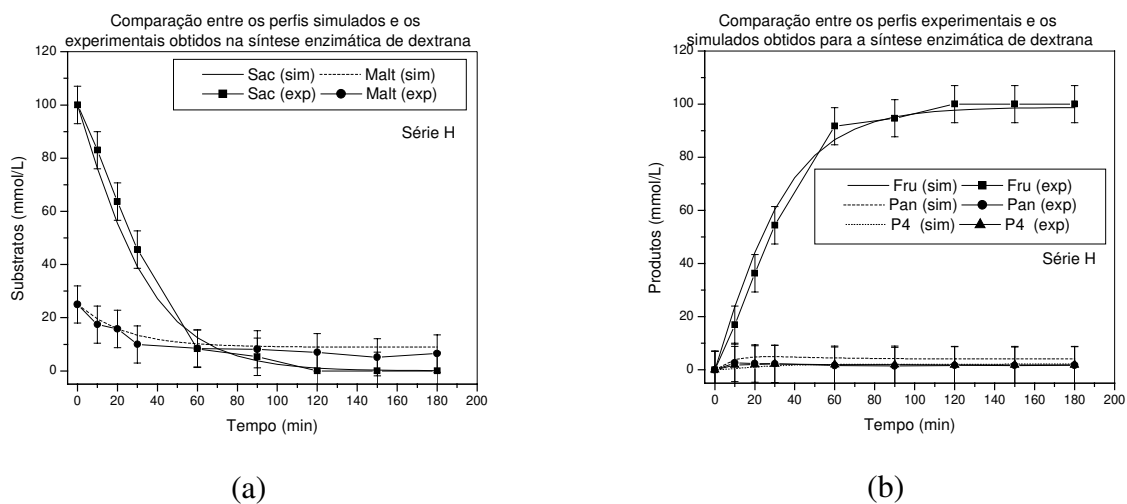


Figura 8 – Comparação entre os perfis experimentais e os obtidos através da simulação com as constantes ajustadas para a dextrana-sacarase do *L. mesenteroides* B512FMC: (a) perfil dos substratos, (b) perfil dos produtos (Série G).



## Apêndice 8

### Massa molar da dextrana

---

Neste apêndice são apresentados os resultados da determinação da massa molar de dextrana ao longo do tempo para as sínteses enzimáticas apresentadas no Capítulo 7. As amostras são analisadas através de cromatografia de permeação em gel (GPC). Esta análise foi realizada em condições descritas no Capítulo 9. Entretanto, foram analisadas somente as amostras iniciais (até 90 minutos de reação) e finais (270 minutos de reação), sendo que para as séries G e H (Tabela 7.2) foram apenas analisadas as amostras finais.

Os cromatogramas nas Figuras de 1 a 7 apresentam o resultado da análise das amostras por GPC para as sínteses apresentadas na Tabela 7.2, as quais são apresentadas na Tabela 1 deste apêndice:

Tabela 1 – Valores do grau de polimerização da dextrana para as sínteses apresentadas no Capítulo 7 (valores obtidos para o final da síntese).

Código	Sacarose (mM)	Maltose mM	Razão (S/M)
A	200	0	*
B	200	200	1
C	200	100	2
D	200	50	4
E	100	0	*
F	100	100	1
G	100	50	2
H	100	25	4



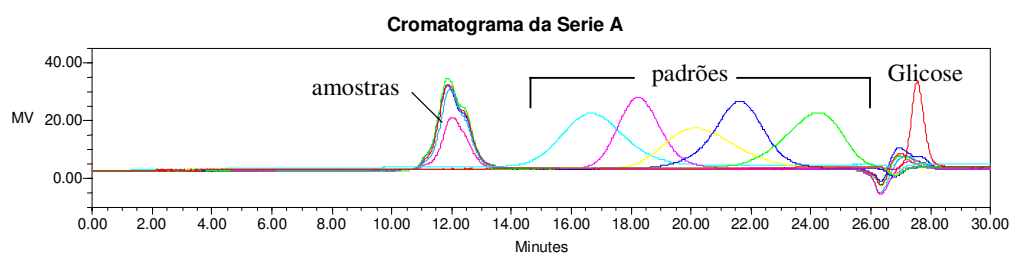


Figura 1 – Cromatografia de permeação em gel para a série A, nos tempos de reação: 10; 30; 60; 90 e 270 min.

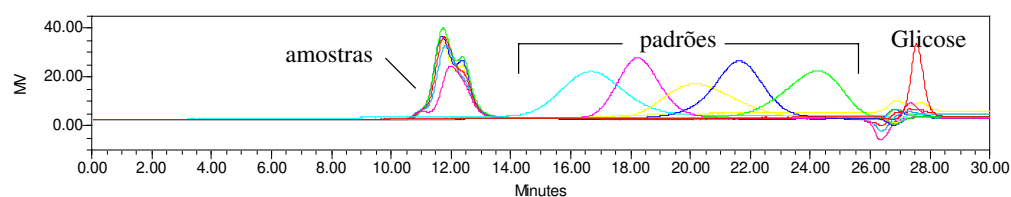


Figura 2 – Cromatografia de permeação em gel para a série B, nos tempos de reação: 10; 30; 60; 90 e 270 min.

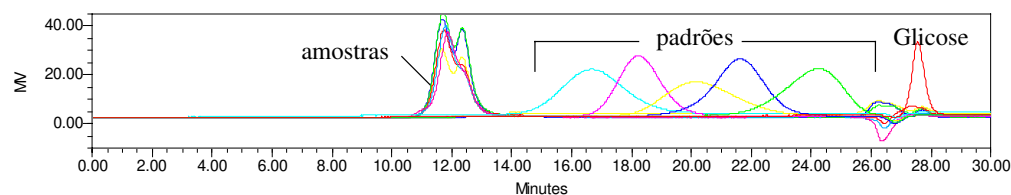


Figura 3 – Cromatografia de permeação em gel para a série C, nos tempos de reação: 10; 30; 60; 90 e 270 min.

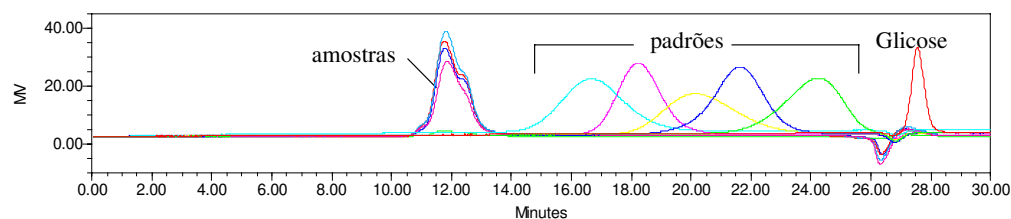


Figura 4 – Cromatografia de permeação em gel para a série D, nos tempos de reação: 10; 30; 60; 90 e 270 min.

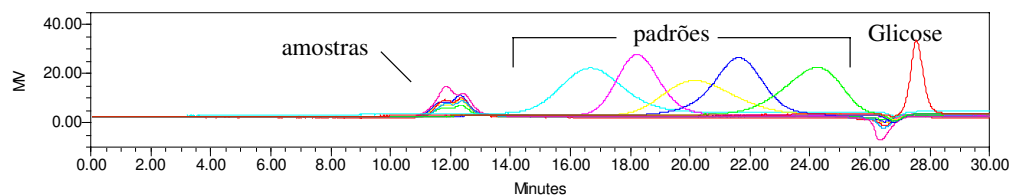


Figura 5 – Cromatografia de permeação em gel para a série E, nos tempos de reação: 10; 30; 60; 90 e 270 min.

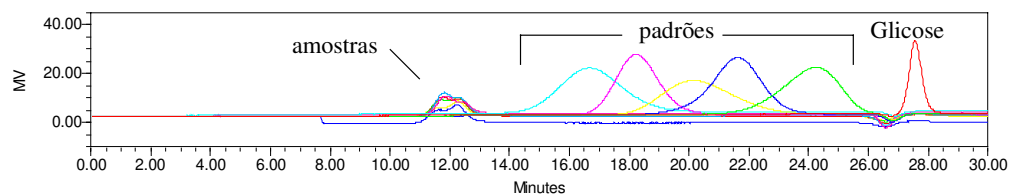


Figura 6 – Cromatografia de permeação em gel para a série F, nos tempos de reação: 10; 30; 60; 90 e 270 min.

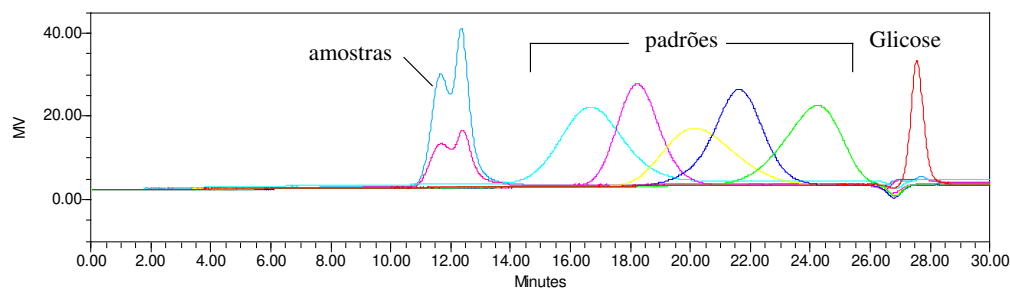


Figura 7 – Cromatografia de permeação em gel para as séries G e H no final da reação (270 min).

De acordo com os cromatogramas apresentados nas Figuras de 1 a 7, a dextrana de alta massa molar ( $> 10^6$ ) é formada logo no começo da reação, sendo que todas as amostras estão fora da curva de calibração em um tempo de retenção referente ao limite de exclusão do estojo de coluna ( $>10^6$ ).

