

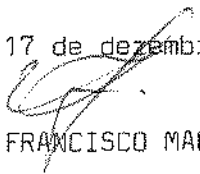
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARA
OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por VANESSA MENDES SANTOS e aprovada pela Comissão Julgadora em 17.12.96.

Campinas, 17 de dezembro de 1996.


Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO
Presidente da Banca

Vanessa Mendes Santos
Engenheira Química UFU/1993

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador

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

Campinas, Dezembro de 1996.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(Orientador)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(Membro)



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
(Membro)

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)

Campinas, de de .

DEDICATÓRIA

*A minha mãezinha Nidia,
exemplo de Amor e Dedicação.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho por sua orientação, confiança e sobretudo pela amizade.
- A Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues pelas valiosas discussões em todo desenvolvimento do trabalho.
- A Banca Examinadora pelas correções e sugestões.
- Ao meu MARCELLO pela paciência, carinho, companheirismo... Enfim, por ser tão especial!!!
- A Fifa pela dedicação com que me ajudou em todas as etapas deste trabalho, pelo carinho e amizade (Fifinha, muito obrigada).
- Aos amigos do laboratório de Bioengenharia, Eliana, Lia, Ana Maria, Marlei, Belzinha, Marco, Bruno, Roger e Inês pela amizade e ajuda inestimável.
- A Rossana e Martiucha pelo apoio, carinho e amizade.
- Ao Uirajara pelo empréstimo da infra-estrutura básica para confecção desse trabalho, um PC.
- Aos amigos da graduação Adilson, Renatinho e Bira por tantos momentos juntos.
- A Bibika, Ana Paula, Cleide e Soraya por tantas alegrias e tristezas compartilhadas.
- Aos meus pais Nídia e Arnaldo e meus irmãos, em especial ao Cacá (Maise), Célia (Zé Carlos) e Sandra (Faustinho) sem os quais isso não seria possível.
- A Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.
- Ao povo brasileiro, pelo respaldo dado através da concessão de uma bolsa de estudo do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ÍNDICE GERAL

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
Nomenclatura	xii
Resumo	xiv
Summary	xv
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 - APECTOS GERAIS	4
2.2 - DEXTRANA-SACARASE	5
2.2.1 - MICRORGANISMO	5
2.2.2 - PROPRIEDADES	5
2.2.3 - PRODUÇÃO	6
2.2.4 - CINÉTICA ENZIMÁTICA	7
2.2.5 - MECANISMO DE AÇÃO CATALÍTICA	8
2.2.5.1 - Sem Receptores	8
2.2.5.2 - Com Receptores	10
2.3- DEXTRANA	12
2.3.1 -PROPRIEDADES	12
2.3.2 - APLICAÇÕES	13
2.3.3 - PRODUÇÃO	15

2.3.3.1 - Processo Convencional	15
2.3.3.2 - Processo Enzimático	16
2.3.3.3 - Outros Processos	17
2.3.4 - REDUÇÃO DO PESO MOLECULAR	17
2.3.4.1 - Hidrólise Ácida	18
2.3.4.2 - Hidrólise Enzimática	19
2.3.5 - FATORES QUE AFETAM A DISTRIBUIÇÃO DO PESO MOLECULAR	19
2.3.6 - CARACTERIZAÇÃO DO PESO MOLECULAR	22
2.3.6.1 - Cromatografia De Permeação Em Gel	23
2.4 - APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS	25
3 - MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 - SÍNTESE DE DEXTRANA	29
3.1.1 - MICRORGANISMO	29
3.1.2 - MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA DEXTRANA-SACARASE	29
3.1.3 - PREPARO DO INÓCULO	30
3.1.4 - ALIMENTAÇÃO	30
3.1.5 - FERMENTAÇÃO	30
3.1.6 - EXTRAÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE	30
3.1.7- REAÇÃO ENZIMÁTICA	31

3.2 - PRODUÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA	31
3.2.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	31
3.2.2 - HIDRÓLISE ÁCIDA	33
3.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS	34
3.3.1 - DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES - MÉTODO DNS (MILLER, 1959)	34
3.3.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
3.3.3- ANÁLISE DO PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL	35
3.3.3.1 - Preparo da fase móvel	36
3.3.3.2 - Preparo das amostras de dextrana e padrões	36
3.3.3.3 - Determinação da eficiência das colunas	36
3.3.3.4- Injeção das amostras no HPLC	37
3.3.3.5 - Curva de Calibração	37
3.3.3.6 - Quantificação das amostras	38
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 SÍNTESE DE DEXTRANA	39
4.1.1 - FERMENTAÇÃO	39
4.1.2 - PURIFICAÇÃO DA DEXTRANA SACARASE	40
4.1.3 - REAÇÃO ENZIMÁTICA	41
4.1.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO	41

4.1.5 - CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DA SÍNTESE	43
4.2 - PRODUÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA	46
4.2.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS HIDROLISADAS	47
4.2.1.1 - ANÁLISE QUALITATIVA	47
4.2.1.2 - RENDIMENTO DAS AMOSTRAS EM TERMOS DE DEXTRANA CLÍNICA	52
4.2.2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS E OTIMIZAÇÃO PELAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA	53
5 -CONCLUSÕES	61
6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	63
APÊNDICE A	68
APÊNDICE B	71
APÊNDICE C	78
APÊNDICE D	85
APÊNDICE E	89
APÊNDICE F	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Valores reais e codificados atribuídos às variáveis do Planejamento Experimental	32
Tabela 3.2: Características das colunas utilizadas	36
Tabela 3.3: Pesos Moleculares dos padrões utilizados	38
Tabela 4.1: Atividade e volume obtidos nas etapas de produção da enzima	39
Tabela 4.2: Atividade total da enzima (UDS) nas etapas de purificação e recuperação final da enzima	40
Tabela 4.3: Tempo de retenção (T_R) dos padrões obtidos através de injeções no sistema de cromatografia líquida	42
Tabela 4.4: Distribuição do peso molecular para a amostra proveniente da síntese	44
Tabela 4.5: Pesos moleculares médios (dalton) em função do tempo de reação para a hidrólise em pH 1.5 e 75.0° C (H5)	49
Tabela 4.6: Rendimento de dextrana clínica (%) em função do tempo de hidrólise para cada ensaio delineado pelo planejamento experimental	52
Tabela 4.7: Variação no rendimento de dextrana clínica (%) em função da mudança de nível da temperatura	53
Tabela 4.8: Variação no rendimento de dextrana clínica (%) em função da mudança de nível do pH	54
Tabela 4.9: Efeitos das variáveis temperatura T, pH e T x pH sobre o rendimento de dextrana clínica em função do tempo de hidrólise	55
Tabela 4.10: Rendimento de dextrana clínica (Rend) em função do tempo-pH-temperatura na hidrólise de dextrana, WOLFF et al (1954)	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Estrutura básica da molécula de dextrana	4
Figura 2.2 - Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT et al. (1974)	9
Figura 2.3 - Mecanismo proposto por ROBYT & TANIGUCHI (1976) para formação da ramificações	10
Figura 2.4 - Mecanismo da atuação dos receptores proposto por ROBYT & WALSETH (1978)	11
Figura 2.5 - Curva de distribuição de pesos moleculares médios	23
Figura 2.6 - Esquema Representativo do Processo de Permeação em Gel	25
Figura 4.1 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra da síntese e padrões 5×10^6 e 1.75×10^6 .	45
Figura 4.2 - Cromatograma obtido da injeção da amostra proveniente da síntese.	46
Figura 4.3 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos com 1 hora e 7 horas de hidrólise em pH 1.5 e 75.0° C (H5/1 hora e H5/7 horas).	48
Figura 4.4: Sobreposição dos cromatogramas referentes a amostra bruta, amostra H5/7horas e padrões de dextrana de peso molecular 43000 e 79000 daltons.	49
Figura 4.5 - Cromatograma referente a amostra H5/1hora.	50
Figura 4.6 - Cromatograma referente a amostra H5/2horas.	50
Figura 4.7 - Cromatograma referente a amostra H5/3 horas.	50
Figura 4.8 - Cromatograma referente a amostra H5/4 horas.	51
Figura 4.9 - Cromatograma referente a amostra H5/ 5 horas.	51

Figura 4.10 - Cromatograma referente a amostra H5/ 6 horas.	51
Figura 4.11 - Cromatograma referente a amostra H5/ 7 horas.	52
Figura 4.12 - Rendimento de dextrana clínica em função do pH e temperatura com 1 hora de hidrólise	58
Figura 4.13 - Rendimento de dextrana clínica em função do pH e temperatura com 2 horas de hidrólise	58
Figura 4.14 - Rendimento de dextrana clínica em função do pH e temperatura com 3 horas de hidrólise	59
Figura 4.15 - Rendimento de dextrana clínica em função do pH e temperatura com 4 horas de hidrólise	59
Figura 4.16 - Rendimento de dextrana clínica em função do pH e temperatura com 5 horas de hidrólise	60
Figura 4.17 - Rendimento de dextrana clínica em função do pH e temperatura com 6 horas de hidrólise	60

NOMENCLATURA

a	Constante de interação do sistema polímero solvente e da temperatura
AT	Atividade enzimática
d	Diluição final no reator
D	Dispersão
F	Conjunto fatorial
i	Classe da molécula
j	Índice numérico
k	Número de variáveis independentes
K_i	Constante de inibição pelo substrato
K_m	Constante aparente de Michaelis-Menten
M	Concentração de maltose
Mn	Peso molecular médio numérico
Mw	Peso molecular médio ponderal
n	Número de moléculas
N	Número de pratos teóricos
p	Peso
PM	Peso molecular
PM_R	Peso molecular do receptor
R	Concentração de receptor
r	Coefficiente de correlação
S	Concentração de sacarose
T	Temperatura
Tr	Tempo de retenção
t	Tempo
v	Volume

V_e	Tempo de eluição
v_{max}	Velocidade máxima
$W_{1/2}$	Largura do pico na metade da altura
X_1	Sítio ativo 1
X_2	Sítio ativo 2
y_i	Valor codificado da variável Y_i
$Y_{i (+1)}$	Valor real da variável no nível +1
$Y_{i (-1)}$	Valor real da variável no nível -1
α	Nível (ou valor codificado) para planejamento estatístico
β	Coefficiente angular da curva padrão de açúcares redutores
γ	Coefficiente angular da curva de absorbância versus tempo
ART	Açúcares redutores totais
MQR	Média Quadrática da Regressão
MQr	Média Quadrática do Resíduo
Rend	Rendimento
UDS	Unidade de dextrana-sacarase
UI	Unidade internacional

RESUMO

A dextrana é um biopolímero formado por resíduos de glicose unidos por ligação α -1,6 majoritariamente. É sintetizada pela enzima dextrana-sacarase, enzima esta produzida extracelularmente por algumas bactérias, principalmente do gênero *Leuconostoc*.

A aplicação deste polímero está diretamente relacionada com o seu peso molecular. As dextranas de peso molecular na faixa de 20.000 a 100.000 daltons (dextrana clínica) possui notáveis aplicações no ramo da medicina como expansor do plasma sanguíneo. Métodos como hidrólise ácida e hidrólise enzimática, e uso de receptores podem ser utilizados para obtenção de dextrana com peso molecular controlado.

Neste trabalho estudou-se a obtenção de dextrana clínica através da hidrólise ácida da dextrana de alto peso molecular. O objetivo principal foi a determinação das condições de pH e temperatura (T) que levassem a um maior rendimento de dextrana clínica. Para isso utilizou-se o método de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para avaliar a importância das variáveis (pH e T) no processo de hidrólise.

A dextrana foi produzida “in vitro” através da reação enzimática entre dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F e sacarose, a pH 5,2 e temperatura de 20,0 °C. A hidrólise foi realizada em várias condições de pH e T, definidas pelo planejamento experimental. A caracterização das amostras quanto à distribuição do peso molecular foi feita por cromatografia de permeação em gel, utilizando um sistema HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance).

Os resultados mostraram que o rendimento de dextrana clínica é influenciado principalmente pelo pH da hidrólise, e em menor intensidade pela temperatura e tempo de reação. Os melhores rendimentos de dextrana clínica dentro da faixa estudada (pH 1,5 a 2,5 e temperatura 65,0° C a 75,0° C) foram obtidos em pH igual a 1,5 e temperatura igual a 75,0 °C. Nestas condições obteve-se com 7 horas de hidrólise um rendimento em torno de 95,0 % em dextrana clínica.

SUMMARY

Dextran is a biopolymer composed by glucose units linked almost exclusively by α -1,6 bonds. It is synthesized from dextransucrase, enzyme which is extracellular produced from many bacterium, mainly *Leuconostoc* genus.

The dextran's applications are related with the molecular weight. Dextran with molecular weight in the range between 20.000 and 100.000 daltons (clinical dextran) has notable application in medicine as blood plasma extender. Methods of acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis, and use of acceptor may be used for obtention of dextran within a desired range of molecular weight.

The present work deals with the obtention of clinical dextran from the acid hydrolysis of high-molecular-weight dextran. The prime objective was the determination of the pH and temperature conditions that proportionated maximum yields of clinical dextran. For that, an experimental design and response surface analyse was employed for verify the importance of the variables (pH and T) in the hydrolysis process.

The dextran was produced "in vitro" from enzymatic reaction between dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B-512 F and sucrose, in pH 5,2 and temperature 20,0 ° C. The hydrolysis were carried out in many pH and temperature's conditions, delineated by the experimental design. Characterization of samples molecular weight distribution was carried out by gel permeation chromatography using a high performace liquid chromatography system (HPLC).

The results showed that clinical dextran yield is influenciad mainly by the pH of the hydrolysis, and in lesser intensity by the temperature and time of the reaction. The bests clinical dextran yields was obtained in pH 1,5 and temperature 75,0 ° C. Yields of 90% of clinical dextran were obtained by the process described

volumétrico do sangue, com um peso molecular médio de 40000 daltons tem aplicação como auxiliar na circulação periférica. Estas frações de dextrana são conhecidas como dextrana clínica.

A obtenção tradicional da fração clínica é através da hidrólise ácida da dextrana de alto peso molecular, seguida de fracionamento com solventes orgânicos. Vários estudos sugerem como alternativa de obtenção de dextrana com peso molecular controlado, a exploração das condições de síntese, uma vez que o peso molecular sofre grande influência destas condições, principalmente em relação à temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares no meio. No que diz respeito à presença de açúcares no meio, pode-se obter dextranas com peso molecular reduzido, durante a reação enzimática, sem necessidade de hidrólise posterior. Estes açúcares, chamados receptores, impedem o crescimento da cadeia do polímero. Neste processo, a dextrana é obtida em duas etapas, uma onde um açúcar é utilizado na produção de oligossacarídeos, e outra onde estes oligossacarídeos são utilizados também como receptores e produzem dextrana com menor peso molecular. Há necessidade de purificação do produto obtido na primeira etapa para sua utilização na etapa seguinte, o que torna o método comercialmente pouco atraente. Além da redução do peso molecular pelo uso de receptores, encontra-se na literatura citações sobre hidrólise enzimática. Entretanto a utilização destes métodos restringe-se a escala laboratorial, não tendo sido encontradas referências à produção industrial.

A hidrólise ácida é o método tradicional utilizado industrialmente para a obtenção da fração clínica de dextrana. As principais vantagens da hidrólise ácida são a não exigência de equipamentos sofisticados, a facilidade no controle e a possibilidade de utilização da dextrana úmida e mesmo não purificada. Apesar de ser o método tradicional, rendimentos baixos da fração clínica podem ser obtidos dependendo das condições usadas na hidrólise e do peso molecular do polímero que será hidrolisado. A literatura reporta condições de hidrólise de 80,0 °C e pH 1,0 (WOLFF et al., 1954) ou temperaturas mais elevadas (100,0 °C) (BIXLER, 1954) para dextranas de peso molecular acima de 30×10^6 daltons. Para produtos com menor peso foi constatado experimentalmente que estas condições não são as mais adequadas, acarretando a formação de produtos com peso molecular menor que o desejado. Portanto, para a obtenção de melhores rendimentos no processo hidrolítico é de grande importância que as condições de hidrólise sejam definidas com base no peso molecular da dextrana, a qual será submetida à redução do peso molecular.

O objetivo deste trabalho foi o de determinar as condições ótimas de hidrólise para obtenção da fração clínica de dextrana. O polímero foi sintetizado em condições tais, anteriormente estudadas, que favorecessem a obtenção de um produto com menor peso molecular, propiciando condições mais brandas de hidrólise. Para isso a hidrólise foi estudada na faixa de pH de 1,5 a 2,5 e na faixa de temperatura de 65,0° C a 75,0° C utilizando-se o método de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para avaliar a importância das variáveis pH e T no processo de hidrólise.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - ASPECTOS GERAIS

O termo "dextrana" foi usado pela primeira vez por SCHEIBLER em 1874, que descobriu que a formação de película e aumento da viscosidade durante processos de fabricação de vinhos e açúcar de beterraba e cana, eram causados por um carboidrato dextro-rotatório de fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$. Anteriormente, em 1861, Pasteur demonstrou que a formação destas películas tinha como causa uma ação microbiana e VAN TIEGHEN, em 1878, isolou o microrganismo responsável pela produção de dextrana o qual foi denominado *Leuconostoc mesenteroides*.

Atualmente o termo dextrana é utilizado para designar toda uma classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares, compostos quase exclusivamente de resíduos glicosídicos ligados predominantemente por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, com ramificações nas posições $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$. São sintetizadas a partir de sacarose por um grande número de bactérias. Estas bactérias pertencem à família *Lactobacillaceae* e em particular ao gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Vários membros do gênero *Streptococcus* estão ligados ao desenvolvimento da placa cariogênica na superfície dos dentes (DE BELDER, 1987). A maioria dos trabalhos com dextrana tem sido conduzido principalmente com a linhagem NRRL B-512 F de *Leuconostoc mesenteroides*. Esta linhagem produz uma dextrana contendo 95,0% de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ e 5,0% de ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ e é a linhagem utilizada na produção de dextrana comercial (ALSOP, 1983). A estrutura básica da molécula de dextrana pode ser observada na Figura 2.1.

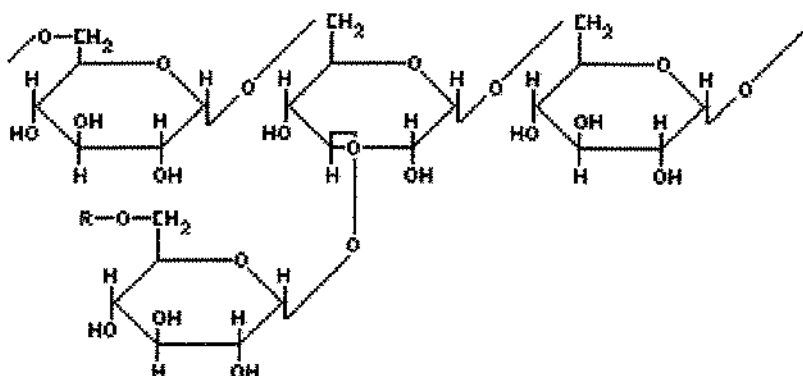


Figura 2.1 - Estrutura básica da molécula de dextrana

2.2 - DEXTRANA-SACARASE

O principal produtor de dextrana-sacarase é uma bactéria esférica e imóvel da família *Lactobacillaceae*, gênero *Leuconostoc*, espécie *mesenteroides*. É uma bactéria aeróbica facultativa, não-patogênica e com grandes carências nutricionais, exigindo meios ricos em vitaminas e aminoácidos para seu desenvolvimento. O pH 7,0 é o ótimo para o crescimento do microorganismo (ALSOP, 1983).

A dextrana-sacarase [EC 2.4.1.5, $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-glucana: D-frutose 2-glicosil transferase] é classificada como uma glicosiltransferase que catalisa a transferência de um grupo α -D-glicopiranosil da sacarose para formar a dextrana de acordo com a equação:

É uma enzima extracelular e indutiva, sendo a sacarose o único substrato capaz de induzir a sua produção.

Quanto à especificidade, acreditava-se que a sacarose era a única substância utilizada como substrato. Estudos posteriores mostraram que alguns compostos contendo uma ligação α -D-glicosídica, tais como lactulosacarose e D-glicopiranosídeo fluoreto, com energia similar a da sacarose servem também como substrato para a dextrana-sacarase, (KABOLI & REILLY, 1980).

Em solução, vários fatores influenciam a estabilidade da enzima. Foi verificado que a presença de dextrana, polímeros não aniônicos como polietileno-glicol (PEG), metil-celulose e detergentes não aniônicos aumentam significativamente a estabilidade da dextrana-sacarase (MILLER & ROBYT, 1984). KOBAYASHI & MATSUDA (1979) analisaram o efeito de vários íons metálicos e reagentes químicos sobre a atividade da dextrana-sacarase B-512F. Segundo os autores a enzima é fortemente inibida por Cu^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} , além de EDTA. Outro fator importante é a presença de íons cálcio (Ca^{+2}) uma vez que é sabido que a enzima desnatura irreversivelmente na ausência de íons metálicos alcalinos terrosos (particularmente Ca^{+2}) (LAWFORD et al, 1979; KABOLI & REILLY, 1980 e MILLER & ROBYT, 1984).

A estabilidade da enzima foi investigada com respeito a variações de pH e temperatura. O pH ótimo no qual a atividade enzimática é máxima foi determinado em torno de 5,2, tanto para a enzima solúvel como para a imobilizada. A faixa de pH entre 5,5-6,0 é a que apresenta a maior estabilidade (KABOLI & REILLY, 1980). Mantendo o pH em 5,2 e variando a temperatura, os autores relataram a temperatura de 30,0 °C como ótima para a atividade da enzima.

2.2.3 - PRODUÇÃO

Em 1952, segundo ALSOP (1983), TSUCHIYA descreveu o efeito de certos fatores sobre a produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Ele concluiu que sacarose é essencial para a produção da enzima. O organismo pode crescer em meio contendo glicose, frutose ou maltose, mas a enzima não é produzida. Isto é confirmado por LAWFORD et al. (1979). A relação entre pH, temperatura e produção também ficou evidenciada. O valor de pH 6,7 tem sido encontrado como o ótimo para a produção da enzima. Sobre a faixa de temperatura de 20-29° C o rendimento de enzima máximo foi encontrado a 23° C. Já estudos feitos por LAZIC (citado por LAZIC, 1993) mostraram que o controle de pH a 6,7 ou 5,5 resultou no mesmo rendimento de dextrana-sacarase.

Em relação a aeração, JEANES (1966) cita que no processo convencional a aeração não é necessária. Porém vários autores contestam a opinião de que a aeração não é requerida. ALSOP (1983) obteve maiores rendimentos de dextrana-sacarase em condições aeradas, comparadas a condições de não aeração ou aeração com oxigênio puro. VELJKOVIC et al (1992) reportaram que condições aeróbicas correspondentes a taxa de tolerância máxima de oxigênio pelo *Leuconostoc mesenteroides* assegura uma produção máxima de enzima. LAZIC et al. (1993)

estudaram a influência do pH e aeração sobre a produção de dextrana utilizando *Leuconostoc mesenteroides*. Segundo os autores a taxa de crescimento específica, a taxa de produção de dextrana-sacarase e o rendimento da enzima são maiores, e a duração do processo menor, sob condições aeróbicas que em condições anaeróbicas.

Segundo BARKER et al (1993) a seleção do tipo de extrato de levedura como fonte de nitrogênio no meio é um fator crítico para o desempenho da fermentação.

Entre 1945 e 1970 estabeleceram-se as bases de produção de dextrana-sacarase por fermentação descontínua (batelada), nessas condições foram obtidas uma atividade média entre 50 a 70 UDS/ml no meio de cultura com 24 horas de fermentação. LOPEZ (1979) utilizando um sistema semi-contínuo com adição contínua de sacarose atingiu 180 UDS/ml no meio de cultura após 24 horas de fermentação.

MONSAN & LOPEZ-MUNGUÍA (1981) desenvolveram um sistema de fermentação em batelada alimentada com solução combinada de sacarose e NaOH que permitiu o aumento de 7 a 8 vezes na produção da enzima.

QUEIROZ & MAUGERI-FILHO (1988) estudaram a produção de dextrana-sacarase usando meios alternativos industriais, tendo melaço como fonte de carbono. Os resultados mostraram que é possível se obter rendimentos e produtividades iguais ou superiores aos obtidos em meios de laboratório.

BAZÁN et al (1993) estudaram as condições de fermentação em batelada alimentada para a obtenção da enzima com máxima atividade e quantidades mínimas de ART (açúcares redutores totais) no final da fermentação, obtendo-se bons resultados. Os autores utilizaram um sistema de alimentação combinada, o mesmo utilizado por MONSAN & LOPEZ-MUNGUÍA (1981), para um controle de pH mais adequado, uma vez que o crescimento do microrganismo, conseqüentemente a queda do pH, e a demanda por sacarose estão associados. Com este sistema obtiveram um valor de 106 UDS/ml para a atividade enzimática.

2.2.4 - CINÉTICA ENZIMÁTICA

A níveis de sacarose abaixo de 10-15% MARTINEZ-ESPÍNDOLA & LOPEZ-MUNGIA (1985), verificaram que a cinética da dextrana-sacarase é descrita pelo modelo de Michaelis-

Menten. A velocidade inicial foi medida variando a concentração de sacarose de 0 a 400 g/l, e o modelo de inibição pelo substrato se ajustou bem aos dados cinéticos. O valor de 5,12 g/l para K_m e 43,21 g/l para K_i foram obtidos.

Estudos cinéticos, realizados por PAUL et al. (1986), e caracterização do produto da reação de receptor com dextrana-sacarase mostraram que aumentos na concentração de maltose no meio de cultura produziu um aumento de 3 vezes na velocidade máxima (v_{max}) da reação e um aumento de 12 mM para 163 mM na constante aparente de Michaelis-Menten (K_m), quando a concentração do receptor variou de 0 a 586 mM. O mesmo comportamento foi observado por CURRALERO (1993).

MILLER & ROBYT (1986) analisaram a influência da concentração de Ca^{+2} sobre a cinética da síntese de dextrana por dextrana-sacarase. Os autores relataram que abaixo de 1mM, Ca^{+2} ativou a enzima aumentando o v_{max} e diminuindo o valor de K_m para a sacarose. Acima de 1 mM, Ca^{+2} mostrou-se como um inibidor competitivo, impedindo a ligação da sacarose. Propuseram um modelo para a síntese da dextrana no qual a dextrana-sacarase tem dois sítios ativos, um ativante e outro inibitório.

2.2.5 - MECANISMO DE AÇÃO CATALÍTICA

O mecanismo de ação catalítica da dextrana-sacarase sobre a sacarose para formação da dextrana, foi objeto de muitos estudos. Várias teorias foram postuladas até que uma série de estudos realizados por ROBYT et al (1974, 1976 e 1978) elucidaram o mecanismo da dextrana-sacarase para formação da cadeia principal e das ramificações presentes na dextrana, na presença ou não de receptores.

2.2.5.1 - Sem Receptores

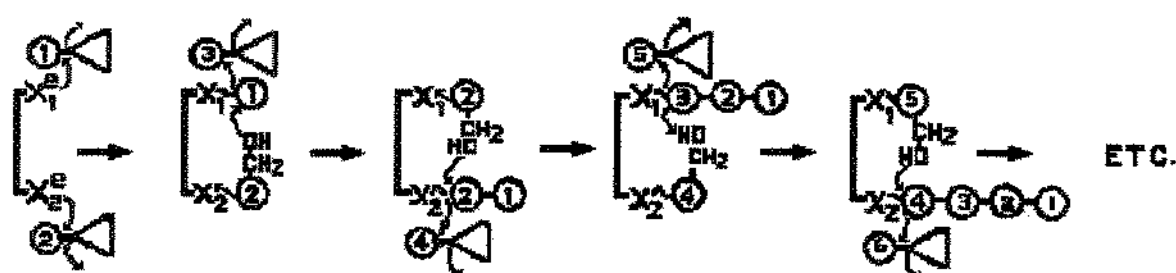
ROBYT et al (1974) utilizando técnicas de marcadores radioativos e análises cromatográficas demonstraram o mecanismo de ação da dextrana-sacarase. O mecanismo proposto pode ser resumido nas seguintes etapas:

Primeira Etapa: Dois nucleófilos, localizados nos sítios ativos (X1 e X2), fazem um ataque nucleofílico em duas moléculas de sacarose, formando dois grupos complexos enzima-glicosil.

Estes complexos estão formados por ligações covalentes através dos nucleófilos e o carbono 1 da glicose.

Crescimento da Cadeia: A hidroxila do carbono 6, de uma das unidades de glicose (do complexo enzima-glicosil), faz um ataque nucleofílico à outra glicose formando uma ligação α (1 $\rightarrow$ 6). Este ataque libera um dos sítios que então ataca outra molécula de sacarose formando um novo complexo enzima-glicosil. Em seguida, a hidroxila do carbono 6, do novo glicosil formado, faz um ataque no carbono 1 do isomaltosil formado na etapa anterior. Na presença de sacarose o mecanismo se repete continuamente com os dois sítios catalíticos X1 e X2, formando alternadamente, complexo covalentes com a glicose e a cadeia de dextrana em crescimento.

Terminação da Cadeia: Quando o receptor natural (glicose ou frutose) estiver numa concentração suficiente para agir no sítio ativo, a dextrana é liberada, cessando o alongamento da cadeia. Neste mecanismo, um grupo hidroxila do receptor efetua um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 da cadeia de dextrana. Este mecanismo está esquematizado na Figura 2.2.



X₁ e X₂ = grupos nucleófilos no sítio ativo

○ = glicose

△ = frutose

○—△ = sacarose

○—○ = glicoses ligadas por ligação $\alpha = 1,6$

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

Em trabalho posterior usando os mesmos métodos, ROBYT & TANIGUCHI segundo CURRALERO (1993), propuseram um mecanismo apresentado esquematicamente na Figura 2.3, segundo o qual a biossíntese das ligações $\alpha(1\rightarrow3)$, se dá quando um grupo $C_3\text{-OH}$ de uma molécula livre de dextrana atua como nucleófilo no C-1 no final redutor do complexo enzima-dextranosil. A partir deste ataque nucleofílico, a dextrana se desprende do complexo, formando a ligação $\alpha(1\rightarrow3)$, característica das ramificações na dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

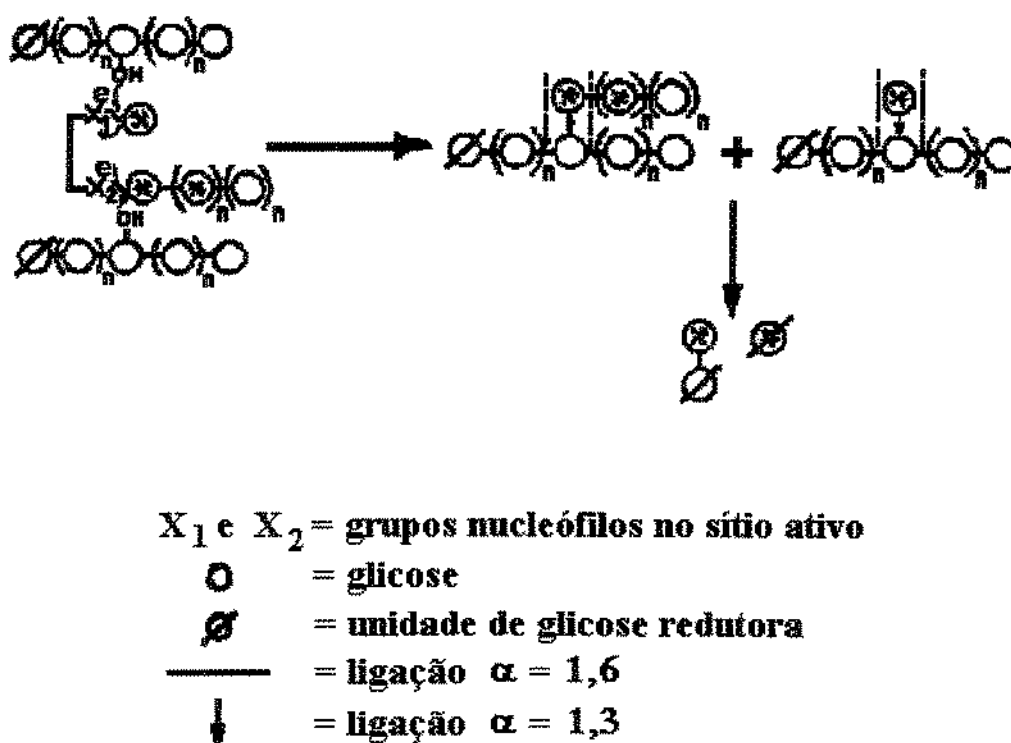


Figura 2.3 - Mecanismo proposto por ROBYT & TANIGUCHI (1976) para formação da ramificações

2.2.5.2 - Com Receptores

Reações entre a sacarose e a dextrana-sacarase na presença de receptores (carboidratos de baixo peso molecular) têm sido analisadas, pois além de alguns receptores aumentarem a velocidade de reação, influenciam de forma decisiva no peso molecular da dextrana formada.

Dando continuidade aos estudos do mecanismo de ação catalítica da dextrana-sacarase com açúcares marcados e cromatografia, ROBYT & WALSETH (1978) propuseram um mecanismo de ação dos receptores, ilustrado pela Figura 2.4.

Os receptores agem como nucleófilos nos quais um grupo hidroxil (C_6-OH para D-glicose e maltose, C_5-OH para D-frutose) ataca o C-1 dos grupos glicosil e dextranosil no complexo com a enzima. Dextranas são obtidas pelo deslocamento do grupo dextranosil, e oligossacarídeos são obtidos pelo deslocamento do grupo D-glicosil. Quando a concentração do primeiro produto, proveniente da reação com o receptor, torna suficientemente alta, ele também age como um receptor e assim dá uma série de oligossacarídeos homólogos. Quando a razão da concentração do receptor pela da sacarose é suficientemente alta (10:1), o receptor desloca continuamente o grupo D-glicosil a partir da enzima, diminuindo ou impedindo a biossíntese da dextrana.

Considerando estas observações e os resultados de trabalhos anteriores, os pesquisadores concluíram que o receptor atua na terminação da cadeia de dextrana e, conseqüentemente, libera o sítio ativo para o início de uma nova.

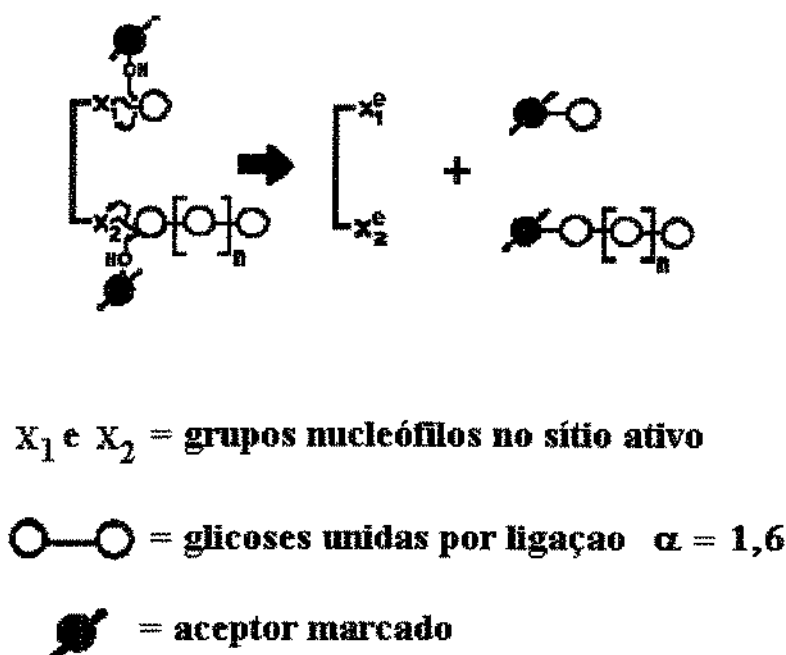


Figura 2.4 - Mecanismo da atuação dos receptores proposto por ROBYT & WALSETH (1978)

2.3- DEXTRANA

A produção e uso de dextrana teve início na Suíça por volta de 1942-1944; na Inglaterra começou em 1947 pela indústria Dextran Ltd. (East Anglia Chemical Company) e mais tarde por Benger Laboratories Ltd., nos Estados Unidos pela Commercial Solvents Corporation em 1949 e por vários outros produtores. Meios de produção foram estabelecidos também na África do Sul, Canadá e Rússia. Estes fabricantes produziam dextranas solúveis em água no meio de cultura em crescimento. Inicialmente foram utilizadas linhagens diferentes da bactéria por cada fabricante, mas a partir de 1952 a linhagem NRRL B-512F, usada nos Estados Unidos, foi adotada pelos outros países. Estes desenvolvimentos foram estimulados pela necessidade de soluções coloidais terapeuticamente seguras para restaurar o volume sanguíneo na maioria dos acidentes causados pela guerras civis e militares. As pesquisas foram incentivadas por órgãos médicos e de defesa de vários governos. A dextrana foi produzida pela depolimerização da dextrana nativa ($40-50 \times 10^6$) através de hidrólise ácida e fracionamento para obtenção do expansor sintético do volume sanguíneo (JEANES, 1966).

2.3.1 - PROPRIEDADES

As dextranas são polímeros de glicose contendo grandes quantidades de ligações α -D-glucopiranosil, principalmente $\alpha(1\rightarrow6)$, com ramificações nas posições $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$. Podem ser produzidas por uma série de microrganismos. No entanto, as estruturas das moléculas diferem entre si, dependendo do microrganismo produtor. A dextrana produzida pela linhagem NRRL B-512 F é constituída por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ na cadeia principal e ramificações na posição $\alpha(1\rightarrow3)$ (DE BELDER, 1987). O comprimento das cadeias laterais é restrito a uma unidade de glicose para 45% das ramificações, duas unidades de glicose para 40% das ramificações e mais de duas unidades para 15% das ramificações (SABATIE et al., 1886). Segundo KUGE et al. (1987) o conteúdo de ramificações longas aumenta com o peso molecular.

A dextrana produzida pela linhagem NRRL B-512 F é completamente solúvel em água, metil sulfóxido, formamida, etilenoglicol, glicerol e hexametilfosforamida. Algumas dextranas apresentam um certo grau de cristalinidade e podem ser solubilizadas por aquecimento (DE BELDER, 1987). Em solução apresenta rotação ótica específica de $+199^\circ$, $+203^\circ$ e $+215^\circ$ em água, hidróxido de potássio 1N e formamida, respectivamente (JEANES, 1966).

As soluções contendo dextrana, apresentam comportamento reológico que sofre grande influência das condições de síntese (SABATIE et al., 1886). Em soluções alcalinas, a dextrana forma complexo de composição definida com muitos íons metálicos tais como antimônio, cálcio, cobalto, cobre, ferro e urânio (JEANES, 1966).

2.3.2 - APLICAÇÕES

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

A dextrana de peso molecular médio tem potencial para ser utilizada na indústria química e indústria de alimentos. Na indústria química a dextrana é usada para fabricação de redes moleculares cruzadas e empacotamento de colunas cromatográficas de exclusão molecular. Na indústria de alimentos pode ser usada como inibidor de cristalização em sorvetes, homogeneizador e espessante em doces e xaropes.

As dextranas de alto peso molecular tem aplicação possível na recuperação secundária do petróleo, filmes protetores para sementes, estabilizantes para agregados de solos e vários outras (ALSOP, 1983).

Na indústria farmacêutica, as dextranas de baixo peso molecular apresentam duas importantes características, que as qualificam para os usos clínicos: são completamente metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos ou alérgicos (CURRALERO, 1993). Dentre os usos clínicos destacam-se:

a-) Ferro-dextrana

Vários foram os carboidratos testados para produzir soluções de ferro estáveis e mais facilmente assimiláveis, para infusão intramuscular ou intravenosa. Os objetivos foram alcançados com a ferro-dextrana, onde as moléculas do polissacarídeo têm baixo peso molecular (5000 ± 2500 daltons). Tem sido utilizada com sucesso comercial no tratamento e profilaxia de anemia por deficiência de ferro em animais e humanos (ALSOP, 1983).

b-) Dextrana-sulfato

Este derivado de dextrana que possui peso molecular de aproximadamente 8000 daltons e contém 17 a 20% de enxofre é utilizado como anticoagulante. Estudos recentes têm mostrado a atividade da dextrana-sulfato como agente contra o vírus da AIDS (MITSUDA et al., 1988).

c-) Dextrana-hemoglobina

Solução deste complexo tem aplicação possível como substituto do sangue, tendo a função de expansão do plasma e liberação de oxigênio (ALSOP, 1983).

d-) Dextrana Clínica

O volume plasmático pode sofrer contração em consequência da simples perda de líquidos e eletrólitos, como ocorre no cólera, ou em casos em que as perdas são de natureza mais complexa, como no choque hemorrágico. Obviamente, o sangue total adequadamente tipado representa o melhor substituto para a perda de sangue total. Entretanto, quando o volume plasmático está criticamente comprometido, o uso de soluções coloidais é perfeitamente indicado.

Os produtos naturais de origem humana além de sua disponibilidade limitada, encontram-se associados ao risco de transmissão da hepatite (vírus B e C da hepatite) ou do vírus responsável pela Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Assim, a pesquisa de compostos sintéticos tem sido estimulada.

O grande requisito procurado em um expansor do plasma ideal é ter pressão osmótica comparável à do plasma. A substância deve permanecer na circulação por período de tempo adequado para desempenhar sua função de expansão imediata do volume do plasma e ainda posteriormente ser eliminada por excreção ou degradação metabólica. O expansor ideal não deve prejudicar nenhuma função visceral, nem ter efeito antigênico, alergênico ou pirogênico. Na realidade, exceto pelas suas propriedades físicas, deve ser farmacologicamente inerte. Deve ser capaz de resistir a longos períodos de armazenamento e a largas variações de temperatura do meio, permanecendo eficaz. Deve ser facilmente esterilizado e ter viscosidade conveniente para infusão dentro de intervalo de temperatura razoável.

Muitas substâncias têm sido pesquisadas como possíveis expansores do plasma, como a dextrana e o hidroxietil-amido (hetamido). A dextrana é usada com maior frequência e possui

grande parte dos requisitos apresentados acima, sendo a antigenicidade o seu principal defeito. Esta atividade antigênica parece excluir o seu uso repetido. Entretanto, quando administrada nas doses maciças que são empregadas para infusão, não ocorre produção de anticorpos, talvez devido ao fenômeno de "paralisia imunológica" (GILMAN et al., 1991).

São disponíveis no mercado dois tipos de dextrana como substituto do plasma sanguíneo, a dextrana 75 (peso molecular médio de 75.000 daltons), vendida como uma solução 6% p/v em uma solução salina. Por apresentar propriedades osmóticas similares aos do plasma é mais utilizada para manter o volume sanguíneo e a pressão arterial em casos de choque por queimaduras ou hemorragias severas. A dextrana 40 (peso molecular 40.000 daltons), vendida como uma solução 10% p/v em uma solução salina, atua como auxiliar do fluxo sanguíneo. Ambos os produtos são utilizados extensivamente para prevenir complicações pulmonares fatais em cirurgias, traumas e choques (DE BELDER, 1987 e GILMAN et al., 1991).

2.3.3 - PRODUÇÃO DE DEXTRANA

Para a produção de dextrana, a enzima dextrana-sacarase [EC 2.4.1.5, $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-glucana: D-frutose 2-glicosil transferase] é obtida primeiramente por fermentação bacteriana utilizando-se sacarose como substrato. A enzima é extracelular e a obtenção da dextrana é geralmente conduzida por dois processos, um convencional onde a produção se dá durante o crescimento, ou por síntese enzimática que utiliza o extrato enzimático obtido na fermentação (JEANES, 1966 e ALSOP, 1983).

2.3.3.1 - Processo Convencional

Tradicionalmente a dextrana é produzida diretamente no meio de cultura durante o crescimento do microrganismo *Leuconostoc mesenteroides*. Portanto, este processo envolve três etapas simultâneas:

- crescimento celular
- produção da enzima dextrana-sacarase
- síntese da dextrana

As soluções de açúcar enriquecidas com nutrientes apropriados, estimuladores de crescimento, tampões e sais minerais são inoculadas com o microrganismo num pH em torno de 7,0 (ALSOP, 1983). A sacarose é então fonte de carbono e energia para o microrganismo, indutor e substrato da enzima. É de se esperar, portanto, um rendimento de dextrana baixo, em torno de 25% com base no açúcar adicionado.

Durante o processo o pH cai de 7,0 a 4,8 devido a formação de subprodutos ácidos e a temperatura aumenta em alguns graus devido ao caráter exotérmico da reação. Tem-se uma viscosidade máxima no término da fermentação.

O caldo fermentado é diluído com água, e as células são separadas por centrifugação. A dextrana é obtida do sobrenadante por precipitação com solventes orgânicos, normalmente etanol (42-45% v/v) e purificada através de processos de ressolubilização e precipitação (JEANES, 1966 e ALSOP, 1983). A dextrana assim obtida é de alto peso molecular (2 a 40 milhões de daltons).

2.3.3.2 - Processo Enzimático

Neste processo ocorre primeiramente a produção da enzima dextrana-sacarase em condições controladas de fermentação, e depois de separadas as células, a enzima na sua forma bruta ou purificada é utilizada na produção de dextrana.

Este processo apresenta as seguintes vantagens:

- Purificação mais simples: no processo convencional, o caldo adquire alta viscosidade (mais de 500 cp) o que dificulta a separação de células. Isto não ocorre no processo enzimático já que a produção de dextrana nativa, causadora de alta viscosidade se dá em meio livre de microrganismos.
- Maior rendimento: o rendimento teórico da síntese enzimática é de 100%, já que não há consumo de sacarose no crescimento microbiano. Em condições industriais, com concentrações de sacarose abaixo de 10% a produção fica pouco abaixo do valor teórico.
- Melhores condições de controle: no processo tradicional ocorrem simultaneamente três processos - crescimento celular (pH ótimo 7,0), produção de dextrana-sacarase (pH ótimo 6,0-6,9) e síntese de dextrana (pH ótimo 5,2), além das condições de temperatura e concentração de sacarose ótimas distintas. Este fato dificulta o controle, já que as condições são transitoriamente

ótimas para cada processo. No processo enzimático o controle e otimização da fermentação e da síntese ficam largamente facilitados.

LEE et al. (1992) sugerem a utilização de um reator duplo-estágio para a produção contínua de dextrana clínica por processo enzimático. No primeiro estágio ocorre o cultivo das células e o caldo fermentado é bombeado para o segundo reator, onde sacarose e receptores são adicionados. As células são separadas por centrifugação e a fração clínica é obtida por precipitação com metanol.

2.3.3.3 - Outros Processos

Processos alternativos para a produção de dextrana clínica tem sido estudados. Bioreatores-separadores cromatográficos contínuos e em batelada vem sendo estudados por BARKER e colaboradores (BARKER et al., 1993). Neste sistema ocorre remoção contínua da frutose devido a interações com a resina. E a fração de dextrana de alto peso molecular é hidrolisada de modo convencional. A etapa de fracionamento se dá através de um sistema de membranas e cromatografia de exclusão por tamanho.

Um outro processo é a produção de dextrana clínica por fermentação de culturas mistas de *Lipomyces starkeyi* e *Leuconostoc mesenteroides*. A formação de dextrana clínica no sistema parece ser resultado tanto da ação direta da dextranase como de receptores (produtos da hidrólise da dextrana pela dextranase) (KIM, D. e DAY, D. F., 1994).

2.3.4 - REDUÇÃO DO PESO MOLECULAR

Uma vez que a aplicação técnica da dextrana, bem como de outros polímeros, depende estritamente do peso molecular e da distribuição do peso molecular, uma redução deste de acordo com aplicação desejada faz-se necessária.

Vários métodos podem ser utilizados para a redução do peso molecular da dextrana tais como: hidrólise ácida, hidrólise enzimática (WOLFF et al, 1954), além do uso de açúcares receptores no meio reacional.

2.3.4.1 - Hidrólise Ácida

As principais vantagens da hidrólise ácida são a não exigência de equipamentos sofisticados, a facilidade no controle e a possibilidade de utilização da dextrana nativa úmida. A possibilidade de ocorrência de caramelização e produção de furfural, comuns em hidrólise ácida de açúcar, existe. Entretanto não foi encontrada descrição destes subprodutos na literatura consultada.

BIXLER et al. (1953) reportaram a produção industrial de dextrana clínica utilizando temperaturas de hidrólise na faixa de 100-105° C.

WOLFF et al. (1954) estudaram a hidrólise ácida parcial da dextrana obtida através da linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Analisaram o efeito do pH/ temperatura durante a hidrólise, tipo de ácido e a concentração de dextrana na qualidade do produto obtido. As hidrólises ocorreram por um período de tempo variando de 10 minutos a 46 horas, temperatura de 70° C a 120° C e pH entre 0,35 e 2,9, obtendo-se rendimentos em torno de 36% de dextrana clínica com peso molecular na faixa de 75.000 ± 25.000 , a partir de dextrana de alto peso molecular ($30-50 \times 10^6$ daltons). Utilizando-se a condição de 80° C, pH 1,0 e ácido sulfúrico o rendimento de dextrana obtida através da precipitação com etanol foi 47%. Os autores relataram que diferentes dextranas e mesmo preparações diferentes da dextrana produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F podem requerer alguma alteração nos valores obtidos. A escolha do tipo de ácido foi baseada se a não-volatilidade e menor corrosividade do ácido sulfúrico em relação ao ácido clorídrico são consideradas importantes ou se a formação de sulfato de sódio, menos solúvel em álcool e sua tendência de precipitar com a dextrana exceda as vantagens do ácido sulfúrico. Quanto a distribuição do peso molecular dos produtos obtidos com os diferentes tipos de ácidos, os autores relatam que esta é geralmente semelhante.

A variação na concentração de dextrana não alterou significativamente a distribuição de produtos, mas os autores recomendaram uma concentração de 5%, em função da alta viscosidade observada em altas concentrações, dificultando a agitação.

ZIEF et al. (1956) hidrolisaram dextrana de alto peso molecular para obtenção de dextrana clínica a 100° C e pH igual a 1,9 por 1 hora, quando então a taxa de hidrólise foi moderada

através da elevação do pH a 2,2 com adição de alcali. Um rendimento de 40% de dextrana clínica foi conseguido, porém não é relatada a extensão da hidrólise.

A hidrólise ácida é o processo tradicional usado para obtenção da fração clínica de dextrana. Não foi encontrada literatura recente sobre processos de hidrólise. Trabalhos sobre a obtenção da dextrana clínica por este método baseiam-se normalmente na literatura tradicional.

2.3.4.2 - Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da dextrana é obtida com a enzima dextranase. Segundo ALSOP (1983) uma seleção de enzimas disponíveis comercialmente produziram distribuições de peso molecular diferentes a partir do mesmo material e obviamente agiram por diferentes mecanismos em relação ao ataque à molécula de dextrana. A hidrólise enzimática vem sendo estudada, porém sua utilização se restringe à escala laboratorial, não tendo sido encontradas referências à produção industrial.

Outros métodos de redução de peso molecular citados na literatura são: depolimerização térmica, clivagem por ultrassom e hidrólise alcalina (WOLFF et al., 1954).

Seja qual for o processo utilizado para a redução do grau de polimerização, se faz necessário uma etapa de fracionamento para o isolamento da fração de interesse. Isto pode ser conseguido explorando as diferentes solubilidades das moléculas de dextrana de diferentes tamanhos. Tal fracionamento pode ser feito pela precipitação da dextrana com concentrações diferentes de solventes orgânicos normalmente álcoois ou cetonas (GRÖNWALL and INGELMAN, 1948).

A fração de dextrana clínica pode ser precipitada com concentrações entre 42 a 49% de metanol e 39 a 46% de etanol (WOLFF et al., 1954), com controle da temperatura. No processo de fracionamento usa-se também ultrafiltração (BARKER, 1969), cromatografia de permeação em gel semi-continua (BARKER et al., 1983) em batelada (BARKER et al., 1987) e contínua (BARKER et al., 1989).

2.3.5 - FATORES QUE AFETAM A DISTRIBUIÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular depende das condições de síntese como temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares. A dextrana nativa produzida pelo método convencional

pode atingir um peso molecular superior a 50×10^6 de daltons, possuindo uma composição molecular bastante dispersa. O efeito da concentração de sacarose é o parâmetro mais importante no rendimento e distribuição do peso molecular da dextrana, segundo ALSOP (1983). Com o aumento da concentração de sacarose uma série de alterações ocorrem: (1) a quantidade de monossacarídeos (principalmente frutose) aumenta além do esperado; (2) a quantidade de dissacarídeos (principalmente leucrose) aumenta consideravelmente; (3) a quantidade de dextrana de baixo peso molecular ($PM < 5000$ daltons) aumenta, principalmente acima de 10% de sacarose. Como consequência disso o rendimento em dextranas de alto peso molecular decresce bastante. Alta porcentagem de dextranas de baixo peso molecular foram obtidas com concentração de sacarose de 500 g/L. Porém o uso destas condições para produção de polissacarídeo foi inviável pelo baixo rendimento global (CURRALERO, 1993).

A adição de certos açúcares na reação de dextrana-sacarase/sacarose modificam as características dos produtos da reação. O resíduo glicosil da sacarose é desviado para um grupo hidroxil livre destes açúcares, chamados receptores, antes de se adicionarem na cadeia em crescimento.

ROBYT & EKLUND (1983) estudaram as reações de 17 receptores. A eficiência relativa dos diferentes receptores foi determinada comparando a porcentagem de D-glicose incorporada nos vários produtos obtidos na reação. A maltose mostrou-se o mais eficiente. Outros receptores em ordem decrescente de eficiência foram isomaltose, nigerose, metil- α -D-glicosídeo, 1,5-anidro-D-glucitol e D-glicose.

PAUL et al (1986) analisaram o efeito da presença de maltose e oligossacarídeos na síntese de dextrana de peso molecular controlado, relacionando o peso molecular das espécies formadas com uma função linear da concentração de sacarose pela concentração do receptor.

Com o uso de maltose foi obtida a seguinte relação:

$$PM = 340 (1 + 0,48 S/M) \quad (2.1)$$

onde: PM é o peso molecular das espécies formadas

S é a concentração de sacarose

M é a concentração de maltose

Com a utilização de oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares como receptores, foi obtida a equação (2.2).

$$PM = PM_R (1 + 0,474 S/R) \quad (2.2)$$

onde: PM_R é o peso molecular do receptor

R é a concentração de receptor

Segundo os autores com um controle das condições de reação é possível obter dextrana com peso molecular controlado apresentando a mesma polidispersividade das dextranas comercialmente disponíveis preparadas pela hidrólise ácida dos polímeros de alto peso molecular.

ROBYT & SU (1993) estudaram o efeito da (1) razão da concentração de receptor pela concentração de sacarose, (2) concentração de sacarose, e (3) quantidade de enzima presente no meio na síntese de dextrana. Embora a concentração de sacarose e enzima devam ser consideradas, segundo os autores a razão entre as concentrações de receptor e sacarose é o fator predominante no controle da síntese.

A influência da temperatura, da relação receptor/sacarose e da concentração da sacarose sobre a síntese de dextranas com peso molecular controlado foi estudada por BAZÁN. (1993). Os parâmetros ótimos encontrados pelos autores para formação de dextrana clínica foram altas concentrações de sacarose (133,6 g/l), altos valores da relação receptor/sacarose (0,0384) e baixas temperaturas (18,0 °C). Com respeito à temperatura o autor cita que a diminuição da temperatura, favorece a formação de dextrana clínica devido a diminuição da velocidade de reação. Altas temperaturas favorecem a formação de dextrana de alto peso molecular.

A maltose foi também utilizada como receptor por LEE et al.(1992). Segundo os autores a maltose pode ser um receptor não adequado para a produção de dextrana clínica em cultura em batelada, porém pode ser um excelente receptor para a produção de oligossacarídeos. O mesmo foi observado por PEREIRA et al. (1996) utilizando glicose como receptor inicial. para a produção de oligossacarídeos de baixo peso molecular. Os autores determinaram as condições ótimas de temperatura e concentrações de sacarose e receptor glicose através da metodologia de análise por superfície de resposta.

2.3.6 - CARACTERIZAÇÃO DO PESO MOLECULAR

Em contraste com as substâncias químicas comuns, os polímeros não são produtos homogêneos no que se refere ao peso molecular; contém mistura de moléculas de variados pesos moleculares, apresentando o que se chama de polimolecularidade. Assim para a caracterização da amostra é necessário o conhecimento da distribuição de pesos e o peso molecular médio do produto. Os três principais tipos de peso molecular comumente referidos na literatura são: peso molecular numérico médio (M_n), peso molecular ponderal médio (M_w) e peso molecular viscosimétrico médio (M_v).

a-) Peso molecular numérico médio (M_n)

$$M_n = (\sum_{i=1} n_i M_i) / \sum_{i=1} n_i \quad (2.3)$$

onde: M_i é o peso molecular de moléculas de classe i

n_i é o número de moléculas de classe i

O peso molecular numérico médio depende do número de moléculas com determinado peso, e é geralmente obtido através de osmometria de membrana, osmometria de pressão de vapor e análise de grupos terminais.

b-) Peso molecular ponderal médio (M_w)

$$M_w = (\sum_{i=1} n_i M_i^2) / (\sum_{i=1} n_i M_i) \quad (2.4)$$

O peso molecular ponderal médio depende do número e do peso das moléculas presentes na solução do polímero. É obtido principalmente por espalhamento de luz de laser (LALLS).

c-) Peso molecular viscosimétrico médio (M_v)

$$M_v = [(\sum_{i=1} n_i M_i^{1+a})]^{1/a} / (\sum_{i=1} n_i M_i) \quad (2.5)$$

onde: a é constante que depende do sistema polímero-solvente e da temperatura; quando $a = 1$, $M_v = M_w$

O peso molecular viscosimétrico médio se baseia na propriedade dos polímeros de produzirem soluções viscosas mesmos a grandes diluições. Depende do espaço ocupado pelas

macromoléculas, causando resistência ao escoamento, e são fatores importantes não apenas o número e o peso das moléculas, mas também a sua forma na solução. As interações polímero-solvente afetam os resultados obtidos. É determinado por viscosimetria. A distribuição dos pesos médios na curva podem ser observados na Figura 2.5.

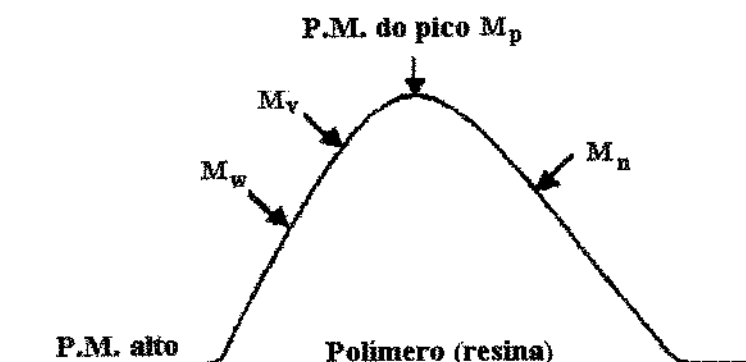


Figura 2.5 - Curva de distribuição de pesos moleculares médios

A dispersão em relação a distribuição de peso molecular pode ser calculada pela equação 2.6. Quanto mais larga a curva maior a dispersão.

$$D = M_w / M_n \quad (2.6)$$

onde: D é o índice de dispersão da amostra

De acordo com a prática aceitável, dextranas clínicas são controladas através da determinação do peso molecular ponderal médio, M_w , da distribuição de pesos moleculares, por LALLS (Espalhamento de Luz de Laser). NILSON et al. (1974) propuseram a utilização de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) para caracterização de dextranas clínicas, e para isso fizeram um estudo comparando o desempenho dos dois métodos. Relataram a aplicação bem sucedida de GPC comparadas às técnicas convencionais, e os vários fatores que influenciam a qualidade da análise.

2.3.6.1 - Cromatografia de Permeação em Gel

Cromatografia de permeação em gel é um método cromatográfico que se baseia num processo físico, onde uma amostra adequadamente diluída é passada através de uma coluna empacotada com um meio cromatográfico que é um gel. A separação é o resultado do acesso

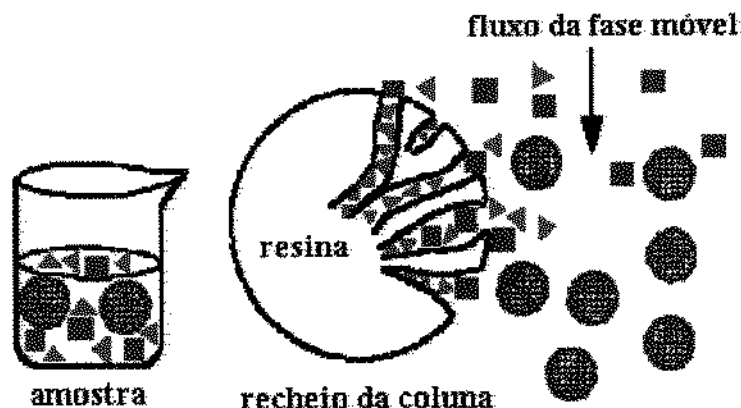


Figura 2.6 - Esquema Representativo do Processo de Permeação em Gel

2.4 - APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

A importância das variáveis em um processo pode ser determinada através da adoção de um método de planejamento experimental, o qual possibilita o planejamento e execução de forma organizada de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Este método permite ainda a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, através de programas estatísticos de regressão.

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são o simplex, o planejamento fatorial e o método de análise por superfície de resposta. O método simplex e suas derivações são mais adequados para ensaios rápidos, já que a especificação das condições nas quais deve ser realizado o ensaio seguinte depende da resposta do ensaio anterior (BOX et al, 1978).

O método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta tem como base o método de planejamento fatorial. Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento e produtividade) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (como temperatura, pH e concentração). Estas técnicas são usadas para resolver principalmente as seguintes questões:

limitado das moléculas grandes dentro da estrutura porosa do recheio. Assim as moléculas que difundem para dentro do gel são retardadas na sua passagem através da coluna comparadas às moléculas grandes que não podem difundir dentro do gel e move continuamente na coluna fluindo com o eluente. As moléculas com tamanho intermediário migram com velocidades entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada com seus tamanhos efetivos. O processo de separação é ilustrado na Figura 2.6.

Este método primeiramente fornece a distribuição do volume de eluição, ou distribuição do tempo de retenção. O tempo de retenção das espécies moleculares é uma função do seus tamanhos; de variáveis operacionais, tais como tipo de gel, solvente, temperatura, vazão e de outras variáveis que influenciam o alargamento da curva. O peso molecular das frações pode ser obtido relacionando o tempo de retenção ao peso molecular quando padrões apropriados são disponíveis para construção da curva de calibração. O objetivo da calibração, contudo, é estabelecer uma expressão que relaciona o tempo de retenção ao tamanho molecular a dados valores operacionais e outras variáveis. Nos métodos de calibração aplicados $\log M_w$ é assumido ser uma função linear ou um polinômio de maior grau, do tempo de retenção. Um número de padrões selecionados, normalmente maior que 6 devem ser disponíveis. Os pesos moleculares dos padrões devem cobrir o intervalo de pesos moleculares para o qual a curva será válida e suas propriedades devem ser o mais próximas possíveis daquelas das amostras a serem analisadas. É portanto, um método relativo de determinação de peso molecular e vários fatores podem influenciar o tempo de retenção. Amostras e padrões devem ser preparados em concentrações baixas para evitar alteração dos cromatogramas devido à viscosidade. Amostras concentradas tendem a se "dividir", sendo que parte dela é mais retida na coluna, ocorrendo deslocamento do cromatograma para a região de baixo peso molecular. Para amostras e padrões de peso molecular superior a 200.000 daltons deve haver um período de equilíbrio de algumas horas (16-20 horas) antes da injeção para permitir a cadeia do polímero estender-se para a sua conformação de solvatação no solvente. As amostras de alto peso molecular não devem ser deaeradas com ultrassom já que pode ocorrer a quebra das cadeias maiores, mas a deaeração da fase móvel deve ser feita diariamente, uma vez que o ar dissolvido causa problemas de bolhas nas colunas que afetam o tempo de retenção e a reprodutibilidade da análise.

- como uma resposta é afetada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada.
- quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas.
- quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto.

Para aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento fatorial com 2 níveis (nível +1 e nível -1) para cada variável é especificamente eficiente. Se “n” variáveis estão envolvidas no estudo de um determinado sistema, o número de experimentos que devem ser realizados para investigar todas as combinações possíveis é portanto 2^n . Acrescentam-se ainda ensaios em triplicata realizados nas condições correspondentes às intermediárias entre as dos dois níveis atribuídos a cada variável (nível 0 ou ponto central do planejamento) com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios (BOX et al, 1978).

Neste ponto, pode-se considerar encerrado o método de planejamento fatorial. Com os dados obtidos após a execução dos ensaios é possível calcular os efeitos simples e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado, e até ajustar um modelo de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas.

Caso se deseja explorar outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial ou se o modelo de 1ª ordem proposto não estiver bem correlacionado com os dados experimentais, pode-se completar o planejamento realizando ensaios no pontos axiais para um modelo de 2ª ordem.

Para avaliar se o modelos empíricos obtidos através de regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, BOX et al (1978) sugerem que

seja feita uma análise estatística, utilizando como parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F descritos a seguir.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero, não existe correlação. A análise dos valores intermediários não pode ser expressa de forma tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste do modelo aos pontos experimentais (BOX et al , 1978).

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas.

O fundamento do teste F consiste em verificar se existe relação entre as variáveis e a resposta. Segundo BARROS NETO et al (1995), quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQR / MQr) segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devida exclusivamente a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada usando o valor efetivamente calculado para MQR / MQr . Para isso basta compará-lo com o valor de F tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula. Então, pode-se afirmar que a equação de regressão não é significativa.

Por outro lado, se a razão MQR/MQr é maior que o valor de F tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto.

Pode acontecer, porém, que uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F, não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. BOX e WETZ (1973), segundo BARROS NETO et al (1995), sugeriram que para que isso não ocorra, isto é, para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa mas

também útil para fins preditivos, o valor da razão MQR/MQr deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes o valor de F tabelado.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 -SÍNTESE DE DEXTRANA

Neste item serão descritos as etapas utilizadas para obtenção da dextrana de alto peso molecular. A enzima dextrana-sacarase foi produzida para posterior utilização no processo de síntese.

3.1.1 - MICRORGANISMO

Nas fermentações realizadas para a produção da enzima dextrana-sacarase foi utilizado *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, mantido em estoque a -15° C em solução de glicerol a 10% (p/v).

3.1.2 - MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DA ENZIMA DEXTRANA-SACARASE.

Meio Padrão

Sacarose (açúcar cristal comercial)	40,0 g/l
Extrato de Levedura	20,0 g/l
Fosfato de Potássio Dibásico	20,0 g/l
Sulfato de Magnésio	0,20 g/l
Sulfato de Manganês	0,01 g/l
Sulfato Ferroso	0,01 g/l
Cloreto de Cálcio	0,02 g/l
Cloreto de Sódio	0,01 g/l

Antiespumante

Foram dissolvidos o açúcar comercial e o extrato de levedura em água, adicionando-se uma alíquota da solução de oligoelementos e antiespumante suficientes para a obtenção das

concentrações desejadas. O pH foi ajustado a 6,7. A solução de fosfato foi preparada separadamente e o pH ajustado também a 6,7.

Ambas soluções foram esterilizadas a 121 °C por 15 minutos. A solução de fosfato deve ser esterilizada separadamente para evitar precipitação constatada experimentalmente quando este sal é autoclavado em presença dos demais componentes do meio.

3.1.3 - PREPARO DO INÓCULO

Foram realizadas três pré-fermentações para ativar o microrganismo. Na pré-fermentação final foram transferidos 10% de inóculo para o frasco contendo 30 ml de K_2HPO_4 e 120 ml de meio padrão. O meio foi incubado a 27,0°C a 150 rpm por 5 horas.

3.1.4 - ALIMENTAÇÃO

O sistema de alimentação escolhido foi o mesmo utilizado por BAZÁN (1993). Foram preparados 600 ml de solução de sacarose 200 g/l e 150 ml de solução de hidróxido de sódio 200 g/l, esterilizando-os separadamente a 121°C por 15 minutos e misturando-os depois de frios, para obter uma solução final com concentração de 160 g/l de sacarose e 40 g/l de hidróxido de sódio.

3.1.5 - FERMENTAÇÃO

Em um fermentador de 3,0 litros de capacidade contendo 1,5 l de meio padrão estéril, foi adicionado o inóculo e incubado a 27,0 °C com aeração de 0,6 l/min, agitação magnética e controle de pH. O pH foi mantido em $6,7 \pm 0,1$ pela adição de solução combinada de sacarose e NaOH, preparada de acordo com o item anterior. Esta adição foi feita por um período de 6 horas através de uma bomba conectada ao controlador automático de pH.

No final da fermentação uma amostra de 10 ml foi retirada e centrifugada. A atividade do sobrenadante foi determinada para avaliar o desempenho da fermentação. O pH do caldo fermentado foi acertado para 5,2 com solução de ácido clorídrico.

3.1.6 - PURIFICAÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE

O caldo proveniente da fermentação foi centrifugado a 10.000 rpm a 5,0°C por 10 minutos, em centrífuga modelo RC-5C da Sorvall, para separação das células bacterianas. O

sobrenadante proveniente da centrifugação foi colocado em banho de gelo e submetido a uma ultrafiltração em um ultrafiltro Sartorius modelo SM 16525 para a concentração da enzima. A atividade do filtrado foi medida em intervalos de 30 min durante esta etapa. A enzima presente na solução concentrada foi precipitada através da adição de um volume igual de solução 50% de polietilenoglicol 1.500 (PEG 1.500), e então centrifugada. O precipitado rico em dextrana-sacarase foi dissolvido em solução tampão de acetato de sódio 200 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/l de cloreto de cálcio e estocada à -15°C.

3.1.7- REAÇÃO ENZIMÁTICA

As polimerizações foram realizadas num reator de vidro encamisado de 1,0 l de volume reacional equipado com agitador mecânico. Foram adicionados ao reator solução de sacarose 100,0 g/l e solução de dextrana-sacarase 40 UDS/ml. A temperatura de reação foi 20,0°C e o pH mantido em 5,2, valor este que é o ótimo de atividade e estabilidade da enzima.

A extensão da reação foi acompanhada por retirada de 1,0 ml de amostra em intervalos de 30 min para a dosagem de frutose liberada. A amostra foi aquecida em banho-maria durante 10 minutos para inativação da enzima e a frutose quantificada pelo método DNS. A reação foi interrompida quando pelo menos dois valores iguais de concentração de frutose foram obtidos. Isso ocorreu por volta de 5 a 6 horas de reação e a concentração de frutose foi de aproximadamente 40,0 g/l.

3.2 - PRODUÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

A dextrana clínica foi obtida através de hidrólise ácida da dextrana de alto peso sintetizada, utilizando-se a metodologia de planejamento experimental descrita a seguir.

3.2.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Conforme determina a metodologia do planejamento por superfície de resposta, deve-se iniciar o estudo através de um Planejamento Fatorial, onde o número de experimentos é 2^n (n é o número de variáveis) e mais uma triplicata no ponto central.

As variáveis de interesse e seus valores máximos e mínimos foram escolhidos com base em informações obtidas na literatura (BIXLER et al, 1953 e WOLFF et al, 1954). Estas variáveis foram pH e temperatura de hidrólise.

Foram realizados $2^2 = 4$ experimentos para o planejamento fatorial inicial (ensaios 1 a 4) e mais 3 experimentos no ponto central (ensaios 5, 6, e 7). Se o modelo de 1ª ordem proposto não correlacionar bem os dados experimentais, é necessário recorrer ao modelo de 2ª ordem. Para isso deve-se executar os $2 \times n$ experimentos (nível $+\alpha$ ou $-\alpha$) que correspondem aos ensaios 8, 9, 10 e 11 da Tabela 3.1. O valor de α dependente do número de variáveis é definido pela equação (3.1) (BOX & WILSON, 1951):

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^n)^{1/4} \quad (3.1)$$

onde: F corresponde ao conjunto fatorial

n é o número de variáveis independentes

As variáveis foram estudadas a dois níveis, codificados como -1 e +1. Os valores reais correspondentes a estes níveis foram definidos com base na literatura e ensaios preliminares..A Tabela 3.1 apresenta os valores reais e codificados correspondentes ao planejamento completo.

Tabela 3.1: Valores reais e codificados atribuídos às variáveis do Planejamento Experimental

Ensaio	Y1	Y2	pH	T °C
1(4)*	-1	-1	1,5	65,0
2 (6)	+1	-1	2,5	65,0
3 (5)	-1	+1	1,5	75,0
4 (2)	+1	+1	2,5	75,0
5 (1)	0	0	2,0	70,0
6 (7)	0	0	2,0	70,0
7(3)	0	0	2,0	70,0
8	-1,41	0	1,3	70,0
9	+1,41	0	2,7	70,0
10	0	-1,41	2,0	63,0
11	0	+1,41	2,0	77,0

* Os valores entre parêntesis indicam a ordem de realização do ensaio.

Os valores reais foram calculados pela seguinte equação:

$$y_i = [2Y_i - (Y_{i(+1)} + Y_{i(-1)})] / (Y_{i(+1)} - Y_{i(-1)}) \quad (3.2)$$

onde: y_i é o valor codificado da variável Y_i

$Y_{i(+1)}$: é o valor real da variável no nível +1

$Y_{i(-1)}$ é o valor real da variável no nível -1

3.2.2 - HIDRÓLISE ÁCIDA

A hidrólise da solução de dextrana bruta proveniente da síntese foi realizada em cada uma das condições delineadas pelo planejamento experimental e acompanhada por um período de 7 horas após a adição do ácido.

Os experimentos foram realizados em balão de três bocas de 250 ml, contendo 100 g de dextrana. O balão de reação, imerso em banho termostatizado para a manutenção da temperatura, foi equipado com condensador, agitador mecânico e termômetro.

A quantidade de ácido sulfúrico 3N requerida para propiciar o pH desejado foi adicionada tão rapidamente quanto possível com agitação rápida. Esta quantidade de ácido foi previamente determinada. O tempo de hidrólise foi cronometrado a partir do instante em que se adicionou o ácido.

Amostras foram retiradas por um período de 7 horas. Nas duas horas iniciais foram retiradas amostras de 15 em 15 min. Nas duas horas seguintes foram retiradas amostras a cada 30 min e nas três horas restantes a amostragem ocorreu a cada 60 min. A hidrólise foi interrompida através de resfriamento rápido em banho de gelo e simultânea neutralização com solução de hidróxido de sódio 1,5 N. A neutralização final (pH 6,5 a 7,0) foi realizada a temperatura ambiente com solução alcalina mais diluída. As amostras foram congeladas para posterior análise do peso molecular.

3.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 - DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES - MÉTODO DNS (MILLER, 1959)

Reagente DNS:

Misturar:

1. água destilada	1416 ml
2. ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)	10,6 g
3. hidróxido de sódio	19,8 g

Dissolver a quente e adicionar:

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

Este método consiste na reação de 1,0 ml de amostra convenientemente diluída com 1,0 ml do reagente descrito acima, aquecendo-se a seguir a 100° C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em solução de gelo e adiciona-se solução de tartarato de sódio e potássio (11,25 g/l). O branco é feito pela substituição da amostra por água destilada.

A reação de DNS com açúcares redutores produz uma coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de açúcares redutores presentes na amostra. Esta correlação foi obtida através de uma curva padrão, onde soluções com concentrações conhecidas de glicose foram submetidas ao teste, fazendo-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro modelo B 342 II da Micronal. A cada novo reagente, uma curva padrão de absorbância versus concentração de açúcares redutores foi elaborada.

3.3.2 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A determinação de atividade enzimática foi feita no acompanhamento das fermentações e em amostras iniciais de polimerização. A atividade foi determinada medindo-se a velocidade inicial de produção de frutose, pela ação da dextrana-sacarase sobre a sacarose em condições controladas.

Foi utilizado um reator de vidro encamisado de 25 ml de volume, agitado magneticamente e termostatizado a 30° C. No reator foi colocado entre 0,1 a 1,0 ml de solução enzimática, 0,5 ml de tampão acetato de sódio 200 mM a pH 5,2 (contendo 2,5 g/l de CaCl_2) e completou o volume com água destilada a 10,0 ml. Foram adicionados 2,0 ml de solução de sacarose 600 g/l. Amostras foram retiradas a cada 2 minutos para dosar a frutose pelo método descrito acima (DNS). A evolução da absorbância foi plotada em função do tempo. Com o valor da inclinação da reta obtida e a curva padrão do DNS, a atividade enzimática expressa em UDS (unidade de dextrana-sacarase), pode ser obtida pela equação (3.3).

$$AT \text{ (UDS/ml)} = (\gamma \cdot \beta \cdot 60 \cdot d) / 0,52 \quad (3.3)$$

onde: γ é o: coeficiente angular da curva absorbância x tempo

β é o coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d é a diluição final no reator

A unidade de dextrana-sacarase é definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana, em uma hora, liberando 0,52 mg de frutose, a pH 5,2 e temperatura de 30° C. Uma unidade internacional (UI) corresponde a 20,27 UDS.

3.3.3- ANÁLISE DO PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL

O sistema utilizado para a determinação do peso molecular relativo das amostras bem como suas quantidades relativas consistiu em:

- 1- Um injetor automático Varian 9095
- 2- Uma bomba ternária Varian 9010
- 3- Um forno Spark Holland 99
- 4- Um detetor de índice de refração RI4
- 5- Um software para aquisição e processamento dos dados além de geração de relatórios ("Millenium Chromatography Manager" - Waters)

6- Um conjunto de três colunas e uma pré-coluna Varian série Micropak. As colunas foram conectadas em série na sequência do poro decrescente. A faixa de exclusão de cada coluna utilizada e suas dimensões são mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Características das colunas utilizadas.

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

3.3.3.1 - Preparo da fase móvel

O critério básico para a análise de polímeros por GPC é a sua solubilidade na fase móvel. Foi utilizada água ultrapura como eluente, obtida através de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus. A fase móvel foi desgaseificada diariamente através de aquecimento e banho de ultra-som Eurosonics modelo SX-20 durante duas horas. O frasco contendo a fase móvel foi mantido 10 a 15 cm acima da entrada na bomba. O fluxo foi aumentado lentamente até 1,0 ml/min. O sistema foi deixado apenas com fase móvel até conseguir estabilização do refratômetro, verificada através do monitoramento da linha de base pelo software.

3.3.3.2 - Preparo das amostras de dextrana e padrões

As amostras descongeladas provenientes da síntese e das hidrólises, e os padrões de dextrana foram dissolvidos em água Milli-Q numa concentração de 0,20% (p/v) e as soluções de amostras e padrões com pesos moleculares superiores a 200.000 daltons foram deixadas em repouso por um período de 16 a 20 horas antes da injeção.

3.3.3.3 - Determinação da eficiência das colunas

Foi injetada uma solução 0,25% (p/v) de etanol e o número de pratos teóricos de cada coluna foi calculado pelo método da $\frac{1}{2}$ altura, utilizando a largura correspondente à metade da altura do pico obtido pela injeção de etanol e o tempo de eluição, através da equação (3.4). O valor calculado foi comparado com o valor fornecido pelo fabricante.

$$N = 5,54 (V_e / W_{1/2})^2 \quad (3.4)$$

- onde: V_e é o tempo de eluição da solução de etanol (min)

$W_{1/2}$ é o valor da largura do pico na metade da altura (min)

N é o número de pratos teóricos da coluna

3.3.3.4 - Injeção das amostras no HPLC

Depois de testada a eficiência, as colunas disponíveis (série Micropak TSK Gel 3.000, 4.000 e 6.000) foram conectadas em série na sequência do poro decrescente para separar primeiramente as moléculas maiores, evitando problemas de viscosidade. Além disso, esta sequência possibilita a coluna de menor porosidade, mais sensível à pressão, ficar mais distante da bomba. Os dados foram obtidos através da injeção das soluções dos padrões e das amostras nas mesmas condições:

- Temperatura ambiente: 25° C
- Temperatura do forno: 40° C
- Temperatura do detector de índice de refração: 40° C
- Volume de injeção: 98,0 µl
- Vazão do eluente: 1,0 ml/min
- Tempo de corrida: 35 min

3.3.3.5 - Curva de Calibração

Foram utilizados padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation) e glicose (Tabela 3.3). A curva de calibração foi obtida utilizando M_w , M_n e M_p como parâmetros básicos. A integração dos picos para cada padrão foi otimizada de tal forma que os pesos moleculares médios fornecidos e aqueles calculados fossem os mais próximos possíveis e o tipo de regressão para a curva de calibração foi definida com base no melhor coeficiente de regressão obtido.

A opção de calibração do software Millenium utilizada foi aquela adequada para padrões dispersos, ou seja, "broad standards".

Tabela 3.3: Pesos moleculares dos padrões utilizados.

Padrão	Mw	Mp	Mn
DXT 11K	11.700	9.900	8.000
DXT 43K	42.750	35.000	28.700
DXT 79K	78.800	68.000	49.400
DXT 165K	165.500	150.000	110.800
DXT 685K	685.000	500.000	380.600
DXT 1750K	1.750.000	1.450.000	1250.000
DXT 5000K	4.900.000	4.500.000	1.500.000
Glicose	—	180	—

3.3.3.6 - Quantificação das amostras

Utilizando o software "Millenium" os cromatogramas foram integrados e a distribuição do peso molecular das amostras obtida através da curva de calibração. As porcentagens da amostra em cada faixa de peso molecular são apresentadas nos relatórios.

Para determinação do percentual de dextranas totais considerou-se a quantidade acumulada até o peso molecular de 10.000 daltons. Na determinação do percentual para as demais faixas de peso molecular, o valor foi obtido subtraindo da porcentagem acumulada, no limite de peso molecular inferior, a porcentagem acumulada no limite de peso molecular superior. Por exemplo, para a dextrana clínica o percentual foi obtido fazendo-se:

$$\% \text{ dextrana clínica} = (\% \text{ acumulada até } 20.000 \text{ daltons}) - (\% \text{ acumulada até } 100.000 \text{ daltons})$$

Os rendimentos calculados foram todos relativos a quantidade de dextrana inicial (14,2%) presente na solução bruta..

$$\text{Rend} = (\% \text{ dextrana clínica} \times 100) / 14,2 \quad (3.5)$$

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - SÍNTESE DE DEXTRANA

4.1.1 - FERMENTAÇÃO

As fermentações com *Leuconostoc mesenteroides* foram feitas utilizando as condições descritas no capítulo anterior: pH inicial 6,7, temperatura 27 ° C, aeração de 0,5 l/min, controle de pH por 6 horas e processo em batelada alimentada com alimentação de solução de sacarose e NaOH (solução combinada). A solução combinada permite o controle do pH durante a fermentação e a alimentação de sacarose para manutenção de uma concentração ótima. Estas condições foram adotadas com vistas aos resultados obtidos por BAZÁN (1993) para produção da enzima dextrana-sacarase com maior atividade enzimática e menor quantidade de açúcares redutores totais (ART). A presença de grandes quantidades de açúcares redutores totais no meio de fermentação acarreta a produção de dextrana de alto peso molecular, juntamente com a dextrana-sacarase, produzindo um caldo fermentado de alta viscosidade que dificulta o processo de separação.

Esta etapa restringiu-se à realização de fermentações para produção de quantidades de enzima suficiente para a etapa de polimerização. Esta quantidade foi conseguida por meio de várias fermentações devido ao fato de não se obter alta atividade enzimática durante este processo. A Tabela 4.1 mostra os resultados obtidos.

Tabela 4.1: Atividade e volume obtidos nas etapas de produção da enzima

<i>Fermentação</i>	<i>Atividade do caldo (UDS/ml)</i>	<i>Volume (ml)</i>
1	33,7	2000
2	72,7	1970
3	70,0	2160
4	38,3	2000
5	27,4	1500

BAZÁN (1993) relatou um valor de 106 UDS/ml para a atividade de dextrana-sacarase obtida nas mesmas condições. Porém este valor foi obtido com 6 horas de fermentação. Nos

ensaios realizados a determinação foi feita depois de 8 horas, por impossibilidade de realizar as fermentações durante o dia. Isso pode explicar os valores baixos de atividade, uma vez que o decréscimo na atividade no final da fermentação é típico desta enzima devido a sua baixa estabilidade nas condições de fermentação empregadas ($T = 27^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH } 6,7$).

4.1.2 - PURIFICAÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE

A purificação da enzima foi realizada como descrito em Material e Métodos. A Tabela 4.2 mostra a recuperação final da enzima no processo de purificação..

Tabela 4.2: Atividade total (UDS) nas etapas de purificação e recuperação final da enzima

Fermentação	Atividade do Caldo	Ativ.após precipitação	Recuperação (%)
1	67.320	151.182	22,5
2	143.179	—	—
3	151.200	15.249	10,1
4	76.680	27.226	35,5
5*	41.130	28.781	70,0

- valor não disponível

* não foi realizada a etapa de ultrafiltração

Como foi obtida uma baixa recuperação da enzima, optou-se por monitorar a atividade do filtrado durante a ultrafiltração. Como o filtrado não apresentou atividade, a possibilidade de decréscimo na atividade devido a não retenção da enzima pelas membranas do ultrafiltro foi descartada. Talvez a perda de atividade possa ser explicada pela tensão de cisalhamento à qual a enzima é submetida durante todo o processo de ultrafiltração, por perdas durante a centrifugação e também pela exposição prolongada da enzima em condições pouco favoráveis. Inicialmente diminui o tempo de ultrafiltração, através do aumento da velocidade de ultrafiltração, porém isso acarretou formação de espumas, além da não retenção da enzima pelas membranas, detectada através da presença de atividade no filtrado. Então optou-se por concentrar menos a solução enzimática, entretanto não houve melhoria nos resultados.

Uma vez que o caldo obtido no experimento 5 apresentou uma atividade muito baixa, optou-se por não realizar a etapa de ultrafiltração, precipitando a enzima diretamente do meio fermentado. Apesar deste procedimento apresentar o inconveniente de se trabalhar com grandes

volumes, foi o que resultou a melhor recuperação da enzima (70%), fortalecendo a hipótese que parte da perda de atividade se dá durante a etapa de ultrafiltração. LENCKI et al. (1993) relataram o efeito da tensão de cisalhamento sobre a inativação da enzima dextrana-sacarase. Porém, segundo os autores abaixo de 25° C, mesmo altas tensões de cisalhamento não aceleram significativamente a inativação da enzima.

4.1.3 - REAÇÃO ENZIMÁTICA

Vários estudos sugerem como alternativa de obtenção de dextrana com peso molecular controlado, a exploração das condições de síntese, uma vez que o peso molecular sofre grande influência destas condições, principalmente em relação à concentração de sacarose, temperatura e presença de outros açúcares.

Na intenção de obter dextranas cujo peso molecular propiciasse condições mais brandas de hidrólise para a obtenção da fração clínica, foram utilizadas as seguintes condições: temperatura de 20° C, concentração de sacarose de 100 g/l e atividade enzimática de 40 UDS/ml. Segundo BAZÁN (1993), a diminuição da temperatura favorece a formação de dextrana clínica devido a diminuição da velocidade de reação. As reações de polimerização foram realizadas como descrito anteriormente. Não foi utilizada solução tampão pois de acordo com a literatura (CURRALERO, 1993) o pH não sofre alteração significativa durante a reação.

Amostras foram retiradas em intervalos regulares de tempo para acompanhamento da extensão da reação através da determinação da frutose liberada no meio. A reação foi interrompida quando pelo menos dois valores iguais de concentração de frutose foram obtidos. Isso ocorreu por volta de 5 a 6 horas de reação e a concentração de frutose foi de aproximadamente 40.0 g/l. A interrupção da reação foi feita por aquecimento em banho-maria durante 10 min para desativação da enzima no meio.

O material obtido foi congelado sendo que uma amostra foi separada para caracterização quanto à distribuição de peso molecular.

4.1.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO

Após a determinação da eficiência de cada coluna como descrito no capítulo anterior, as mesmas foram conectadas em série na sequência do poro decrescente para separar primeiramente

as moléculas maiores, evitando problemas de viscosidade. Além disso, esta sequência possibilita a coluna de menor porosidade, mais sensível à pressão, ficar mais distante da bomba.

Com a integração dos picos dos padrões a curva de calibração foi obtida relacionando os pesos moleculares médios e os tempos de retenção (Apêndice A). Várias tentativas foram feitas afim de se obter o melhor ajuste entre os pesos moleculares fornecidos e os estimados. E o que apresentou melhor resultado foi o obtido pela Equação 4.1. A Tabela 4.3 mostra o tempo de retenção obtido através da injeção dos padrões.

Tabela 4.3: Tempo de retenção (T_R) dos padrões obtidos através de injeções no sistema de cromatografia líquida

<i>Padrão</i>	<i>M_w</i>	<i>T_R (min)</i>
DXT 5000 K	4.900.000	16,9
DXT 1750 K	1.750.000	18,3
DXT 685 K	685.000	19,6
DXT 165 K	165.500	22,3
DXT 79 K	78.800	23,4
DXT 43 K	42.750	24,5
DXT 11 K	11.700	26,7
Glicose	180	31,2

$$\log M_w = 22,1 - 1,75 T_R + 6,69 \times 10^{-2} T_R^2 - 9,91 \times 10^{-4} T_R^3 \quad (4.1)$$

$$r = 0,9987$$

Ficaram então estabelecidos como extremos para efeito de cálculos e avaliações, o padrão de dextrana 5×10^6 daltons como o máximo e o padrão de glicose como o mínimo. É importante ressaltar que para dextranas com peso molecular superior a 5×10^6 , estimativas de peso molecular médio e quantificações não devem ser feitas, pois não há precisão nestas medidas, uma vez que acima deste valor a curva de calibração é obtida por extrapolação devido à falta de padrão com maior peso molecular, além da perda de resolução da coluna a valores de M_w maiores que o limite de exclusão da coluna ($1,0 \times 10^7$ daltons). No caso das dextranas de baixo peso molecular, quanto menor (próximo ao tempo de retenção da glicose) maior a imprecisão, principalmente no

que se refere ao cálculo do peso molecular médio, tendo em vista que por uma limitação das colunas empregadas, monossacarídeos, dissacarídeos (sacarose, maltose) e oligossacarídeos pequenos saem no mesmo tempo de retenção do padrão de glicose, ou muito próximo a ele. Segundo BERGQUIST (1995) os cálculos de distribuição de peso molecular e os pesos moleculares médios não devem ser considerados para pesos abaixo de 2000 daltons.

4.1.5 - CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DA SÍNTESE

A amostra de dextrana proveniente da síntese foi preparada para injeção seguindo os procedimentos recomendados descritos no capítulo anterior. Sua caracterização quanto ao peso molecular foi feita utilizando a curva de calibração através do software "Millenium".

Na descrição dos resultados a seguir, a distribuição de peso molecular foi dividida em três faixas:

- Alto peso molecular: dextranas com peso molecular acima de 100.000 daltons.
- Clínica: dextranas com peso molecular entre 20.000 e 100.000 daltons. Para definição desta fração foram consideradas a dextrana 40 (peso molecular 40.000 ± 20.000 daltons) e a dextrana 75 (peso molecular 75.000 ± 25.000 daltons).
- Baixo peso molecular: dextranas com peso molecular entre 10.000 e 20.000 daltons.

Inicialmente foi analisada a influência da concentração da amostra sobre a distribuição de peso molecular. Amostras com concentrações de 0,20%, 0,10% e 0,05% (p/v) foram injetadas e como não houve variação significativa na % de dextranas de alto peso, clínica e baixo peso optou-se por trabalhar com a concentração de 0,20% (p/v) que propiciou um melhor sinal cromatográfico. Os relatórios para estas injeções são apresentados no Apêndice B.

A amostra proveniente da síntese foi caracterizada através da integração do pico e quantificação pelo software "Millenium". Foram realizadas três injeções para a mesma amostra. A distribuição percentual de dextrana total e clínica na amostra foi obtida como descrito anteriormente e os resultados podem ser verificados na Tabela 4.4.

Os valores considerados foram obtidos fazendo a média aritmética para as três injeções. A variação entre os valores apresentados nos relatórios (Apêndice C) e na Tabela 4.4 deve-se ao

fato que foram utilizados em todos os cálculos um relatório com um maior número de fatias ("slices") e para efeito de ilustração foi utilizado um relatório consiso.

Tabela 4.4 : Distribuição do peso molecular para a amostra proveniente da síntese

<i>Injeção</i>	<i>% Dextrana</i>	<i>% Dextrana</i>
1	14,0	1,3
2	14,1	1,5
3	14,4	1,6
média	14,2	1,5

A concentração teórica máxima de dextrana obtida na síntese é dada pela Equação 4.2 (PAUL et al., 1986).

$$[\text{dextrana}]_{\text{teórica}} = [\text{sacarose}]_{\text{inicial}} \times 0,474 \quad (4.2)$$

É importante ressaltar que a glicose não está ligada apenas na forma de dextrana de alto peso e médio peso molecular, mas também como oligossacarídeos. Portanto este rendimento teórico deve englobar os oligossacarídeos. Um rendimento de apenas 30,0% (14,2 / 47,04) em relação ao teórico foi obtido para a formação de dextranas totais (PM > 10.000). Por outro lado, considerando também os oligossacarídeos temos um rendimento de 68,8% (32,4 / 47,04). O valor 32,4 % foi obtido através dos relatórios (Apêndice C), desconsiderando o último pico (frutose e sacarose) e computando a % acumulada até o tempo de 30 minutos. CURRALERO (1993) determinou o rendimento da síntese através de hidrólise total da dextrana, e obteve um rendimento de 86%. Entretanto a comparação destes valores não traz esclarecimentos devido às diferentes metodologias empregadas.

PEREIRA et al. (1996) citaram a influência da temperatura no rendimento de oligossacarídeos. Segundo os autores o peso molecular foi afetado pela interação da concentração de sacarose com a temperatura, levando a altos rendimentos de oligossacarídeos quando foram utilizadas as condições de 100g/l e 20,0° C, o que pode justificar o rendimento de dextrana obtido.

Para a amostra em termos de dextrana obteve-se um polímero composto quase exclusivamente por dextranas de alto peso molecular, o que pode ser verificado qualitativamente pela Figura 4.1, na qual a curva de distribuição de peso molecular da amostra da síntese é sobreposta com as curvas de distribuição dos padrões de peso molecular 5×10^6 e $1,75 \times 10^6$.

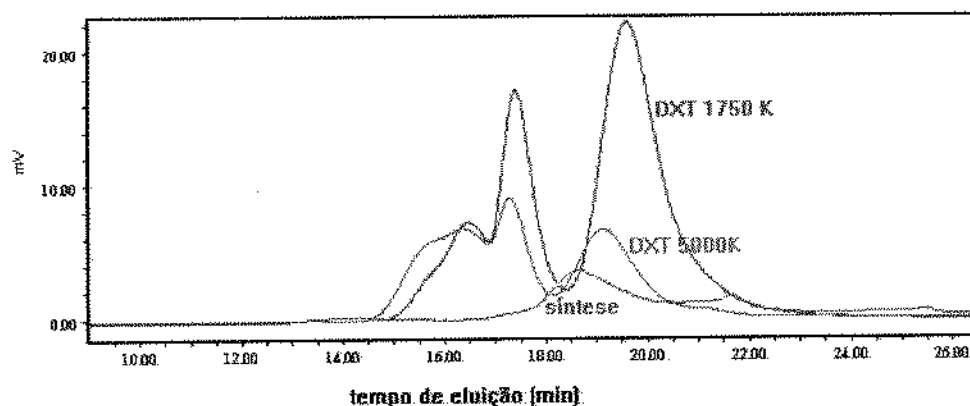


Figura 4.1 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra da síntese e padrões 5×10^6 e $1,75 \times 10^6$

Uma pequena parte da amostra (menos de 1,0%) possui peso molecular acima de 5×10^6 e portanto está fora da faixa de calibração dada pela curva padrão. Portanto os pesos moleculares das fatias correspondentes ao tempo de retenção menor que 16,9 min são obtidos por extrapolação e não devem ser considerados. Isto pode ser verificado no Apêndice A, através da tabela referente a curva de calibração.

Quantitativamente o peso médio da amostra foi obtido fazendo a integração apenas do pico referente à dextrana. O peso molecular determinado foi próximo de 1.500.000 daltons e está indicado no cromatograma mostrado pela Figura 4.2.

Para uma melhor caracterização das amostras provenientes da hidrólise da dextrana de alto peso, poderia realizar-se diálise, utilizando membranas com peso molecular de corte por volta de 10.000 daltons. Com isso eliminaria resíduos de sacarose e pequenos oligossacarídeos e grande quantidade de frutose.

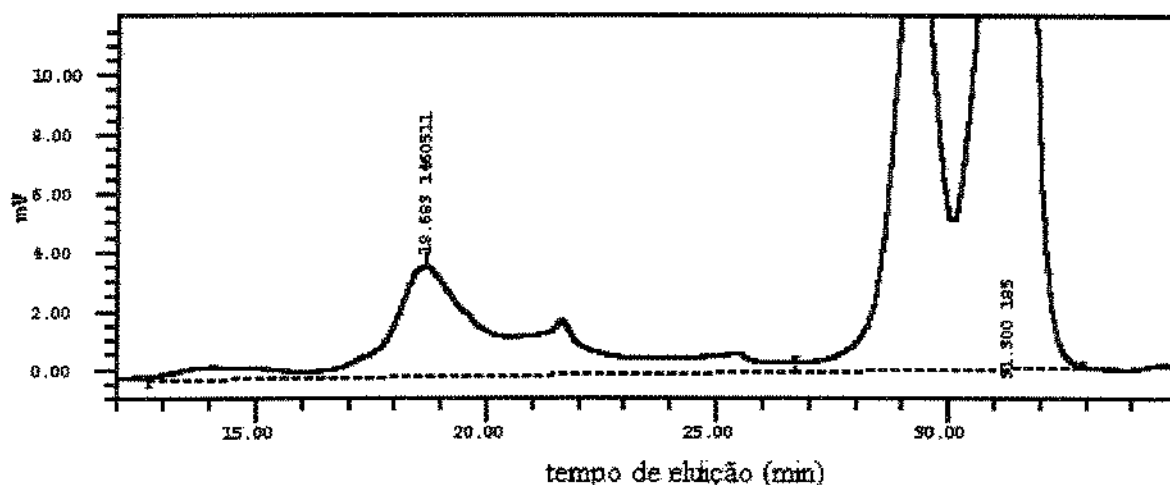


Figura 4.2 - Cromatograma obtido da injeção da amostra proveniente da síntese

4.2 - PRODUÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

Na intenção de obter dextranas com peso molecular apropriados para uso clínico (20.000 - 100.000 daltons) foram feitos estudos em várias temperaturas e pH com o objetivo de maximizar o rendimento do produto dentro dessas especificações.

A hidrólise ácida da dextrana ocorreu sob a ação de ácido sulfúrico. As faixas de pH e temperatura escolhidas para estudo foram baseadas nas características do produto obtido na síntese e em dados da literatura. WOLFF et al. (1954) utilizando condições de hidrólise de 80°C e pH 1,0 com ácido sulfúrico obtiveram com 5 horas de hidrólise em torno de 47% de rendimento de dextrana clínica (75.000 ± 25.000), a partir de dextrana com peso molecular na faixa de 30×10^6 a 50×10^6 de daltons. Os autores relataram queda no rendimento para tempos de reação acima deste valor. Com base na literatura, no peso molecular da dextrana obtida, em torno de 1.5×10^6 daltons, e em ensaios preliminares realizados nas condições citadas na literatura nos quais foi constatada quebra do peso molecular para faixa menor que a desejada, condições mais brandas foram adotadas (temperatura entre 65,0 e 75,0 °C, pH entre 1,5 e 2,5 e tempo de 7 horas), com objetivo de obtenção de dextrana clínica em condições mais favoráveis a nível operacional.

Foram realizados quatro ensaios e três repetições no ponto central, de acordo com a Tabela 3.1. Durante as reações de hidrólise foram retiradas amostras em intervalos regulares de

tempo e todas as amostras foram injetadas para caracterização quanto à distribuição de peso molecular. Porém, nem todos os resultados serão apresentados.

4.2.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS HIDROLISADAS

Neste item serão apresentados resultados de composição da massa reacional em termos de peso molecular de dextrana, durante a etapa hidrolítica e uma avaliação qualitativa e quantitativa dos produtos obtido nas diversas condições testadas.

Em ensaios preliminares foi realizada a precipitação da dextrana com álcool etílico e posterior liofilização das amostras. Este procedimento permite a eliminação de monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos, o que acarretou dificuldades na análise do desempenho do processo, já que algumas vezes eram obtidas porcentagens de dextrana de alto peso maior que a amostra retirada no intervalo anterior. Optou-se por não fazer a precipitação e usar as amostras tais como obtidas na hidrólise. Assim, como para a amostra proveniente da síntese, as amostras provenientes das hidrólises foram injetadas numa concentração de 0,20% (p/v) sem nenhum processo de purificação. Com isso todos os cromatogramas obtidos apresentaram além do pico de dextrana, picos referentes a monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos.

4.2.1.1 - Análise Qualitativa

Uma característica das dextranas obtidas nas condições de hidrólise discutidas a seguir, é a grande heterogeneidade quanto à distribuição de peso molecular, originando picos muito largos, os quais podem ser vistos nos cromatogramas.

As hidrólises realizadas nas condições mais brandas da faixa estudada não resultaram em uma alteração significativa na porcentagem de dextrana clínica ao longo da reação. Com a hidrólise realizada em pH 2,5 e 65,0 ° C (H6) obteve-se com 7 horas de reação uma amostra com peso molecular médio igual a da amostra da síntese mostrando que não houve quebra considerável que alterasse a distribuição média de pesos moleculares.

Com a realização das hidrólises a pH 1,5 e 65,0 ° C e pH 1,5 e 75,0 ° C verificou-se que a distribuição do peso molecular "caminha" em direção a dextranas com peso molecular menor, ou com maior tempo de retenção. No Apêndice D estão apresentados os cromatogramas com o peso molecular médio determinado através da integração da região de interesse. Para a amostra obtida

com 7 horas de hidrólise a pH 1,5 e 65,0 °C (H4 / 7 horas), verifica-se que, apesar da formação de uma fração maior de dextrana clínica, a maior parte da amostra corresponde a fração de alto peso molecular, com peso médio de aproximadamente 1.291.200daltons.

A condição que propiciou melhores rendimentos da dextrana clínica foi aquela na qual utilizou-se o menor pH (1,5) em conjunto com a maior temperatura (75,0° C) do delineamento experimental. Os cromatogramas sobrepostos para os tempos de 1 hora e 7 horas de hidrólise para esta condição estão apresentados na Figura 4.3

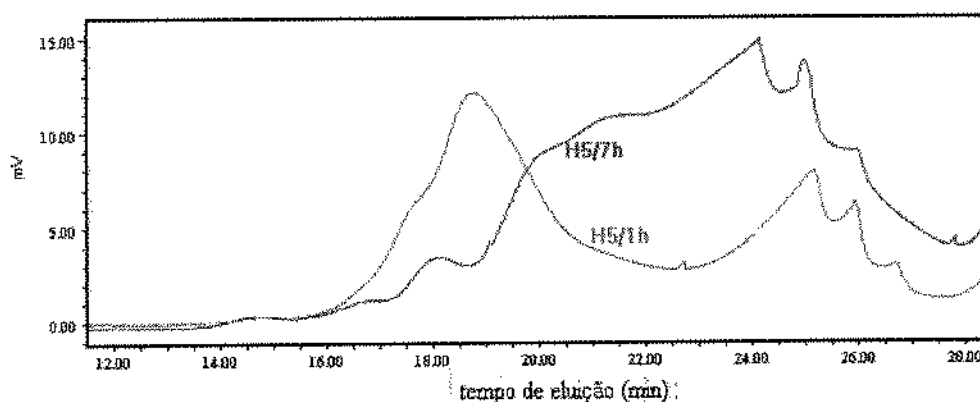


Figura 4.3 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos com 1 hora e 7 horas de hidrólise em pH 1,5 e 75,0° C (H5/1 hora e H5/7 horas)

Para o tempo inicial (1 hora) de hidrólise verificou-se ainda um pico bem definido de dextrana de alto peso que se deslocou para a região de menor peso molecular com o tempo de reação. Em ambos os casos verificou-se picos na região de dextrana clínica, em maior proporção para a amostra H5/7horas. A Figura 4.4 mostra os cromatogramas sobrepostos para a amostra bruta (sem hidrolisar), os padrões de dextrana com peso molecular de 43.000 e 79.000 daltons e a amostra obtida com 7 horas de hidrólise a pH 1,5 e 75,0° C (H5/7 horas). Observa -se de maneira clara o deslocamento do peso molecular da região de alto peso (amostra bruta) para aquela correspondente à fração de dextrana clínica (amostra H5/7h).

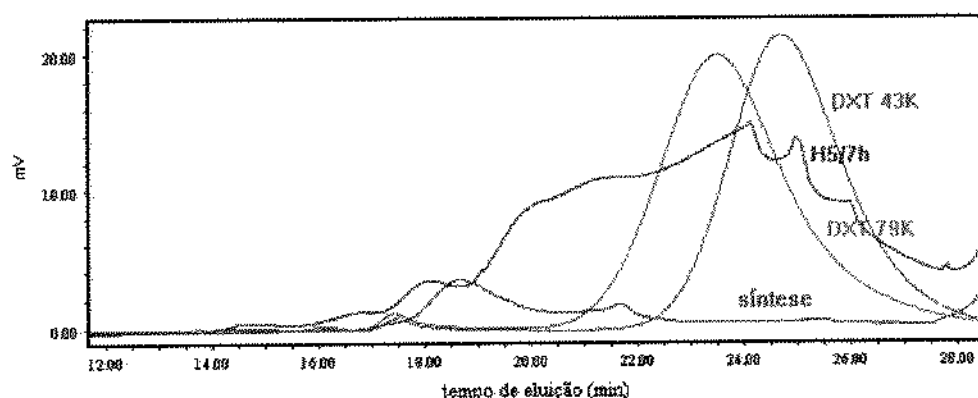


Figura 4.4: Sobreposição dos cromatogramas referentes a amostra bruta, amostra H5/7horas e padrões de dextrana de peso molecular 43.000 e 79.000 daltons

A evolução do peso molecular durante toda a hidrólise para o ensaio que propiciou maiores rendimentos pode ser verificada pelos pesos médios obtidos integrando apenas a região de interesse. Os pesos médios em função do tempo de reação estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Pesos moleculares médios (dalton) em função do tempo de reação para a hidrólise em pH 1,5 e 75,0° C (H5)

<i>Amostra</i>	<i>Peso Molecular</i>
H5 / 1 hora	1.365.297
H5 / 2horas	1.276.937
H5 / 3horas	910.596
H5/4horas	1.025.244
H5 / 5horas	66.729
H5 / 6horas	65.430
H5/7horas	55.317

As Figuras 4.5 a 4.11 mostram os cromatogramas com os respectivos pesos moleculares médios para as amostras da Tabela 4.5, ilustrando a evolução do pico para a região de dextrana clínica.

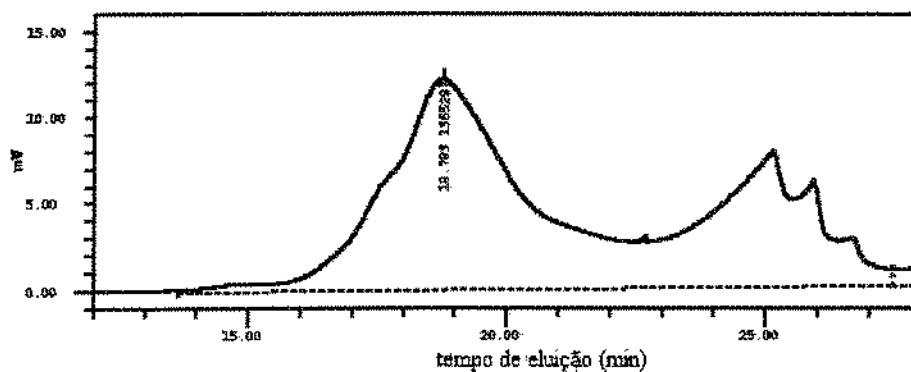


Figura 4.5 - Cromatograma referente a amostra H5/1 hora

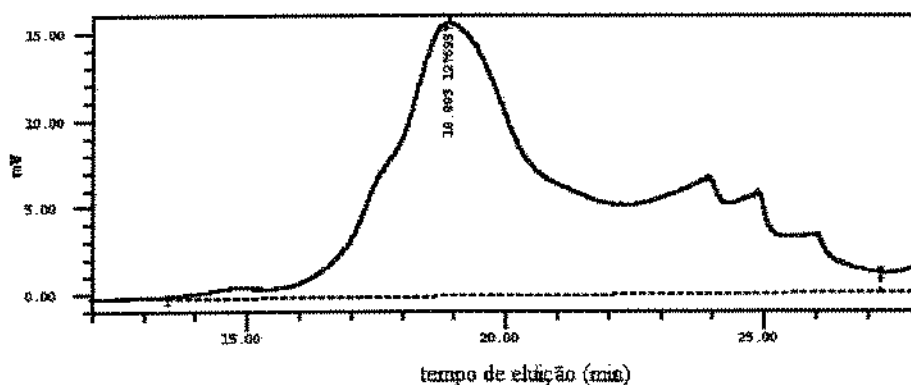


Figura 4.6 - Cromatograma referente a amostra H5/2 horas

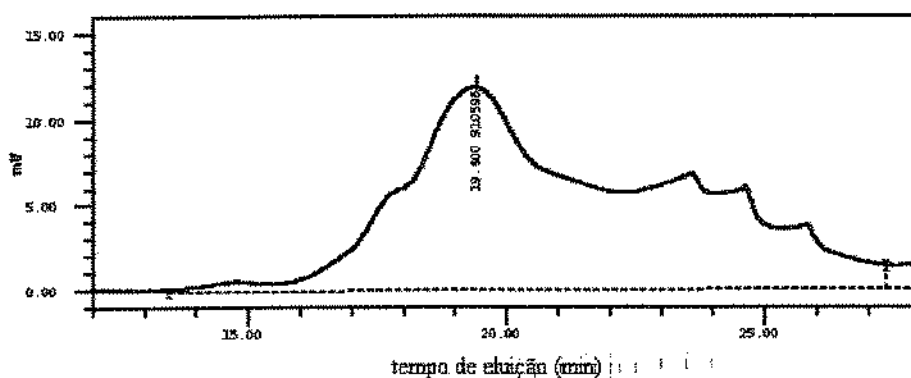


Figura 4.7- Cromatograma referente a amostra H5/3 horas

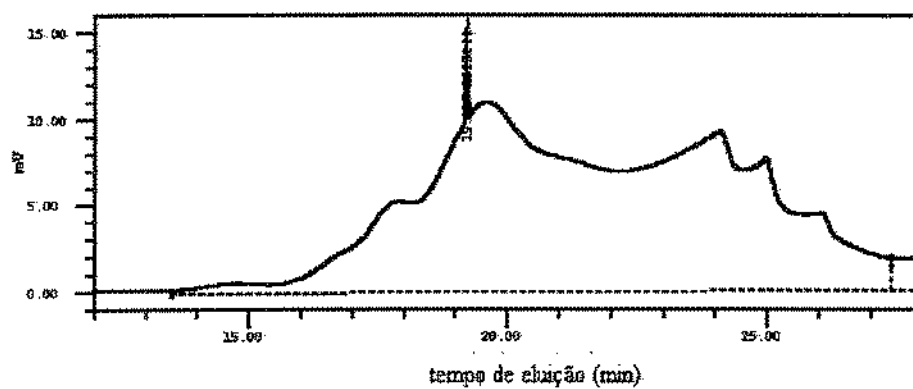


Figura 4.8- Cromatograma referente a amostra H5/4 horas

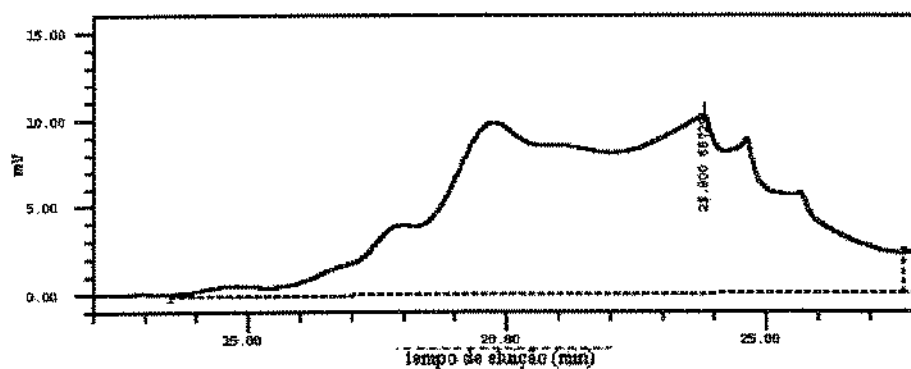


Figura 4.9 - Cromatograma referente a amostra H5/ 5 horas

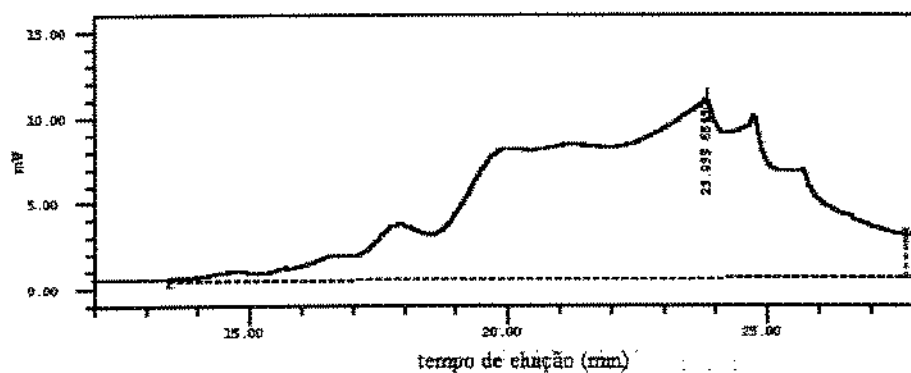


Figura 4.10 - Cromatograma referente a amostra H5/ 6 horas

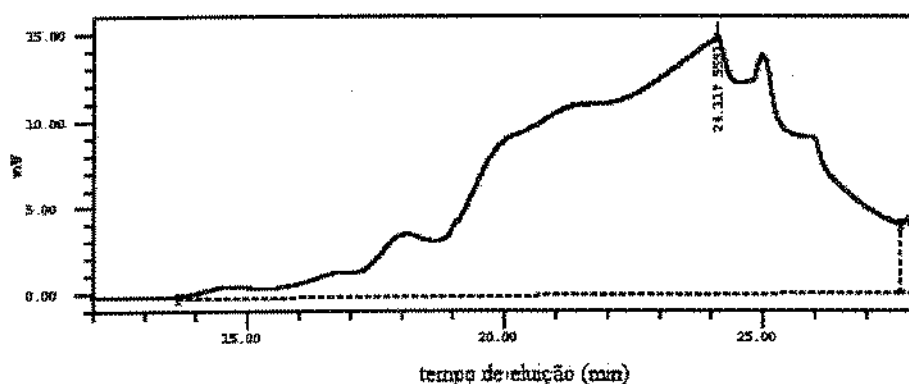


Figura 4.11 - Cromatograma referente a amostra H5/ 7 horas

4.2.1.2 - Rendimentos das Amostras em Termos de Dextrana Clínica

De maneira geral o rendimento de dextrana clínica aumentou com o tempo de hidrólise. Dentre as condições estudadas as que apresentaram melhores rendimentos foram as realizadas em baixo valor de pH. A Tabela 4.6 traz os dados de rendimentos de dextrana clínica obtidos em função do pH, temperatura e tempo de hidrólise. Os valores foram obtidos como descritos na metodologia. O Apêndice E traz a distribuição do peso molecular para algumas amostras da Tabela 4.6.

Com 7 horas de hidrólise para as condições de pH 2,5 e temperatura 75,0 ° C, e para pH 2,0 e temperatura 70,0 ° C, não foram retiradas amostras devido a problemas com o equipamento no final da reação.

Tabela 4.6: Rendimento de dextrana clínica (%) em função do tempo de hidrólise para cada ensaio delineado pelo planejamento experimental

<i>ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>T(° C)</i>	<i>1 hora</i>	<i>2 horas</i>	<i>3 horas</i>	<i>4 horas</i>	<i>5 horas</i>	<i>6 horas</i>	<i>7 horas</i>
1 (H4)	1.5	65.0	38.0	39.0	33.9	40.0	37.0	40.9	44.6
2 (H6)	2.5	65.0	9.0	14.3	12.1	13.5	14.9	15.2	16.3
3 (H5)	1.5	75.0	57.4	48.1	54.7	70.9	76.6	89.9	95.7
4 (H2)	2.5	75.0	8.1	26.1	19.8	13.7	13.4	14.0	-
5 (H1)	2.0	70.0	11.8	15.9	16.6	17.9	21.9	18.4	17.6
6 (H7)	2.0	70.0	10.9	14.7	13.4	17.9	22.4	26.4	20.1
7 (H3)	2.0	70.0	8.9	17.6	21.6	17.0	20.9	25.1	-

4.2.2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS E OTIMIZAÇÃO PELAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

Através dos resultados da Tabela 4.6, a influência das variáveis pH e temperatura sobre o rendimento de dextrana clínica pode ser analisada. A realização de ensaios em pelo menos dois níveis da variável permite observar o que ocorre na resposta, ou seja, no rendimento quando o nível da variável é modificado.

Mantendo-se o pH em 1,5 e elevando a temperatura de 65,0° C para 75,0 ° C (ensaios 1 e 3) houve um aumento no rendimento de dextrana clínica. Já quando o pH é mantido em 2,5 a passagem do menor nível de temperatura para o maior resulta em uma variação pequena no rendimento de dextrana clínica. O efeito da temperatura em cada nível de pH pode ser observado na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7: Variação no rendimento de dextrana clínica (%)
em função da mudança do nível de temperatura**

tempo (h)	pH = 1,5	pH = 2,5
1	19,4	-0,9
2	9,1	11,8
3	20,8	7,7
4	30,9	0,2
5	39,6	-1,5
6	49,0	-1,2
7	51,1	-

Os resultados mostram que o efeito da temperatura, isto é, o que ocorre com o rendimento quando a temperatura é elevada de 65,0° C para 75,0 ° C, depende do nível do pH. O efeito da mudança de nível do pH, por sua vez, depende da temperatura.

A Tabela 4.8 mostra o efeito do pH em cada nível de temperatura.

Tabela 4.8: Variação no rendimento de dextrana clínica (%) em função da mudança de nível do pH

tempo (h)	T = 65,0 ° C	T = 75,0 ° C
1	-29,0	-49,3
2	-24,7	-22,0
3	-21,8	-34,9
4	-26,5	-57,2
5	-22,1	-63,2
6	-25,7	-75,9
7	-28,3	-

Como o efeito de uma variável depende do nível da outra, dizemos que as variáveis se interagem. Como na ausência de interação esses dois valores deveriam ser idênticos (a menos do erro experimental), a diferença entre eles é tomada como uma medida da interação entre as variáveis pH e T. Por exemplo, pela Tabela 4.8 temos para 1 hora $(-49,3 - (-29,0))$ a diferença do efeito do pH em função do nível da temperatura. A metade da diferença é, por definição, o efeito de interação entre o pH e a temperatura $(-10,15)$; Tabela 4.9). A existência de um efeito de interação significativo indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente.

A Tabela 4.9 traz os valores dos efeitos principais do pH e temperatura e os efeitos de interação em função do tempo de hidrólise, calculados pelo software "Statistica", versão 5.0 for windows. O efeito principal de uma variável é, por definição, a média dos efeitos nos dois níveis da outra variável. Um efeito de -23,3 % para o pH (Tabela 4.9) com 2 horas de reação significa que o rendimento diminui 23,3 % em média, quando o pH passa do nível -1 ($\text{pH} = 1,5$) para o nível +1 ($\text{pH} = 2,5$).

Tabela 4.9: Efeitos das variáveis temperatura (T), pH e T x pH sobre o rendimento de dextrana clínica em função do tempo de hidrólise

<i>tempo (h)</i>	<i>T(°C)</i>	<i>pH</i>	<i>T x pH</i>
1	9,25	-39,08	-10,15
2	10,44	-23,32	-1,35
3	14,28	-28,30	-6,54
4	15,56	-41,91	-15,36
5	19,06	-42,68	-20,55
6	23,89	-50,98	-25,12

Estes resultados podem ser mais facilmente compreendidos através das superfícies de resposta, uma ferramenta do planejamento experimental, que possibilita uma visualização gráfica da tendência das respostas do processo em estudo. As superfícies de resposta relacionando o rendimento de dextrana clínica em função do pH, temperatura e tempo de hidrólise são mostradas nas Figura 4.12 a 4.17 e foram obtidas através dos modelos:

- t = 1 hora

$$\text{Rend} = 20,6 - 19,5 \text{ pH} + 4,6 \text{ T} - 5,1 \text{ pH T} \quad (4.3)$$

- t = 2 horas

$$\text{Rend} = 26,4 - 11,7 \text{ pH} + 5,2 \text{ T} + 0,7 \text{ pH T} \quad (4.4)$$

- t = 3 horas

$$\text{Rend} = 25,1 - 14,2 \text{ pH} + 7,1 \text{ T} - 3,3 \text{ pH T} \quad (4.5)$$

- t = 4 horas

$$\text{Rend} = 29,0 - 20,9 \text{ pH} + 7,8 \text{ T} - 7,7 \text{ pH T} \quad (4.6)$$

- t = 5 horas

$$\text{Rend} = 29,6 - 21,3 \text{ pH} + 9,5 \text{ T} - 10,3 \text{ pH T} \quad (4.7)$$

- t = 6 horas

$$\text{Rend} = 34,1 - 25,4 \text{ pH} + 11,9 \text{ T} - 12,6 \text{ pH T} \quad (4.8)$$

O rendimento de dextrana clínica é influenciado fortemente pelo aumento da temperatura e diminuição do pH. Verifica-se em todas as superfícies obtidas, como constatado anteriormente, uma tendência de maximização do rendimento quando têm-se baixos valores de pH (1,5) e altos valores de temperatura (75° C). Para as superfícies correspondentes a tempos de hidrólise maiores observa-se uma inclinação mais acentuada das superfícies indicando um efeito conjugado maior das duas variáveis com o tempo sobre o rendimento de dextrana clínica.

O efeito de interação entre as variáveis também pode ser observado nas superfícies planas. Quanto maior o tempo de hidrólise maior o rendimento de dextrana clínica para a região de maior temperatura e menor pH. Verifica-se que o efeito mais importante é o pH, mas a temperatura e tempo de hidrólise tem influência significativa no rendimento. Além disso, observa-se que o efeito de interação entre pH e temperatura praticamente é inexistente para maiores valores de pH. Já quando tem-se valores de pH mais baixos observa-se um aumento do rendimento com o aumento da temperatura, acentuando-se após 4 horas de hidrólise como pode ser observado nas Figuras 4.12 a 4.17.

A análise de regressão, ou o ajuste por mínimos quadrados dos modelos lineares aos resultados obtidos a partir do planejamento experimental, foi feita com o auxílio do software “Statistica”, versão 5.0 for windows. A partir destes cálculos, foram obtidos os coeficientes dos polinômios ajustados. Os parâmetros destes modelos foram calculados de forma a minimizar os resíduos, que são diferenças entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo. A análise estatística foi feita pela avaliação da tabela de análise de variância fornecida pelo programa. Como pode ser verificado pelos valores do teste F (Apêndice F) os modelos não se ajustaram a nível de 90% de confiança, indicando a necessidade de um planejamento (“estrela”) que provavelmente levaria a modelos mais representativos. Não foram obtidas superfícies curvas com ponto de máximo, mas planos indicadores da otimização. Segundo BARROS NETO (1995) em situações onde a vizinhança do máximo não é evidente, mas sim apenas a tendência do processo, um novo planejamento com base nos dados obtidos é sugerido para a otimização. No entanto, o rendimento de 95% obtido para dextrana clínica com peso molecular na faixa de 20.000 a 100.000 daltons está próximo a um rendimento ótimo, podendo haver degradação da

fração clínica em fração de menor peso molecular como observado também nas condições estudadas por WOLFF et al. (1954).

A relação tempo-pH-temperatura na hidrólise de dextrana foi analisada por este autores. e os resultados obtidos para dextrana com peso molecular na faixa de 50.000 a 100.000 daltons estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Rendimento de dextrana clínica (Rend) em função do tempo-pH-temperatura na hidrólise de dextrana WOLFF et al. (1954).

Temperatura (° C)	tempo (h)	pH	Rend (%)
121	2,5	2,9	38
80	0,17	0,35	33
75	24	1,6	36
70	46	1,6	39

Através da distribuição do peso molecular para a amostra H5/7 horas (Apêndice E) o rendimento de dextrana clínica na mesma faixa considerada por WOLFF et al. (1954) e obtida nas mesmas condições de pH, temperatura e tipo de ácido é aproximadamente 49%; rendimento este conseguido com 7 horas de reação. Portanto, foi obtido em condições semelhantes um rendimento maior com um menor tempo de hidrólise, como previsto com base no peso molecular da amostra bruta.

Segundo WOLFF et al. (1954) na ausência de diferenças marcantes no produto (Tabela 4.10) a escolha das condições de hidrólise torna-se uma questão de conveniência, e o fator essencial é o controle da extensão da hidrólise.

No que se refere ao objetivo principal, que é a obtenção da fração clínica com peso molecular na faixa de 20.000 a 100.000 bons resultados foram obtidos e a possibilidade de realização de alguns ensaios adicionais é interessante para a complementação da otimização.

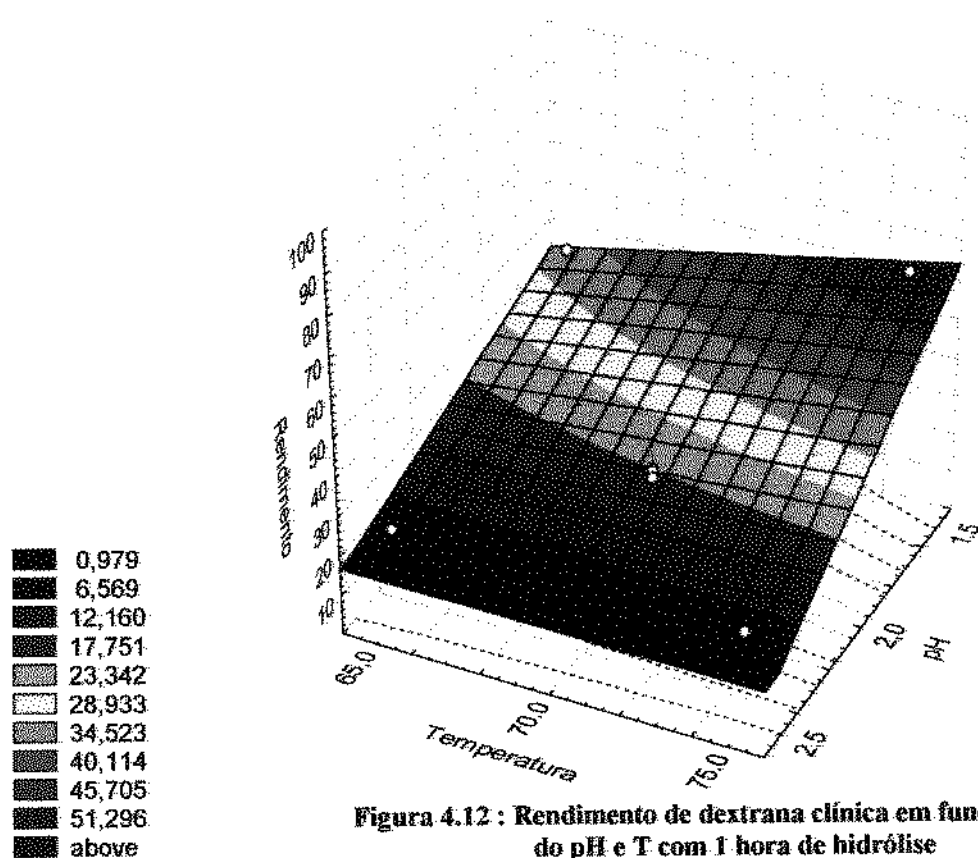


Figura 4.12 : Rendimento de dextrana clínica em função do pH e T com 1 hora de hidrólise

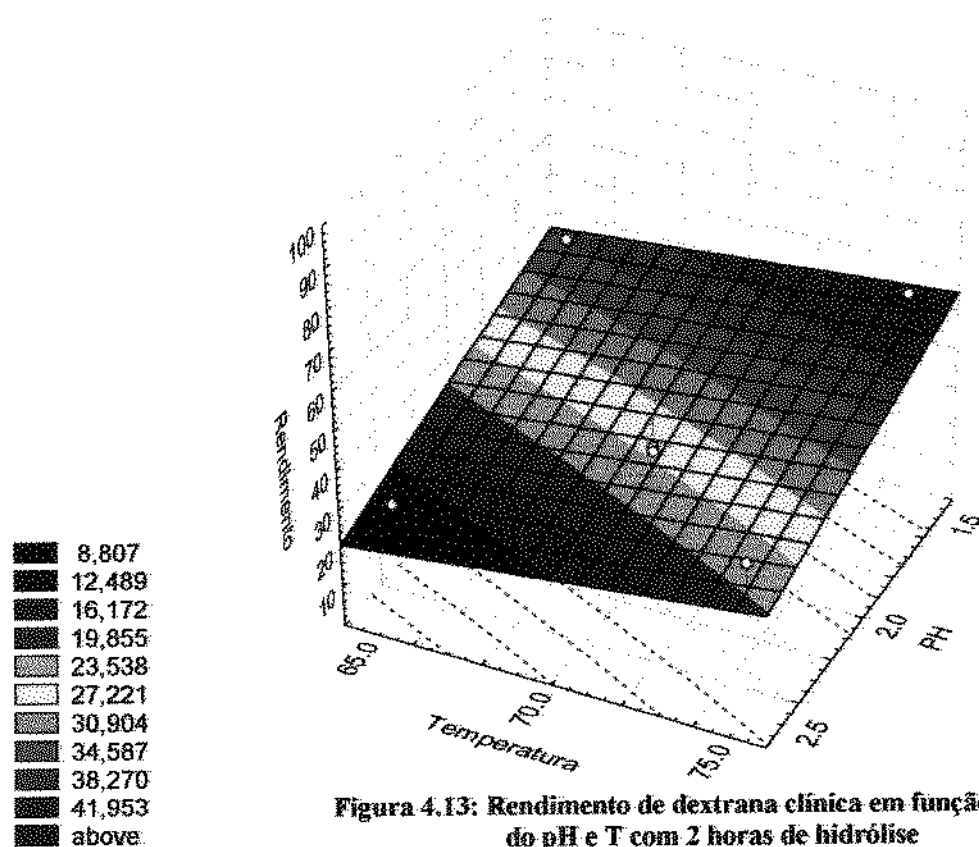


Figura 4.13: Rendimento de dextrana clínica em função do pH e T com 2 horas de hidrólise

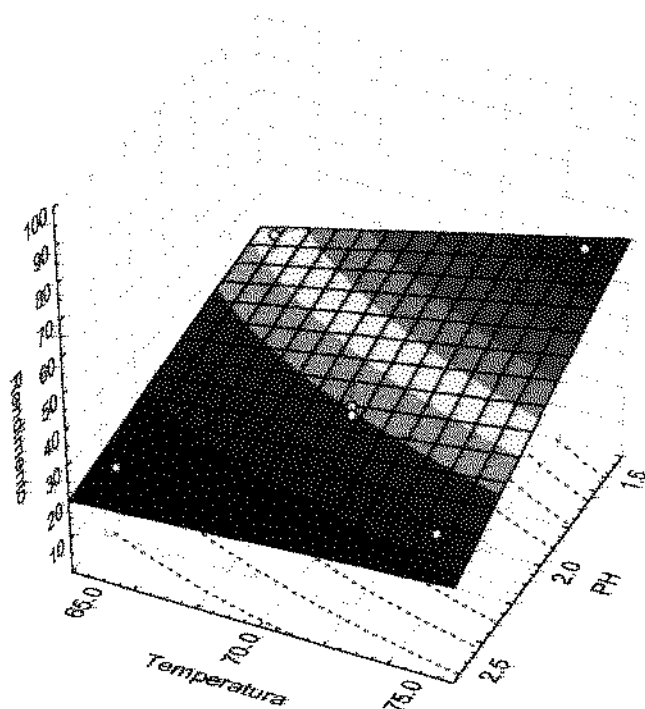
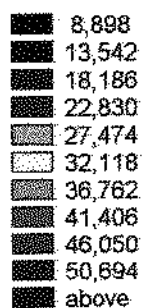


Figura 4.14: Rendimento de dextrana clínica em função do pH e T com 3 horas de hidrólise

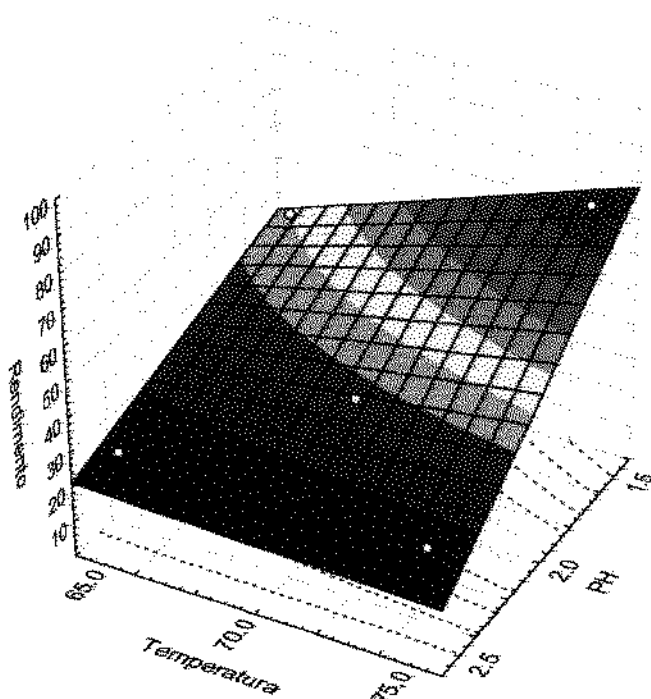
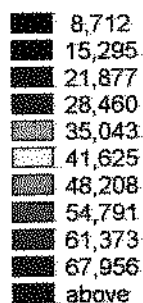


Figura 4.15: Rendimento de dextrana clínica em função do pH e T com 4 horas de hidrólise

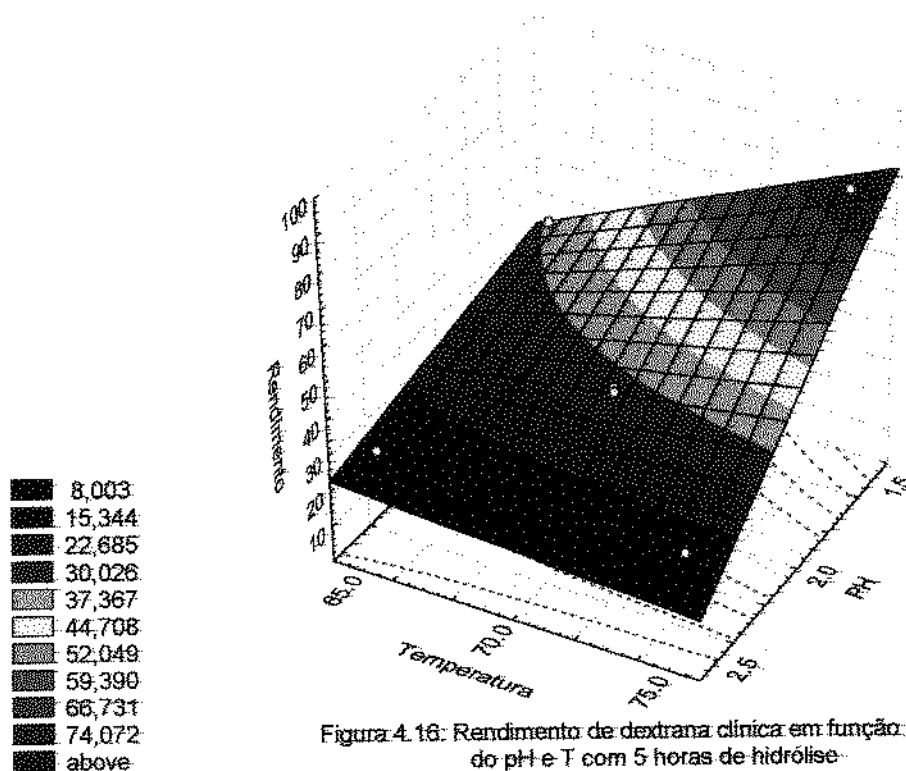


Figura 4.16: Rendimento de dextrana clínica em função do pH e T com 5 horas de hidrólise.

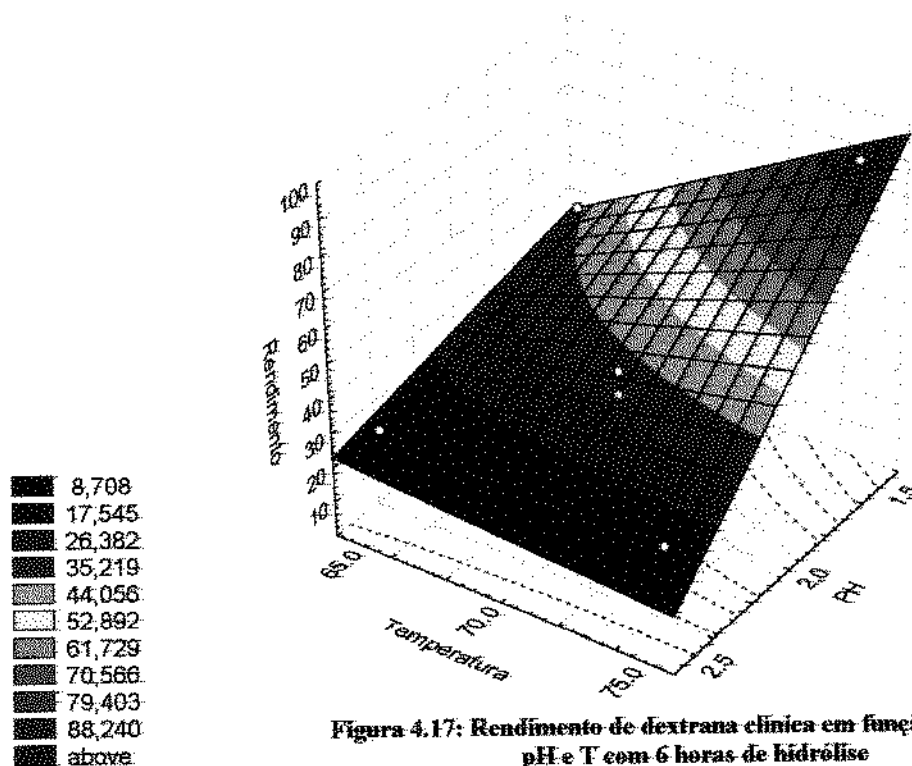


Figura 4.17: Rendimento de dextrana clínica em função do pH e T com 6 horas de hidrólise

5 -CONCLUSÕES

Dentro do objetivo principal do trabalho que foi a otimização das condições de hidrólise para obtenção de dextrana clínica a partir da dextrana sintetizada, podemos concluir:

1 - O pH é a variável que mais influencia o processo de hidrólise ácida de dextrana, sendo que a diminuição do pH favorece o rendimento. Um aumento de até 50% no rendimento é obtido com a diminuição do pH de 2,5 para 1,5 com 7 horas de reação.

2 - Com respeito à temperatura, verifica-se que o aumento da temperatura de 65° C a 75° C, aumenta o rendimento de dextrana clínica em até 23% com 7 horas de reação.

3 - Dentro do intervalo de tempo de hidrólise estudado (1 a 7 horas) maiores rendimentos de dextrana clínica são obtidos com 7 horas de reação.

4 - Os parâmetros para produzir dextrana clínica (20.000-100.000 daltons) com maior rendimento (95,7 %), foram pH igual a 1,5, temperatura de 75° C e tempo de hidrólise de 7 horas. As condições utilizadas tiveram um efeito de maximização uma vez que a hidrólise para peso abaixo de 20.000 daltons não foi expressiva, não prejudicando o rendimento global.

5 - A proposta inicial da utilização de condições mais brandas de hidrólise que aquelas reportadas na literatura, levaram a obtenção da fração clínica de dextrana com alto rendimento.

6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Dar continuidade ao processo de otimização baseando-se nos dados obtidos.
- Estudar as condições de síntese de dextrana visando a otimização do processo em termos de rendimento de dextrana.
- Avaliar a separação dos monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos presentes em grandes quantidades no produto da síntese, principalmente a frutose, cuja recuperação poderia trazer grandes ganhos econômicos.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

01. ALSOP, L. Industrial production of dextrans. Progress in Industrial Microbiology, 18, p. 1-44, 1983.
02. BARKER, P. E.; GANETSOS, G. AJONGWEN, N. J. A novel approach to the production of clinical grade dextran. J. Chem. Tech. Biotechnol., 57, p. 21-26, 1993.
03. BARKER, R. W. Methods of fractionating polymers by ultrafiltration. Journal of Applied Polymer Science, 13, p. 369- 376, 1969.
04. BARKER, P. E.; VLACHOGIANNIS, G.; ALSOP, R. M. Dextran fractionation on a semi-continuous counter-current simulated moving-bed chromatograph, 17, 3, p. 149-153, 1983.
05. BARKER, P. E. ; ENGLAND, K.; GANETSOS, G. Fractionation of dextran using repetitive batch chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol., 41, p. 61-68, 1988.
06. BARKER, P. E. ; ENGLAND, K.; GANETSOS, G. Dextran fractionation using preparative scale continuous chromatography. J. Chem. Tech. Biotechnol., 46, p. 209-218, 1989.
07. BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos; 1a. edição. Campinas; Editora da Unicamp, 1995. 278 p. Série Manuais
08. BAZÁN, J.H.V. Produção de Dextrana Clínica Por Via Enzimática. Campinas, 1993. 123p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
09. BERQUIST, C. W. Curso básico Waters de Cromatografia de Permeação em Gel. São Paulo: Waters Comercial, 1995.
10. BIXLER, G. H.; HINES, G.E.; MCGHEE, R. M.; SHURTER, R. A. Dextran: A staff - Industry Collaborative Report Industrial Engineering Chemistry, 45, p. 692-705, 1953.
11. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for experimenters-an introduction to design, data analysis and model building. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1987.

12. BRUNNER, G.; ZIEF, M.; METZENDORF, J. Fractionation of partially hydrolyzed dextran. Ind. Eng. Chem, 46, p.119-121, 1956.
13. CURRALERO, I.C.B. Estudo da Produção de Dextrana de Baixo Peso Molecular Por Via Enzimática. Campinas, 1993. 164p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
14. DE BELDER, A.N. Dextran. In: Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim, W. Gerhart, vol.A8, p.449-454, 1987.
15. EBERT, K. H. & SCHENK, G. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. Adv. Enzymol., 30, p. 179-221, 1968.
16. GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. In: The pharmacological Basis of Therapeutics, Macmillan Publishing Company. 8^a ed. p.454-455, 1991.
17. United States of America, GRÖNWALL, A. J. T. & INGELMAN, B. G. A. Process for producing dextran products having substantially uniform molecular size for pharmaceutical and therapeutic preparations. Cl. 260-209 US. Pat. Off. Pat. 2.644.815. 15 Oct, 1948. Uppsala, Sweden.
18. JEANES, A. Dextran. In: Encyclopedia of Polymer Science and Technology, John Wiley and Sons Inc., 4, p.805-824, 1966
19. KABOLI, H. & REILLY, P.J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase. Biotech. Bioeng., 23, p.1055-1069, 1980.
20. KIM, D. & DAY, D. F. A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme Microb. TECHNOL., 16, p.844-848, 1994.
21. KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Characterization of the multiple forms and main component of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biochem. Biophys. Acta., 614, p.46-62, 1980.

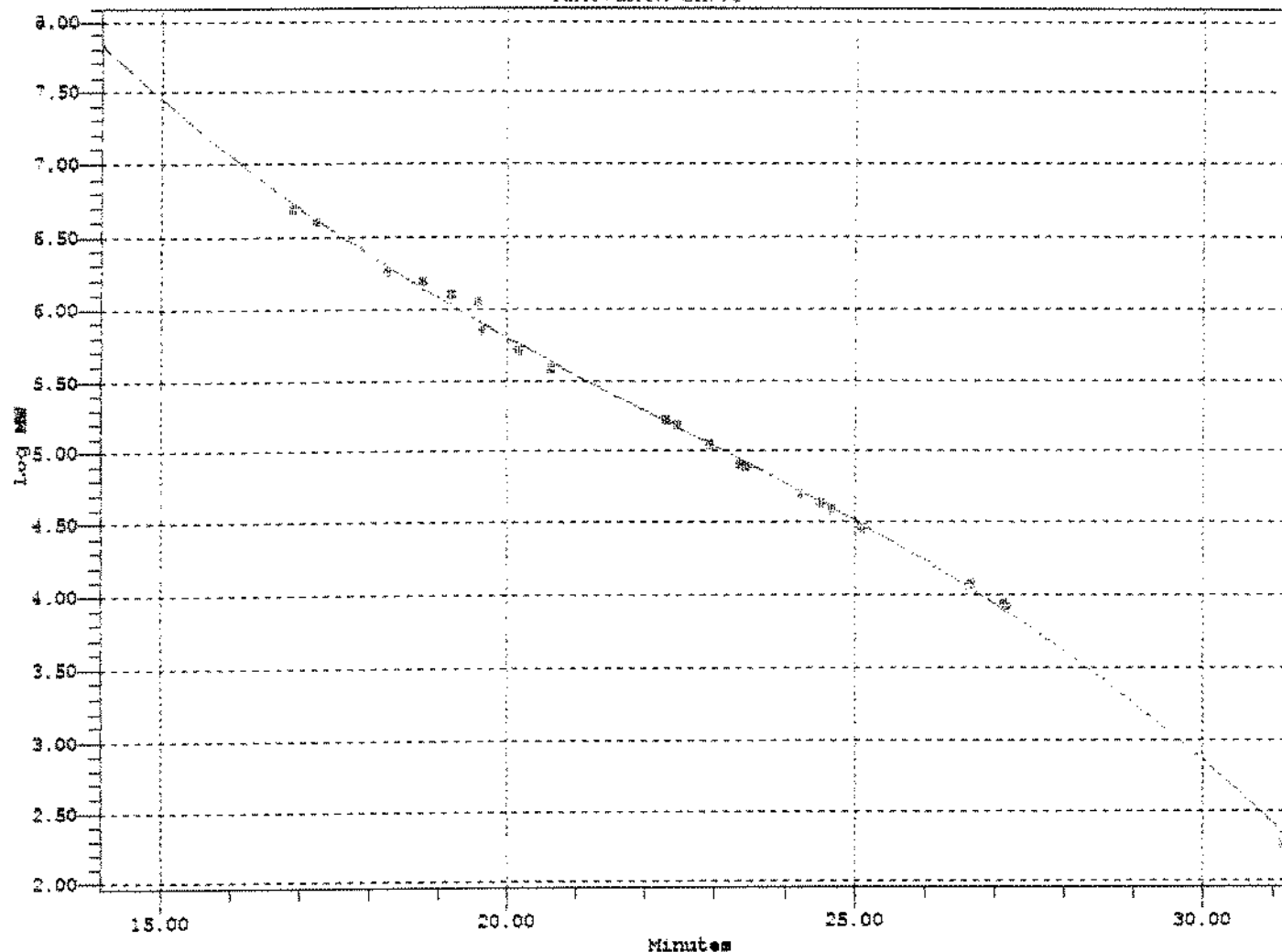
22. KUGE, T.; KOBAYASHI, S.; KITAMURA, S.; TANAHASHI, H. Degrees of long-chain branching in dextrans. Carbohydrate Research, 160, p. 205-214, 1987.
23. LAZIC, M.L.; VELJKOVIC, V.B.; VUCETIC, J.I.; VRVIC, M.M. Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme Microb. Technol., 15, p.334-338, 1993.
24. LAWFORD, G. R.; KLIGERMAN, A.; WILLIAMS, T. Dextran Biosynthesis and Dextranase Production by Continuous Culture of *Leuconostoc mesenteroides*. Biotechnology and Bioengineering, 21, p.1121-1131, 1979.
25. LEE, S.; CHOI, E. K.; KOO, Y. Continuous production of dextran using two-stage reactor. Biotechnology Letters, 14, p.379-384, 1992.
26. LENCKI, R. W.; TECANTE, A.; CHOPLIN, L. Effect of Shear on the Inactivation Kinetics of the Enzyme Dextranase. Biotechnology and Bioengineering, 42, p.1061-1067, 1993.
27. LOPEZ, A. Production, purifications et immobilization de la dextran-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides*. Produção, purificação e imobilização da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* Toulouse, 1979. Tese (Docteur Ingenieur) Institut National des Sciences Appliquées. (INSA)
28. MARTINEZ-ESPINDOLA, J.P. & LOPES-MUNGUIA, C.A. On the kinetics of dextranase and dextran synthesis in batch reactions. Biotech. Lett., 7, 7, p.483-486, 1985.
29. MILLER, A. W. & ROBYT, J. F. Stabilization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, polyethylene glycol and high molecular weight dextran. Biochem. Biophys. Acta, 785: 89-96, 1984.
30. MILLER, A. W. & ROBYT, J. F. Activation and inhibition of dextranase by calcium. Biochem. Biophys. Acta, 880, p.32-39, 1986.

31. MITSUDA, H.; LOONEY, D. J.; KUNO, S.; UENO, R.; WONG-STALL, F.; BRODER, S. Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4⁺ cells. Science, 240, p.646-649, 1988.
32. MONSAN, P. & LOPEZ, A. On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase. Biothechnology Bioeng., 23, p. 2027-2037, 1981.
33. NILSON, G. & NILSSON, K. Molecular weight distribution determination of clinical dextran by gel permeation chromatography. Journal of Chromatography, 101, p. 137-153, 1974.
34. PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled molecular weight dextrans. Carbohydr. Res. 149:433-441, 1986
35. PEREIRA, A.M. Estudo da produção de dextrana clínica utilizando glicose como receptor. Campinas, 1995 Tese de mestrado (em andamento) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
36. PEREIRA, A.M; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Estudo da produção de dextrana e oligossacarídeos utilizando glicose como receptor. Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações. S. Carlos, 1996.
37. QUEIROZ, J. H. & MAUGERI, F. Otimização da produção de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melão como fonte de carbono. Rev. Microbiol., 20, p.150-156, 1988.
38. ROBYT, J.F.; KIMBLE, B.K.; WALSETH, T.F. The mechanism of dextransucrase action direction of dextran biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys., 165, p. 634-640, 1974.
39. ROBYT, J.F. & CORRIGAN, A.J. The mechanism of dextransucrase action - Activation of dextransucrase from *Streptococcus mutans* OMZ 176 by dextran and modified dextran and the non-existence of the primer requirement for the synthesis. Arch. Biochem. Biophys., 183, p. 726-731, 1977.

- 40 ROBYT, J.F. & WALSETH, T.F. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. Carbohy. Res., 68,p. 95-111, 1979.
- 41 ROBYT, J.F.; & EKLUND, S.H. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextransucrase. Carbohyd. Res., 121, p.279-286, 1983.
- 42 SABATIE, J.; CHOPLIN, L. PAUL, F.; MONSAN, P. The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. Biotechnol. Letters, 8,6, p. 425-430, 1986.
- 43 SU, D. & ROBYT, J.F. Control of the synthesis of dextran and acceptor products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextransucrase. Carbohyd. Res., 248, p. 339-348, 1993.
- 44 TANRISEVEN, A. & ROBYT, J.F. Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentration. Carbohy. Res., 245, p.97-104, 1993
- 45 VELJKOVIC, V. B.; LAZIC, M. L.; RUTIC, D. J.; JOVANOVIC, S. M.; SKALA, D.U. Effects of aeration on extracellular dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme Microb. Techonol., 14, p 665-668, 1992.
- 46 WOLFF, I.A.; MEHLTRETTER, C.L.; MELLIES, R.L.; WATSON, P.R.; HOFREITER, B.T.; PATRICK, P.L.; RIST, C.E. Production of chemical type dextran-Partial hydrolytic depolymerization and fractionation of the dextran from *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-512. Ind. Eng. Chem., 46, p.370-377, 1954.

APÊNDICE A: Curva de calibração relacionando os pesos moleculares e tempos de retenção

Calibration Curve



Calibration Information

Processing Method	dextrana_pm	System	GPC_1
Channel	SATIN	Date	11-APR-96
Type	GPC	Manual Coeffs	No
Data Origin		Order	3
A	22.069818	B	-1.754646
C	0.066865	D	-0.000991
E	0.000000	F	0.000000
R	0.998737	R^2	0.997476
Standard Error	0.218215	Vo	14.133 ml,min
Vt	31.200 ml,min	Valid	Yes
Mo		b	
Slope		K	1.000000000 dl/g
alpha	0.000000		

Narrow Standard table

#	Retention Time (min)	Elution Volume (ml)	Mol Wt (Daltons)	Log Mol Wt	Calculated Weight (Daltons)	% Residual	Manual	Ignore
1	16.932	16.932	4900000	6.690196	5249604	-6.660	No	No
2	17.283	17.283	3922211	6.593531	3998702	-1.913	No	No
3	18.283	18.283	1750000	6.243038	1929030	-9.281	No	No
4	18.799	18.799	1500000	6.176091	1355227	10.683	No	No
5	19.207	19.207	1250000	6.096910	1035240	20.745	No	No

Narrow Standard table

#	Retention Time (min)	Elution Volume (ml)	Mol Wt (Daltons)	Log Mol Wt	Calculated Weight (Daltons)	% Residual	Manual	Ignore
6	19.583	19.583	1089841	6.037363	912732	34.096	No	No
7	19.639	19.639	685000	5.835691	784435	-12.676	No	No
8	20.183	20.183	500813	5.699676	559015	-10.412	No	No
9	20.660	20.660	380600	5.580469	418649	-9.088	No	No
10	22.319	22.319	165500	5.218798	158597	4.353	No	No
11	22.467	22.467	150231	5.176759	145608	3.175	No	No
12	22.933	22.933	110800	5.044540	111277	-0.429	No	No
13	23.392	23.392	78800	4.896526	85263	-7.580	No	No
14	23.467	23.467	75566	4.878325	81614	-7.411	No	No
15	24.228	24.228	49400	4.693727	52103	-5.188	No	No
16	24.540	24.540	42750	4.630936	43178	-0.990	No	No
17	24.683	24.683	38736	4.588112	39583	-2.140	No	No
18	25.118	25.118	28700	4.457882	30268	-5.181	No	No
19	26.667	26.667	11700	4.068186	10944	6.912	No	No
20	27.133	27.133	8416	3.925083	7857	7.107	No	No
21	27.205	27.205	8000	3.903090	7458	7.265	No	No
22	31.200	31.200	180	2.255273	210	-14.205	No	No

APÊNDICE B: Análise da concentração da amostra sobre a distribuição do peso molecular da dextrana

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: Sint 0.05%

Vial: 4

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 23/04/96 17:02:17

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Relatório para a amostra da síntese (0,05%)

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: Sint 0.05%

Vial: 4

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 23/04/96 15:04:47

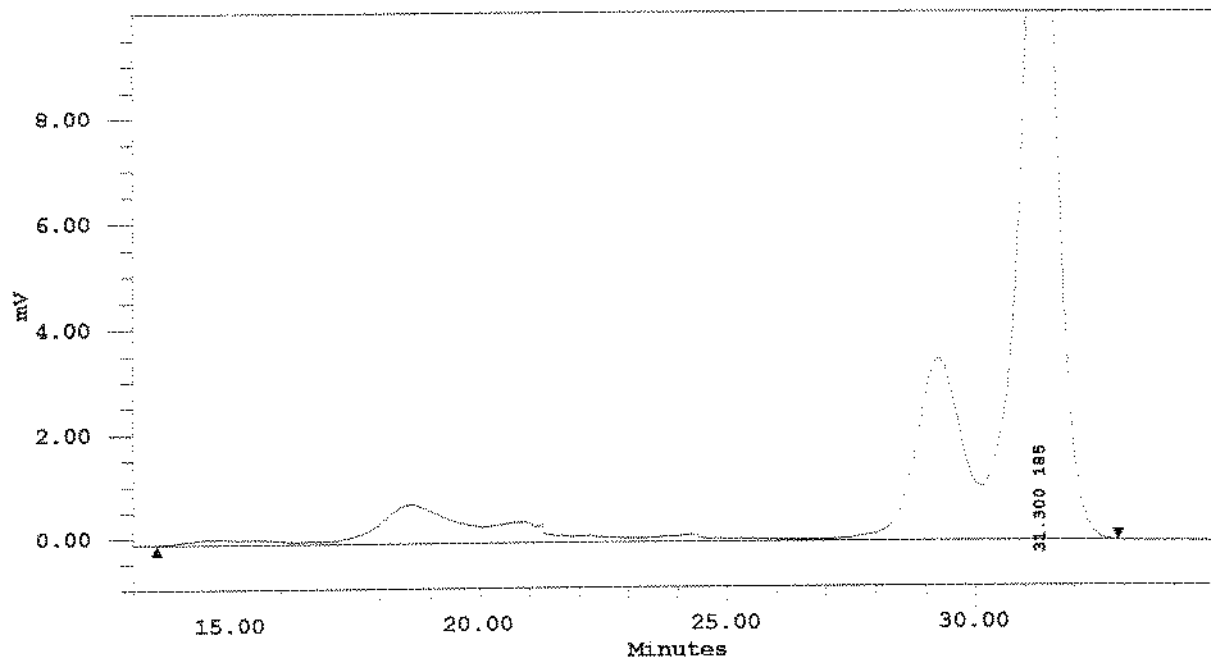
Date Processed: 23/04/96 17:02:17

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: Sint 0.05%

Vial: 4

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 23/04/96 17:02:17

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Slice Table showing 50 of 1164 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	88	0.222	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	86	0.401	14.880	14.880	7.500565	31863934
3	77	0.559	15.253	15.253	7.345744	22168888
4	83	0.716	15.627	15.627	7.196921	15738961
5	64	0.854	16.000	16.000	7.053788	11319425
6	34	0.933	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	41	1.020	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	58	1.118	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	133	1.307	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	303	1.713	17.867	17.867	6.412612	2585902
11	591	2.584	18.240	18.240	6.297131	1982036
12	747	3.970	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	635	5.380	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	475	6.473	19.360	19.360	5.970508	834347
15	363	7.290	19.733	19.733	5.867242	736618
16	318	7.948	20.107	20.107	5.766282	593787
17	353	8.608	20.480	20.480	5.667257	464790
18	394	9.377	20.853	20.853	5.569918	371465
19	326	10.087	21.227	21.227	5.473936	297808
20	129	10.427	21.600	21.600	5.379002	239333
21	110	10.655	21.973	21.973	5.284806	192886
22	113	10.868	22.347	22.347	5.191039	155253
23	71	11.061	22.720	22.720	5.097392	125139
24	63	11.204	23.093	23.093	5.003554	100822
25	70	11.339	23.467	23.467	4.909217	81137
26	95	11.503	23.840	23.840	4.814071	65173
27	128	11.723	24.213	24.213	4.717807	52216
28	61	11.917	24.587	24.587	4.620116	41698
29	43	12.015	24.960	24.960	4.520687	33166
30	38	12.103	25.333	25.333	4.419212	26255
31	39	12.188	25.707	25.707	4.315331	20672
32	36	12.257	26.080	26.080	4.208886	16177
33	35	12.316	26.453	26.453	4.099415	12572
34	29	12.376	26.827	26.827	3.986661	9698
35	31	12.443	27.200	27.200	3.870314	7418
36	60	12.539	27.573	27.573	3.750063	5624
37	127	12.730	27.947	27.947	3.625600	4223
38	332	13.142	28.320	28.320	3.496616	3139
39	1219	14.520	28.693	28.693	3.362901	2306
40	3037	18.831	29.067	29.067	3.223846	1674
41	3223	25.556	29.440	29.440	3.079441	1201
42	1688	30.400	29.813	29.813	2.929276	850
43	1083	32.805	30.187	30.187	2.773044	593
44	2350	36.044	30.560	30.560	2.610433	408
45	7322	44.611	30.933	30.933	2.441136	276
46	14734	68.516	31.307	31.307	2.264841	164
47	7321	91.714	31.680	31.680	2.081240	121
48	1321	98.860	32.053	32.053	1.890023	78
49	157	99.904	32.427	32.427	1.690882	49
50	4	99.997	32.800	32.800	1.483507	30

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: Sint 0.10%

Vial: 3

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 23/04/96 16:58:01

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Relatório para a amostra da síntese (0,10%)

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: Sint 0.10%

Vial: 3

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 23/04/96 14:18:10

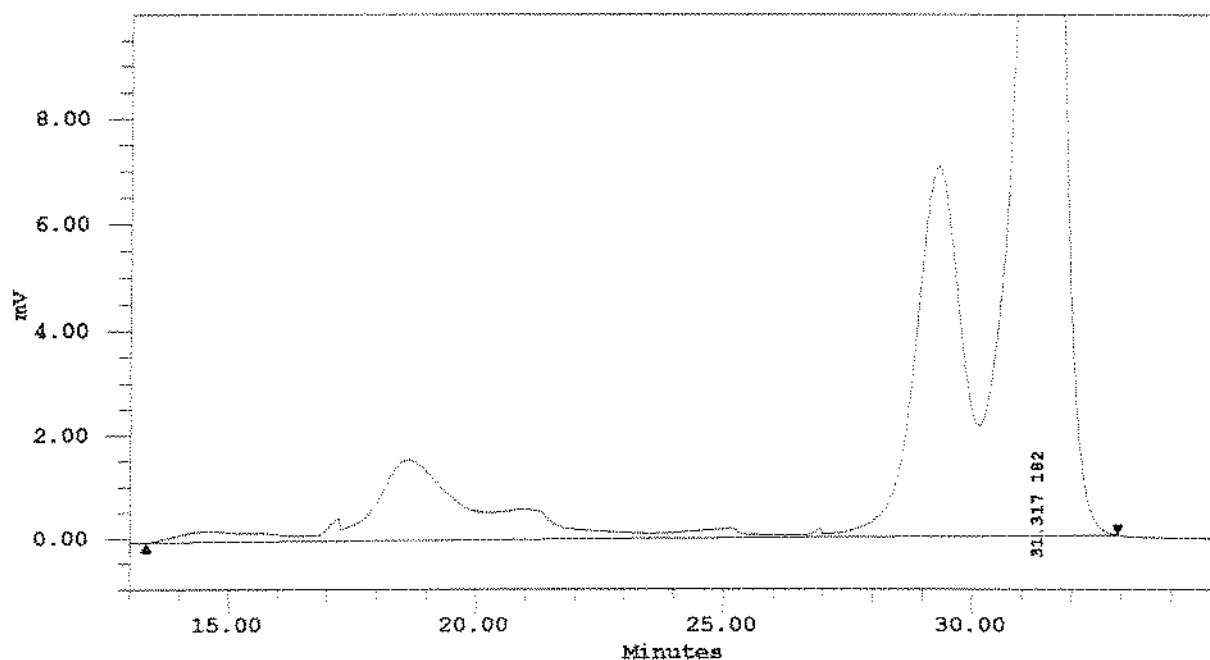
Date Processed: 23/04/96 16:58:01

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: Sint 0.10%

Vial: 3

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 23/04/96 16:58:01

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Slice Table showing 50 of 1178 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	200	0.332	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	188	0.534	14.880	14.880	7.500565	31663934
3	160	0.704	15.253	15.253	7.346744	22168888
4	169	0.864	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	137	1.014	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	102	1.121	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	103	1.226	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	343	1.421	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	293	1.716	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	563	2.119	17.867	17.867	6.412612	2685902
11	1168	2.968	18.240	18.240	6.297111	1982036
12	1550	4.381	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	1340	5.853	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	961	6.987	19.360	19.360	5.970508	934347
15	666	7.776	19.733	19.733	5.867242	736618
16	535	8.349	20.107	20.107	5.766262	583797
17	528	8.869	20.480	20.480	5.667257	464790
18	569	9.418	20.853	20.853	5.569918	371465
19	541	9.985	21.227	21.227	5.473936	297808
20	295	10.420	21.600	21.600	5.379002	239333
21	198	10.647	21.973	21.973	5.284806	192666
22	167	10.823	22.347	22.347	5.191039	155253
23	133	10.969	22.720	22.720	5.097392	125139
24	109	11.093	23.093	23.093	5.003554	100822
25	95	11.195	23.467	23.467	4.909217	81137
26	103	11.290	23.840	23.840	4.814071	65173
27	128	11.396	24.213	24.213	4.717807	52216
28	142	11.526	24.587	24.587	4.620116	41698
29	161	11.683	24.960	24.960	4.520687	33166
30	102	11.849	25.333	25.333	4.419212	26255
31	56	11.915	25.707	25.707	4.315381	20672
32	53	11.962	26.080	26.080	4.208886	16177
33	50	12.004	26.453	26.453	4.099415	12572
34	78	12.053	26.827	26.827	3.986661	9698
35	65	12.150	27.200	27.200	3.870314	7418
36	132	12.243	27.573	27.573	3.750063	5624
37	279	12.435	27.947	27.947	3.625600	4223
38	658	12.860	28.320	28.320	3.496616	3138
39	2292	14.179	28.693	28.693	3.362801	2306
40	5921	16.363	29.067	29.067	3.223846	1674
41	6631	25.025	29.440	29.440	3.079441	1201
42	3571	30.103	29.813	29.813	2.929276	850
43	2193	32.633	30.187	30.187	2.773044	593
44	4546	35.785	30.560	30.560	2.610433	408
45	13714	43.865	30.933	30.933	2.441136	276
46	29232	66.903	31.307	31.307	2.264841	184
47	15718	90.766	31.680	31.680	2.081240	121
48	3042	98.617	32.053	32.053	1.890023	76
49	388	99.855	32.427	32.427	1.690882	49
50	29	99.996	32.800	32.800	1.483507	30

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: Sint 0.20%

Vial: 2

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 23/04/96 16:56:19

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Relatório para a amostra da síntese (0,20%)

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: Sint 0.20%

Vial: 2

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 23/04/96 13:25:50

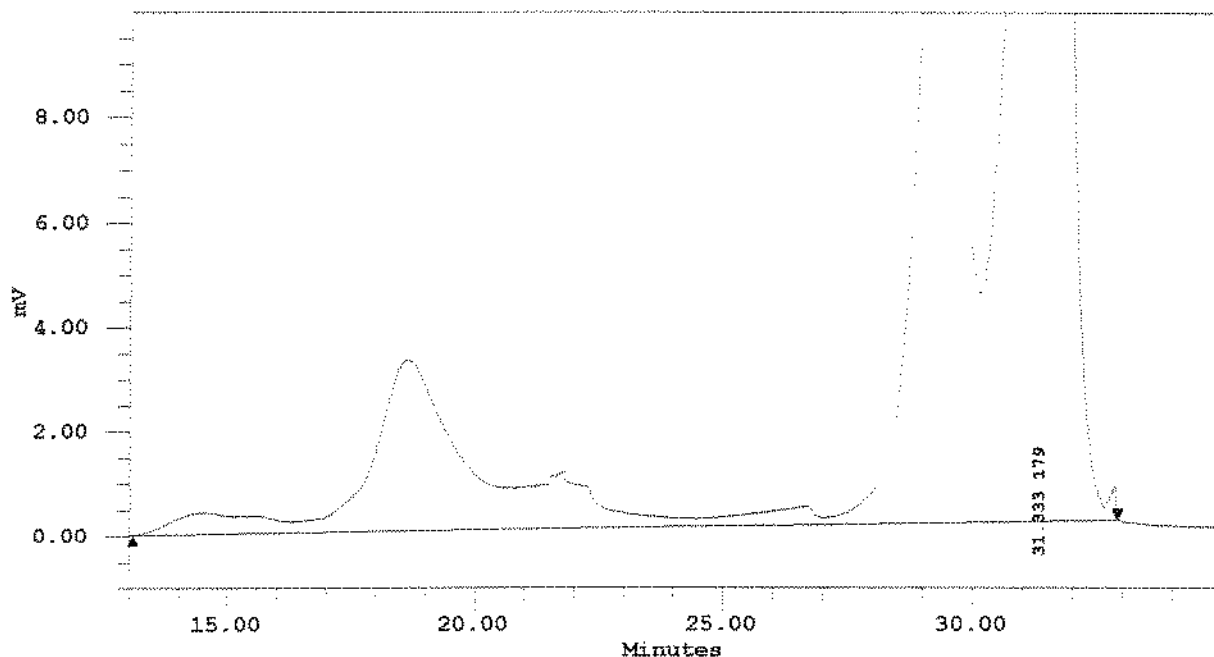
Date Processed: 23/04/96 16:56:19

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: Sint 0.20%

Vial: 2

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 23/04/96 16:56:19

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Slice Table showing 50 of 1193 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	416	0.396	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	354	0.586	14.880	14.880	7.500565	31653934
3	320	0.751	15.253	15.253	7.345744	22166086
4	323	0.911	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	247	1.051	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	214	1.157	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	232	1.265	16.747	16.747	6.763345	6072185
8	336	1.400	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	621	1.640	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	1130	2.055	17.867	17.867	6.412612	2555902
11	2393	2.909	18.240	18.240	6.297111	1982036
12	3264	4.359	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	2812	5.883	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	1976	7.049	19.360	19.360	5.970508	934347
15	1368	7.855	19.733	19.733	5.867242	736618
16	955	8.411	20.107	20.107	5.766262	583797
17	798	8.829	20.480	20.480	5.667257	464790
18	775	9.211	20.853	20.853	5.569918	371465
19	793	9.598	21.227	21.227	5.473936	297808
20	939	10.018	21.600	21.600	5.379002	239333
21	837	10.486	21.973	21.973	5.284806	192666
22	662	10.871	22.347	22.347	5.191039	155253
23	324	11.076	22.720	22.720	5.097392	125139
24	256	11.218	23.093	23.093	5.003554	100822
25	195	11.327	23.467	23.467	4.909217	81137
26	170	11.418	23.840	23.840	4.814071	65173
27	149	11.494	24.213	24.213	4.717807	52216
28	140	11.561	24.587	24.587	4.620116	41698
29	156	11.633	24.960	24.960	4.520687	33166
30	182	11.716	25.333	25.333	4.419212	26255
31	222	11.820	25.707	25.707	4.315381	20672
32	270	11.942	26.080	26.080	4.209886	16177
33	307	12.083	26.453	26.453	4.099415	12572
34	234	12.239	26.827	26.827	3.986661	9698
35	130	12.306	27.200	27.200	3.870314	7418
36	238	12.394	27.573	27.573	3.750063	5624
37	535	12.579	27.947	27.947	3.625600	4223
38	1294	13.001	28.320	28.320	3.496616	3138
39	4522	14.282	28.693	28.693	3.362801	2306
40	11871	18.331	29.067	29.067	3.223846	1674
41	13498	25.040	29.440	29.440	3.079441	1201
42	7353	30.170	29.813	29.813	2.929276	850
43	4445	32.748	30.187	30.187	2.773044	593
44	9086	35.876	30.560	30.560	2.610433	408
45	27202	43.795	30.933	30.933	2.441136	276
46	58697	66.508	31.307	31.307	2.264841	184
47	32191	90.362	31.680	31.680	2.081240	121
48	6468	98.417	32.053	32.053	1.890023	76
49	841	99.735	32.427	32.427	1.690882	49
50	573	99.946	32.800	32.800	1.483507	30

APÊNDICE C: Relatórios utilizados na determinação da porcentagem de dextrana presente na amostra da síntese

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: SINT.0.20%

Vial: 8

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 20/05/96 18:35:14

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Relatório para a amostra da síntese (0,20%) injeção 1

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: SINT.0.20%

Vial: 8

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 25/04/96 16:50:02

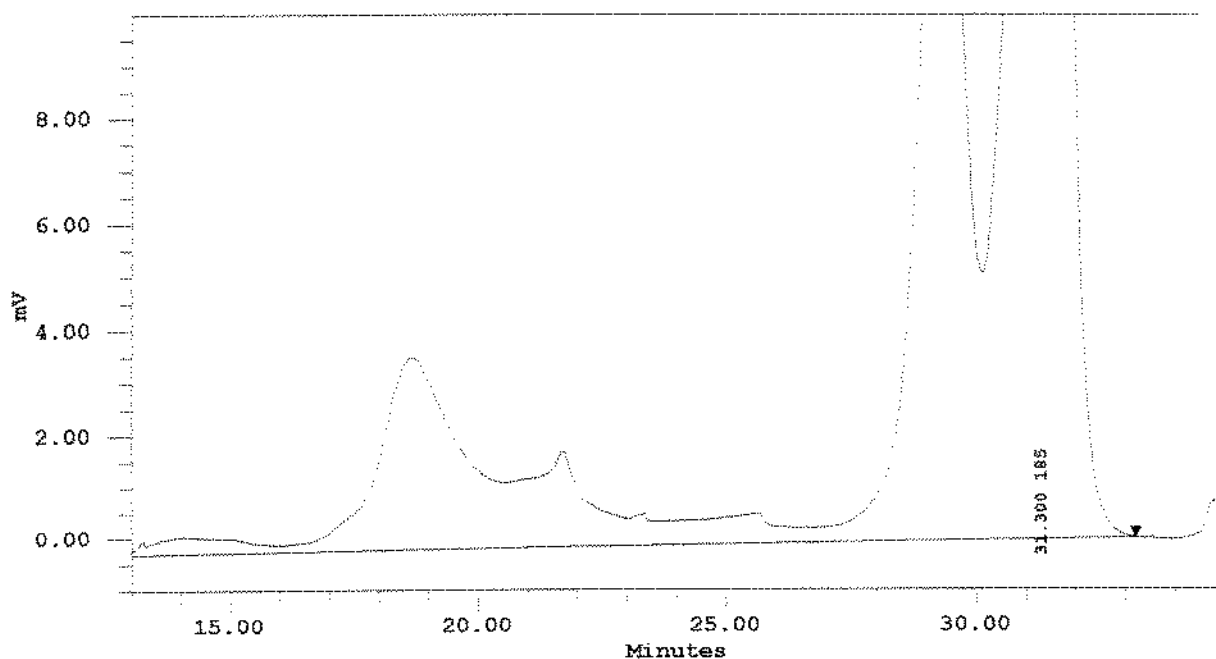
Date Processed: 20/05/96 18:35:14

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: SINT.0.20%

Vial: 8

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 20/05/96 18:35:14

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Slice Table showing 50 of 1244 slices

#	Area	Cumulative %	Elution Volume	Retention Time	Log Mol Wt	Mol Wt
		(%)	(ml)	(min)		(Daltons)
1	285	0.474	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	278	0.597	14.880	14.880	7.500565	31663934
3	230	0.709	15.253	15.253	7.345744	22168888
4	167	0.780	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	136	0.850	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	151	0.910	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	216	0.987	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	464	1.129	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	747	1.392	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	1316	1.808	17.867	17.867	6.413612	2585902
11	2716	2.664	18.240	18.240	6.297111	1982036
12	3692	4.096	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	3303	5.630	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	2478	6.858	19.360	19.360	5.970508	934347
15	1846	7.787	19.733	19.733	5.867242	736618
16	1449	8.459	20.107	20.107	5.766262	583797
17	1289	9.037	20.480	20.480	5.667257	464790
18	1327	9.595	20.853	20.853	5.569918	371465
19	1375	10.177	21.227	21.227	5.473936	297808
20	1683	10.812	21.600	21.600	5.379002	239333
21	1232	11.514	21.973	21.973	5.284806	192666
22	770	11.914	22.347	22.347	5.191039	155253
23	626	12.211	22.720	22.720	5.097392	125139
24	538	12.454	23.093	23.093	5.003554	100822
25	483	12.699	23.467	23.467	4.909217	81137
26	479	12.902	23.840	23.840	4.814071	65173
27	472	13.106	24.213	24.213	4.717807	52216
28	481	13.312	24.587	24.587	4.620116	41698
29	519	13.528	24.960	24.960	4.520697	33166
30	559	13.759	25.333	25.333	4.419212	26255
31	555	14.007	25.707	25.707	4.315381	20672
32	318	14.167	26.080	26.080	4.208886	16177
33	296	14.300	26.453	26.453	4.099415	12572
34	294	14.426	26.827	26.827	3.986661	9698
35	325	14.559	27.200	27.200	3.870314	7418
36	467	14.724	27.573	27.573	3.750063	5624
37	618	14.991	27.947	27.947	3.625600	4223
38	1746	15.511	28.320	28.320	3.496616	3138
39	5642	16.949	28.693	28.693	3.362801	2306
40	13680	21.193	29.067	29.067	3.223846	1674
41	14878	27.816	29.440	29.440	3.079441	1201
42	7906	32.678	29.813	29.813	2.929276	850
43	5336	35.181	30.187	30.187	2.773044	593
44	10845	38.544	30.560	30.560	2.610433	408
45	31845	46.553	30.933	30.933	2.441136	276
46	65925	69.560	31.307	31.307	2.264841	184
47	32286	91.695	31.680	31.680	2.081240	121
48	6347	98.608	32.053	32.053	1.890023	78
49	959	99.789	32.427	32.427	1.690882	49
50	160	99.973	32.800	32.800	1.483507	30

Millennium Separation Report
Report Method: TESTE_GPC
For Sample: SINT.0.20%
Proc Chan: SATIN
Baseline Noise:
Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Vial: 8

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 20/05/96 18:27:19

Baseline Drift:

Relatório para a amostra da síntese (0,20%) injeção 2

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: SINT.0.20%

Vial: 8

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 25/04/96 13:36:09

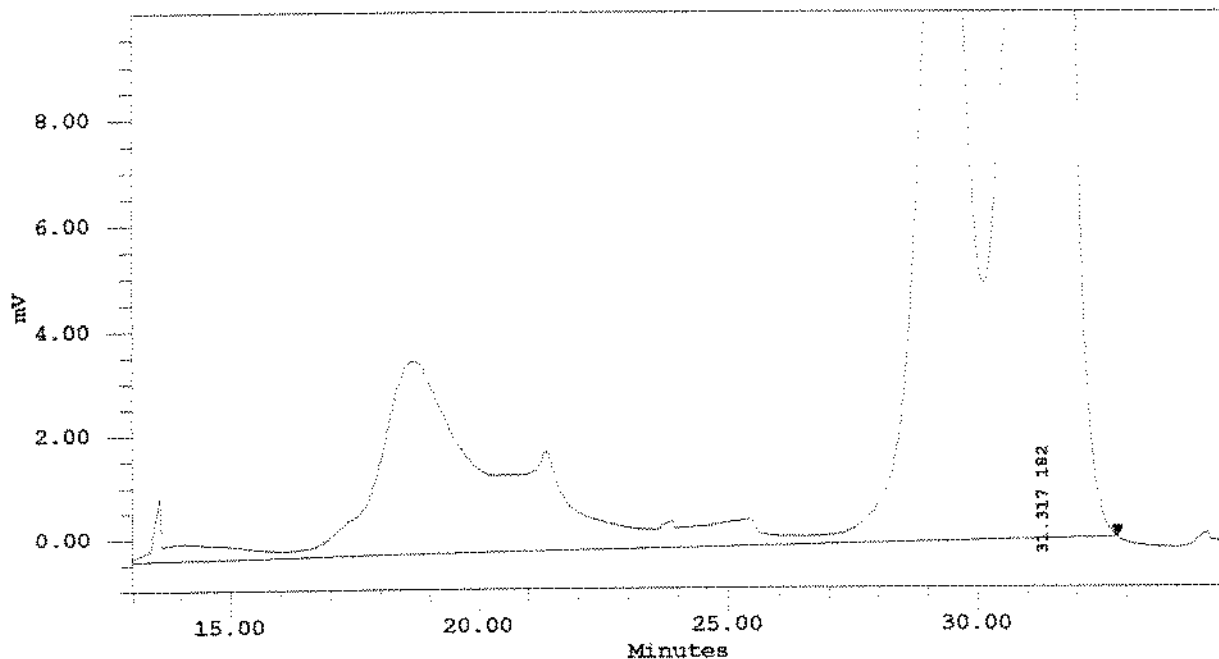
Date Processed: 20/05/96 18:27:19

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE_GPC
 For Sample: SINT.0.20%
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996
 Version: 2.10
 Vial: 8 Injection: 1
 Processed: 20/05/96 18:27:19
 Baseline Drift:

Page: 2 of 2

Chan: SATIN

Slice Table showing 50 of 1223 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml.)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	279	0.584	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	247	0.699	14.880	14.880	7.500565	31663934
3	202	0.801	15.253	15.253	7.345744	22166888
4	156	0.878	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	130	0.936	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	135	0.989	16.373	16.373	6.916031	6241963
7	211	1.061	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	457	1.204	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	728	1.468	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	1311	1.853	17.867	17.867	6.412613	2585900
11	2745	2.756	18.240	18.240	6.297111	1982036
12	3709	4.216	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	3332	5.782	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	2517	7.043	19.360	19.360	5.970508	934347
15	1900	7.984	19.733	19.733	5.867242	736618
16	1555	8.718	20.107	20.107	5.766262	583797
17	1488	9.369	20.480	20.480	5.667257	464790
18	1476	10.015	20.853	20.853	5.569918	371465
19	1661	10.683	21.227	21.227	5.473936	297808
20	1274	11.413	21.600	21.600	5.379002	239333
21	754	11.817	21.973	21.973	5.284806	192688
22	579	12.098	22.347	22.347	5.191039	155253
23	474	12.326	22.720	22.720	5.097392	125139
24	393	12.514	23.093	23.093	5.003554	100822
25	368	12.678	23.467	23.467	4.909217	81137
26	493	12.858	23.840	23.840	4.814071	65173
27	393	13.033	24.213	24.213	4.717807	52216
28	406	13.206	24.587	24.587	4.620116	41696
29	447	13.393	24.960	24.960	4.520687	33166
30	492	13.596	25.333	25.333	4.419212	26255
31	226	13.763	25.707	25.707	4.315361	20672
32	180	13.847	26.080	26.080	4.208886	16177
33	167	13.918	26.453	26.453	4.099415	12572
34	160	13.987	26.827	26.827	3.986661	9696
35	178	14.059	27.200	27.200	3.870314	7418
36	315	14.164	27.573	27.573	3.750063	5624
37	664	14.370	27.947	27.947	3.625600	4223
38	1539	14.818	28.320	28.320	3.496616	3138
39	5192	15.133	28.693	28.693	3.362801	2306
40	13379	20.203	29.067	29.067	3.223846	1674
41	15004	26.840	29.440	29.440	3.079441	1201
42	8104	31.865	29.813	29.813	2.929276	850
43	5061	34.391	30.187	30.187	2.773044	593
44	10239	37.576	30.560	30.560	2.610433	408
45	29021	45.057	30.933	30.933	2.441136	276
46	65876	67.359	31.307	31.307	2.264841	184
47	35389	90.788	31.680	31.680	2.081240	121
48	7107	98.558	32.053	32.053	1.890023	78
49	954	99.859	32.427	32.427	1.690882	49
50	6	100.000	32.800	32.800	1.483507	30

Millennium Separation Report
Report Method: TESTE_GPC
For Sample: SINT.0.20%
Proc Chan: SATIN
Baseline Noise:
Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Vial: 8

Injection: 2

Chan: SATIN

Processed: 20/05/96 18:31:39

Baseline Drift:

Relatório para a amostra da síntese (0,20%) injeção 3

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: SINT.0.20%

Vial: 8

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 2

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 25/04/96 15:44:52

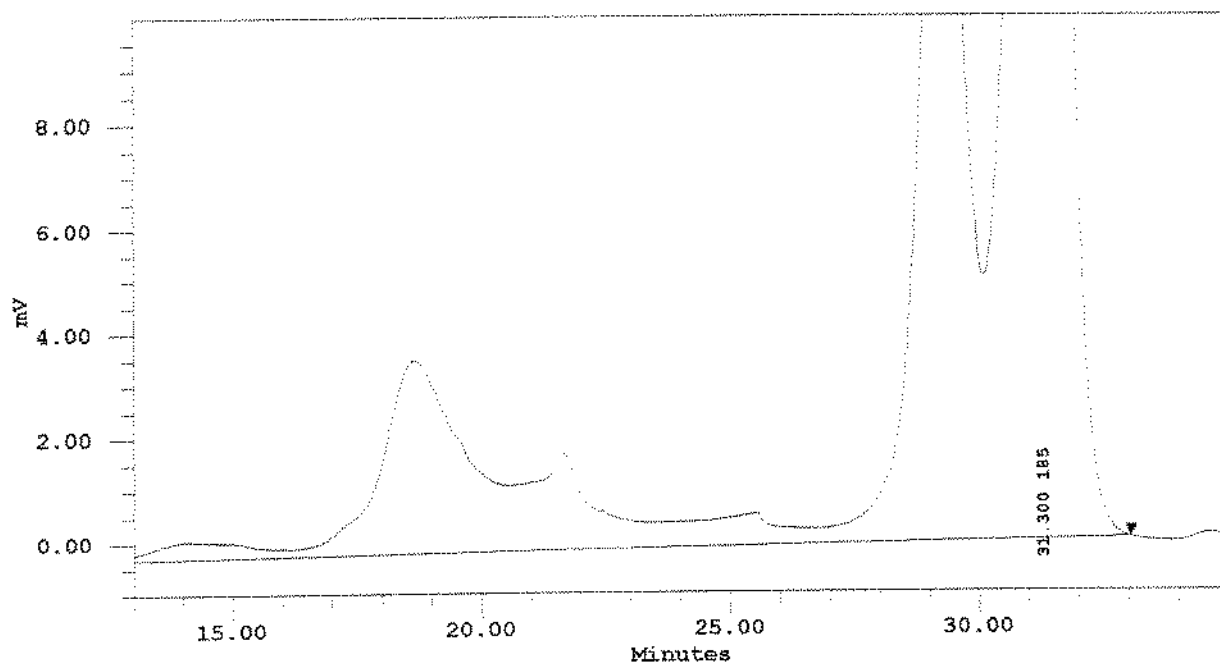
Date Processed: 20/05/96 18:31:39

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Report Method: TESTE GPC

Version: 2.10

For Sample: SINT.0.20%

Vial: 8

Injection: 2

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 20/05/96 18:31:39

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

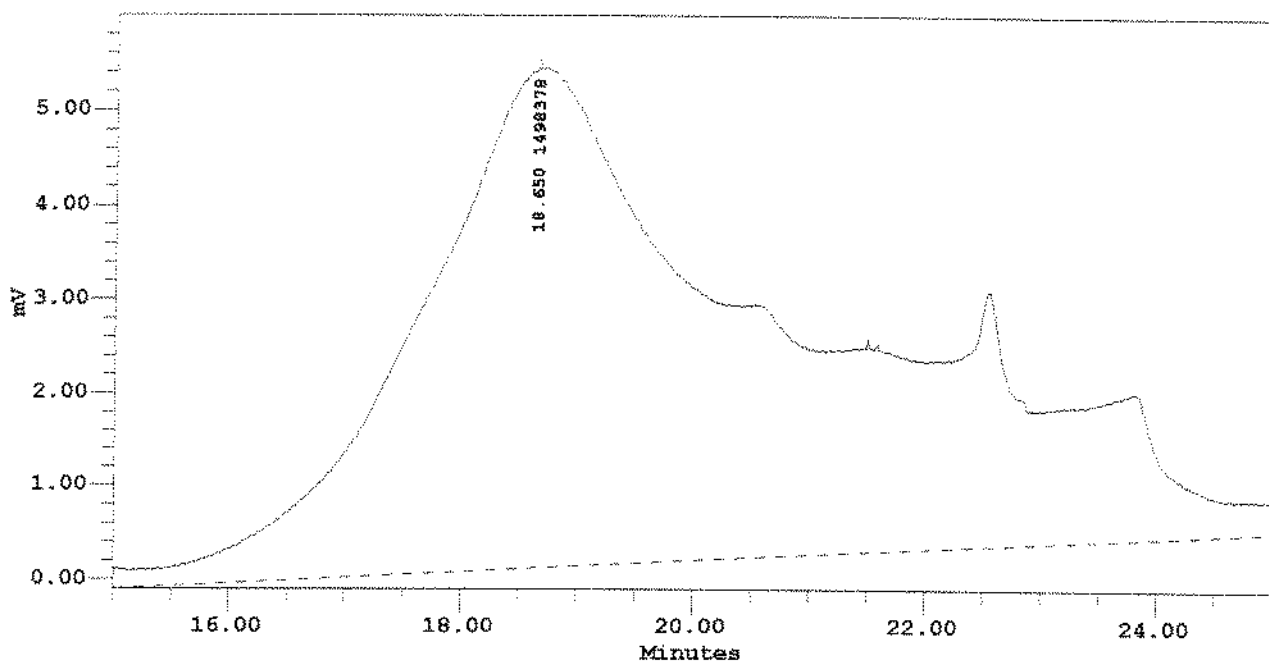
Slice Table showing 50 of 1238 slices

#	Area	Cumulative %	Elution Volume	Retention Time	Log Mol Wt	Mol Wt
		(%)	(ml)	(min)		(Daltons)
1	306	0.462	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	379	0.590	14.880	14.880	7.500565	31663934
3	238	0.706	15.253	15.253	7.345744	22168868
4	173	0.793	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	156	0.860	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	156	0.922	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	223	1.000	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	449	1.141	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	709	1.397	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	1367	1.800	17.867	17.867	6.412612	2585901
11	1703	2.647	18.240	18.240	6.297111	1982038
12	3665	4.074	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	3259	5.598	18.987	18.987	6.076369	1192256
14	2429	6.815	19.360	19.360	5.970508	934347
15	1789	7.727	19.733	19.733	5.867242	736818
16	1418	8.407	20.107	20.107	5.766262	583797
17	1266	9.972	20.480	20.480	5.667257	464790
18	1072	9.512	20.853	20.853	5.569918	371465
19	1331	10.073	21.227	21.227	5.473936	297808
20	1749	10.711	21.600	21.600	5.379002	239333
21	1097	11.366	21.973	21.973	5.284806	192666
22	733	11.735	22.347	22.347	5.191039	155253
23	585	12.016	22.720	22.720	5.097392	125139
24	490	12.246	23.093	23.093	5.003554	100622
25	467	12.451	23.467	23.467	4.909217	81137
26	470	12.653	23.840	23.840	4.814071	65173
27	477	12.855	24.213	24.213	4.717807	52216
28	482	13.061	24.587	24.587	4.620116	41698
29	521	13.277	24.960	24.960	4.520687	33166
30	569	13.813	25.333	25.333	4.419212	26255
31	411	13.751	25.707	25.707	4.315381	20572
32	321	13.897	26.080	26.080	4.208866	16177
33	292	14.026	26.453	26.453	4.099415	12572
34	276	14.147	26.827	26.827	3.986661	9698
35	309	14.274	27.200	27.200	3.870314	7418
36	456	14.435	27.573	27.573	3.750063	5624
37	816	14.700	27.947	27.947	3.625600	4223
38	1763	15.223	28.320	28.320	3.496616	3138
39	5718	16.682	28.693	28.693	3.362801	2306
40	13962	20.984	29.067	29.067	3.223846	1674
41	14805	27.639	29.440	29.440	3.079441	1201
42	7863	32.474	29.813	29.813	2.929276	850
43	9334	34.975	30.187	30.187	2.773044	593
44	10919	38.362	30.560	30.560	2.610433	408
45	32295	46.504	30.933	30.933	2.441136	278
46	66009	69.763	31.307	31.307	2.264841	184
47	31897	91.877	31.680	31.680	2.081240	121
48	6172	98.688	32.053	32.053	1.890023	78
49	907	99.825	32.427	32.427	1.690882	49
50	106	99.988	32.800	32.800	1.483507	30

APÊNDICE D: Cromatogramas obtidos na integração do pico de interesse para determinação do peso molecular médio das amostras H6/7 horas, H4/7 horas e H5/7 horas

Cromatograma para a amostra H6/7 horas

Project Name:	DEXTRANA_1		
Sample Name:	H6 - 7 horas		
Vial:	7	Sample Type:	Broad Unknown
Injection:	1	Volume:	98.00
Channel:	SATIN	Run Time:	35.0 min
Date Acquired:	10/04/96 20:36:48	Date Processed:	10/06/96 16:21:20
SampleWeight:	1.00000	Dilution:	1.00000
Acq Meth Set:	DEXT_MS		
Processing Method:	dextrana_pm		



Millennium Separation Report

Report Method: TESTE_GPC

For Sample: H5-7 horas

Proc Chan: SATIN

Baseline Noise:

Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Version: 2.10

Vial: 12

Injection: 1

Processed: 10/06/96 18:29:58

Baseline Drift:

Page: 1 of 1

Chan: SATIN

Cromatograma para a amostra H5/7 horas

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H5-7 horas

Vial: 12

Injection: 1

Channel: SATIN

Date Acquired: 02/04/96 10:35:29

SampleWeight: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM

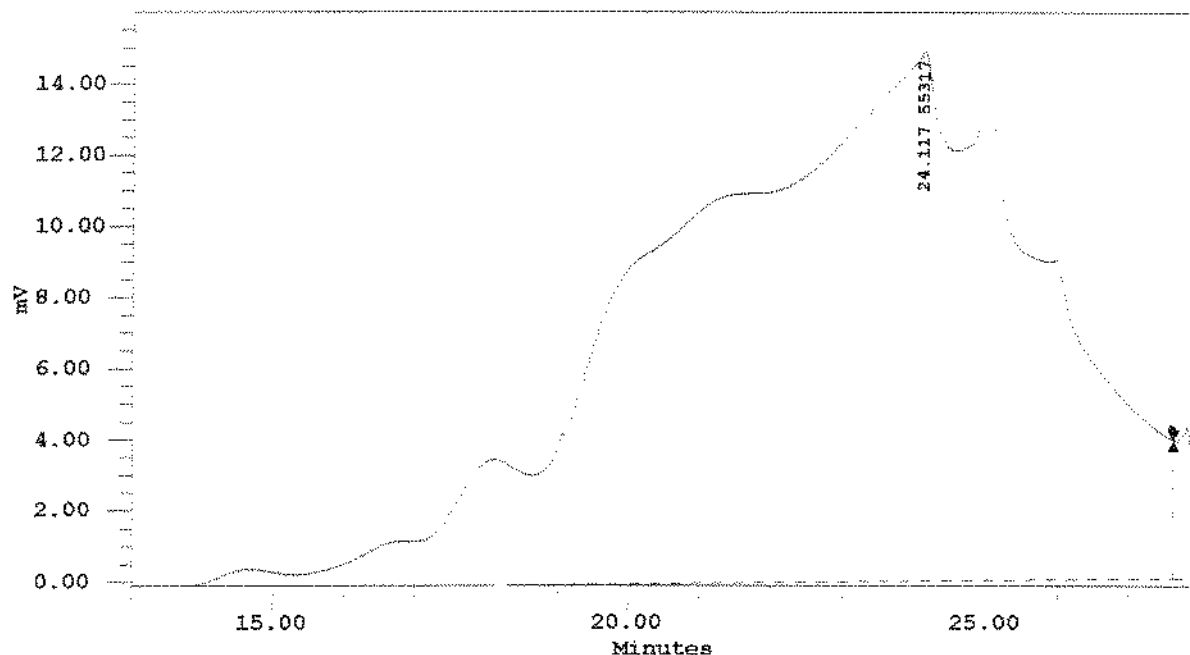
Sample Type: Broad Unknown

Volume: 98.00

Run Time: 35.0 min

Date Processed: 10/06/96 18:29:58

Dilution: 1.00000



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: H4-7horas

Vial: 7

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 12/08/96 20:56:45

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Cromatograma para a amostra H4/7 horas

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H4-7horas

Vial: 7

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 02/04/96 15:40:52

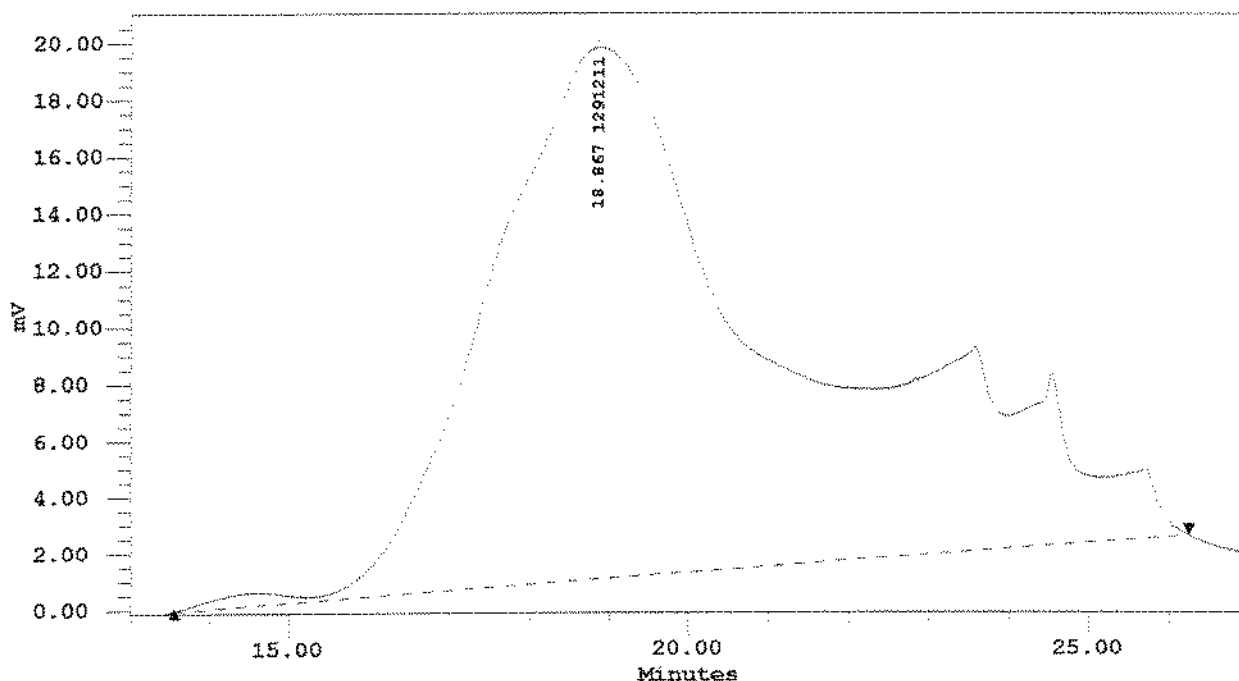
Date Processed: 12/08/96 20:56:45

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



APÊNDICE E: Relatórios mostrando a distribuição do peso molecular e cromatogramas para algumas amostras obtidas no processo de hidrólise.

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: H1-1 hora

Vial: 1

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 19/04/96 14:57:04

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Relatório para a amostra H1/1 hora

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H1-1 hora

Vial: 1

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 12/04/96 16:38:39

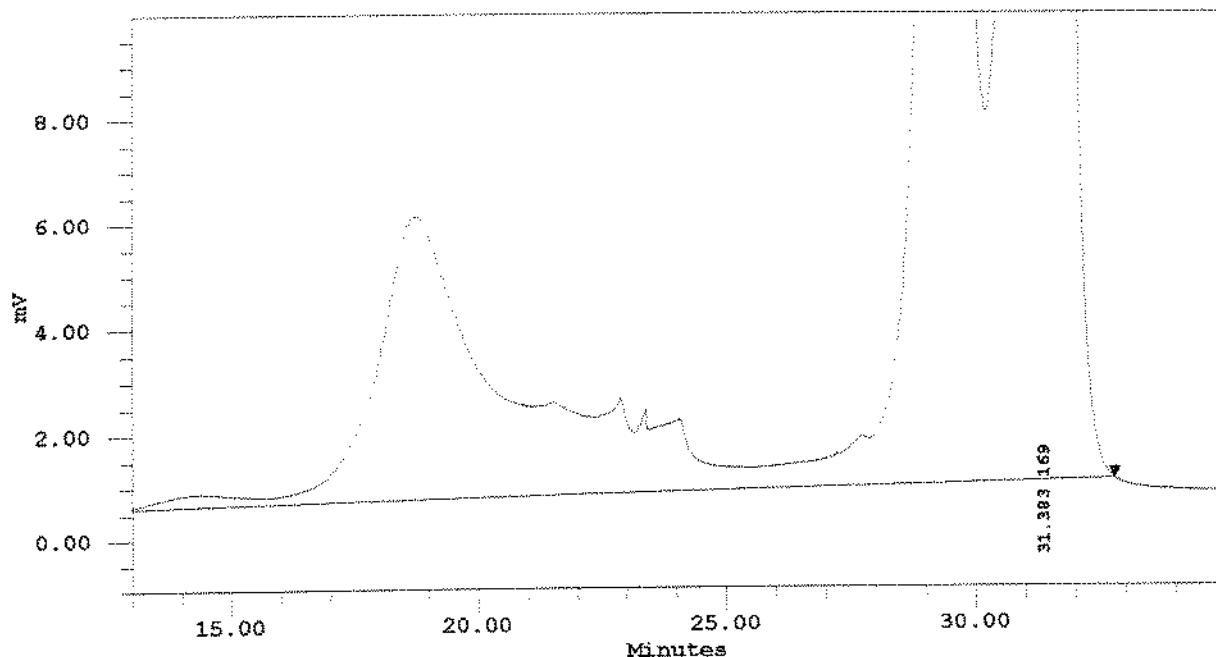
Date Processed: 19/04/96 14:57:04

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: H1-1 hora

Vial: 1

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 19/04/96 14:57:04

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Slice Table showing 50 of 1210 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	218	0.183	14.506	14.506	7.661840	45902901
2	167	0.244	14.879	14.879	7.500847	31684501
3	154	0.293	15.252	15.252	7.346150	22189639
4	132	0.334	15.625	15.625	7.197442	15755857
5	131	0.372	15.998	15.998	7.054413	11334776
6	199	0.421	16.371	16.371	6.916754	8255710
7	322	0.498	16.744	16.744	6.784159	6083577
8	626	0.635	17.117	17.117	6.656317	4532286
9	1221	0.908	17.490	17.490	6.532920	3411302
10	2119	1.398	17.863	17.863	6.413660	2592151
11	3745	2.360	18.236	18.236	6.298228	1987138
12	5237	3.638	18.609	18.609	6.186316	1535733
13	5046	5.207	18.982	18.982	6.077614	1195678
14	3971	6.547	19.355	19.355	5.971815	937163
15	3004	7.571	19.728	19.728	5.868610	738941
16	2310	8.348	20.101	20.101	5.767689	585719
17	1920	8.967	20.474	20.474	5.668746	466387
18	1734	9.506	20.847	20.847	5.571470	372795
19	1682	10.012	21.220	21.220	5.475555	298920
20	1732	10.523	21.593	21.593	5.380690	240265
21	1544	11.009	21.966	21.966	5.286567	193449
22	1444	11.448	22.339	22.339	5.192879	155912
23	1550	11.890	22.712	22.712	5.099315	125694
24	1190	12.352	23.085	23.085	5.005569	101291
25	1168	12.723	23.458	23.458	4.911331	81532
26	1267	13.087	23.831	23.831	4.816291	65508
27	955	13.462	24.204	24.204	4.720144	52496
28	511	13.651	24.577	24.577	4.622578	41935
29	428	13.786	24.950	24.950	4.523286	33365
30	396	13.908	25.323	25.323	4.421959	26422
31	388	14.025	25.696	25.696	4.318290	20811
32	412	14.145	26.069	26.069	4.211968	16292
33	447	14.273	26.442	26.442	4.102688	12667
34	488	14.411	26.815	26.815	3.990135	9775
35	570	14.566	27.188	27.188	3.874007	7482
36	778	14.763	27.561	27.561	3.753992	5675
37	894	15.027	27.934	27.934	3.629782	4264
38	1806	15.405	28.307	28.307	3.501070	3170
39	5957	16.430	28.680	28.680	3.367546	2331
40	19093	20.046	29.053	29.053	3.228900	1694
41	26364	27.373	29.426	29.426	3.084827	1216
42	15217	33.708	29.799	29.799	2.935015	861
43	7150	36.701	30.172	30.172	2.779158	601
44	12724	39.374	30.545	30.545	2.616946	414
45	31007	45.338	30.918	30.918	2.448070	281
46	93710	64.027	31.291	31.291	2.272223	167
47	61276	80.105	31.664	31.664	2.089095	123
48	9788	98.833	32.037	32.037	1.898378	79
49	936	99.911	32.410	32.410	1.699766	50
50	-0	100.000	32.783	32.783	1.492945	31

Millennium Separation Report
Report Method: TESTE_GPC
For Sample: H1- 7horas
Proc Chan: SATIN
Baseline Noise:
Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Vial: 7

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 19/04/96 15:26:06

Baseline Drift:

Relatório para a amostra H1/7 horas

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H1- 7horas

Vial: 7

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 12/04/96 21:20:20

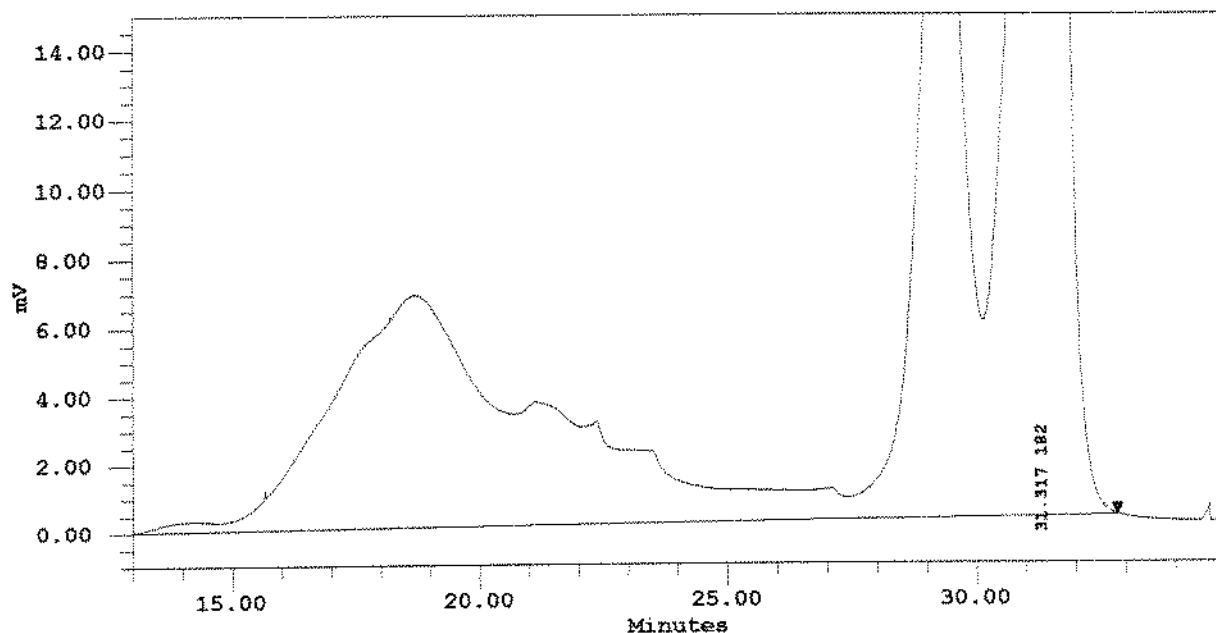
Date Processed: 19/04/96 15:26:06

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE_GPC
 For Sample: H1- 7thoras
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 2 of 2

Version: 2.10

Vial: 7

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 19/04/96 15:26:06

Baseline Drift:

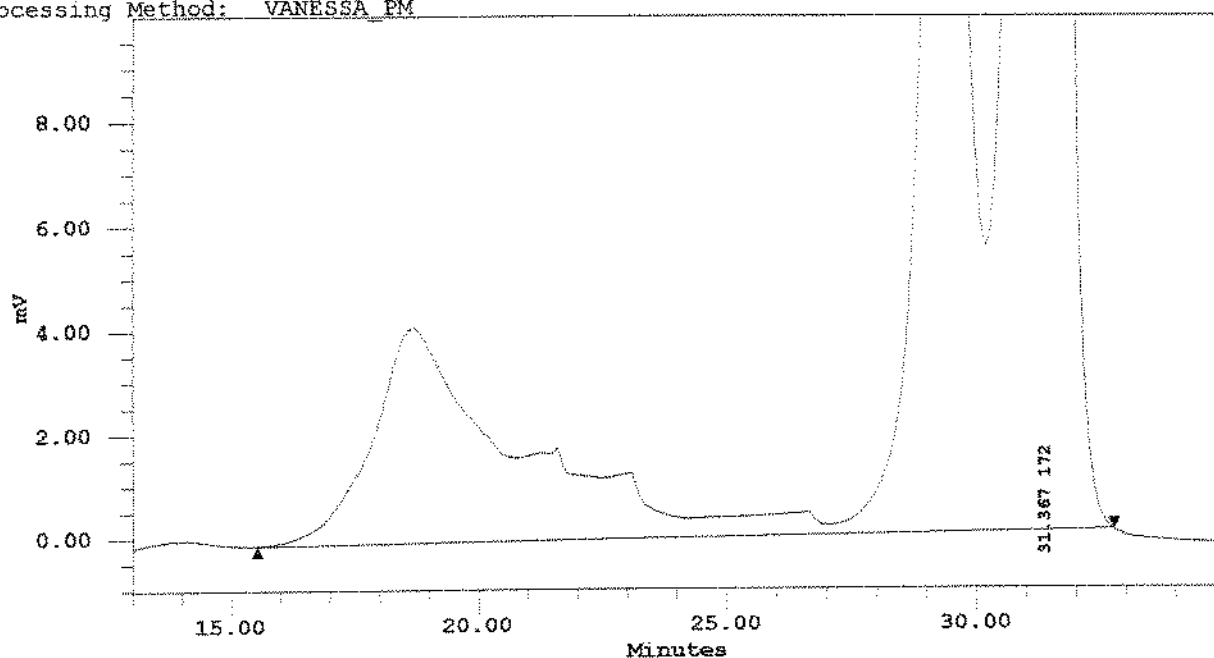
Slice Table showing 50 of 1195 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	280	0.236	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	265	0.310	14.880	14.880	7.500565	31663934
3	447	0.406	15.253	15.253	7.345744	22168888
4	875	0.586	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	1516	0.922	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	2325	1.462	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	3140	2.233	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	3989	3.229	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	5003	4.494	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	5602	5.989	17.867	17.867	6.412612	2585902
11	6141	7.625	18.240	18.240	6.297111	1982036
12	6765	9.444	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	6498	11.320	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	5615	13.013	19.360	19.360	5.970508	934347
15	4604	14.432	19.733	19.733	5.867242	736618
16	3780	15.588	20.107	20.107	5.766262	583797
17	3344	16.571	20.480	20.480	5.667257	464790
18	3307	17.492	20.853	20.853	5.569918	371465
19	3602	18.474	21.227	21.227	5.473936	297808
20	3357	19.452	21.600	21.600	5.379002	239333
21	2900	20.319	21.973	21.973	5.284806	192666
22	2995	21.125	22.347	22.347	5.191039	155253
23	2198	21.822	22.720	22.720	5.097392	125139
24	2142	22.425	23.093	23.093	5.003554	100822
25	2100	23.019	23.467	23.467	4.909217	81137
26	1353	23.493	23.840	23.840	4.814071	65173
27	1110	23.831	24.213	24.213	4.717807	52216
28	989	24.121	24.587	24.587	4.620116	41698
29	918	24.385	24.960	24.960	4.526687	33166
30	915	24.643	25.333	25.333	4.419212	26255
31	869	24.895	25.707	25.707	4.315381	20672
32	869	25.140	26.080	26.080	4.208866	16177
33	864	25.379	26.453	26.453	4.099415	12572
34	859	25.617	26.827	26.827	3.986661	9698
35	773	25.859	27.200	27.200	3.870314	7418
36	669	26.042	27.573	27.573	3.750063	5624
37	1040	26.276	27.947	27.947	3.625600	4223
38	2135	26.695	28.320	28.320	3.496616	3138
39	7068	27.845	28.693	28.693	3.362801	2306
40	18990	31.496	29.067	29.067	3.223846	1674
41	21086	37.560	29.440	29.440	3.079441	1201
42	10511	41.960	29.813	29.813	2.929276	850
43	5846	43.944	30.187	30.187	2.773044	593
44	13341	46.457	30.560	30.560	2.610433	408
45	39928	52.993	30.933	30.933	2.441136	276
46	93764	73.177	31.307	31.307	2.264841	184
47	43771	93.783	31.680	31.680	2.081240	121
48	5255	99.272	32.053	32.053	1.690023	76
49	667	99.935	32.427	32.427	1.690882	49
50	30	100.000	32.800	32.800	1.483507	30

Millennium Separation Report	Printed: December 3, 1996	Page: 1 of 2
Report Method: TESTE_GPC	Version: 2.10	
For Sample: H2-1hora	Vial: 2	Injection: 1
Proc Chan: SATIN	Processed: 22/05/96 14:17:02	Chan: SATIN
Baseline Noise:	Baseline Drift:	
Channel Descr: REFRACT		

Relatório para a amostra H2/1 hora

Project Name:	DEXTRANA_1		
Sample Name:	H2-1hora		
Vial:	2	Sample Type:	Broad Unknown
Injection:	1	Volume:	98.00
Channel:	SATIN	Run Time:	35.0 min
Date Acquired:	04/04/96 10:49:19	Date Processed:	22/05/96 14:17:02
SampleWeight:	1.00000	Dilution:	1.00000
Acq Meth Set:	DEXT_MS		
Processing Method:	VANESSA_PM		



Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: H2-1hora

Vial: 2

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 22/05/96 14:17:02

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

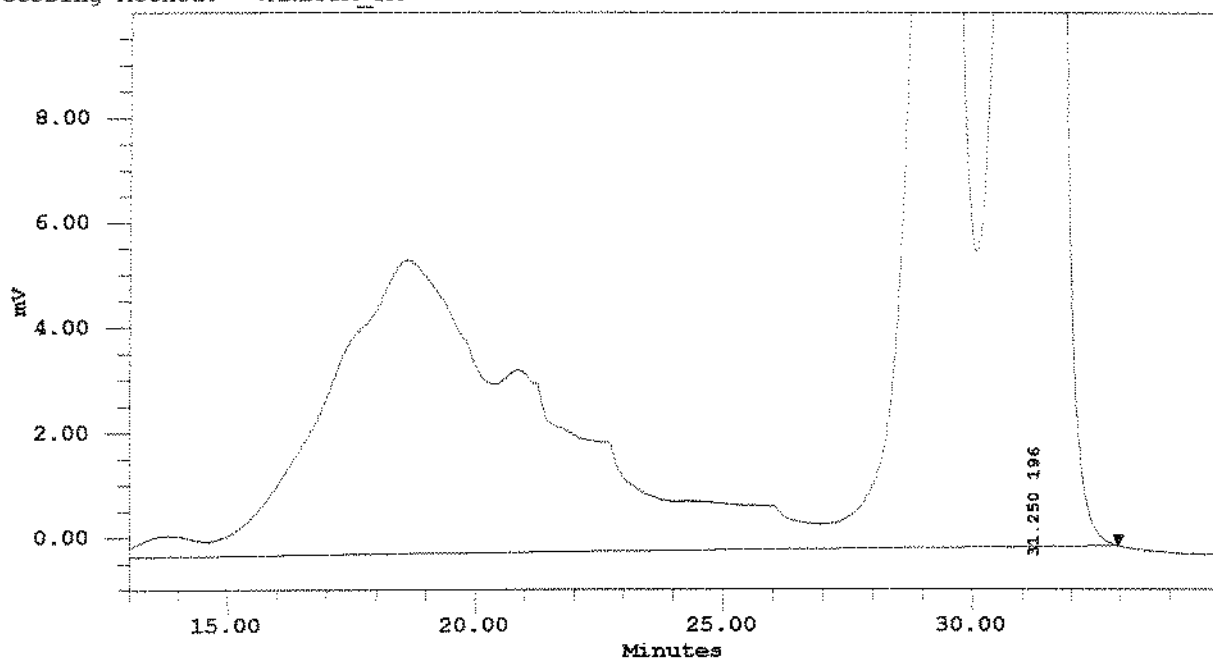
Slice Table showing 50 of 1034 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	23	0.005	15.878	15.878	7.100080	12591581
2	90	0.025	16.222	16.222	6.971242	9359274
3	234	0.078	16.566	16.566	6.846823	7027860
4	451	0.187	16.911	16.911	6.726581	5328303
5	863	0.406	17.255	17.255	6.610272	4076358
6	1394	0.790	17.599	17.599	6.497656	3145253
7	2178	1.382	17.944	17.944	6.388487	2446170
8	3395	2.317	18.288	18.288	6.282523	1916564
9	4128	3.610	18.632	18.632	6.179523	1511900
10	3817	4.962	18.977	18.977	6.079243	1200170
11	3150	6.123	19.321	19.321	5.981440	958164
12	2602	7.073	19.665	19.665	5.885872	768904
13	2210	7.874	20.010	20.010	5.792296	619863
14	1816	8.550	20.354	20.354	5.700469	501729
15	1599	9.110	20.698	20.698	5.610146	407519
16	1637	9.648	21.043	21.043	5.521091	331964
17	1670	10.204	21.387	21.387	5.433055	271053
18	1404	10.756	21.731	21.731	5.345797	221716
19	1222	11.178	22.076	22.076	5.259074	181583
20	1183	11.581	22.420	22.420	5.172644	148814
21	1204	11.974	22.764	22.764	5.086264	121973
22	1239	12.385	23.109	23.109	4.999691	99929
23	578	12.659	23.453	23.453	4.912682	81787
24	436	12.826	23.797	23.797	4.824996	66834
25	368	12.958	24.142	24.142	4.736388	54499
26	348	13.075	24.486	24.486	4.646615	44322
27	361	13.197	24.830	24.830	4.555437	35928
28	369	13.319	25.175	25.175	4.462609	29014
29	380	13.443	25.519	25.519	4.367888	23329
30	390	13.570	25.863	25.863	4.271034	18665
31	397	13.702	26.208	26.208	4.171801	14853
32	418	13.840	26.552	26.552	4.069948	11748
33	204	13.953	26.896	26.896	3.965231	9231
34	182	14.074	27.241	27.241	3.857409	7201
35	324	14.097	27.585	27.585	3.746238	5575
36	694	14.263	27.929	27.929	3.631477	4260
37	1494	14.617	28.274	28.274	3.512880	3257
38	4009	15.462	28.618	28.618	3.390207	2456
39	12218	18.055	28.962	28.962	3.263214	1833
40	20487	23.849	29.307	29.307	3.131659	1354
41	15517	30.169	29.651	29.651	2.995298	989
42	7195	33.775	29.995	29.995	2.853891	714
43	6593	35.782	30.340	30.340	2.707191	510
44	14627	39.299	30.684	30.684	2.554959	359
45	40321	47.404	31.028	31.028	2.396950	249
46	87471	70.723	31.373	31.373	2.232923	171
47	39323	93.183	31.717	31.717	2.062633	116
48	5969	99.141	32.061	32.061	1.885841	77
49	684	99.926	32.406	32.406	1.702300	50
50	0	100.000	32.750	32.750	1.511769	32

Millennium Separation Report	Printed: December 3, 1996	Page: 1 of 2
Report Method: TESTE_GPC	Version: 2.10	
For Sample: H2- 6horas	Vial: 7	Injection: 1 Chan: SATIN
Proc Chan: SATIN	Processed: 19/04/96 10:55:57	
Baseline Noise:	Baseline Drift:	
Channel Descr: REFRACT		

Relatório para a amostra H2/6 horas

Project Name:	DEXTRANA_1		
Sample Name:	H2- 6horas		
Vial:	7	Sample Type:	Broad Unknown
Injection:	1	Volume:	98.00
Channel:	SATIN	Run Time:	35.0 min
Date Acquired:	04/04/96 14:10:49	Date Processed:	19/04/96 10:55:57
SampleWeight:	1.00000	Dilution:	1.00000
Acq Meth Set:	DEXT_MS		
Processing Method:	VANESSA_PM		



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE_GPC
 For Sample: H2- 6horas
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996
 Version: 2.10
 Vial: 7 Injection: 1
 Processed: 19/04/96 10:55:57
 Baseline Drift:

Page: 2 of 2

Chan: SATIN

Slice Table showing 50 of 1232 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	277	0.408	14.507	14.507	7.661694	45887414
2	336	0.493	14.880	14.880	7.500565	31663934
3	516	0.614	15.253	15.253	7.345744	22168888
4	848	0.814	15.627	15.627	7.196921	15736961
5	1308	1.132	16.000	16.000	7.053786	11318425
6	1868	1.604	16.373	16.373	6.916031	8241963
7	2448	2.240	16.747	16.747	6.783345	6072185
8	3277	3.078	17.120	17.120	6.655420	4522929
9	4070	4.172	17.493	17.493	6.531945	3403649
10	4434	5.428	17.867	17.867	6.412612	2685902
11	5090	6.824	18.240	18.240	6.297111	1982036
12	5674	8.414	18.613	18.613	6.185134	1531559
13	5276	10.018	18.987	18.987	6.076369	1192255
14	4803	11.496	19.360	19.360	5.970508	934347
15	4146	12.806	19.733	19.733	5.867242	736618
16	3375	13.908	20.107	20.107	5.766262	583797
17	3216	14.860	20.480	20.480	5.667257	464790
18	3466	15.848	20.853	20.853	5.569918	371465
19	3209	16.829	21.227	21.227	5.473936	297808
20	2429	17.627	21.600	21.600	5.379002	239333
21	2245	18.313	21.973	21.973	5.284806	192666
22	2109	18.948	22.347	22.347	5.191039	155253
23	2060	19.560	22.720	22.720	5.097392	125139
24	1306	20.028	23.093	23.093	5.003554	100822
25	1075	20.375	23.467	23.467	4.909217	81137
26	958	20.670	23.840	23.840	4.814071	65173
27	933	20.944	24.213	24.213	4.717807	52216
28	916	21.217	24.587	24.587	4.620116	41698
29	880	21.483	24.960	24.960	4.520687	33166
30	852	21.738	25.333	25.333	4.419212	26255
31	836	21.985	25.707	25.707	4.315381	20672
32	808	22.228	26.080	26.080	4.208886	16177
33	538	22.408	26.453	26.453	4.099415	12572
34	471	22.584	26.827	26.827	3.986661	9698
35	474	22.692	27.200	27.200	3.870314	7418
36	629	22.852	27.573	27.573	3.750063	5624
37	1085	23.086	27.947	27.947	3.625600	4223
38	2501	23.582	28.320	28.320	3.496616	3138
39	9354	25.138	28.693	28.693	3.362801	2306
40	22564	29.970	29.067	29.067	3.223846	1674
41	20661	36.839	29.440	29.440	3.079441	1201
42	8908	41.034	29.813	29.813	2.929276	850
43	6277	42.922	30.187	30.187	2.773044	593
44	15258	46.001	30.560	30.560	2.610433	408
45	49866	54.241	30.933	30.933	2.441136	276
46	92917	78.202	31.307	31.307	2.264841	184
47	28783	96.067	31.680	31.680	2.081240	121
48	3525	99.531	32.053	32.053	1.890023	78
49	452	99.946	32.427	32.427	1.690882	49
50	46	99.998	32.800	32.800	1.483507	30

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: H7-1 hora

Vial: 1

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 10:33:12

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Relatório para a amostra H7/1hora

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H7-1 hora

Vial: 1

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 09/04/96 14:26:45

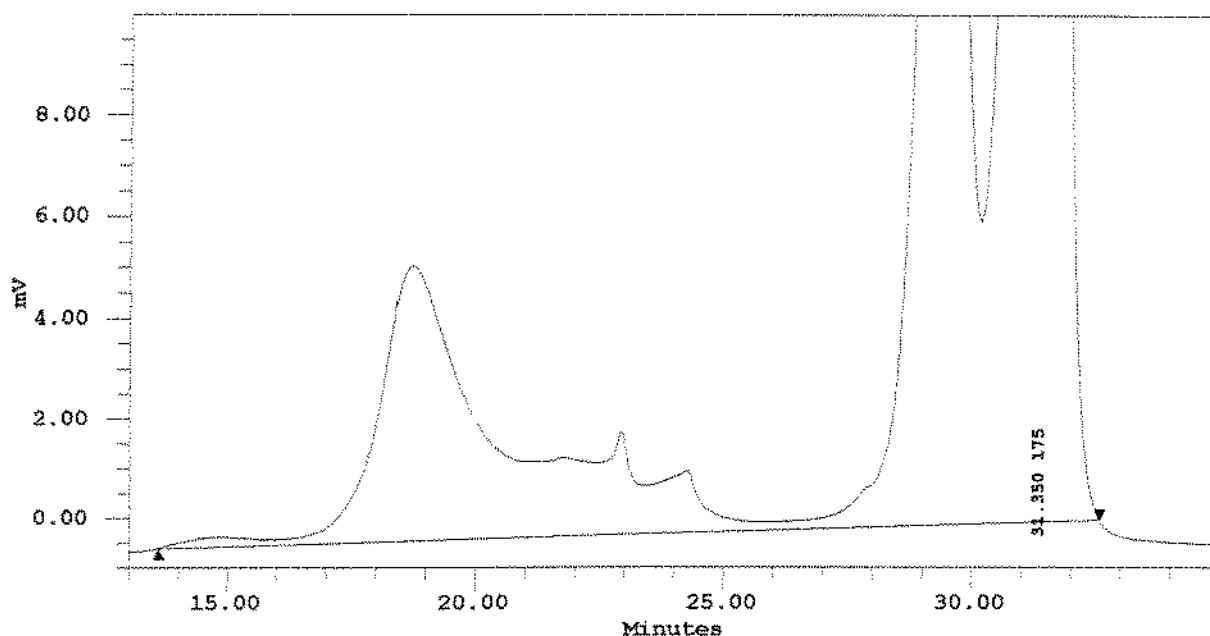
Date Processed: 18/04/96 10:33:12

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE_GPC
 For Sample: H7-1 hora
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 2 of 2

Version: 2.10

Vial: 1

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 10:33:12

Baseline Drift:

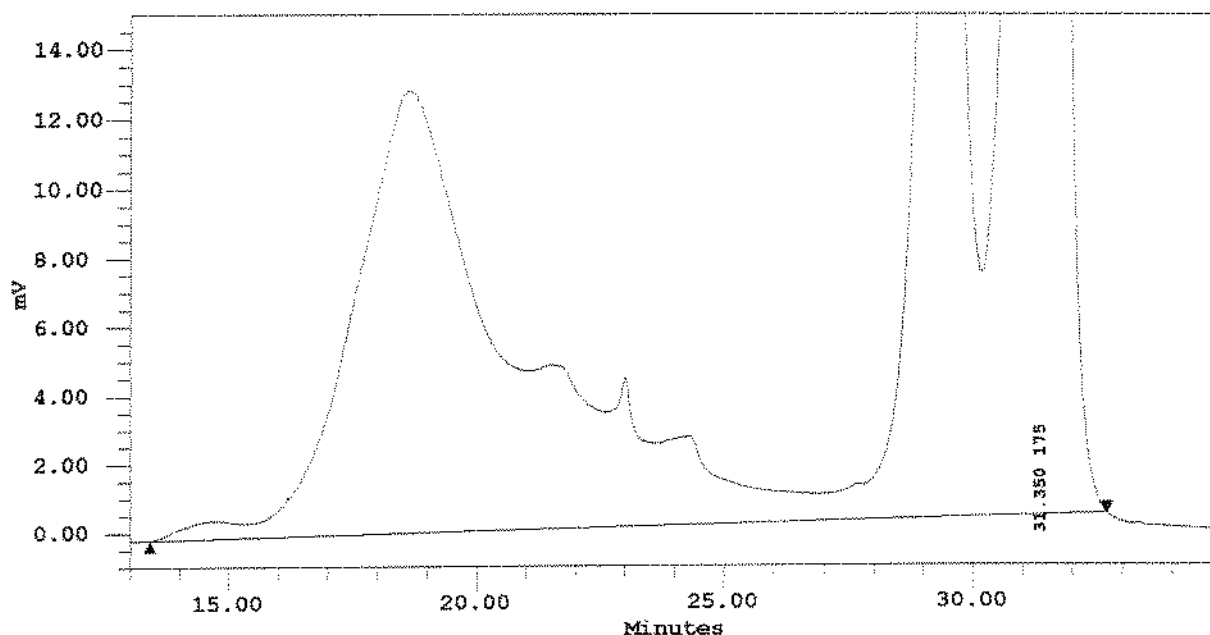
Slice Table showing 50 of 1140 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	182	0.081	14.501	14.501	7.664336	46167476
2	194	0.140	14.868	14.868	7.505644	32036442
3	168	0.196	15.235	15.235	7.353068	22545935
4	133	0.241	15.603	15.603	7.206313	16081012
5	118	0.276	15.970	15.970	7.065085	11616757
6	125	0.312	16.337	16.337	6.929088	8493529
7	182	0.358	16.705	16.705	6.798029	6280999
8	343	0.437	17.072	17.072	6.671611	4694733
9	775	0.608	17.439	17.439	6.549541	3544388
10	1569	0.963	17.807	17.807	6.431524	2700996
11	3303	1.706	18.174	18.174	6.317265	2076181
12	5187	3.070	18.541	18.541	6.206469	1608679
13	5292	4.747	18.909	18.909	6.098843	1255575
14	4252	6.232	19.276	19.276	5.994090	986484
15	3199	7.376	19.643	19.643	5.891916	779679
16	2386	8.227	20.011	20.011	5.792027	619480
17	1868	8.873	20.378	20.378	5.694127	494456
18	1580	9.400	20.745	20.745	5.597923	396208
19	1503	9.873	21.113	21.113	5.503119	318507
20	1504	10.341	21.480	21.480	5.409421	256697
21	1557	10.822	21.847	21.847	5.316534	207269
22	1465	11.292	22.215	22.215	5.224163	167557
23	1440	11.741	22.582	22.582	5.132013	135523
24	2051	12.257	22.949	22.949	5.039791	109595
25	980	12.670	23.317	23.317	4.947200	88552
26	1003	12.973	23.684	23.684	4.853947	71441
27	1136	13.304	24.051	24.051	4.759736	57509
28	894	13.660	24.419	24.419	4.664273	46161
29	389	13.828	24.786	24.786	4.567264	36920
30	245	13.921	25.153	25.153	4.468412	29404
31	179	13.984	25.521	25.521	4.367425	23304
32	158	14.035	25.888	25.888	4.264007	18366
33	153	14.084	26.255	26.255	4.167863	14383
34	163	14.135	26.623	26.623	4.068696	11187
35	199	14.191	26.990	26.990	3.966219	8634
36	303	14.269	27.357	27.357	3.8620130	6609
37	595	14.403	27.725	27.725	3.7600136	5013
38	957	14.649	28.092	28.092	3.6575943	3767
39	2564	15.142	28.459	28.459	3.447256	2801
40	10181	16.915	28.827	28.827	3.313781	2060
41	23988	22.409	29.194	29.194	3.175221	1497
42	21544	30.035	29.561	29.561	3.031284	1075
43	9319	34.652	29.929	29.929	2.881674	762
44	6730	38.772	30.296	30.296	2.726096	532
45	15983	42.224	30.663	30.663	2.564256	367
46	48598	48.900	31.031	31.031	2.395860	249
47	98046	74.542	31.398	31.398	2.220610	166
48	33353	95.392	31.765	31.765	2.038216	109
49	3751	99.601	32.133	32.133	1.848179	71
50	178	99.996	32.500	32.500	1.650807	45

Millennium Separation Report	Printed: December 3, 1996	Page: 1 of 2
Report Method: TESTE_GPC	Version: 2.10	
For Sample: H7 - 7 horas	Vial: 7	Injection: 1
Proc Chan: SATIN	Processed: 18/04/96 11:04:54	Chan: SATIN
Baseline Noise:	Baseline Drift:	
Channel Descr: REFRACT		

Relatório para a amostra H7/7 horas

Project Name:	DEXTRANA_1	Sample Type:	Broad Unknown
Sample Name:	H7 - 7 horas	Volume:	98.00
Vial:	7	Run Time:	35.0 min
Injection:	1	Date Processed:	18/04/96 11:04:54
Channel:	SATIN	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/04/96 19:49:12		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	DEXT_MS		
Processing Method:	VANESSA_PM		



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE GPC
 For Sample: H7 - 7 horas
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 2 of 2

Version: 2.10

Vial: 7

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 11:04:54

Baseline Drift:

Slice Table showing 50 of 1160 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	506	0.157	14.501	14.501	7.664336	46167476
2	503	0.263	14.868	14.868	7.505644	32036442
3	411	0.356	15.235	15.235	7.353068	22545935
4	435	0.440	15.603	15.603	7.206313	16081012
5	712	0.556	15.970	15.970	7.065085	11616757
6	1317	0.765	16.337	16.337	6.929088	8493529
7	2326	1.140	16.705	16.705	6.798029	6280999
8	3850	1.774	17.072	17.072	6.671611	4694733
9	6132	2.806	17.439	17.439	6.549541	3544388
10	8536	4.339	17.807	17.807	6.431524	2700996
11	10957	6.350	18.174	18.174	6.317265	2076181
12	12699	8.821	18.541	18.541	6.206469	1608679
13	12287	11.441	18.909	18.909	6.098843	1255575
14	10441	13.791	19.276	19.276	5.994090	986484
15	8419	15.730	19.643	19.643	5.891916	778679
16	6556	17.263	20.011	20.011	5.792027	619480
17	5290	18.470	20.378	20.378	5.694127	494456
18	4747	19.496	20.745	20.745	5.597923	396208
19	4609	20.458	21.113	21.113	5.503119	318507
20	4753	21.425	21.480	21.480	5.409421	256697
21	4509	22.398	21.847	21.847	5.316534	207269
22	3669	23.228	22.215	22.215	5.224163	167557
23	3366	23.946	22.582	22.582	5.132013	135523
24	3919	24.661	22.949	22.949	5.039791	109595
25	2559	25.361	23.317	23.317	4.947200	88552
26	2397	25.863	23.684	23.684	4.853947	71441
27	2508	26.370	24.051	24.051	4.759736	57509
28	2374	26.894	24.419	24.419	4.664273	46161
29	1402	27.291	24.786	24.786	4.567264	36920
30	1172	27.516	25.153	25.153	4.468412	29404
31	1007	27.740	25.521	25.521	4.367425	23304
32	905	27.937	25.888	25.888	4.264007	18366
33	839	28.117	26.255	26.255	4.157863	14383
34	786	28.285	26.623	26.623	4.048698	11187
35	761	28.443	26.990	26.990	3.936219	8634
36	820	28.603	27.357	27.357	3.820130	6609
37	1015	28.794	27.725	27.725	3.700136	5013
38	1386	29.023	28.092	28.092	3.575943	3767
39	3482	29.481	28.459	28.459	3.447256	2801
40	13165	31.039	28.827	28.827	3.313781	2060
41	29229	35.599	29.194	29.194	3.175221	1497
42	25527	41.678	29.561	29.561	3.031284	1075
43	11017	45.316	29.929	29.929	2.881674	762
44	8038	46.985	30.296	30.296	2.726096	532
45	19548	49.752	30.663	30.663	2.564256	367
46	62835	57.189	31.031	31.031	2.395860	249
47	120268	78.438	31.398	31.398	2.220610	166
48	43256	95.723	31.765	31.765	2.038216	109
49	5712	99.536	32.133	32.133	1.848379	71
50	522	99.980	32.500	32.500	1.650807	45

Millennium Separation Report
Report Method: TESTE_GPC
For Sample: H5-4 horas
Proc Chan: SATIN
Baseline Noise:
Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Vial: 8

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:27:32

Baseline Drift:

Relatório para a amostra H5/4 horas

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H5-4 horas

Vial: 8

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 01/04/96 20:16:51

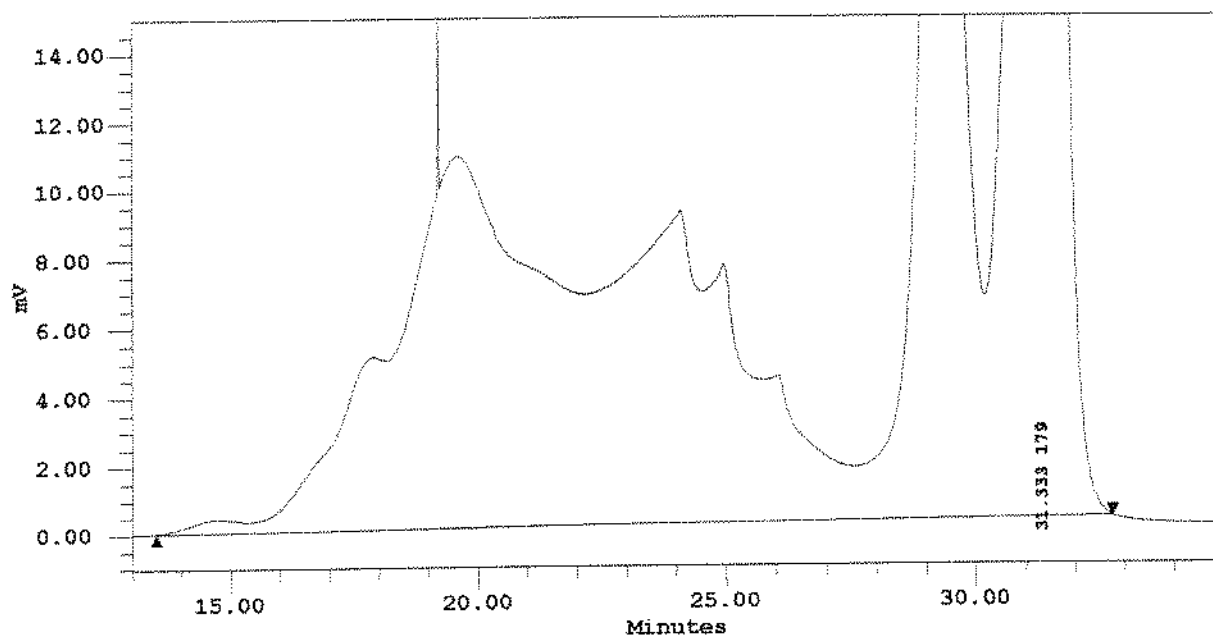
Date Processed: 18/04/96 13:27:32

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE_GPC
 For Sample: H5-4 horas
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 2 of 2

Version: 2.10

Vial: 8

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:27:32

Baseline Drift:

Slice Table showing 50 of 1157 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	349	0.087	14.506	14.506	7.662134	45933938
2	386	0.164	14.878	14.878	7.501411	31725678
3	296	0.234	15.250	15.250	7.346964	22231249
4	340	0.297	15.623	15.623	7.198485	15793726
5	643	0.393	15.995	15.995	7.055667	11367548
6	1261	0.585	16.367	16.367	6.918204	8283309
7	2012	0.924	16.740	16.740	6.785788	6106440
8	2648	1.396	17.112	17.112	6.658113	4551065
9	4059	2.071	17.484	17.484	6.534872	3426666
10	5029	3.027	17.857	17.857	6.415757	2604697
11	4951	4.040	18.229	18.229	6.300463	1997389
12	6171	5.147	18.601	18.601	6.188681	1544120
13	8443	6.642	18.974	18.974	6.080106	1202557
14	10325	8.626	19.346	19.346	5.974429	942821
15	10755	10.805	19.718	19.718	5.871345	743610
16	9516	12.879	20.091	20.091	5.770547	589585
17	8213	14.672	20.463	20.463	5.671726	469598
18	7692	16.279	20.835	20.835	5.574577	375472
19	7441	17.818	21.208	21.208	5.478793	301157
20	7097	19.287	21.580	21.580	5.384066	242140
21	6788	20.704	21.952	21.952	5.290090	195025
22	6746	22.075	22.325	22.325	5.196558	157238
23	6960	23.468	22.697	22.697	5.103163	126813
24	7369	24.925	23.069	23.069	5.009598	102235
25	7908	26.481	23.442	23.442	4.915556	82330
26	8535	28.156	23.814	23.814	4.820730	66181
27	8582	29.953	24.186	24.186	4.724813	53066
28	8745	31.418	24.559	24.559	4.627499	42413
29	7395	32.830	24.931	24.931	4.526480	33766
30	4637	34.062	25.303	25.303	4.427449	26758
31	4140	34.934	25.676	25.676	4.324100	21091
32	4244	35.781	26.048	26.048	4.218126	16524
33	2663	36.465	26.420	26.420	4.109219	12859
34	2128	36.948	26.793	26.793	3.997073	9933
35	1741	37.336	27.165	27.165	3.881382	7610
36	1555	37.667	27.537	27.537	3.761837	5779
37	1680	37.991	27.910	27.910	3.638132	4346
38	2397	38.393	28.282	28.282	3.509961	3236
39	6333	39.186	28.654	28.654	3.377015	2382
40	20774	41.831	29.027	29.027	3.238988	1734
41	29164	47.364	29.399	29.399	3.095575	1246
42	15757	52.036	29.771	29.771	2.946467	884
43	6571	54.047	30.144	30.144	2.791357	619
44	12863	55.792	30.516	30.516	2.629939	427
45	30831	59.876	30.888	30.888	2.461906	290
46	109230	74.097	31.261	31.261	2.286951	194
47	61276	93.892	31.633	31.633	2.104767	127
48	7991	99.343	32.005	32.005	1.915046	82
49	806	99.946	32.378	32.378	1.717482	52
50	0	100.000	32.750	32.750	1.511769	32

Millennium Separation Report
Report Method: TESTE_GPC
For Sample: H5-5 horas
Proc Chan: SATIN
Baseline Noise:
Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Vial: 10

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:34:46

Baseline Drift:

Relatório para a amostra H5/5 horas

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H5-5 horas

Vial: 10

Sample Type: Broad Unknown

Injection: 1

Volume: 98.00

Channel: SATIN

Run Time: 35.0 min

Date Acquired: 01/04/96 21:29:58

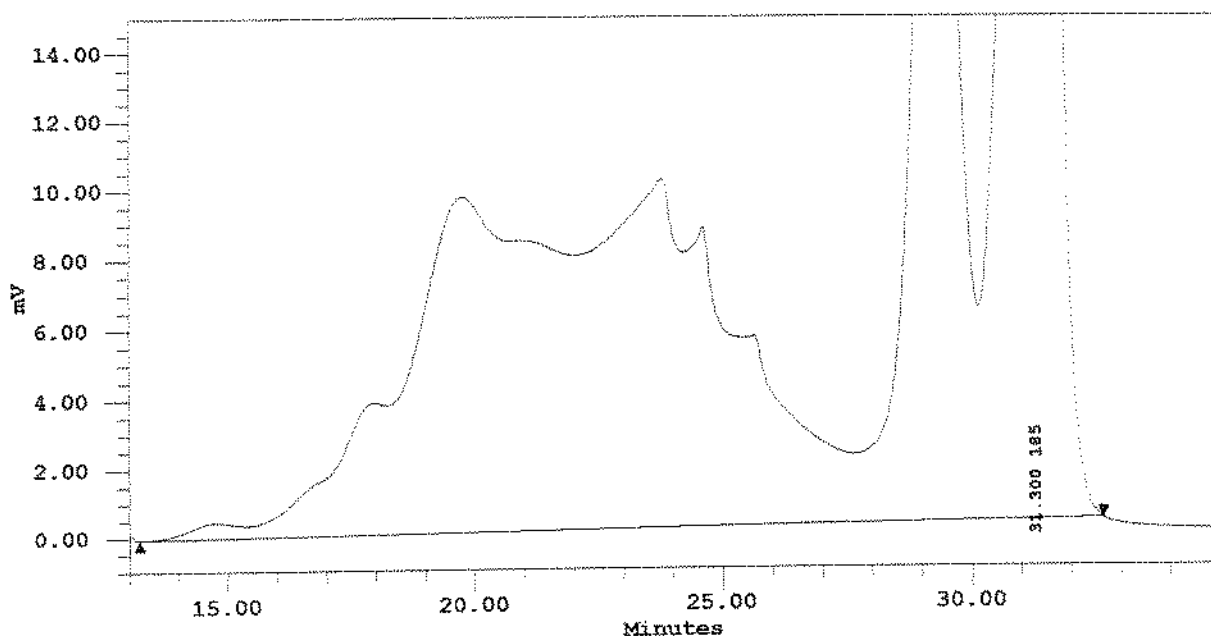
Date Processed: 18/04/96 13:34:46

SampleWeight: 1.00000

Dilution: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE GPC
 For Sample: H5-5 horas
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 2 of 2

Version: 2.10

Vial: 10

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:34:46

Baseline Drift:

Slice Table showing 50 of 1170 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	403	0.092	14.504	14.504	7.662868	46011684
2	448	0.180	14.875	14.875	7.502822	31828913
3	355	0.259	15.245	15.245	7.346997	22335582
4	368	0.328	15.616	15.616	7.201092	15888842
5	588	0.422	15.987	15.987	7.058803	11449947
6	1002	0.579	16.357	16.357	6.921828	8352718
7	1451	0.829	16.728	16.728	6.789863	6164008
8	1782	1.150	17.099	17.099	6.662606	4598396
9	2737	1.590	17.469	17.469	6.539755	3465410
10	3742	2.253	17.840	17.840	6.421005	2636362
11	3755	3.009	18.211	18.211	6.306055	2023275
12	4245	3.785	18.581	18.581	6.194601	1565313
13	6091	4.806	18.952	18.952	6.086342	1219949
14	6380	5.262	19.323	19.323	5.980973	957134
15	9634	8.091	19.693	19.693	5.878192	755426
16	9237	9.989	20.064	20.064	5.777696	599371
17	8511	11.744	20.435	20.435	5.679163	477731
18	8350	13.414	20.805	20.805	5.582350	382252
19	8314	15.075	21.176	21.176	5.486894	306827
20	8099	16.711	21.547	21.547	5.392512	246895
21	7907	18.302	21.917	21.917	5.298901	199022
22	7955	19.879	22.288	22.288	5.205758	160605
23	8280	21.493	22.659	22.659	5.112781	129653
24	8783	23.192	23.029	23.029	5.019667	104633
25	9370	25.000	23.400	23.400	4.926113	84355
26	10022	26.930	23.771	23.771	4.831816	67892
27	7969	28.707	24.141	24.141	4.736473	54510
28	8221	30.302	24.512	24.512	4.638783	43830
29	6155	31.815	24.883	24.883	4.541440	34789
30	5456	32.943	25.253	25.253	4.441144	27625
31	5452	34.024	25.624	25.624	4.338591	21807
32	3864	34.950	25.995	25.995	4.233478	17119
33	3198	35.645	26.365	26.365	4.125503	13351
34	2677	36.235	26.736	26.736	4.014363	10336
35	2285	36.716	27.107	27.107	3.899754	7939
36	2028	37.142	27.477	27.477	3.781374	6045
37	2051	37.543	27.848	27.848	3.658920	4560
38	2650	37.989	28.219	28.219	3.532090	3405
39	6216	38.795	28.589	28.589	3.400581	2515
40	20284	41.302	28.960	28.960	3.264089	1837
41	30297	48.765	29.331	29.331	3.122313	1325
42	17333	51.653	29.701	29.701	2.974949	944
43	6518	53.764	30.072	30.072	2.821694	663
44	12017	55.349	30.443	30.443	2.662245	459
45	27909	59.107	30.813	30.813	2.496300	314
46	105838	71.888	31.184	31.184	2.323556	211
47	72318	92.572	31.555	31.555	2.143710	139
48	10370	99.180	31.925	31.925	1.956460	90
49	1000	99.939	32.296	32.296	1.761502	58
50	-27	100.000	32.667	32.667	1.558533	36

Report Method: TESTE_GPC

Version: 2.10

For Sample: H5-6 horas

Vial: 11

Injection: 1

Chan: SATIN

Proc Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:38:36

Baseline Noise:

Baseline Drift:

Channel Descr: REFRACT

Slice Table showing 50 of 1130 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	265	0.043	14.505	14.505	7.662281	45949487
2	293	0.108	14.877	14.877	7.501693	31746290
3	244	0.166	15.249	15.249	7.347370	22252061
4	470	0.240	15.621	15.621	7.199006	15812698
5	617	0.356	15.993	15.993	7.056294	11383978
6	1006	0.535	16.365	16.365	6.918928	8297133
7	1250	0.795	16.737	16.737	6.786603	6117904
8	1279	1.067	17.109	17.109	6.659011	4560487
9	2149	1.432	17.481	17.481	6.535848	3434376
10	2985	2.024	17.853	17.853	6.416806	2610997
11	2707	2.668	18.225	18.225	6.301580	2002535
12	2471	3.224	18.597	18.597	6.189864	1548333
13	3466	3.861	18.969	18.969	6.081352	1206013
14	5382	4.841	19.341	19.341	5.975737	945665
15	7030	6.239	19.713	19.713	5.872714	745957
16	7448	7.863	20.085	20.085	5.771976	591529
17	7346	9.496	20.457	20.457	5.673217	471213
18	7493	11.134	20.829	20.829	5.576131	376817
19	7648	12.813	21.201	21.201	5.480412	302282
20	7594	14.502	21.573	21.573	5.385755	243083
21	7504	16.168	21.945	21.945	5.291852	195818
22	7635	17.836	22.317	22.317	5.198398	157906
23	8041	19.564	22.689	22.689	5.105087	127376
24	8642	21.410	23.061	23.061	5.011612	102710
25	9364	23.404	23.433	23.433	4.917668	82731
26	10209	25.566	23.805	23.805	4.822948	66519
27	8290	27.577	24.177	24.177	4.727147	53352
28	8577	29.430	24.549	24.549	4.629958	42654
29	7130	31.317	24.921	24.921	4.531075	33968
30	6046	32.715	25.293	25.293	4.430192	26927
31	6104	34.053	25.665	25.665	4.327003	21233
32	4272	35.181	26.037	26.037	4.221282	16642
33	3608	36.042	26.409	26.409	4.112482	12956
34	3093	36.787	26.781	26.781	4.000538	10012
35	2687	37.421	27.153	27.153	3.885064	7675
36	2380	37.975	27.525	27.525	3.765753	5831
37	2353	38.491	27.897	27.897	3.642300	4388
38	2955	39.062	28.269	28.269	3.514398	3269
39	6791	40.041	28.641	28.641	3.381741	2408
40	20601	42.982	29.013	29.013	3.244023	1754
41	26202	48.637	29.385	29.385	3.100939	1262
42	12987	53.003	29.757	29.757	2.952180	896
43	5541	54.780	30.129	30.129	2.797443	627
44	12716	56.598	30.501	30.501	2.636421	433
45	31783	61.000	30.873	30.873	2.468808	294
46	103175	76.433	31.245	31.245	2.294297	197
47	48290	95.054	31.617	31.617	2.112581	130
48	5655	99.496	31.989	31.989	1.923357	84
49	589	99.960	32.361	32.361	1.726318	53
50	-11	100.000	32.733	32.733	1.521156	33

Millennium Separation Report
Report Method: TESTE_GPC
For Sample: H5-7 horas
Proc Chan: SATIN
Baseline Noise:
Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 1 of 2

Version: 2.10

Vial: 12

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:44:38

Baseline Drift:

Relatório para a amostra H5/7 horas

Project Name: DEXTRANA_1

Sample Name: H5-7 horas

Vial: 12

Injection: 1

Channel: SATIN

Date Acquired: 02/04/96 10:35:29

SampleWeight: 1.00000

Acq Meth Set: DEXT_MS

Processing Method: VANESSA_PM

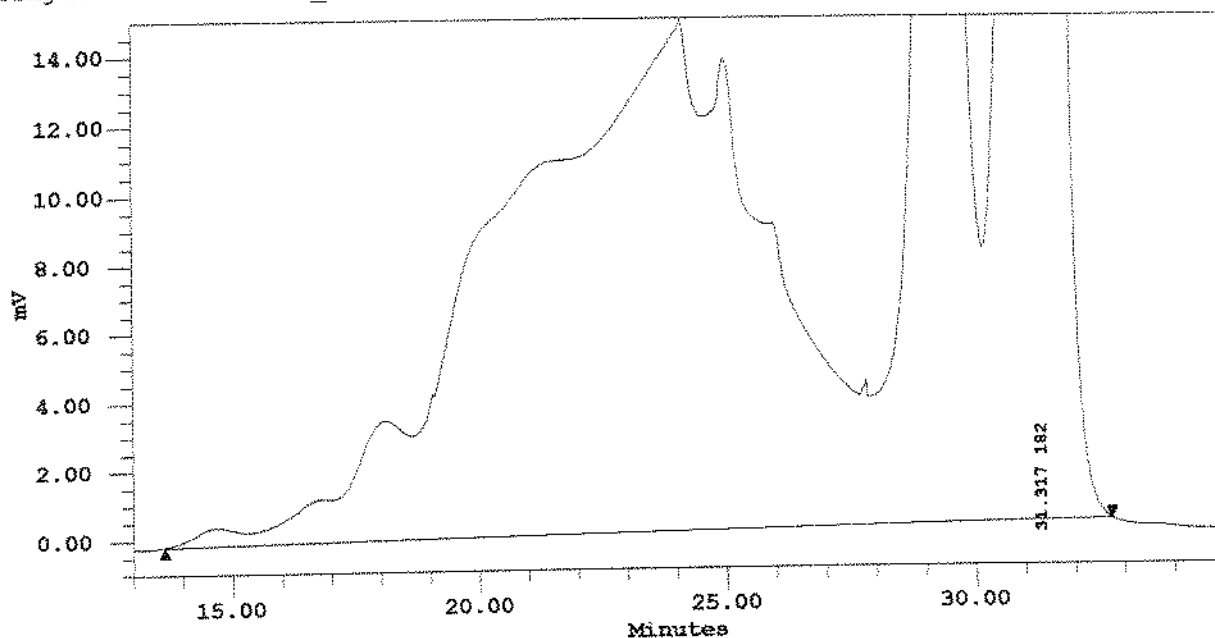
Sample Type: Broad Unknown

Volume: 98.00

Run Time: 35.0 min

Date Processed: 18/04/96 13:44:38

Dilution: 1.00000



Millennium Separation Report
 Report Method: TESTE_GPC
 For Sample: H5-7 horas
 Proc Chan: SATIN
 Baseline Noise:
 Channel Descr: REFRACT

Printed: December 3, 1996

Page: 2 of 2

Version: 2.10

Vial: 12

Injection: 1

Chan: SATIN

Processed: 18/04/96 13:44:38

Baseline Drift:

Slice Table showing 50 of 1149 slices

#	Area	Cumulative % (%)	Elution Volume (ml)	Retention Time (min)	Log Mol Wt	Mol Wt (Daltons)
1	484	0.076	14.506	14.506	7.662134	45933938
2	475	0.154	14.878	14.878	7.501411	31725678
3	347	0.217	15.250	15.250	7.346964	22231245
4	410	0.273	15.623	15.623	7.198485	15793726
5	612	0.352	15.995	15.995	7.055667	11367548
6	955	0.471	16.367	16.367	6.918204	8283309
7	1244	0.645	16.740	16.740	6.785788	6106440
8	1252	0.836	17.112	17.112	6.658113	4551065
9	1941	1.069	17.484	17.484	6.534872	3426666
10	3176	1.472	17.857	17.857	6.415757	2604697
11	3434	1.998	18.229	18.229	6.300463	1997389
12	3045	2.493	18.601	18.601	6.188681	1544120
13	3656	2.986	18.974	18.974	6.080106	1202557
14	5580	3.691	19.346	19.346	5.974429	942821
15	7850	4.739	19.718	19.718	5.871345	743610
16	8995	6.055	20.091	20.091	5.770547	589585
17	9476	7.478	20.463	20.463	5.671726	469598
18	10138	8.987	20.835	20.835	5.574577	375472
19	10715	10.597	21.208	21.208	5.478793	301157
20	10901	12.263	21.580	21.580	5.384066	242140
21	10936	13.941	21.952	21.952	5.290090	195025
22	11175	15.638	22.325	22.325	5.196556	157238
23	11732	17.399	22.697	22.697	5.103163	126813
24	12483	19.263	23.069	23.069	5.009598	102235
25	13287	21.248	23.442	23.442	4.915556	82330
26	14102	23.357	23.814	23.814	4.820730	66181
27	14310	25.584	24.186	24.186	4.724813	53066
28	12039	27.525	24.559	24.559	4.627499	42413
29	13476	29.426	24.931	24.931	4.528480	33766
30	9864	31.281	25.303	25.303	4.427449	26758
31	8965	32.703	25.676	25.676	4.324100	21091
32	8419	34.067	26.048	26.048	4.218126	16524
33	6267	35.144	26.420	26.420	4.109219	12859
34	5290	36.027	26.793	26.793	3.997073	9933
35	4500	36.775	27.165	27.165	3.881382	7610
36	3920	37.418	27.537	27.537	3.761837	5779
37	3729	38.015	27.910	27.910	3.638132	4346
38	4449	38.628	28.282	28.282	3.509961	3236
39	9648	39.624	28.654	28.654	3.377015	2382
40	29852	42.582	29.027	29.027	3.238989	1734
41	38529	48.326	29.399	29.399	3.095575	1246
42	19281	52.819	29.771	29.771	2.946467	884
43	8069	54.650	30.144	30.144	2.791357	619
44	18113	56.456	30.516	30.516	2.629939	427
45	44702	60.791	30.888	30.888	2.461906	290
46	147562	76.009	31.261	31.261	2.286951	194
47	71667	94.836	31.633	31.633	2.104767	127
48	8543	99.474	32.005	32.005	1.915046	82
49	856	99.957	32.378	32.378	1.717482	52
50	-19	100.000	32.750	32.750	1.511769	32

APÊNDICE F: Análise da variância para o ajuste de um modelo linear

Tabela F: Dados estatísticos para os modelos ajustados pelo software "Statistica"

Dados	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas
n	7	6	6	6	6	6
p-1	3	3	3	3	3	3
n-p	3	2	2	2	2	2
b0 (média)	20,5843	26,3517	25,0833	28,9950	29,6014	34,1400
b1 (pH)	-19,53	-11,6600	-14,15	-20,9575	-21,3400	-25,430
b2 (T)	4,6275	5,2200	7,14	7,7825	9,5300	11,9450
b12 (pH-T)	-5,0725	0,6750	-3,27	-7,6775	-10,2550	-12,550
R ²	0,76229	0,64002	0,77185	0,85907	0,88866	0,89453
SQReg	1715,432	654,639	1047,22	2234,912	2605,826	3788,486
MQR	571,81	218,21	349,07	744,97	868,61	1262,829
MQres	178,3154	184,0973	154,7772	183,3196	108,8182	223,3347
Fcal	3,2067	1,1853	2,2553	4,0638	7,9822	5,6544
Ftab ($\alpha=0,95$)	9,28	19,16	19,16	19,16	19,16	19,16
Ftab ($\alpha=0,90$)	5,39	9,16	9,16	9,16	9,16	9,16

onde:

n = número de ensaios

p-1 = número de graus de liberdade da regressão

n-p = número de graus de liberdade dos resíduos