

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

**Síntese do Processo de Obtenção
de Dextrana Clínica e Frutose
a partir de Sacarose**

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Guilherme Martinez Mibielli

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Guilherme Martinez Mibielli, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de março de 2001.

Campinas, 12 de março de 2001


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, na área de concentração de Bioprocessos.

Campinas, SP
Março – 2001

i



66770700

UNIDADE	Be		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	M58s		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	44482		
PROC.	16-392101		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC	R\$ 11,00		
DATA	16/05/01		
N.º CPD			

CM00156288-4

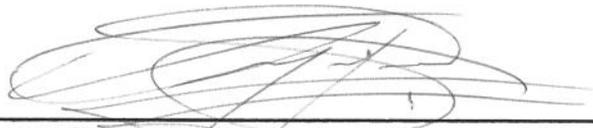
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M58s Mibielli, Guilherme Martinez
Síntese do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose / Guilherme Martinez Mibielli. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I.Frutose. 2.Sacarose. I.Maugeri Filho, Francisco.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora



Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho



Prof. Dra. Maria Isabel Rodrigues



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

DEDICATÓRIAS

À minha amável família, Pedrão, Regininha e Maninhos, pelo apoio e incentivo em todos os momentos no decorrer destes anos.

Em especial a minha querida noiva Rosiléa, pela dedicação, companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Ele, pois "*Tudo posso naquele que me fortalece*".

Ao Dr. Francisco Maugeri Filho, pela sua orientação, conhecimento e amizade no decorrer deste trabalho.

À Prof^ª. Dr Maria Isabel Rodrigues, pela amizade e apoio, e também juntamente com o Prof^º. Dr. Rubens Maciel Filho, por participarem como membros da banca do exame de qualificação.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos, Li, Lia, Luciano, Belzinha, Márcio, e em especial a Fifa, pelo apoio técnico e pelos momentos legais que curtimos juntos durante os dois anos de convívio.

Aos meus amigos de curso, Patrícia, Susi, Éder (negão), Fernando (carioca), Fernanda, Bel, Daniela, pela amizade e companheirismo.

À minha querida e já mais esquecida República, a qual era composta pelos amigos Daniel (crock), Luciana (loirinha), Alle (alezinho), Carla (magra), e mais recentemente pelo Carlos (cacá), pelos vários momentos de alegria e descontração proporcionados durante esse tempo.

À Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de demanda social que me foi concedida.

Enfim, às demais pessoas que não foram citadas aqui mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XII
RESUMO	XII
SUMARY	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Dextrana-Sacarase	5
3.1.1 Propriedades	5
3.1.2 Microrganismo	6
3.1.3 Produção da Dextrana-sacarase	7
3.1.4 Cinética Enzimática	9
3.1.5 Definição de Atividade Enzimática.....	10
3.2 Dextrana.....	10
3.2.1 Aspectos Gerais	10
3.2.2 Propriedades	12
3.2.3 Aplicações	13
3.2.4 Produção	16
3.2.5 Redução da Massa Molecular	19
3.2.6 Fracionamento.....	21
3.3 Frutose.....	23
3.3.1 Aspectos Gerais	23
3.3.2 Propriedades	24

3.3.3 Aplicações	25
3.3.4 Produção	25
3.3.5 Separação da Frutose	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Produção Dextrana	28
4.1.1 Processo Enzimático	28
4.1.2 Processo Convencional	33
4.2 Obtenção de Dextrana Clínica	35
4.2.1 Redução da Massa Molecular	35
4.2.2 Precipitação e Estocagem	36
4.3 Métodos Analíticos.....	39
4.3.1 Determinação da Massa Molecular da Dextrana.....	39
4.3.2 Determinação de Açúcares	42
4.3.3 Determinação do Rendimento	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Produção de Dextrana	49
5.1.1 Processo Enzimático	49
5.1.2 Processo Convencional	61
5.2 Obtenção de Dextrana Clínica	64
5.2.1 Hidrólise Ácida.....	65
5.2.2 Fracionamento.....	73
5.2.3 Fração Clínica.....	76
5.3 Rendimentos	78
5.3.1 Rendimento de Dextrana.....	78
5.3.2 Rendimento de Frutose	80
6. CONCLUSÕES	82
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Condições utilizadas nos experimentos de hidrólise ácida	36
Tabela 4.2: Percentuais de etanol utilizados para fracionamento de dextrana ...	37
Tabela 4.3: Concentrações de etanol utilizadas para a obtenção da fração clínica de dextrana	39
Tabela 4.4: Características das colunas utilizadas para determinação do percentual da massa molecular da dextrana	40
Tabela 4.5: Massas moleculares dos padrões de dextrana utilizados para fazer a curva padrão	42
Tabela 5.1: Concentrações da enzima dextrana-sacarase nas fermentações	49
Tabela 5.2: Acompanhamento da atividade enzimática durante a purificação da enzima dextrana-sacarase	50
Tabela 5.3: Acompanhamento da perda de atividade da enzima purificada durante a estocagem a -15°C	51
Tabela 5.4: Concentrações de açúcares da 1ª síntese enzimática com enzima purificada	53
Tabela 5.5: Concentrações de açúcares da 2ª síntese enzimática com enzima purificada	55
Tabela 5.6: Distribuição percentual da massa molecular da dextrana produzida na 2ª síntese enzimática com enzima purificada	56
Tabela 5.7: Concentrações de açúcares da 3ª síntese enzimática com enzima purificada	58
Tabela 5.8: Distribuição percentual da massa molecular da dextrana produzida na 3ª síntese enzimática com enzima purificada	59

Tabela 5.9: Concentrações de açúcares da síntese enzimática com a enzima bruta	60
Tabela 5.10: Distribuição percentual da massa molecular da dextrana produzida na síntese enzimática com enzima bruta	61
Tabela 5.11: Concentrações de açúcares produzidas no processo convencional	62
Tabela 5.12: Distribuição percentual da massa molecular produzido no processo convencional	64
Tabela 5.13: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 1ª hidrólise ácida	65
Tabela 5.14: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 2ª hidrólise ácida	66
Tabela 5.15: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 3ª hidrólise ácida	67
Tabela 5.16: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 3ª hidrólise ácida após a diálise	72
Tabela 5.17: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana no sobrenadante obtida no 1º fracionamento	73
Tabela 5.18: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana no sobrenadante obtida no 2º fracionamento	74
Tabela 5.19: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana no sobrenadante obtida no 3º fracionamento	75
Tabela 5.20: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 1ª fração clínica	76
Tabela 5.21: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 2ª fração clínica	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura de um fragmento de cadeia de dextrana	11
Figura 4.1: Fluxograma de obtenção da fração clínica	38
Figura 5.1: Perda da atividade enzimática durante o armazenamento a -15°C	51
Figura 5.2: Concentrações de açúcares da 1ª síntese enzimática com enzima purificada	53
Figura 5.3: Concentrações de açúcares da 2ª síntese enzimática com enzima purificada	55
Figura 5.4: Picos de dextrana das concentrações de 50g/L e 100g/L	57
Figura 5.5: Concentrações de açúcares da 3ª síntese enzimática com enzima purificada	58
Figura 5.6: Concentrações de açúcares da síntese enzimática com enzima bruta	60
Figura 5.7: Concentrações de açúcares produzidas no processo convencional por tempo de fermentação	63
Figura 5.8: Distribuição de dextrana do final da síntese e início da hidrólise ácida	69
Figura 5.9: Cromatograma do final da síntese de dextrana	70
Figura 5.10: Cromatograma de água acidificada com ácido sulfúrico	70
Figura 5.11: Cromatograma de água alcalinizada com hidróxido de sódio	71
Figura 5.12: Cromatograma de água acidificada com ácido sulfúrico e neutralizada com hidróxido de sódio	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UDS - unidade de dextrana sacarase

α - coeficiente angular da curva de absorvância vs. tempo

β - coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d - volume de diluição final no reator de vidro

$Y_{D>30K/S}$ - rendimento de dextrana de alta massa molecular (> 30.000 Da);

m_D - massa de dextrana produzida no processo convencional (g);

$\%_{D>30}$ - percentual de dextrana de alta massa molecular (> 30.000 Da) na síntese enzimática;

m_s - massa de sacarose utilizada no processo (inóculo e fermentação) (g).

m_{ss} - massa de sacarose utilizada na síntese enzimática (g);

$Y_{F/S}$ - rendimento de frutose;

m_F - massa de frutose produzida no processo (g);

0,474 - máximo rendimento teórico de síntese de dextrana a partir de sacarose;

RESUMO

SÍNTESE DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA E FRUTOSE A PARTIR DE SACAROSE

A dextrana é um polissacarídeo composto exclusivamente por unidades monoméricas de glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 na posição linear. Este polissacarídeo apresenta interesse industrial nas áreas de petroquímica, alimentos, química e farmacêutica. Durante o processo de síntese de dextrana ocorre a liberação de frutose, que é um monossacarídeo de grande importância na indústria de alimentos. Este trabalho teve por finalidade sintetizar as etapas do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose. A fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* foi realizada em batelada alimentada, para se obter extracelularmente a enzima dextrana-sacarase. A dextrana foi sintetizada pela enzima a partir de sacarose como substrato, onde foram testadas as concentrações de 50 g/L e 100 g/L. A dextrana clínica foi obtida pela hidrólise ácida da dextrana bruta produzida na síntese, e posterior separação com concentrações diferentes de Etanol. Os rendimentos de processo para a dextrana de alta massa molecular e a frutose obtidos em relação ao valor teórico máximo foram: processo convencional – 24,9% e 42,2%; processo enzimático com enzima bruta – 24,9% e 55,7% e processo enzimático com enzima purificada – 41,6% e 80,2%. Na síntese enzimática com enzima purificada os percentuais de dextrana de alta massa molecular obtidos foram 70,4% e 55,5% para as concentrações de sacarose de 50 g/L e 100 g/L, respectivamente. Na hidrólise ácida os melhores resultados foram obtidos com temperatura de 76°C e pH 1,0, num tempo de processo de 4,5 horas. Com os resultados obtidos conclui-se que o melhor processo de obtenção de dextrana clínica e frutose foi a síntese enzimática com enzima purificada.

SUMMARY

SYNTHESIS OF THE CLINICAL DEXTRAN AND FRUCTOSE OBTAINING PROCESS FROM SUCROSE

Dextran is a polysaccharid exclusively composed of monomeric units of glucose, joined by α -1,6 glucosidic bonds at the linear position. This polysaccharid is of a great industrial interest at the petrochemistry, food, chemistry and pharmaceutical areas. During the synthesis process of dextran occurs the fructose liberation, that is a monosaccharid of high interest in the food industry. The aim of this work was to synthesize the process steps for clinical dextran and fructose production from sucrose. The fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* was accomplished in a fed-batch process, for obtaining the extracellular dextran-sucrase enzyme. The dextran was synthesized by the enzyme using sucrose as substrate at the concentrations of 50 and 100 g/L. The clinical dextran was obtained by acid hydrolysis of the crude dextran produced at the synthesis and further separation with different ethanol concentrations. The process yields for the dextran with high molecular and fructose obtained from maximum theoretical value was: conventional process – 24,9 and 42,2%, enzymatic process with unmanufactured enzyme – 24,9 and 55,7% and enzymatic process with purified enzyme – 41,6 and 80,2%. On enzymatic process with purified enzyme, percentage of dextran of high molecular mass obtained was: 70,4 and 55,5% for sucrose concentration of 50 g/L and 100 g/L, respectively. On acid hydrolysis, the best results were obtained with temperature of 76°C and pH 1,0, in process time of 4,5 hours with results it can conclude that the best process for obtaining clinical dextran and fructose was enzymatic synthesis with purified enzyme.

1. INTRODUÇÃO

Devido ao grande avanço que a microbiologia sofreu nas últimas décadas, e em particular a biotecnologia, o interesse por produtos de origem microbiana vem aumentando cada vez mais. Os biopolímeros têm sido objeto de muito estudo, em especial os polissacarídeos, por possuírem muitas aplicações industriais. Dentre os polissacarídeos com potencial, destacam-se a dextrana e a xantana com produção em grande escala.

A dextrana é um biopolímero linear formado por unidades monoméricas de glicose, unidas predominantemente por ligações glicosídicas α (1→6). Suas aplicações industriais são bem diversificadas, devido a certas características que diferenciam a dextrana entre si, como por exemplo, o massa molecular.

A dextrana de alta massa molecular, mais conhecida como dextrana bruta, pode atingir 25 milhões de Daltons (Da) e é utilizada na recuperação secundária do petróleo, em filmes protetores para sementes, entre outros. A de média massa molecular tem grande aplicação nas indústrias química e de alimentos, onde é usada na fabricação de redes moleculares cruzadas e como espessante em doces e sorvetes, respectivamente.

Com baixa massa molecular, a dextrana encontra a maior e mais importante aplicação. A dextrana com massa de 75.000 Da é utilizada como expansor volumétrico do sangue. As com massa na ordem de 40.000 Da tem sido aplicadas no auxílio a circulação sanguínea em zonas periféricas. Estas frações são conhecidas como dextrana clínica.

A dextrana é sintetizada pela enzima dextrana-sacarase a partir de sacarose como substrato. A enzima é produzida extracelularmente por uma grande variedade de bactérias, principalmente do gênero *Leuconostoc*. A maioria dos trabalhos

recentes tem sido conduzidos com várias linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, mais especificamente a NRRL-B512F.

Durante a síntese do polissacarídeo, ocorre liberação de frutose, um monossacarídeo que possui como principal propriedade a elevada doçura relativa, a qual possui um valor de 117 em uma escala onde a doçura da sacarose é 100. Suas maiores aplicações se encontram na indústria de refrigerantes, onde é usado como adoçante e na preparação de produtos dietéticos para diabéticos.

A síntese de dextrana pode ocorrer por dois processos diferentes, um convencional onde a produção se dá durante o crescimento do microrganismo, e outro por síntese enzimática, o qual utiliza o extrato enzimático proveniente da fermentação. O processo enzimático vem sendo mais estudado ultimamente por apresentar algumas vantagens em relação ao convencional. Ele, além de possuir duas etapas distintas facilitando o controle das variáveis pH, temperatura e agitação, não utiliza a sacarose para o crescimento microbiano, o que implica em maior rendimento.

A hidrólise ácida é o método tradicionalmente utilizado industrialmente para obtenção da fração clínica de dextrana. As principais vantagens da hidrólise ácida são: não exigência de equipamentos sofisticados, facilidade no controle e possibilidade de utilização da dextrana úmida e mesmo não purificada.

Após a quebra da dextrana bruta ocorrida na hidrólise ácida, utiliza-se Etanol 95% para o fracionamento da dextrana em solução. Com diferentes concentrações do álcool pode-se isolar a dextrana clínica existente.

Com a retirada da dextrana, resta em solução polissacarídeos pequenos e frutose, os quais podem ser separados utilizando métodos de troca iônica.

No Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, vários trabalhos foram desenvolvidos sobre etapas específicas do processamento de dextrana. Muitos destes conseguiram ótimos resultados de processo, porém uma avaliação envolvendo todas as etapas, desde o crescimento

do microrganismo até a produção de dextrana clínica e obtenção de frutose, ainda não tinha sido realizada.

Na realização do trabalho foram utilizados resultados das pesquisas já desenvolvidas na área, o que colaborou na busca de parâmetros de avaliação do processo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral sintetizar as etapas do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

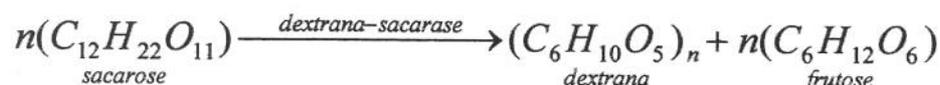
- Analisar a influência da concentração de sacarose e a utilização de enzima bruta ou purificada na síntese de dextrana;
- Analisar a concentração de etanol utilizada na precipitação seletiva da dextrana clínica;
- Fazer uma análise geral do processo em termos de rendimento global e rendimento de cada composto formado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DEXTRANA-SACARASE

3.1.1 PROPRIEDADES

A dextrana-sacarase [EC 2.4.1.5, $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-glucana: D-frutose 2-glucosiltransferase] é classificada como uma glicosiltransferase que catalisa a transferência de um grupo α -D-glicopiranosil da sacarose para formar a dextrana, liberando uma molécula de frutose, de acordo com a seguinte equação (JEANES, 1966):



Esta enzima é uma das poucas que não necessita da presença de receptores ou intermediários fosforilados de alta energia para a síntese de polissacarídeo. A energia requerida para a ligação de duas unidades de glicose é fornecida pela hidrólise da sacarose (CURRALERO, 1993).

A enzima é produzida extracelularmente por muitos microrganismos do tipo *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Vários substratos promovem o crescimento da bactéria, como: sacarose, glicose, frutose, manose, lactose, etc. Entretanto, a sacarose é o único substrato conhecido que induz à produção da enzima (ALSOP, 1983).

A estabilidade da enzima é influenciada por vários fatores. Em solução, foi verificado que a presença de dextrana, polímeros não aniônicos (polietileno-glicol), metil-celulose e detergentes não aniônicos aumentam significativamente a

estabilidade da dextrana-sacarase. Outro fator importante que foi mencionado por MILLER e ROBYT (1986), é a presença de cálcio (Ca^{+2}), devido a maior estabilidade que este íon metálico proporciona à enzima.

KABOLI e REILY (1980) também verificaram que a estabilidade da enzima purificada melhorou significativamente pela adição de cálcio (Ca^{+2}). Em pH 4,5 e 27,5°C aproximadamente 70% da atividade foi perdida em meios livres de cálcio, após 6 horas. Adicionando 50 mM de cálcio, esta perda é reduzida para 30% no mesmo período de tempo.

ALSOP (1983) cita que o caldo de fermentação não mostrou nenhuma modificação em atividade enzimática por adição de cálcio. Entretanto, para a enzima purificada a atividade é afetada fortemente. Por exemplo, na adição de 0,05% de cloreto de cálcio, ocasiona um aumento de 12,6 UDS/mL (unidade de dextrana-sacarase/mL) para 33,9 UDS/mL na atividade.

Durante o armazenamento, a enzima purificada perde atividade rapidamente à 4°C e até mesmo à -15°C, onde sua atividade diminui 60% em 20 dias. A enzima pode ser estabilizada com adição de dextrana (ALSOP, 1983).

A atividade da enzima foi investigada com respeito a variações de pH e temperatura, sendo o pH ótimo em torno de 5,2, tanto para a enzima solúvel como para a enzima imobilizada. Mantendo o pH em 5,2 e variando a temperatura, os autores relataram a temperatura de 30°C como ótima para a atividade enzimática (KABOLI e REILY, 1980).

3.1.2 MICRORGANISMO

Os trabalhos mais recentes desenvolvidos com dextrana têm sido conduzidos com várias cepas de *Leuconostoc mesenteroides*, em particular o NRRL B-512F. Este microrganismo pertence ao grupo *Streptococceae*, família *Lactobacillaceae* e gênero *Leuconostoc*. As células são esféricas ou lenticulares, com dimensões

aproximadas de 0,5 – 0,7 μm por 0,7 – 1,2 μm . É uma bactéria aeróbia facultativa, imóvel, gram positivo, não patogênica e não forma esporos, sendo também uma espécie quimiorganotrófica com grande carência nutricional, exigindo meios ricos em vitaminas e aminoácidos para seu desenvolvimento (ALSOP, 1983).

Em metabolismo aeróbio oxidativo também existe formação de dióxido de carbono, ácido láctico e ácido acético. O crescimento e a produção de biomassa podem ser medidos por densidade ótica em comprimento de onda de 590 ou 650 nm (ALSOP, 1983).

3.1.3 PRODUÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE

TSUCHIYA *et al.* (1952 B) descreveram o efeito de certos fatores na produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Eles concluíram que sacarose é essencial para a produção da enzima. Em experimentos preliminares, constataram que o microrganismo pode crescer em meios contendo glicose, frutose ou maltose, mas estes não são capazes de induzir a produção da enzima. Também concluíram que um aumento progressivo do nível de sacarose de 0,5 – 5% aumenta o rendimento de enzima, entretanto, para concentrações de sacarose acima de 2%, ocorre um indesejável aumento de viscosidade, dificultando a remoção das células para processamento futuro.

Para as condições ótimas de pH, é necessário conhecer a relação de produção da atividade e estabilidade da enzima com o pH do meio. TSUCHIYA *et al.* (1952 B), mostraram que o máximo rendimento de enzima foi obtido em pH 6,7. Seus resultados mostram que em valores de pH pouco mais baixos (6,1 e 6,3), ocorre um aumento de atividade em menor tempo de fermentação, porém os valores não chegam a máximos. Os autores observaram que a maior estabilidade da enzima está entre pH 5,0 – 5,3, e que em pH 6,7 ocorre uma perda de 35% da atividade em 1 hora.

ALSOP (1983) comenta que o problema pode ser solucionado no processo global. No momento em que o rendimento da enzima atingir um máximo, sendo este cuidadosamente monitorado, o valor do pH deve ser ajustado de 6,7 para 5,2. Com este procedimento, a enzima produzida converte o residual de açúcar em dextrana, e este valor de pH leva às condições ótimas de estabilidade da enzima.

O valor da temperatura na fermentação é também um parâmetro crítico e que se relaciona diretamente com o pH. Embora o pH 6,7 tenha-se mostrado um ótimo valor, o mesmo deve ser aplicado a uma temperatura de 23°C. A altas temperaturas a inativação em pH 6,7 é extremamente rápida e baixos rendimentos são obtidos (ALSOP, 1983).

Para uma produção econômica de enzima, é essencial manter um nível baixo de sacarose durante a fermentação (5,0 – 10,0 g/L). Como a bactéria produz ácido no decorrer da fermentação, os níveis de sacarose e pH podem ser mantidos com adição de álcali e sacarose durante o processo. ALSOP (1983) descreve que em adições de 20 g/L/h de sacarose na fase de crescimento maximizam o rendimento de enzima. BAZÁN (1993) estudou as condições de fermentação em batelada alimentada, com o objetivo de obter a enzima com a máxima atividade e quantidades mínimas de ART (açúcares redutores totais) no final da fermentação. Utilizando uma alimentação de 160 g/L de sacarose e NaOH 1 N, para uma temperatura de fermentação de 27°C, obteve-se uma atividade enzimática de 106 UDS/mL, considerado bom resultado.

Em estudos mais recentes, GUIMARÃES (1997) constatou que cortando a alimentação após 6 horas de fermentação acarretaria a diminuição do pH do meio e consequente formação de dextrana, levando a melhores condições de estabilidade da enzima. Os resultados obtidos em seus experimentos mostram que para se obter um pH de 5,2 após o corte da alimentação (total de 8 horas de fermentação), seria necessário o meio fermentativo conter 50 g/L de concentração inicial de sacarose e a alimentação conter concentração de 200 g/L de sacarose e NaOH 1 N, sem adição de outros componentes.

Com relação à aeração, JEANES (1966) cita que no processo convencional a aeração não é necessária. Em contrapartida, KOEPEL e TSUCHIYA (1952) conseguiram maiores rendimentos de enzima em shaker do que em frascos imóveis. Já ALSOP (1983) obteve melhores resultados em condições aeradas, comparadas as condições de aeração com oxigênio puro, com dióxido de oxigênio puro ou sem aeração.

Os primeiros estudos realizados sobre a produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua foram bastante desanimadores. Trabalhando com taxas de diluição de $0,2 \text{ h}^{-1}$, LAWYER, KLIGERMAN e WILLIAMS (1979) não conseguiram nenhuma atividade enzimática no eluente. Acima deste valor, a concentração máxima atingida foi de aproximadamente $9,0 \text{ UDS/mL}$, com $0,53 \text{ h}^{-1}$ de taxa de diluição.

3.1.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

MARTINEZ-ESPINDOLA e LOPEZ-MUNGUIA (1985) verificaram que a cinética da dextrana-sacarase é descrita pelo modelo de Michaelis-Menten para níveis de sacarose abaixo de 10-15%. A velocidade inicial foi medida variando a concentração de sacarose de 0 a 400 g/L , sendo possível observar uma significativa inibição pelo substrato. Portanto, foi proposto um modelo que considera este fator bem ajustado aos dados cinéticos. O valor de $5,12 \text{ g/L}$ para K_m e 4.321 g/L para K_i foram obtidos.

PAUL *et al.* (1986) estudaram o comportamento cinético da enzima utilizando maltose como receptor. Foi observado que com a variação da concentração deste de 0 a 200 g/L , a velocidade máxima aumentava mais de três vezes. O valor da constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) variou linearmente de 12 a 163 mM com o aumento do receptor.

3.1.5 DEFINIÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade de dextrana-sacarase (UDS) é definida como sendo a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana no período de uma hora, liberando 0,52 mg de frutose, nas condições de teste. Este inclui uma incubação a 30°C em tampão acetato pH 5,2.

LAWFORD, KLIGERMAN e WILLIAMS (1979) expressam a atividade enzimática como μg de açúcar redutor produzido/min/mL, num pH 5,5 e a 30°C. A conversão desta unidade é: $10 \mu\text{g}$ açúcar reduzido/min/mL = 1,15 UDS/mL.

ROBYT e WALSETH (1979) utilizaram a unidade internacional (UI), sendo a quantidade de enzima que incorpora 1 μmol de D-glicose no polissacarídeo em um minuto a 25°C e pH 5,0. Então $1(\text{UI}) = 20,27 \text{ UDS}$.

3.2 DEXTRANA

3.2.1 ASPECTOS GERAIS

O termo “dextrana” foi primeiramente usado em 1874 por Scheibler. Nesta época ele descobriu que um carboidrato dextro-rotatório de fórmula empírica $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ era o causador da formação de película e do aumento de viscosidade durante os processos de fabricação de vinhos e açúcar de beterraba e cana (ALSOP, 1983). Anteriormente, em 1856, Pauster demonstrou que a formação destas películas em caldos ricos em sacarose eram causadas por ação microbiana. Em 1878, Van Tieghen isolou o microrganismo responsável pela produção de dextrana e denominou de *Leuconostoc mesenteroides* (ALSOP, 1983 e DE BELDER, 1987).

Mais recentemente o termo dextrana vem sendo usado para designar uma larga classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares, compostos por unidades monoméricas de glicose ligadas predominantemente por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ (ALSOP, 1983 e JEANES, 1966). Várias dextranas contêm ramificações nas posições $\alpha(1\rightarrow2)$,

$\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ e outras também podem conter ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ na cadeia principal (DE BELDER, 1987). A estrutura molecular de um resíduo da molécula de dextrana é apresentada na Figura 3.1.

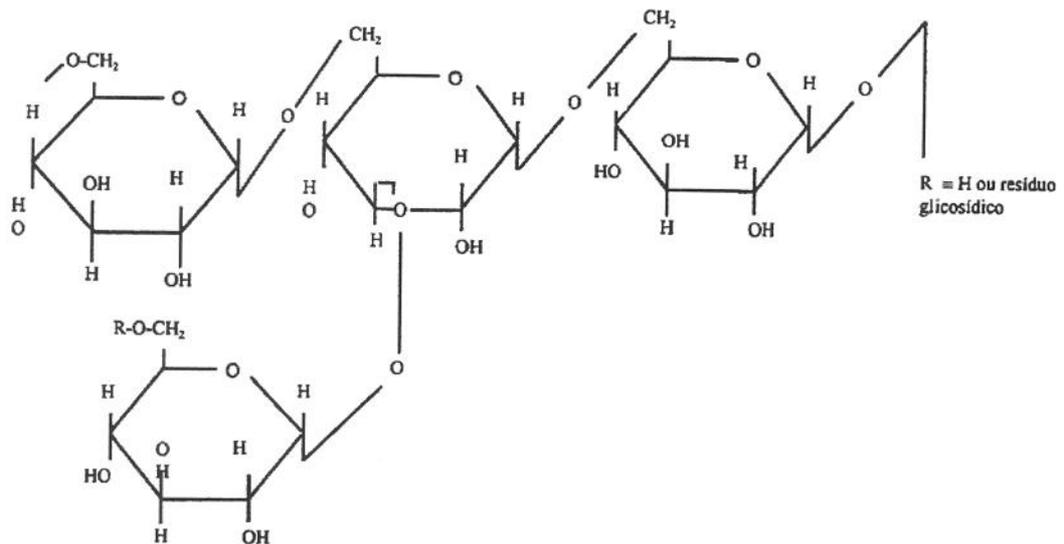


Figura 3.1: Estrutura de um fragmento de cadeia de dextrana

As dextranas são sintetizadas a partir da sacarose por um grande número de bactérias. Estas bactérias pertencem a família *Lactobacillaceae* e em particular do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (DE BELDER, 1987).

A maioria dos trabalhos desenvolvidos com dextrana tem sido conduzidos com várias espécies do *Leuconostoc mesenteroides* e em particular a linhagem NRRL B-512F. Esta linhagem produz uma dextrana contendo 95% de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ e 5% de ligações $\alpha(1\rightarrow3)$, sendo a mais comumente utilizada na produção de dextrana comercial nos Estados Unidos e na Europa (ALSOP, 1983).

Quando se fala na produção de dextrana, é importante salientar que esta não é um produto direto da fermentação bacteriana na presença de sacarose. Esta provém da ação da enzima dextrana-sacarase, produzida pelo microrganismo a partir do consumo de sacarose existente no meio.

3.2.2 PROPRIEDADES

A dextrana é classificada como um homopolissacarídeo de origem bacteriana, formado por uma cadeia principal linear com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ de unidades de glicose, apresentando diversidade quanto à proporção de ligações $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ e graus de ramificações. Esta diversidade se deve a grande variedade de microrganismos que produzem dextrana, fazendo com que esta não apresente características definidas, sendo suas propriedades e estrutura determinadas pela espécie que a produz (JEANES, 1966; LAWFORD, KLIGERMAN, WILLIAMS, 1979).

A dextrana produzida pela linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F é constituída por 95% de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ em sua longa cadeia principal. Os 5% de ligações restante são do tipo $\alpha(1\rightarrow3)$, e formam as cadeias secundárias. Estas são curtas, sendo 40% delas constituídas por uma unidade, 45% por duas e somente 15% por mais de duas unidades de glicose (DE BELDER, 1987).

A dextrana B-512F é bastante solúvel em água, metil sulfóxido, etilenoglicol, glicerol e hexametilfosforamida. Em solução aquosa (3 a 10%) apresentam rotação ótica característica em torno de $+200^\circ$, apresentando uma solução clara e bastante estável à esterilização por calor, ao congelamento e ao descongelamento (DE BELDER, 1987). JEANES (1966) cita que este tipo de dextrana apresenta rotação ótica específica de $+199^\circ$, $+203^\circ$ e $+215^\circ$ em água, hidróxido de sódio 1 N e formamida, respectivamente.

A capacidade de complexar íons metálicos é outra importante propriedade da dextrana e aparentemente está relacionada com os grupos 3-hidroxil das ramificações $\alpha(1\rightarrow3)$. Esta constatação foi feita medindo-se a rotação ótica a 20°C , para dextranas com diferentes porcentagens de ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ (SANDFORD & BAIRD, 1983, citado por BAZÁN, 1993). Em soluções alcalinas, a dextrana forma complexos com composição definida com muitos íons metálicos, tais como antimônio, cálcio, cobalto, cobre, ferro e urânio (JEANES, 1966).

O tamanho das moléculas pode variar dependendo da temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares durante a reação de síntese. A dextrana nativa apresenta em média, uma massa molecular entre 40 e 50 milhões de Da, nas condições industriais atualmente utilizadas. Já a dextrana clínica, atinge uma massa molecular entre 30.000 a 100.000 Da após a hidrólise (QUEIRÓZ, 1987).

3.2.3 APLICAÇÕES

O uso dos polissacarídeos, em geral, está baseado na capacidade que estes têm de alterar as propriedades básicas da água, podendo também exercer funções de estabilizantes, emulsificantes, floculantes, lubrificantes, etc...

As fontes tradicionais de polissacarídeos são os vegetais e as algas. Entretanto, nos últimos anos as fontes microbianas vêm substituindo rapidamente as fontes tradicionais. A expansão do uso de polissacarídeos microbianos cresceu bastante, devido a um programa desenvolvido por laboratórios americanos, iniciado por volta de 1945. O programa trouxe um desenvolvimento significativo na produção de biopolímeros, conseguindo linhagens mais produtivas e ainda a descoberta de novos produtos como a xantana. (SANDFORD & BARID, 1983, citado por QUEIRÓZ, 1987).

Os usos da dextrana são baseados em certas características distintas que as diferenciam de outros polissacarídeos. Estas características são afetadas fundamentalmente pela massa molecular e pela distribuição da massa molecular, pelo tipo de estrutura, pela solubilidade ou insolubilidade em água, ou pela utilização da dextrana ou derivado da mesma (JEANES, 1966).

As dextranas de alta massa molecular têm várias aplicações, como por exemplo, na recuperação secundária do petróleo, em filmes protetores para sementes, no processo de galvanização de metais, entre outros (ALSOP, 1983).

A dextrana de massa molecular médio tem potencial para ser utilizada nas indústrias química e de alimentos. Na indústria química a dextrana é usada na 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 (SANTOS, 1996).

Com baixa massa molecular, a dextrana apresenta a sua maior aplicabilidade, principalmente na indústria farmacêutica. Nesta condição, o polímero apresenta duas características importantes: são completamente metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos ou alérgicos (CURRALERO, 1993). Estes efeitos aparecem, por outro lado, com a dextrana de alta massa molecular, ou com alto grau de ramificação (QUEIRÓZ, 1987). Dentre os usos clínicos destacam-se:

a) Dextrana Clínica:

No mercado estão disponíveis dois tipos de dextrana clínica (D40 e D75). A dextrana de massa molecular 75.000 ± 25.000 daltons (D75) tem sido comercializada em solução salina a 6% p/v, a qual apresenta propriedades osmóticas e coloidas semelhantes as do plasma. Portanto, é mais utilizada para manter o volume sanguíneo e a pressão arterial no tratamento de choque ou choque iminente, como resultado de hemorragia, queimaduras ou cirurgia (DE BELDER, 1987 e ALSOP, 1983). A dextrana com massa molecular 40.000 ± 10.000 Daltons (D40), é comercializada em solução salina 10% p/v, e apesar de ter um poder de expansão limitado, melhora a fluidez do sangue, auxiliando a circulação nos vasos capilares. Ambos os produtos são utilizados extensivamente para prevenir complicações pulmonares fatais em cirurgias, traumas e choques (DE BELDER, 1987).

b) Dextrana-sulfato:

MITSUYA *et al.* (1988) relatam que este derivado de dextrana possui massa molecular de aproximadamente 8.000 Daltons e contém 17 à 20% de enxofre, sendo utilizado como anti-coagulante.

c) Dextrana-hemoglobina:

A aplicação de soluções de dextrana-hemoglobina como substituto do sangue tem sido usada com duas funções principais: expansão do plasma e liberação de oxigênio (ALSOP, 1983).

d) Ferro-dextrana:

Durante muitos anos, vários carboidratos foram utilizados para estabilizar soluções de ferro, não se obtendo um produto farmacêutico satisfatório. ALSOP (1983) comenta que em 1954 pesquisadores produziram uma solução estabilizada de ferro, a qual pode ser administrada por via intramuscular. O complexo de ferro-dextrana tem sido utilizado com sucesso para o tratamento e profilaxia de anemia por deficiência de ferro, tanto em humanos como em animais.

Outras aplicações também têm sido estudadas, como por exemplo, na indústria fotográfica. Foram patenteados vários melhoramentos alcançados com a incorporação de dextrana em radiografias e em outras emulsões fotográficas, resultando em economias sem a perda de qualidade (ALSOP, 1983).

3.2.4 PRODUÇÃO

Apesar de um grande número de microrganismos produzirem dextrana, industrialmente o mais utilizado é o *Leuconostoc mesenteroides*, particularmente a linhagem B-512F (DE BELDER, 1987). Para a produção do polissacarídeo, 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. Dois processos são comumente utilizados para a obtenção de dextrana, um convencional onde a produção se dá durante o crescimento do microrganismo, e outro por síntese enzimática, o qual utiliza o extrato enzimático proveniente da fermentação (JEANES, 1966; ALSOP, 1983).

A dextrana produzida por ambos processos (sem utilização de receptores), pode atingir valores de até 50 milhões de Da (dextrana bruta). Para uso farmacêutico a dextrana clínica deve possuir massa molecular entre 30.000 e 100.000 Da, o que se faz necessário a redução da massa molecular da dextrana bruta.

3.2.4.1 Processo Convencional

A dextrana é produzida diretamente no meio de cultura durante o crescimento do microrganismo, constituindo-se um processo bastante simples, onde poucos controles são realizados além da temperatura. Este processo envolve três etapas simultâneas: crescimento celular, produção da enzima dextrana-sacarase e síntese enzimática.

O meio de cultura contendo solução de açúcar enriquecida com nutrientes apropriados, tampões e sais minerais é inoculado com o microrganismo em pH neutro (ALSOP, 1983). A sacarose é utilizada pela bactéria como fonte de carbono e energia, como também indutor e substrato da enzima (SANTOS, 1996). Usando 10% p/v de substrato, o rendimento esperado está em torno de 25% de dextrana com relação ao peso de açúcar adicionado (ALSOP, 1983).

O meio utilizado neste tipo de processo é o seguinte: 100 g/L de sacarose, 2,5 g/L de extrato de levedura, 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 5,0 g/L de K_2HPO_4 . O $pH_{inicial}$ é 7,0, temperatura de 25°C e tempo de 18 a 30 horas (BAZÁN, 1993).

Durante o processo fermentativo o pH cai de 7,0 para 4,8 devido a formação de subprodutos ácidos, e a temperatura aumenta de 25°C para aproximadamente 29°C devido ao processo ser exotérmico. O término do processo se dá entre 18 e 24 horas, tempo no qual se obtém um máximo de viscosidade coincidindo com a diminuição do pH para 4,5 (PEREIRA, 1996). A dextrana é obtida do meio fermentativo inicialmente pela centrifugação do caldo diluído em água, onde ocorre a separação das células e, em seguida, pela precipitação com solventes orgânicos, etanol ou metanol. O produto é dextrana nativa, e possui uma massa molecular de vários milhões de Daltons.

Em concentrações iniciais mais baixas de sacarose, o rendimento é maior e os custos com o açúcar são menores. No entanto, ALSOP (1983) percebeu em outros estudos, que a quantidade líquida de dextrana produzida foi menor, reduzindo a produtividade do processo. O autor concluiu que a concentração inicial de sacarose ótima a ser usada na produção industrial deve ser em torno de 170 à 180 g/L.

3.2.4.2 Processo Enzimático

Este processo é conduzido em duas etapas bem distintas. Na primeira ocorre a produção da enzima dextrana-sacarase via fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Na outra etapa, após a separação das células, a enzima na sua forma purificada ou bruta é utilizada para a síntese “*in vitro*” da dextrana.

A síntese “*in vitro*” apresenta um potencial econômico enorme, devido a algumas características da enzima: é extracelular, sem intermediários fosforilados; não necessita de energia adicional para a síntese; e a reação ocorrida é irreversível (BAZÁN, 1993).

As vantagens do processo de síntese enzimática de dextrana são:

- Condições de processo: no processo convencional, ocorrem simultaneamente três processos: crescimento celular (pH ótimo 7,0), produção da enzima (pH ótimo 6,0-6,9) e síntese de dextrana (pH ótimo 5,2), além das condições ótimas de temperatura e concentrações de sacarose. Como esses valores são diferentes para cada etapa, o desenvolvimento em dois estágios (processo enzimático) facilita o controle e a otimização tanto da fermentação como da síntese enzimática (PEREIRA, 1996; SANTOS, 1996).

- Purificação mais simples: no processo tradicional, a separação das células fica dificultada devido a alta viscosidade que o meio adquire (mais de 500 cp). Isso não ocorre no processo enzimático, pois a produção da dextrana nativa que causa a alta viscosidade ocorre em meio isento de microrganismo (BAZÁN, 1993; SANTOS, 1996).

- Maior rendimento: na síntese enzimática, como não há consumo de sacarose para o crescimento microbiano, o rendimento teórico é de 100%. Em condições industriais, com concentrações de sacarose abaixo de 10%, a produção fica pouco abaixo do valor teórico.

Com relação a concentração inicial de sacarose para a síntese enzimática, CURRALERO (1993) relata que em concentrações acima de 100 g/L ocorre uma grande queda na velocidade inicial de síntese, devido a inibição pelo substrato sofrida pela enzima. Também em concentrações acima deste valor, a autora comenta que ocorre a formação de dextranas de baixa massa molecular e oligossacarídeos, o que é indesejável nesta etapa.

GUIMARÃES (1997) fez um planejamento experimental variando a concentração de sacarose inicial de 30 a 100 g/L e a temperatura de 20 a 36°C, com o objetivo de otimizar o rendimento de dextrana de alta massa molecular. Como resultados de seu trabalho observa-se uma tendência a bons rendimentos de

dextrana de alta massa molecular em concentrações próximas a 50 e 100 g/L e em temperaturas baixas.

A etapa de síntese é de grande importância para se obter um maior rendimento global do processo, portanto necessita de estudos mais detalhados, principalmente quanto a concentração inicial de substrato e o tempo de processo, para evitar o residual de sacarose no final desta etapa.

3.2.5 REDUÇÃO DA MASSA MOLECULAR

A massa molecular e a distribuição da massa molecular são os principais fatores para a aplicação técnica da dextrana. Em vista disso, para uso farmacêutico, se faz necessário a redução da massa molecular da dextrana nativa, que está em torno de 50 milhões de Da.

Praticamente toda dextrana clínica produzida no mundo é obtida a partir da hidrólise ácida da dextrana nativa com ácidos minerais. Apesar disso, existem outras maneiras para reduzir a massa molecular, como por exemplo, a hidrólise enzimática.

3.2.5.1 Hidrólise Ácida

As principais vantagens da hidrólise ácida são: facilidade de controle, possibilidade de utilização da dextrana nativa úmida ou não isolada e não exigência de equipamentos sofisticados. A hidrólise é feita normalmente utilizando ácido sulfúrico ou clorídrico em temperaturas próximas a 100°C, sendo controlada pela medida da viscosidade (WOLF *et al.*, 1954).

WOLF *et al.* (1954) estudaram a hidrólise ácida parcial da dextrana obtida através da linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Os autores analisaram o efeito do pH e da temperatura durante a hidrólise, o 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. Os rendimentos obtidos foram em torno de 36% de dextrana clínica com massa molecular na faixa de 75.000 ± 25.000 , a partir de dextrana nativa de alta massa molecular (30-50 milhões de Da). Utilizando-se as condições de 80°C, pH 1,0 e ácido sulfúrico, o rendimento de dextrana foi de 47%. Os autores relatam que diferentes dextranas e mesmo preparações diferentes da dextrana produzida pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F podem requerer alguma alteração nos valores obtidos.

SANTOS (1996) estudou as condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica, a partir da dextrana de alta massa molecular. Para a realização dos experimentos, usou-se a metodologia de planejamento experimental, com as seguintes condições: temperatura entre 65 e 75°C e pH entre 1,5 e 2,5. A condição que propiciou melhores rendimentos de dextrana clínica, em torno de 95,7%, foi a que utilizou-se pH 1,5 e temperatura 75°C, num tempo de reação de 7 horas. A autora concluiu que o rendimento da dextrana clínica é influenciado pelo aumento da temperatura e diminuição do pH, e que seriam necessários mais alguns estudos para a otimização do processo de hidrólise ácida.

Dando continuidade ao trabalho de SANTOS (1996), GUIMARÃES *et al.* (1999) utilizando a metodologia de planejamento experimental otimizaram o processo de hidrólise ácida. Em experimentos iniciais concluíram que o pH ótimo era de 1,0 e que a temperatura ficava em torno dos 75°C. Numa etapa posterior, fixaram o pH em 1,0 e variaram a temperatura entre 72 a 80°C. Nestes experimentos concluíram que em pH 1,0 e temperatura de 72°C, consegue-se aproximadamente 100% de conversão de dextrana bruta em dextrana clínica.

3.2.5.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da dextrana é obtida através da enzima dextranase. Esta enzima é produzida por cultura de várias espécies de bactérias aeróbias, *Penicillium* e *Aspergillus*. Uma seleção de enzimas disponíveis comercialmente produziram distribuições de massa molecular diferentes a partir do mesmo material, devido aos diferentes mecanismos de ação das enzimas utilizadas (ALSOP, 1983).

TSUCHIA *et al.* (1952 A) começaram a pesquisar a capacidade de produção de dextranases extracelulares de várias linhagens de bactérias, leveduras e fungos. Como resultado destes estudos foram detectadas linhagens de *Penicillun lilacinum*, *Penicillum funiculosum* e *Spicaria* que produziam quantidades consideráveis de dextranases extracelulares. Os autores estabeleceram as condições de cultura de produção, bem como o pH ótimo de atividade e estabilidade das enzimas.

CURRALERO (1993) comenta que Novak e Witt patentearam um processo de obtenção de dextrana clínica, onde é usado a enzima de *Aspergillus wentii* com a adição de sacarose e dextrana-sacarase. Neste processo obteve-se rendimentos de 60-80% de dextranas com viscosidade intrínseca na faixa permitida pelo FDA para uso clínico como expansor de plasma.

Muitos estudos estão sendo realizados com relação a depolimerização enzimática, obtendo-se bons rendimentos e produtos homogêneos, porém sua utilização se restringe a escala laboratorial.

3.2.6 FRACIONAMENTO

Convencionalmente, dextranas que apresentam distribuição da massa molecular específicas, são fracionadas após a hidrólise por precipitação repetitiva com solvente. A distribuição da massa molecular pode ser rapidamente verificada por cromatografia de permeação em gel. Com isso, a hidrólise pode ser finalizada

quando o resultado mostrar o máximo número de moléculas na faixa de massa molecular desejada (ALSOP, 1983).

Independente do processo utilizado para a redução do grau de polimerização, esta etapa se faz necessária, pois a partir do fracionamento, consegue-se o isolamento das frações de interesse. Isto pode ser feito explorando as diferentes solubilidades das moléculas de dextrana de diferentes tamanhos. Tal fracionamento pode ser feito pela precipitação da dextrana com variações nas concentrações de solventes orgânicos, normalmente álcoois ou acetonas.

WOLF *et al.* (1954) em seus estudos utilizaram etanol 95% em concentrações de 39 a 46%, e conseguiram 47% de rendimento de dextrana clínica. Com o uso de metanol, nas proporções de 42 a 49%, o rendimento ficou um pouco inferior, em torno de 43%. Os mesmos autores verificaram o efeito da temperatura durante o fracionamento, e relatam que o rendimento e a distribuição da massa molecular são muito afetados com a diminuição da temperatura do processo. A temperatura ideal para esta etapa está em torno de 25°C.

Em soluções contendo 5% de dextrana, ZIEF, BRUNNER, METZENDORF (1956) comentam que a precipitação da dextrana clínica se ocorre com uma concentração de metanol entre 44 e 51%. Os autores utilizando estas concentrações conseguiram aproximadamente 40% de rendimento.

CURRALERO (1993) cita outras formas de fracionamento e seus respectivos autores. As outras alternativas são: ultrafiltração (BAKER, 1969), cromatografia de permeação em gel em batelada (GRANATH e FLODIN, 1961), semi-contínua (BARKER e VLACHOGIANIS, 1983) e contínua (BARKER, GANETSOS e ENGLAND, 1989). As principais desvantagens desses processos são: o alto custo dos equipamentos envolvidos e a curta vida útil das membranas e resinas, mas apesar disso estas técnicas estão sendo bastante estudadas recentemente.

3.3 FRUTOSE

3.3.1 ASPECTOS GERAIS

A frutose é um monossacarídeo, que no estado cristalino, encontra-se na forma β -D-frutopiranosose. É encontrada em plantas, animais e principalmente em frutas, onde pode estar presente na forma livre ou combinada (dissacarídeos ou polissacarídeos). Em humanos é constituinte normal do sangue (0,5-5,0 mg/100 mL de sangue), do líquido seminal e do líquido amniótico. Quando dissolvida em água a frutose resulta em uma mistura complexa de isômeros em equilíbrio, como α -D-frutopiranosose, β -D-frutopiranosose, α -D-frutofuranose e β -D-frutofuranose. A proporção relativa destas diferentes substâncias formadas pela frutose em solução pode variar com a temperatura, pH e outros fatores. Este fenômeno de mutarrotação é resultado de uma rápida interconversão piranosose-furanose (PAWAN, 1973).

O principal produto comercial contendo frutose é um xarope (high-fructose syrups, HFS) composto por 42 a 55% de frutose, e ainda glicose e pequenas quantidades de oligossacarídeos. Na década de 60 ocorreu um grande desenvolvimento das tecnologias de refinação, isomerização e separação, o que viabilizou a produção industrial do HFS. A comercialização de frutose cristalina surgiu somente na década de 80, devido aos avanços tecnológicos na área de cristalização (SILVA, 1998).

O mecanismo de absorção da frutose pelo organismo humano depende da maneira como o monossacarídeo se encontra. A sua absorção como uma molécula livre tem recebido considerável importância, devido a introdução do HFS. Atualmente não há evidências que a absorção ocorra por transporte ativo em humanos, e por isso aceita-se a hipótese de que a frutose é absorvida pela mucosa intestinal de humanos por difusão facilitada, ou seja, absorção facilitada na presença de glicose (RUBY, FUJISAWA, KRETCHMER, 1993).

3.3.2 PROPRIEDADES

As propriedades químicas e físicas da frutose são os principais fatores de seu uso nas indústrias de alimentos e de refrigerantes. Sua principal propriedade é a doçura relativa, a qual possui um valor de 117 em uma escala onde a doçura da sacarose é fixada em 100. O HFS-55 (high-fructose syrups, 55% de frutose) e a sacarose apresentam praticamente a mesma doçura relativa. Outras propriedades importantes são: a alta solubilidade em água (80% a 20°C) e a alta higroscopicidade, o que a torna útil como inibidor de cristalização no armazenamento de alimentos (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996; HANOVER e WHITE, 1993).

Dependendo do sistema em que a frutose se encontra, ou seja, em qual isômero se apresenta, terá um grau relativo de doçura. A formação dos diferentes isômeros dependem de variáveis que alteram o equilíbrio das reações de mutarrotação. O isômero β -D-frutopiranosose é o mais doce dentre os quatro (doçura relativa de 170 a 180), e com o decréscimo do pH, temperatura e teor de sólidos, a doçura do sistema aumenta (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

A sinergia apresentada pela frutose com outros açúcares presentes no sistema é outra propriedade importante, por exemplo, a mistura de 50% de frutose + 50% de sacarose apresenta uma doçura relativa de 128. A sinergia também é possível com adoçantes como aspartame, sacarina e sucralose, o que possibilita a obtenção de produtos alimentares com maior doçura e menor custo, devido a redução da quantidade de adoçante utilizado (CÂNDIDO e CAMPOS, 1996).

A frutose reduz a atividade de água em alimentos, possibilitando uma maior estabilidade aos microrganismos sem que haja remoção de umidade, necessária à textura dos mesmos. Em concentrações iguais, soluções de frutose apresentam menor atividade de água do que soluções de açúcares com massas moleculares mais elevadas. A alta solubilidade da frutose dificulta sua cristalização em sistemas onde está muito concentrada, favorecendo a retenção da umidade do alimento por

um período maior, melhorando a qualidade, textura e vida de prateleira (HANOVER e WHITE, 1993).

3.3.3 APLICAÇÕES

A indústria de refrigerantes, e mais recentemente a indústria de panificação, vem sendo a principal aplicação do HFS. Na panificação verifica-se que o HFS além de econômico e de fácil manuseio, proporciona uma doçura aproximadamente igual à sacarose. Na indústria de refrigerantes, o HFS em concentrações de 42 a 55% de frutose tem seu maior uso. Nos refrigerantes “colas”, após a acidificação com ácido fosfórico, ocorrem alterações no sabor que podem ser balanceadas com o uso do HFS-55 como adoçante. Nos demais refrigerantes (refrigerantes “não colas”), a acidificação é feita pela adição de ácidos orgânicos que não provocam alterações significativas no sabor, então utiliza-se o HSF-42 como adoçante. Outras indústrias que também utilizam o HFS são: frutas enlatadas, derivados de leite e geléias (HANOVER e WHITE, 1993).

Com o avanço das tecnologias de cristalização, atualmente a comercialização da frutose na forma cristalina é feita em larga escala e a custos menores. Por isso, houve um aumento significativo em sua utilização nas indústrias alimentícias, principalmente nas de produtos como cereais matinais, cereais em barra, bebidas energéticas para esportistas, pó para sucos, iogurtes, leite achocolatado, entre outros (HANOVER e WHITE, 1993).

3.3.4 PRODUÇÃO

O amido de milho é a principal matéria-prima para a produção do HFS devido ao seu baixo custo em muitos países, porém também são usados amidos derivados de arroz, trigo, tapioca e batata.

No processo de síntese “*in vitro*” de dextrana, também se produz a frutose, a qual não é o produto principal. No decorrer do processo, a enzima dextrana-sacarase cliva a molécula de sacarose e polimeriza o polissacarídeo através dos monômeros de glicose. A frutose que é liberada no meio, será separada dos oligossacarídeos presentes na última etapa do processo, após a precipitação seletiva da dextrana de interesse.

3.3.5 SEPARAÇÃO DA FRUTOSE

No processo de obtenção de dextrana, após a hidrólise ácida e precipitação seletiva para obtenção do polissacarídeo, obtém-se uma solução contendo sacarose, leucrose, frutose e oligossacarídeos. O grande valor comercial atribuído a estes açúcares, torna de grande interesse a separação dos mesmos para sua utilização industrial.

A dextrana e a frutose foram produzidas pela primeira vez em um reator separador cromatográfico em batelada, em 1987, por Barker e Zafar. A fase estacionária era formada por uma resina de troca iônica na forma de cálcio, e o eluente foi uma solução diluída de dextrana-sacarase. A separação resultou não só em dextrana pura, mas também em frutose altamente purificada. O reator precisou de um tempo para entrar em regime, porque uma certa quantidade de enzima é adsorvida na superfície da resina (SILVA, 1998).

BARKER e GANETSOS (1985) utilizaram um cromatógrafo semi-contínuo com coluna empacotada com resina na forma cálcica, que devido a frutose formar um complexo químico com os íons cálcio, fica adsorvida na coluna. No eluente, saem da coluna glicose, maltose e oligossacarídeos. Em seus resultados os autores obtiveram produtos com altas purezas, onde havia no mínimo 90% de frutose.

CHENG e LEE (1992) estudaram a separação da mistura glicose-frutose em colunas de adsorção empacotadas com zeólitas Y, utilizando como cátion adsorvente

sódio, potássio, bário e cálcio. As outras variáveis estudadas foram: vazão de dessorvente, proporção da mistura injetada e temperatura. Os seus melhores resultados foram com zeólitas contendo cátions de bário e cálcio (Ba-Y e Ca-Y), temperatura de 40°C, baixas vazões de dessorvente e menores razões de quantidade de mistura injetada por vazão de dessorção.

Já os autores HASHIMOTO *et al.* (1983) utilizaram um leito móvel simulado empacotado com zeólitas Ca-Y para separação de uma mistura de glicose e frutose. O sistema de separação era composto por um conjunto de colunas de adsorção com duas correntes de entrada, uma de adsorbato e outra da mistura, havendo duas saídas, uma corrente rica em frutose e outra rica em glicose.

Em estudos recentes, SILVA (1998) realizou três planejamentos experimentais com três variáveis e dois níveis. Como variáveis foram utilizadas: composição das zeólitas de partida, cátion trocado e tempo de processo. Os melhores resultados de adsorção de frutose obtidos pelo autor foram utilizando zeólitas com relação de Silício/Alumínio de 2,59 Ca como cátion trocado e tempo de processo de 24 horas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DEXTRANA

A produção de dextrana foi realizada por dois processos distintos, o processo enzimático e o processo convencional. A seguir estão descritas as etapas para obtenção de dextrana de alta massa molecular.

4.1.1 PROCESSO ENZIMÁTICO

Neste processo a dextrana foi produzida em duas etapas diferentes. Em uma primeira etapa produziu-se a enzima dextrana-sacarase, e na segunda realizou-se a síntese de dextrana com a enzima produzida. Ambas etapas estão descritas a seguir.

4.1.1.1 Produção da Enzima Dextrana-sacarase

A enzima dextrana-sacarase, responsável pela síntese de dextrana, foi obtida por fermentação, e posteriormente estocada no Laboratório de Bioprocessos em condições ideais para conservação de sua atividade.

Microrganismo

Na realização das fermentações para a produção da enzima dextrana-sacarase utilizou-se o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, mantido em estoque a -15°C em solução de glicerol a 10% p/v.

Meio de Cultura

Na fermentação para a produção da enzima utilizou-se o meio padrão otimizado por GUIMARÃES (1997), descrito a seguir:

Meio Padrão:

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

As soluções dos sais foram preparadas em concentrações mais altas para estoque, e posteriormente usadas para o preparo do meio padrão da pré-fermentação (inóculo da fermentação) e da fermentação. A solução de fosfato de potássio dibásico foi preparada separadamente, para evitar a precipitação durante a esterilização. Este fato foi observado em testes preliminares conduzidos por SANTOS (1996).

A sacarose e o extrato de levedura foram dissolvidos na solução salina sem o fosfato, e o pH ajustado em 6,7 com ácido clorídrico concentrado. A solução de fosfato de potássio dibásico também teve seu pH ajustado para 6,7 com HCl concentrado. Após o ajuste de pH, ambas soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C por 15 min, e misturadas somente depois de frias.

Etapas da Fermentação

A fermentação foi realizada segundo as condições descritas por ALSOP (1983), as quais são ótimas para a produção da enzima. As condições foram: pH de 6,7, temperatura de 27°C e aeração de 0,5 L/min, em batelada alimentada com adição de sacarose e pH.

a) Ativação do microrganismo: esta etapa se torna essencial quando o microrganismo se encontra a muito tempo congelado (-15°C) sem sofrer ativação. Inoculou-se um tubo de cultura estoque do microrganismo em 100 mL de meio padrão previamente esterilizado em um erlenmeyer de 500 mL sem aletas. A incubação foi realizada em shaker rotatório a 27°C e 150 rpm. De 6 em 6 horas foi repicado 10% do inóculo para meio de cultivo novo, até que a atividade enzimática atingisse 20 UDS/mL. Após a ativação o microrganismo foi congelado em solução de glicerol 10%.

b) Inóculo: realizou-se uma pré-fermentação que serviu de inóculo para a fermentação. Foram esterilizados separadamente 30 mL de fosfato de potássio dibásico e 120 mL de meio padrão sem fosfato a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, as soluções foram misturadas em erlenmeyer de 500 mL e inoculada com um tubo de cultura estoque do microrganismo previamente ativado. A incubação foi em shaker rotatório a 27°C e 150 rpm por 6 horas.

c) Alimentação: o sistema de alimentação foi o mesmo utilizado por BAZÁN (1993), apenas com as modificações das concentrações das soluções, otimizadas por GUIMARÃES (1997). Foram preparados 500 mL de solução de sacarose 300 g/L e 250 mL de solução de hidróxido de sódio 120 g/L. As soluções foram esterilizadas separadamente e misturadas logo após esfriarem. A solução final continha uma concentração de 200 g/L de sacarose e 40 g/L de hidróxido de sódio.

d) Fermentação: em um fermentador BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. de 3,0 L de capacidade contendo 1,5 L de meio padrão estéril, foi adicionado o inóculo da pré-fermentação (150 mL). A fermentação ocorreu a 27°C, com aeração de 0,5 L/min e agitação mecânica de 150 rpm. O pH foi mantido em $6,7 \pm 0,1$ com adição de solução combinada de sacarose e NaOH, adicionada ao meio de cultura através de uma bomba peristáltica comandada por um controlador automático de pH durante um período de 6 horas. Após esse tempo, a alimentação foi interrompida para que ocorresse a diminuição do pH e da concentração residual de substrato. A fermentação foi encerrada quando o pH atingiu 5,2, num tempo máximo de 8,5 horas de processo. No final da fermentação foi retirada uma amostra de 10 mL e centrifugada, para determinar a atividade do sobrenadante e avaliar o desempenho da fermentação.

e) Separação das Células: o caldo proveniente da fermentação foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C, em centrífuga SORVALL modelo RC-5C, para separação das células bacterianas.

f) Enzima Bruta: a enzima bruta foi obtida após a separação das células. A enzima é mantida em estoque no laboratório a -15°C.

g) Enzima Purificada: para a purificação da enzima realizou-se uma ultrafiltração em um ultrafiltro SARTORIS modelo SM 16525, para remoção de impurezas e concentração da enzima. O processo de ultrafiltração ocorreu até que se obtivesse um volume de concentrado igual a metade do volume inicial, num tempo máximo de duas horas. Em seguida adicionou-se lentamente no concentrado uma solução 50% de polietilenoglicol 1500 (PEG 1500) de mesmo volume e centrifugou-se a mistura a 12.000 rpm e temperatura de 4°C, durante 10 minutos. A fase rica em dextrana-sacarase (precipitado) foi rediluída em tampão acetato de sódio 20mM com pH ajustado em 5,2, contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio. A enzima purificada é mantida em estoque no laboratório a -15°C.

Foi realizada a determinação da atividade da enzima bruta e purificada, segundo método que será descrito posteriormente.

4.1.1.2 Síntese de Dextrana

As reações de polimerização foram realizadas em reator de vidro encamisado, equipado com um agitador mecânico para garantir uma perfeita homogeneidade. O controle de temperatura foi feito por circulação de água através do reator, obtida de um banho externo termostaticado mantido a temperatura de 23°C. O pH foi mantido em 5,2 através de tampão fosfato, valor este de maior estabilidade e atividade da enzima.

A dextrana foi obtida utilizando-se a enzima purificada e a enzima bruta, com o objetivo de verificar que tipo de enzima apresenta o maior rendimento de dextrana de alta massa molecular.

Síntese com Enzima Purificada

A síntese com enzima purificada ocorreu inicialmente em reatores com volume reacional de 100 mL para realização de um estudo com relação a concentração inicial de sacarose e o tempo de reação. As concentrações iniciais de sacarose utilizadas foram de 50 g/L e 100 g/L de acordo com o trabalho de CURRALERO (1993). Após os testes iniciais, foram realizadas reações de polimerização em reatores de 1000 mL para obtenção de maior quantidade de dextrana para as etapas posteriores. A concentração enzimática foi de 40 UDS/mL.

Síntese com Enzima Bruta

As reações de polimerização com a enzima bruta foram realizadas no reator de 1.000 mL com concentração de sacarose de 50 g/L, nas mesmas condições de

temperatura 23°C e pH 5,2 da síntese com enzima purificada. A concentração de enzima também foi de 40 UDS/mL.

Em ambas as sínteses foram retiradas amostras a cada 30 minutos, num tempo máximo de 10 horas de processo. As amostras foram analisadas em HPLC pelo método de cromatografia de permeação em gel para verificação das concentrações de frutose, glicose, sacarose, oligossacarídeos e dextrana formada, bem como a distribuição da massa molecular das dextranas.

4.1.2 PROCESSO CONVENCIONAL

Microrganismo

O processo convencional foi realizado com o microrganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, o mesmo utilizado no processo enzimático.

Meio de Cultura

Na fermentação foi utilizado o meio descrito por ALSOP (1983), mostrado a seguir:

Meio Padrão:

<i>Reagente</i>	<i>Concentração (g/L)</i>
Sacarose	180,0
Extrato de levedura	20,0
Fosfato de potássio dibásico	20,0
Sulfato de magnésio	0,20
Sulfato de manganês	0,01
Sulfato ferroso	0,01
Cloreto de cálcio	0,02
Cloreto de sódio	0,01
Antiespumante	

O meio foi preparado como descrito anteriormente, apenas o pH que foi alterado, sendo ajustado para 8,0.

Etapas da Fermentação

As etapas de ativação do microrganismo e inóculo foram as mesmas da fermentação do processo enzimático, apenas a concentração de sacarose do inóculo é que foi de 100 g/L ao invés de 50 g/L do meio padrão.

A fermentação ocorreu em um fermentador BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. de 5,0 L de capacidade contendo 2,5 L de meio padrão estéril, onde foi adicionado o inóculo da pré-fermentação (250 mL). A fermentação ocorreu a 23°C e

pH 8,0, com aeração de 0,5 L/min e agitação mecânica de 250 rpm. A fermentação foi encerrada com 48 horas de processo.

Foram retiradas amostras durante as 48 horas de processo para verificação das concentrações de sacarose, glicose, frutose, e dextrana formadas, bem como a distribuição da massa molecular da dextrana.

4.2 OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

A dextrana clínica é obtida a partir da dextrana bruta através de uma etapa de redução da massa molecular. Após a dextrana clínica formada, esta é separada do meio reacional através de precipitação seletiva.

4.2.1 REDUÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Após a síntese da dextrana bruta, foi realizada a redução da massa molecular através da hidrólise ácida da dextrana nativa, utilizando o procedimento de SANTOS (1996).

Foram realizados três experimentos de redução da dextrana bruta pelo método de hidrólise ácida, sendo utilizadas condições diferentes para observação do rendimento de dextrana clínica formada.

Os experimentos foram realizados em balão de três bocas de 250 mL, contendo 100 g de dextrana bruta (proveniente da síntese). O balão de reação foi imerso em um banho termostatizado para a manutenção da temperatura, e equipado com condensador, agitador mecânico e termômetro. Foi adicionado ácido sulfúrico 3 N na amostra em quantidade apropriada para propiciar o pH desejado. O ácido foi adicionado rapidamente com a agitação mecânica ligada e o tempo de hidrólise foi cronometrado a partir do instante da adição do ácido.

As condições da primeira hidrólise foram as otimizadas por GUIMARÃES *et al.* (1999), sendo as outras modificadas para comparação das distribuições de dextrana clínicas produzidas. Na Tabela 4.1 é mostrado as condições utilizadas nos experimentos.

Tabela 4.1: Condições utilizadas nos experimentos de hidrólise ácida

Experimento	Temperatura	pH
1	72°C	1,0
2	76°C	1,0
3	76°C	1,5

Amostras foram retiradas de 30 em 30 minutos para acompanhamento da reação. O processo foi interrompido através de resfriamento rápido em banho de gelo, e simultânea neutralização com solução de hidróxido de sódio 1,5 N. A neutralização final para pH 6,5 a 7,0, ocorreu na temperatura ambiente com solução alcalina mais diluída. As amostras foram congeladas para posterior análise de distribuição da massa molecular.

4.2.2 PRECIPITAÇÃO E ESTOCAGEM

A precipitação e separação da dextrana após a hidrólise ácida ocorreu através de precipitações seletivas com concentrações diferentes de etanol. O método consiste em explorar a diferente solubilidade que as moléculas de dextrana apresentam dependendo do sua massa molecular.

A precipitação, também conhecida como fracionamento, foi realizada segundo metodologia de WOLF *et al.* (1954). A solução de dextrana hidrolisada, contendo no máximo 5% de dextrana, foi colocada em tubos de centrifuga e adicionado etanol 95% em quantidades adequadas para atingir as concentrações desejadas. Após a adição do etanol os tubos foram mantidos em banho termostatizado com temperatura controlado em 25°C por 1 hora. A dextrana foi separada por centrifugação a 12.000

rpm por 12 minutos em centrífuga SORVALL modelo RC-5C, com temperatura controlada em 25°C.

Foram realizados três estudos de fracionamento para descobrir os melhores percentuais de etanol na solução para aumentar o rendimento de dextrana clínica precipitada. A Tabela 4.2 descreve os percentuais de etanol utilizados para precipitação de dextrana.

Tabela 4.2: Percentuais de etanol utilizados para fracionamento de dextrana.

Fracionamento	Percentuais (v/v)
1	35 à 60
2	38 à 47
3	38,5 à 46

O sobrenadante foi quantificado quanto a distribuição da massa molecular de dextrana.

4.2.2.1 Fração Clínica

A fração clínica da dextrana foi obtida através da precipitação seletiva utilizando duas concentrações de etanol. O fluxograma da Figura 4.1 mostra como foi obtida a fração clínica de dextrana.

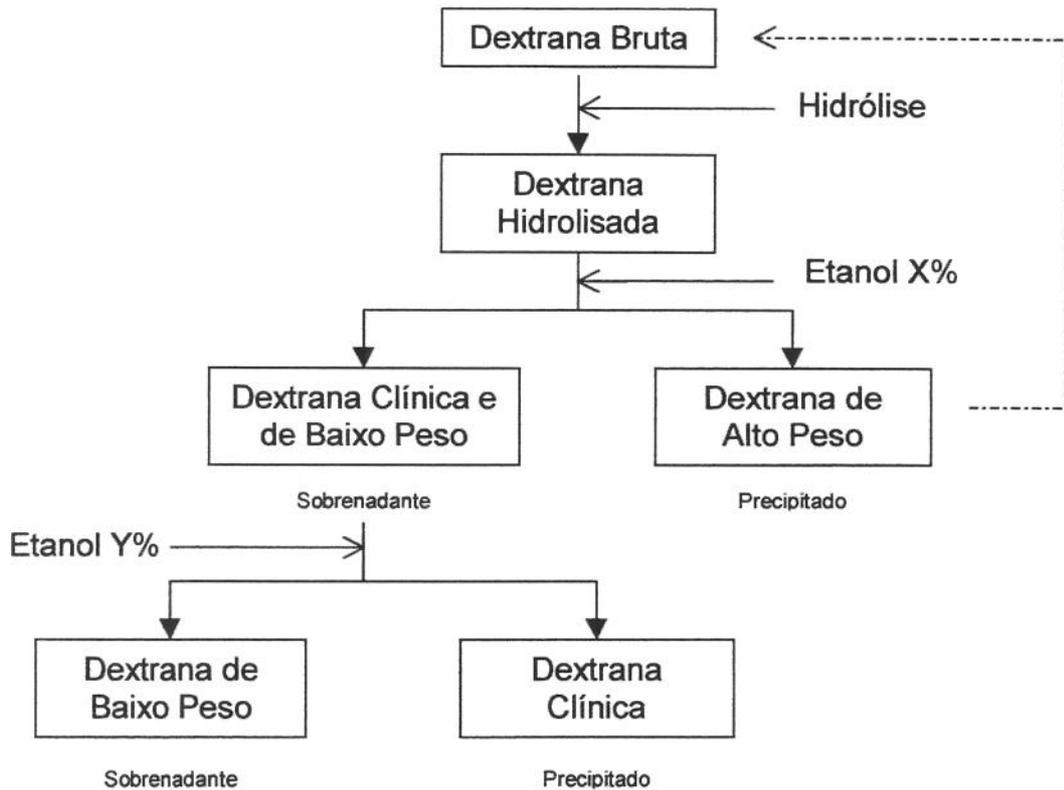


Figura 4.1: Fluxograma de obtenção da fração clínica.

A partir de uma amostra de dextrana hidrolisada foi adicionado etanol 95% até atingir uma concentração X. Nesta concentração ocorreu a precipitação da dextrana de alta massa molecular. Com o sobrenadante, o qual continha dextrana clínica e de baixa massa molecular, foi adicionado mais etanol 95% para atingir uma concentração Y. Nesta segunda concentração de etanol da amostra ocorreu a precipitação da dextrana clínica. Ambas as precipitações seguiram metodologia de WOLF *et al.*(1954), já descritas no item anterior.

A linha pontilhada na Figura 4.1 mostra que poderia ser realizado um aproveitamento da dextrana de alta massa molecular que precipitou com a adição de etanol até X%, podendo assim aumentar o rendimento de dextrana clínica.

Foram realizados três experimentos com concentrações de etanol diferentes para a obtenção da fração clínica de dextrana, concentrações estas mostradas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Concentrações de etanol utilizadas para a obtenção da fração clínica de dextrana

Experimentos Realizados	Concentrações de Etanol	
	X %	Y %
1	39,5	45,5
2	39,5	45,5
3	39	46

O sobrenadante, como também o precipitado rediluído, foram analisados com relação a distribuição da massa molecular de dextrana.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE DEXTRANA

A determinação da massa molecular de dextrana, bem como sua distribuição molecular, foram realizadas por cromatografia de permeação em gel (GPC). Para tal foi utilizada a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), composta de diversos equipamentos:

- a) Um injetor automático VARIAN 9095;
- b) Uma bomba ternária VARIAN 9010;
- c) Um forno Spark Holland 99;
- d) Um detector de índice de refração R14;
- e) Um software para aquisição e processamento dos dados além de geração de relatórios ("Millennium Chromatography Manager v2.10" – Waters);

f) Um conjunto de três colunas e uma pré-coluna VARIAN série Micropak. As colunas foram conectadas em série na sequência de poro decrescente. A faixa de exclusão de cada coluna e suas dimensões são mostradas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Características das colunas utilizadas para determinação do percentual da massa molecular da dextrana

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

Para a realização das análises várias etapas foram realizadas, descritas a seguir.

4.3.1.1 Preparo da Fase Móvel

O principal critério para análise de polímeros por cromatografia de permeação em gel é a sua solubilidade em água. Como eluente foi utilizado água ultrapura, obtida de um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus. A água foi degaseificada a vácuo durante uma hora num banho ultra-som Eurosonics, modelo SX-20. O frasco contendo a fase móvel foi mantido de 10 a 15 cm acima da entrada da bomba, sendo seu fluxo aumentado lentamente até 1,0 mL/min.

4.3.1.2 Preparo das Amostras e Padrões

As amostras e os padrões de dextrana foram dissolvidos em água Milli-Q numa concentração de 0,4% (p/v) e colocados em tubos apropriados do equipamento sem filtragem, devido as amostras serem muito viscosas.

Posteriormente foram deixadas em repouso por um período de 16 a 20 horas antes de serem injetadas. Este tempo é necessário para permitir que a cadeia do polímero se estenda para sua conformação de solvatação no solvente, principalmente para amostras e padrões com massa molecular acima de 200.000 Da.

4.3.1.3 Injeção das Amostras no HPLC

As colunas do cromatógrafo são conectadas em série e na sequência do poro maior para o menor, com o objetivo de separar primeiramente as moléculas maiores, evitando problemas de viscosidade. Esta disposição também faz com que as colunas de menor porosidade fiquem mais distantes da bomba, pois são mais sensíveis a pressão. As condições de injeção das amostras e dos padrões foram:

- temperatura do forno: 40°C;
- temperatura do detector de índice de refração: 40°C;
- volume de injeção: 98,0 µL;
- vazão de eluente: 1,0 mL/min;
- tempo de corrida: 45 min.

4.3.1.4 Curva de Calibração

Na curva padrão foram utilizados padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation), apresentados na Tabela 4.5. A curva padrão foi obtida utilizando M_w , M_n e M_p como parâmetros básicos.

Tabela 4.5: Massas moleculares dos padrões de dextrana utilizados para fazer a curva padrão

Padrão	Mw	Mn	Mp
DXT 11K	11.700	9.900	8.000
DXT 43K	42.750	35.000	28.700
DXT 79K	78.800	68.000	49.400
DXT 165K	165.500	150.000	110.800
DXT 685K	685.000	500.000	380.600
DXT 1750K	1.750.000	1.450.000	1.250.000
DXT 5000K	4.900.000	4.500.000	1.500.000

4.3.1.5 Quantificação das Amostras

As amostras foram quantificadas a partir da integração dos cromatogramas com o auxílio do software “Millennium v2.10”, e a distribuição da massa molecular das amostras obtida através da curva de calibração.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

Durante os experimentos foram determinadas concentrações de sacarose, glicose e frutose. Nas análises desses açúcares foram utilizados dois métodos que serão descritos a seguir.

4.3.2.1 Determinação de Açúcares por HPLC

A determinação das concentrações de sacarose, frutose e glicose nas amostras foram realizadas por cromatografia líquida em coluna KS-801 da marca Shodex, analisadas em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) da marca Varian.

Preparo da Fase Móvel

A fase móvel utilizada foi água ultra pura e degaseificada, preparada de acordo com a metodologia descrita anteriormente. O fluxo de eluente foi aumentado lentamente até 0,6 mL/min.

Curva de Calibração

Foi preparado uma solução padrão de sacarose, glicose e frutose na concentração de 3%. Desta solução mãe, foram preparados os padrões nas concentrações de 0,1 a 3%, resultando sete soluções padrões.

Os padrões foram filtrados em filtros Millipore 0,45 μ m para retirada de impurezas, e colocados em tubos apropriados para posterior injeção no cromatógrafo.

Preparo das Amostras

Foi retirada 1g da solução a qual se deseja determinar as concentrações de açúcares e adicionado 1g de etanol 95%, para precipitar a dextrana produzida. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi retirado e diluído convenientemente para ficar numa faixa de concentração de 0,1 a 3%. Por fim, a amostra foi filtrada em filtro Millipore 0,45 μ m para retirada de impurezas, e acondicionado em frascos adequados para posterior injeção no cromatógrafo.

Injeção das Amostras e Padrões no HPLC

As amostras e padrões foram injetados em uma pré-coluna e coluna Shodex KS-801 nas seguintes condições:

- temperatura do forno: 60°C;
- temperatura do detector de índice de refração: 40°C;
- volume de injeção: 98,0 μ L;
- vazão de eluente: 0,6 mL/min;

- tempo de corrida: 45 min.

A injeção dos padrões e de algumas amostras foram realizadas em repetição, para melhor construir a curva padrão e observar a repetibilidade dos resultados.

Identificação e Quantificação das Amostras

As amostras foram identificadas e quantificadas a partir da integração dos cromatogramas com o auxílio do software “Millennium v2.10”, tendo como base a curva padrão.

4.3.2.2 Determinação de Açúcares Redutores

A determinação de açúcares redutores foi conduzida pelo método de Miller (1959). O método consiste na reação de 1,0 mL de amostra convenientemente diluída com 1,0 mL do reagente DNS, colocando-se a seguir em banho-maria por 5 minutos. Resfria-se imediatamente a solução em gelo e adiciona-se 16 mL da solução de tartarato de sódio e potássio 11,25 g/L previamente preparada. O branco foi feito pela substituição da amostra por água destilada.

A reação de DNS com açúcares redutores produz uma coloração amarela, cuja intensidade é proporcional a concentração de açúcares redutores presentes na amostra. Para a determinação dessa concentração, foi elaborada uma curva padrão através de soluções com concentrações conhecidas de açúcar na faixa de 0,2 a 2,0 g/L. Foram feitas leituras da absorbância das soluções em espectrofotômetro modelo B 342 II da Micronal em comprimento de onda de 540 nm, e estabelecida uma correlação entre absorbância e concentração de açúcares (curva padrão), conforme a Equação 4.1.

$$\text{Conc. (g/L)} = f(\text{ABS}) \quad (\text{eq. 4.1})$$

- Preparo do 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 os três reagentes a quente, e adicionar:

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

Determinação da concentração de açúcar redutor das amostras

As amostras foram diluídas para se obter concentrações dentro da faixa da curva padrão (0,2 a 2,0 g/L) e preparadas como descrito no item anterior, para posteriormente serem lidas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A partir do valor da absorbância encontrado, determinou-se o valor da concentração de açúcares redutores com o auxílio da curva padrão ou da correlação obtida. Este procedimento foi utilizado para a determinação da concentração de frutose para determinação da atividade enzimática.

Atividade enzimática

A atividade da enzima dextrana-sacarase foi determinada medindo a velocidade inicial da frutose produzida durante a reação da sacarose com o pH ajustado em 5,2 e temperatura de 30°C.

A reação enzimática ocorreu em um reator de vidro encamisado de 25 mL de volume, agitado mecanicamente e com temperatura controlada por um banho termostaticado externo. Foram adicionados no reator 2 mL de solução de sacarose de concentração 600 g/L, diluída em tampão acetato de sódio 20 mM com 0,05 g/L de CaCl₂; 0,5 mL de tampão acetato de sódio 20 mM com 1,2 g/L de CaCl₂; 8,5 mL de água destilada e 1 mL da amostra da solução enzimática.

A cada 3 minutos foi retirada uma amostra de 1 mL, e determinada a quantidade de frutose produzida neste período, de acordo com o método DNS para determinação de açúcares redutores descrito anteriormente. A partir dos valores de absorvância lidos no espectrofotômetro a 540 nm, foi construído um gráfico com intervalos de tempo regulares de absorvância versus tempo. A atividade foi calculada a partir da Equação 4.2.

$$\text{Ativ. (UDS / mL)} = \frac{(\alpha \cdot \beta \cdot d \cdot 60)}{0,52} \quad (\text{eq. 4.2})$$

onde:

α - coeficiente angular da curva de absorvância vs. tempo

β - coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d - volume de diluição final no reator de vidro

A atividade é calculada em UDS, que significa a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana num período de uma hora, nas condições de teste ALSOP (1983).

4.3.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO

4.3.3.1 Rendimento de Dextrana

Os rendimentos de dextrana de alta massa molecular foram determinados a partir das Equações 4.3 e 4.4:

Rendimento de Dextrana para o Processo Convencional:

$$Y_{D>30/S} = \frac{m_D * \%_{D>30}}{m_S * 100} \quad (\text{eq. 4.3})$$

onde:

$Y_{D>30/S}$ - rendimento de dextrana de alta massa molecular (> 30.000 Da);

m_D - massa de dextrana produzida no processo convencional (g);

$\%_{D>30}$ - percentual de dextrana de alta massa molecular (> 30.000 Da) na síntese enzimática;

m_S - massa de sacarose utilizada no processo (inóculo e fermentação) (g).

Rendimento de Dextrana para o Processo Enzimático:

$$Y_{D>30/S} = \frac{m_{SS} * 0,474 * \%_{D>30}}{m_S * 100} \quad (\text{eq. 4.4})$$

onde:

0,474 - máximo rendimento teórico de síntese de dextrana a partir de sacarose;

$Y_{D>30/S}$ - rendimento de dextrana de alta massa molecular (> 30.000 Da);

m_{ss} - massa de sacarose utilizada na síntese enzimática (g);

$\%_{D>30}$ - percentual de dextrana de alta massa molecular (> 30.000 Da) na síntese enzimática;

m_s - massa de sacarose utilizada no processo (inóculo, fermentação e síntese) (g).

4.3.3.2 Rendimento Frutose

Os rendimentos de frutose foram determinados a partir da Equação 4.5:

Rendimento de Frutose para os Processos Convencional e Enzimático:

$$Y_{F/S} = \frac{m_F}{m_S} \quad (\text{eq. 4.5})$$

onde:

$Y_{F/S}$ - rendimento de frutose;

m_F - massa de frutose produzida no processo (g);

m_s - massa de sacarose utilizada no processo (inóculo, fermentação e síntese) (g);

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE DEXTRANA

A dextrana bruta foi produzida por dois processos diferentes, o processo convencional e o processo enzimático, com o objetivo de verificar qual deles apresenta o maior rendimento de dextrana de alta massa molecular e frutose. A seguir são mostrados os resultados obtidos na produção de dextrana por ambos processos.

5.1.1 PROCESSO ENZIMÁTICO

Durante o processo enzimático duas etapas distintas ocorrem, sendo primeiro a produção da enzima dextrana-sacarase, e segundo a síntese de dextrana. A síntese de dextrana aconteceu de duas maneiras, uma com a enzima dextrana-sacarase purificada, e outra com a enzima bruta.

5.1.1.1 Produção de dextrana-sacarase

Foram realizadas três fermentações para produção da enzima dextrana-sacarase. Os resultados são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Concentrações da enzima dextrana-sacarase nas fermentações

Fermentação	UDS/mL	UDS	pH final
1	101,27	157,504	5,49
2	89,58	152,286	5,53
3	89,12	160,424	5,32

As três fermentações apresentaram resultados bem parecidos no que se refere as unidades de dextrana-sacarase produzidas. Esses resultados estão bem próximos aos que BAZÁN (1993) encontrou em seus estudos, sendo seus resultados máximos na ordem de 106 UDS/mL.

A enzima produzida foi estocada na forma bruta e na forma purificada para posterior utilização na síntese de dextrana.

Diferença entre enzima bruta e enzima purificada

As principais diferenças entre as duas maneiras de estocagem da enzima são a grande estabilidade e o ganho de atividade apresentadas pela enzima purificada.

Durante o processo de purificação ocorre uma variação na quantidade de enzima em solução, como mostra a Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Acompanhamento da atividade enziática durante a purificação da enzima dextrana-sacarase

Enzima	Atividade Total
Enzima bruta	152.000
Enzima concentrada	135.000
enzima purificada	221.000

A diminuição de atividade em solução ocorrida na fase de concentração deve-se a grande pressão exercida durante o processo de ultrafiltração, bem como a formação de espuma, ocasionando desnaturação de parte da enzima. Porém, na fase da purificação propriamente dita, ocorreu um aumento de 64% na atividade enzimática, ocasionada pela eliminação das impurezas devido a precipitação com polietilenoglicol, e principalmente pela adição de íons Ca^{+2} na solução de rediluição, que afeta fortemente a atividade. Este aumento de atividade foi verificado por ALSOP (1983), onde a adição de 0,05% de cloreto de cálcio ocasionou um aumento de 12,6 UDS/mL para 33,9 UDS/mL na atividade da enzima.

A enzima purificada também apresenta uma pequena perda de atividade de 20,8% durante a estocagem a -15°C , como é mostrada na Tabela 5.3 e Figura 5.1.

Tabela 5.3: Acompanhamento da perda de atividade da enzima purificada durante a estocagem a -15°C

Dias	Atividade/mL	% Ativ. Enzimática
0	250,1	100
4	239,4	95,7
56	208,8	83,5
58	204,8	81,9
79	198,0	79,2

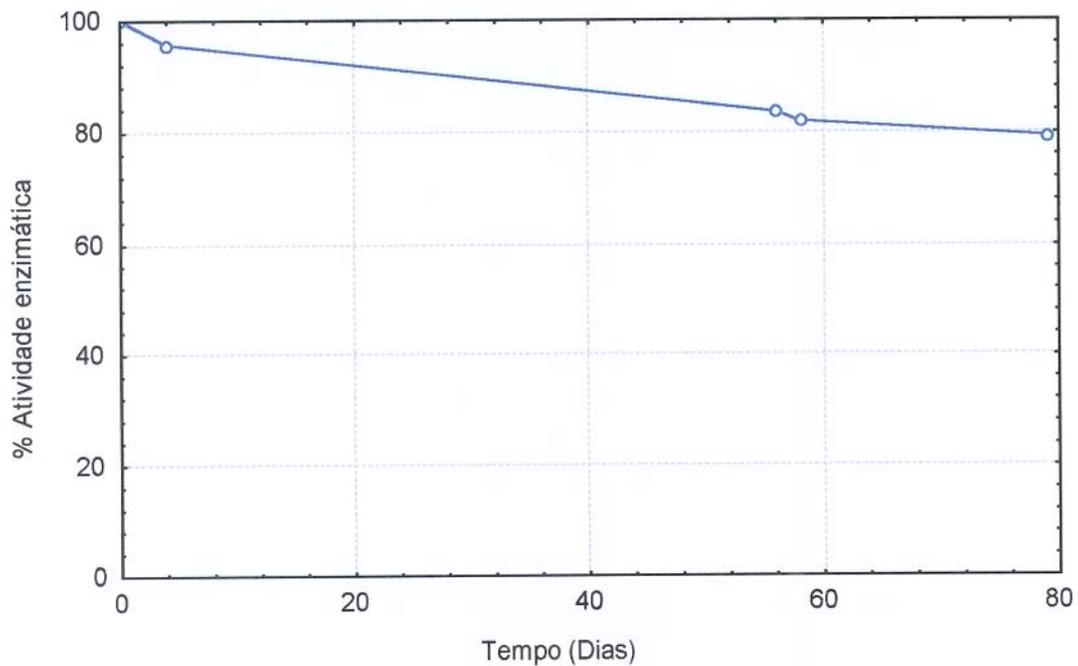


Figura 5.1: Perda da atividade enzimática durante o armazenamento -15°C

A Figura 5.1 e a Tabela 5.3 mostram uma perda de atividade da enzima purificada de 21% em 79 dias de estocagem a -10°C . Este valor está bem abaixo do comentado por ALSOP (1983), que é de 60% de perda em 20 dias. A menor perda apresentada nos resultados deste trabalho se deve a presença de íons Ca^{+2} ,

dextrana e polietilenoglicol em solução com a enzima, sendo essas substâncias imprescindíveis na estabilidade da mesma. A origem destes componentes foi variada, como por exemplo a dextrana foi originária do final da fermentação, quando foi cortada a alimentação deixando que o pH caísse, formando o polissacarídeo. Já o cálcio e o polietilenoglicol foram adicionados em etapas distintas da purificação da enzima.

A importância da adição de cálcio também foram verificados por KABOLI e REILY (1980), onde conseguiram uma redução de mais de 50% na perda de atividade enzimática da dextrana-sacarase purificada em suas condições de teste.

5.1.1.2 Síntese de dextrana bruta

A síntese de dextrana ocorreu com a enzima bruta, proveniente da fermentação, e com a enzima purificada, obtida conforme metodologia descrita anteriormente.

Foram realizados vários testes com a enzima purificada, objetivando aumentar o rendimento de dextrana bruta. Após a escolha das melhores condições, testou-se a utilização da enzima bruta para comparações de rendimento. A seguir serão comentados todos os experimentos realizados para produção da dextrana bruta.

Enzima purificada

Inicialmente foi realizado um estudo de verificação da melhor concentração inicial de sacarose e tempo de processo para se obter o melhor rendimento e produtividade, seguindo trabalhos anteriores de GUIMARÃES *et al.* (1999). A primeira síntese enzimática é mostrada na Tabela 5.4 e no Figura 5.2.

Tabela 5.4: Concentrações de açúcares da 1ª síntese enzimática com enzima purificada

Tempo (horas)	50 g/L			100 g/L		
	sacarose	frutose	Glicose	sacarose	frutose	glicose
0	57,6	7,1	0	89,5	7,1	0
1	27,7	13,1	0	72,3	13,0	0
2	9,8	19,1	0	50,8	21,9	5,4
3	0	25,8	0	39,2	35,8	5,6
4	0	20,7	0	12,8	35,8	0
5	0	21,8	0	6,3	39,7	0
6	0	21,0	0	0	40,2	0
7	0	22,6	0	0	38,6	0
8	0	21,5	0	0	40,0	0
9	0	20,2	0	0	39,9	0
10	0	19,9	0	0	39,7	0

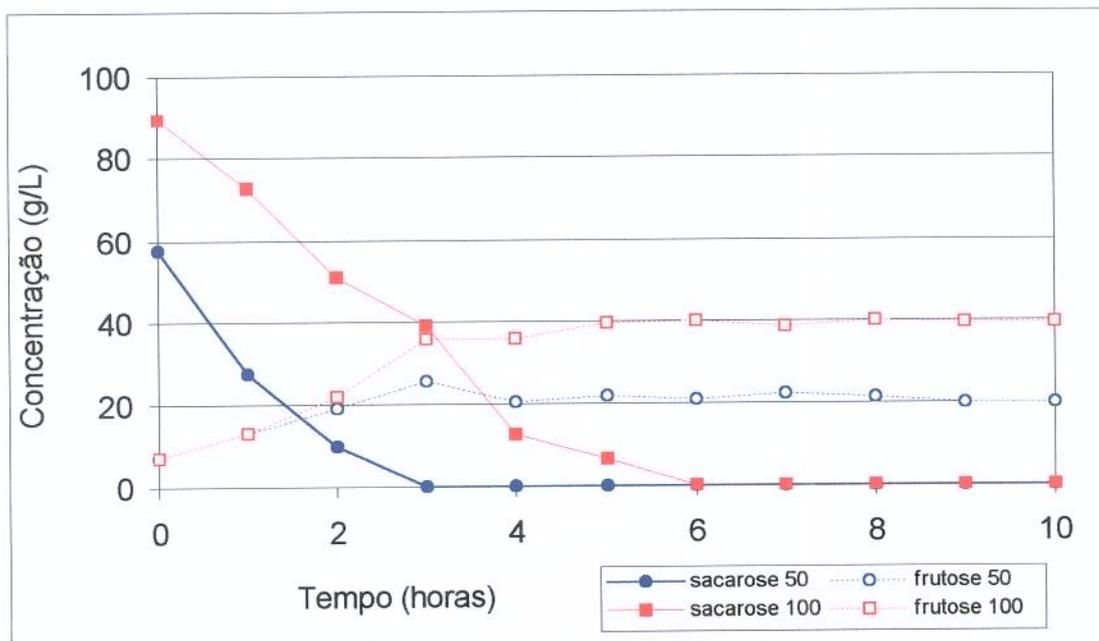


Figura 5.2: Concentrações de açúcares da 1ª síntese enzimática com enzima purificada

Nos testes iniciais foram utilizadas as concentrações de 50 g/L e 100 g/L. Estes valores foram escolhidos devido a inibição pelo substrato sofrida pela enzima, e conseqüente queda na velocidade inicial de síntese para concentrações acima de 100 g/L, evidenciado em estudos de CURRALERO (1993). A autora também comenta que em concentrações elevadas ocorre um aumento significativo da viscosidade do meio, bem como a formação de dextrana de baixa massa molecular, indesejáveis nesta etapa do processo.

Nesses primeiros testes pode-se observar que para a concentração de 50 g/L a reação de polimerização se encerrou próximo das 3 horas de processo, enquanto que para a concentração de 100 g/L o tempo ficou em torno de 6 horas. Esse tempo está diretamente ligado a quantidade de sacarose, que é o substrato da enzima.

A partir desses resultados foi realizada a segunda síntese de dextrana bruta, nas mesmas concentrações, mas com amostragem de 30 em 30 minutos, objetivando encontrar o tempo certo de término do processo. Os resultados da segunda síntese são mostrados na Tabela 5.5 e na Figura 5.3.

Tabela 5.5: Concentrações de açúcares da 2^a síntese enzimática com enzima purificada

Tempo (horas)	50 g/L			100 g/L		
	sacarose	frutose	Glicose	sacarose	frutose	glicose
0	58,6	0	0	107,1	0	0
0,5	38,8	7,0	0	92,2	6,1	0
1	20,5	13,3	0,5	78,8	12,9	1,1
1,5	8,2	18,4	0,5	61,6	18,6	1,1
2	1,5	21,3	0,5	45,0	26,8	1,1
2,5	0	21,6	0,5	32,9	32,6	1,1
3				20,3	37,6	1,1
3,5				9,2	41,7	1,1
4				5,3	43,9	1,1
4,5				4,5	44,5	1,1
5				0	44,6	1,1

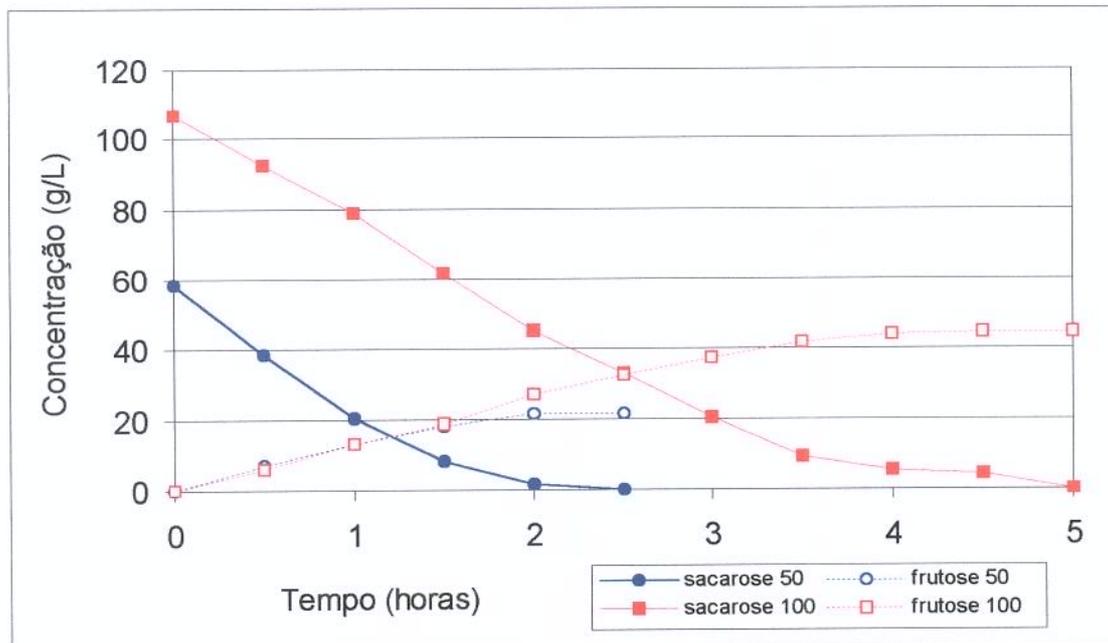


Figura 5.3: Concentrações de açúcares da 2^a síntese enzimática com enzima purificada

Nesta segunda síntese observa-se que chegou-se num tempo de reação menor, devido a amostragem ter sido feita em intervalos de tempo menores. Com relação a produtividade, esta foi igual para os dois casos, pois quando tem-se uma concentração dobrada de sacarose inicial (100 g/L), tem-se também um tempo dobrado de processo. Neste caso, a produtividade não pode ser um parâmetro de decisão, tendo que ser observado a distribuição da massa molecular da dextrana polimerizada, que é mostrada na Tabela 5.6.

Tabela 5.6: Distribuição percentual da massa molecular da dextrana produzida na 2ª síntese enzimática com enzima purificada

	% Dextrana		
	Baixo Massa	Clínica	Alto Massa
100 g/L (5 horas)	44,5	4,7	50,8
50 g/L (2,5 horas)	24,5	2,4	73,1

Com esses resultados observa-se que a quantidade de dextrana de alta massa molecular foi maior quando utilizou-se 50 g/L de concentração inicial de sacarose, indicando um melhor rendimento. Nessa etapa é importante obter o maior percentual possível de dextrana de alta massa molecular, para que numa etapa posterior se produza a dextrana clínica, e uma baixa quantidade de dextrana de baixa massa molecular que não pode ser aproveitada para a dextrana clínica.

Quando utiliza-se maiores concentrações de sacarose inicial, a quantidade de frutose liberada em solução pela quebra da molécula de sacarose será maior. Com isso, a frutose que esta em solução é utilizada pela enzima dextrana-sacarase como receptor, fazendo com que a cadeia de dextrana não se forme por completo, diminuindo sua massa molecular.

Na Figura 5.4 é mostrado os picos de dextrana de alta massa molecular para as duas concentrações iniciais de sacarose.

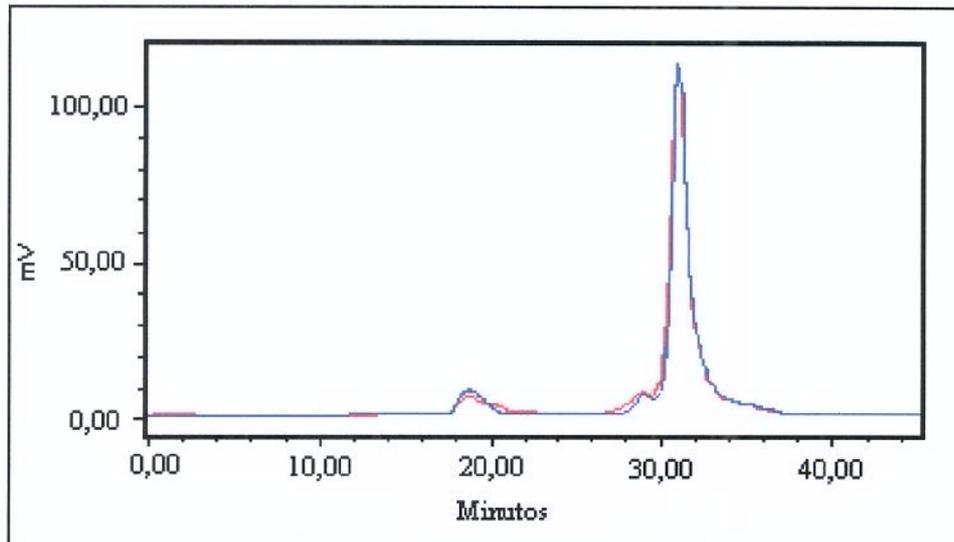


Figura 5.4: Picos de dextrana das concentrações de 50g/L (pico azul) e 100g/L (pico vermelho)

Após verificar qual a melhor concentração de sacarose inicial e o tempo de processo onde se obtém o melhor rendimento, realizou-se mais uma síntese enzimática com a enzima purificada, com a finalidade de se obter uma quantidade maior de dextrana bruta para ser utilizada na etapa de hidrólise ácida. Essa síntese foi realizada com concentração inicial de sacarose de 50 g/L e tempo de 2,5 horas de processo. Nas Tabelas 5.7 e 5.8 e na Figura 5.5 são mostrados os resultados da terceira síntese.

Tabela 5.7: Concentrações de açúcares da 3ª síntese enzimática com enzima purificada

Tempo (horas)	50 g/L		
	sacarose	frutose	Glicose
0	53,1	0	0
0,5	37,5	8,5	0,9
1	22,0	15,6	0,9
1,5	9,8	19,7	0,7
1,75	5,5	22,9	0,6
2	2,1	24,3	0,6
2,25	0,3	24,1	0,3
2,5	0	24,4	0,4
3	0	25,1	0,5

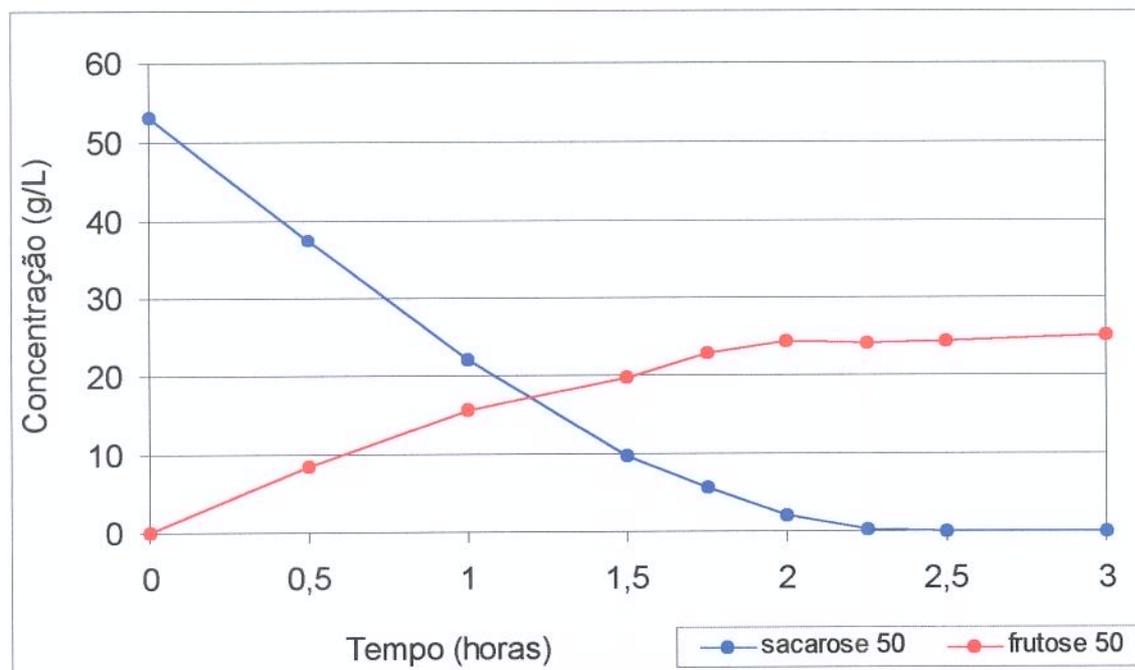


Figura 5.5: Concentrações de açúcares da 3ª síntese enzimática com enzima purificada

Tabela 5.8: Distribuição percentual da massa molecular da dextrana produzida na 3ª síntese enzimática com enzima purificada

	% Dextrana		
	Baixo Massa	Clínica	Alto Massa
50 g/L (2,5 horas)	29,6	2,0	68,4

Os valores de açúcares da terceira síntese estão próximos aos encontrados nos estudos anteriores. Já com relação a distribuição da massa molecular da dextrana produzida, isso não ocorreu, ficando um pouco abaixo do encontrado na segunda síntese. Essa variação pode ter ocorrido devido a concentração enzimática na solução de síntese, ocasionando uma maior velocidade de reação e a utilização da frutose em solução para formação da dextrana de menor massa molecular. Essa variação na concentração enzimática na solução pode ser ocasionada pela variabilidade do método de Miller (1959), utilizado para determinação da atividade enzimática.

Enzima bruta

Após os estudos para verificação da melhor concentração inicial de sacarose para a síntese enzimática de dextrana bruta, utilizou-se a enzima bruta na síntese com concentração de 50 g/L de sacarose.

Foi realizada uma síntese com a enzima bruta, onde os resultados são mostrados na Tabela 5.9 e Figura 5.6.

Tabela 5.9: Concentrações de açúcares da síntese enzimática com a enzima bruta

Tempo (horas)	50 g/L		
	sacarose	frutose	glicose
0	55,2	15,2	5,3
0,5	35,0	14,3	5,1
1	19,4	19,7	4,5
1,5	8,2	27,3	3,7
1,75	1,3	26,1	1,9
2	0	28,2	3,4
2,25	0	28,4	3,4
2,5	0	27,8	3,2

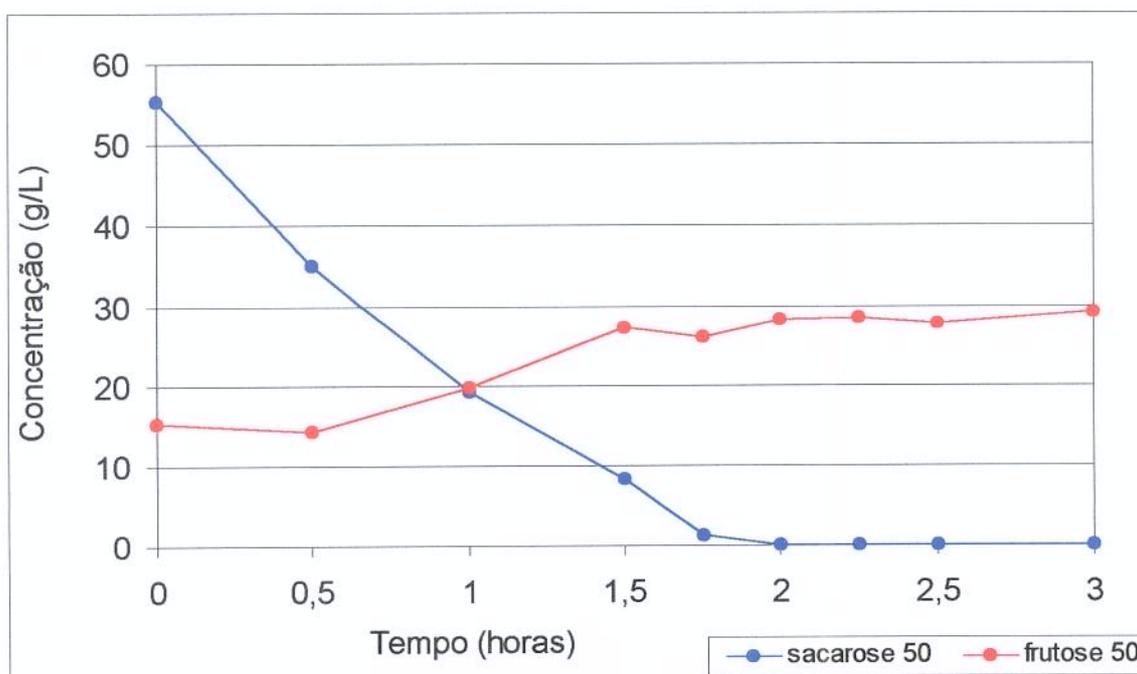


Figura 5.6: Concentrações de açúcares da síntese enzimática com enzima bruta

Nos resultados de açúcares apresentados, pode-se observar que inicialmente já se tinha uma concentração inicial de frutose e glicose. Isso deve-se ao caldo da fermentação onde se encontra a enzima bruta.

Durante a síntese, observa-se que as concentrações de glicose e frutose iniciais tendem a diminuir. Isso se deve a utilização desses dois açúcares pela enzima como receptor.

Na Tabela 5.10 é mostrado o resultado da distribuição molecular da dextrana produzida com enzima bruta.

Tabela 5.10: Distribuição percentual da massa molecular da dextrana produzida na síntese enzimática com enzima bruta

	% Dextrana		
	Baixo Massa	Clínica	Alto Massa
50 g/L (2,0 horas)	50,1	15,3	34,6

Os resultados da distribuição da massa molecular mostram um valor baixo de dextrana de alta massa molecular, devido a utilização de açúcares (glicose e frutose) pela enzima como receptor, ocasionando a produção de dextrana de baixa massa molecular. Isto é evidenciado pela diminuição da concentração de frutose e glicose na primeira hora de síntese, mostrado na Tabela 5.9.

5.1.2 PROCESSO CONVENCIONAL

O processo convencional apresenta as três etapas de produção de dextrana ao mesmo tempo: crescimento do microrganismo, produção da enzima dextranase e síntese de dextrana.

As concentrações de açúcares produzidas pelo método convencional são mostradas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Concentrações de açúcares produzidas no processo convencional

Tempo (horas)	g/L		
	sacarose	frutose	glicose
0	162,1	4,9	0
3	162,7	5,4	0
6	152,9	6,8	0
9	69,3	29,9	8,1
11	25,8	48,2	7,7
13	5,7	43,4	6,4
15	0	43,5	5,7
17	0	42,2	5,1
19	0	41,7	4,7
21	0	41,1	4,5
23	0	38,8	3,7
25	0	38,6	3,4
27	0	37,5	3,2
29	0	35,0	2,6
42	0	37,2	2,9
45	0	35,2	2,6
48	0	36,5	2,8

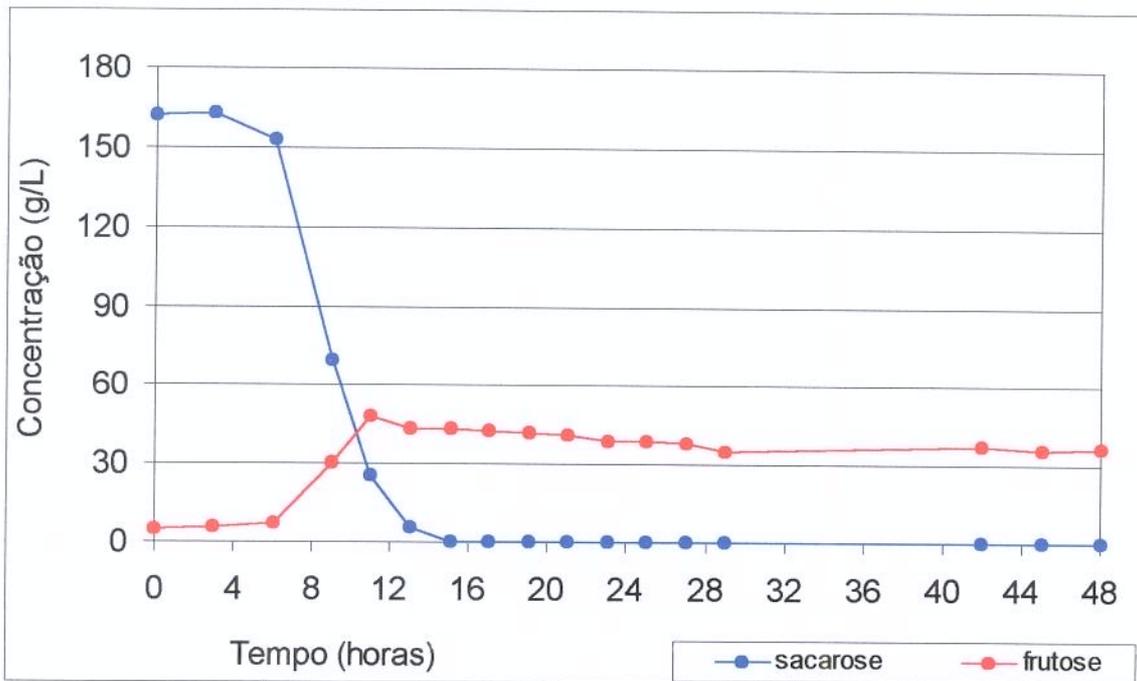


Figura 5.7: Concentrações de açúcares produzidas no processo convencional por tempo de fermentação

A partir dos resultados mostrados acima, pode-se observar que a fermentação convencional para produção de dextrana poderia ter terminado com 15 horas de processo. Nesse ponto a concentração de sacarose já é nula, fazendo com que não se produza mais a enzima dextrana-sacarase e nem dextrana, pois somente com sacarose são produzidas. A presença de glicose e frutose no meio, que são receptores, provocam a diminuição da massa molecular da dextrana produzida. Isso ocasiona um menor rendimento de dextrana de alta massa molecular, prejudicando a etapa posterior de produção de dextrana clínica.

Para uma melhor avaliação do processo convencional, deve-se observar a distribuição da massa molecular, o qual é mostrado na Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Distribuição percentual da massa molecular produzido no processo convencional

Tempo (horas)	% Dextrana		
	Baixa Massa	Clínica	Alta Massa
3	93,7	0,5	5,8
6	87,4	3,0	9,6
9	60,1	13,0	26,9
11	55,1	13,2	31,7
13	55,2	12,8	32,0
15	55,0	13,2	31,8
17	54,0	13,2	32,8
19	56,7	13,0	30,3
45	56,9	12,2	30,9
48	58,8	11,3	29,9

A partir dos resultados da Tabela 5.12, pode-se observar que o percentual de dextrana de alta massa molecular é muito baixo, onde em 15 horas de processo obtém-se 31,8%. Como tem-se desde o início do processo uma quantidade relativamente alta de frutose e glicose, estas são utilizadas pela enzima como receptores, ocasionando a produção da dextrana de baixa massa molecular. Isto já foi evidenciado na síntese enzimática utilizando enzima bruta.

5.2 OBTENÇÃO DE DEXTRANA CLÍNICA

A conversão de dextrana de alta massa molecular em dextrana clínica foi realizada através da hidrólise ácida. Este método consiste na utilização de dois fatores físicos fundamentais, temperatura e pH.

5.2.1 HIDRÓLISE ÁCIDA

Foram realizadas três hidrólises ácida em condições diferentes. Os resultados serão mostrados a seguir:

Primeira hidrólise

Em um primeiro experimento escolheu-se temperatura 72°C e pH 1,0, sendo estas as melhores condições que GUIMARÃES *et al.* (1999) obtiveram a partir de um modelo matemático descrito com o auxílio da metodologia de planejamento experimental. Os resultados desta hidrólise estão mostrados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 1ª hidrólise ácida

Tempo (h)	Distribuição da Massa Molecular de dextrana (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
1,5	28,4	14,6	57,0
2,0	28,0	15,6	56,4
2,5	35,4	15,8	48,8
3,0	35,8	16,8	47,4
3,5	35,6	18,6	45,8
4,0	35,8	20,2	44,0
4,5	37,0	20,9	42,1
5,0	39,3	22,3	38,4
5,5	37,4	23,7	38,9
6,0	40,1	24,4	35,5
6,5	41,7	25,2	33,1
7,0	41,6	25,8	32,6

Analisando a Tabela 5.13 observa-se que apenas 42% do total de dextrana de alta massa molecular converteu-se em dextrana clínica. Este valor é muito baixo, visto que o residual de dextrana de alta massa foi de 32,6%.

A partir destes dados fez-se necessário a realização de uma outra hidrólise, em condições mais drásticas que a primeira.

Segunda hidrólise

No segundo experimento, fixou-se o pH em 1,0 e elevou-se a temperatura para 76°C, condições as quais WOLF *et al.* (1954) conseguiram bons resultados de conversão. Os resultados da segunda hidrólise ácida são mostrados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 2ª hidrólise ácida

Tempo (h)	Distribuição da Massa Molecular de Dextrana (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
0,5	37,1	20,7	42,3
1,0	42,9	19,2	37,9
1,5	47,4	19,1	33,4
2,0	40,1	24,6	35,3
2,5	44,8	25,7	29,5
3,0	47,0	27,3	25,8
3,5	51,0	28,2	20,8
4,0	53,3	27,3	19,4
4,5	58,1	28,5	13,4
5,0	58,0	28,0	14,0
5,5	60,0	27,9	11,9
6,0	63,3	26,5	10,2

Com os resultados da Tabela 5.14, pode-se observar que em condições mais drásticas o percentual de dextrana clínica produzido é maior. Neste segundo

experimento o tempo ideal de hidrólise foi 4,5 horas, pois a partir deste tempo, ocorre uma diminuição do percentual de dextrana clínica. Isso ocorre porque a dextrana clínica produzida começa a ser hidrolisada, convertendo-se em dextrana com massa molecular menor que 30.000 Da. Neste experimento o percentual de conversão de dextrana de alta massa molecular em dextrana clínica chega a 69% no tempo ideal de hidrólise.

Terceira hidrólise

A terceira hidrólise foi realizada em temperatura 76°C e pH 1,5. Estas condições são menos drásticas do que a segunda hidrólise, tendo como objetivo um maior percentual de conversão em dextrana clínica, evitando que no final do processo a dextrana clínica se hidrólise em dextrana menor que 30.000 Da. Os resultados da terceira hidrólise ácida são mostrados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 3ª hidrólise ácida

Tempo (h)	Distribuição da Massa Molecular De Dextrana (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
3,5	19,2	17,3	63,5
4,0	18,7	16,4	64,9
4,5	20,9	17,6	61,5
5,0	21,0	17,4	61,6
5,5	21,3	17,2	61,5
6,0	22,1	17,9	60,0
6,5	22,6	17,8	59,6
7,0	23,3	17,7	59,0

Observa-se nos resultados da Tabela 5.15 que não ocorreu hidrólise, demonstrando que o pH de 1,0 é um fator importante para que ocorra a reação.

Neste caso o interessante seria mexer no valor da temperatura para reduzir a conversão de dextrana clínica ocorrido na segunda hidrólise.

5.2.1.1 Interferente

Durante a análise dos resultados de hidrólise ácida, percebeu-se nos cromatogramas gerados pelo software “Millennium v2.10” que as amostras de dextrana apresentaram alguns picos acentuados diferentes dos picos normais de dextrana. Inicialmente suspeitou-se de concentrações elevadas das amostras que estavam sendo injetadas no HPLC, podendo os polímeros estarem juntos e a coluna não estar separando adequadamente. Após a diluição das amostras e novas injeções, notou-se que os picos de dextrana propriamente ditos diminuía, enquanto o pico não identificado permanecia constante. A partir destes resultados procurou-se comparar os cromatogramas do final da síntese enzimática, com os do início da hidrólise ácida, tendo estes que apresentar a mesma distribuição de dextrana, pois não sofreram nenhum tipo de processo, apenas o congelamento das amostras. Ambos os cromatogramas são mostrados na Figura 5.8.

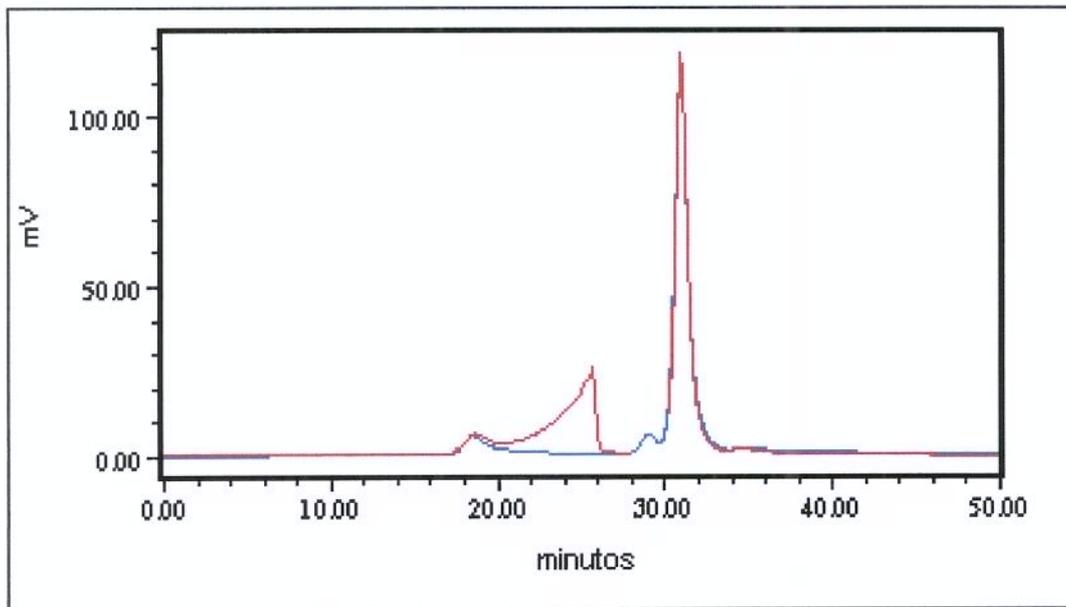


Figura 5.8: Distribuição de dextrana do final da síntese (pico azul) e início da hidrólise ácida (pico vermelho)

Pode-se observar que existe um pico em torno de 26 minutos de tempo de retenção que não fazia parte da distribuição de dextrana do final da síntese enzimática, mas está presente no início da hidrólise ácida. Este pico está sendo confundido com o da dextrana de baixa massa molecular devido ao seu tempo de retenção. O tempo da adição do ácido para o início da hidrólise e o da adição do hidróxido de sódio para neutralização, não poderia ter ocorrido uma hidrólise.

Com esta observação, procurou-se uma substância que poderia estar causando uma interferência nos resultados, através de um pico que as colunas de GPC estariam selecionando e captando como um pico de dextrana. Com isso foi injetado no HPLC amostras de dextrana pura (após a síntese), água acidificada com ácido sulfúrico, água acidificada e neutralizada com hidróxido de sódio e água alcalinizada com hidróxido de sódio. Os cromatogramas dos testes são mostrados nas Figuras 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12.

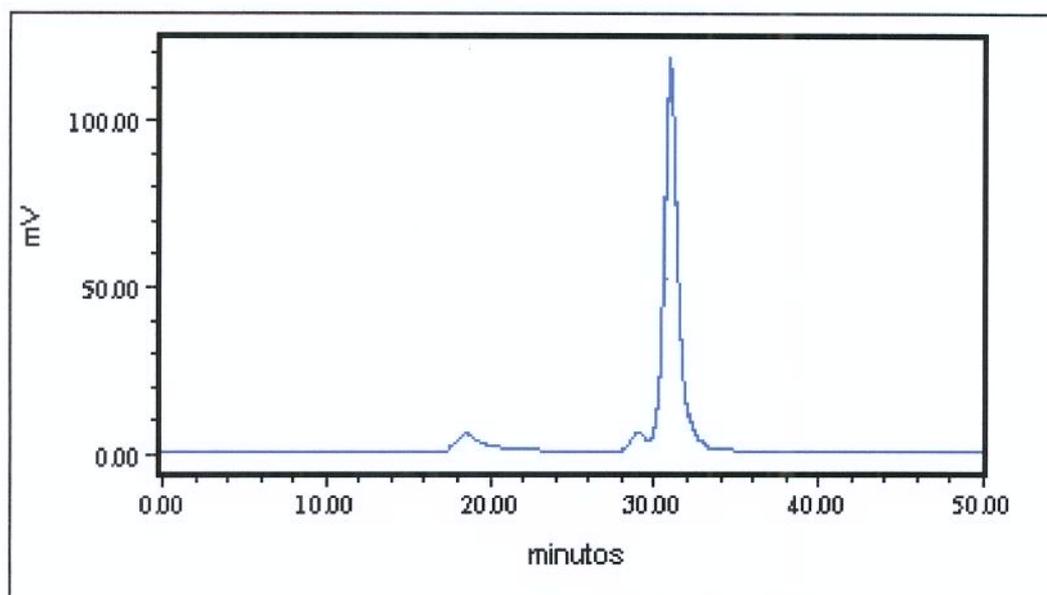


Figura 5.9: Cromatograma do final da síntese de dextrana

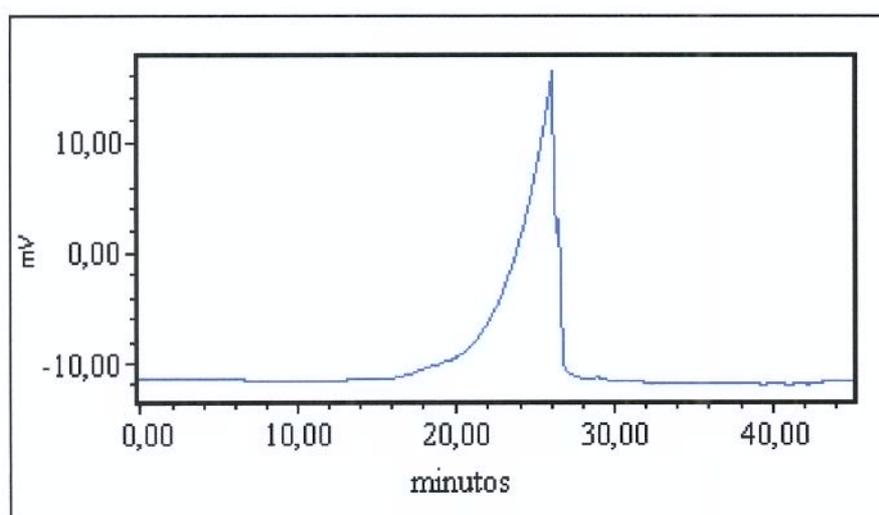


Figura 5.10: Cromatograma de água acidificada com ácido sulfúrico

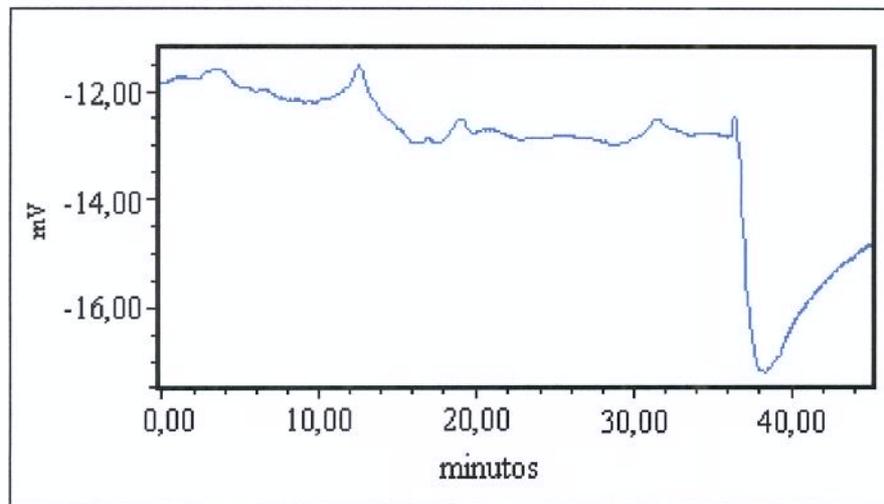


Figura 5.11: Cromatograma de água alcalinizada com hidróxido de sódio

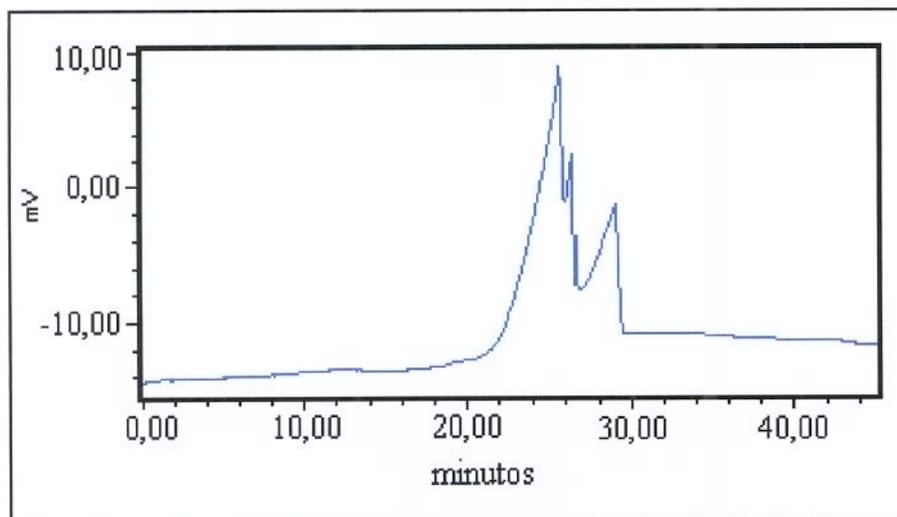


Figura 5.12: Cromatograma de água acidificada com ácido sulfúrico e neutralizada com hidróxido de sódio

Observando-se a Figura 5.10, nota-se um pico com tempo de retenção em torno de 26 minutos referente ao interferente. Este é o ácido sulfúrico que foi utilizado para diminuição do pH da hidrólise. Na Figura 5.11, onde foi utilizado somente o hidróxido de sódio, não aparece nenhum pico, apenas a variação da linha de base. Já na Figura 5.12, o pico do interferente aparece novamente, pois foi utilizado o ácido sulfúrico para acidificação, e mesmo com a neutralização, o pico do interferente não desapareceu.

5.2.1.2 Diálise

Foi realizada uma diálise das amostras da terceira hidrólise, com o objetivo de eliminar o ácido sulfúrico que estava agindo como interferente. Foi utilizado uma membrana de 10.000 μ m para a retirada somente do ácido, e não da dextrana de baixa massa molecular. Os resultados da hidrólise após o processo de diálise são mostrados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 3^a hidrólise ácida após a diálise

Tempo (h)	Distribuição da Massa Molecular De Dextrana (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
PURA	31,6	2,5	65,9
0	29,3	4,4	66,3
1,0	31,2	12,6	55,7
2,0	37,2	19,6	56,8
3,0	41,9	24,1	34,0
4,0	52,2	27,4	20,4
4,5	56,3	31,2	12,5

Na tabela 5.16, observa-se que a distribuição da massa molecular de dextrana da amostra pura, a qual corresponde ao final da síntese enzimática, é muito próxima a distribuição da amostra no tempo zero da hidrólise, mostrando que o interferente foi retirado com a diálise. Também pode-se comparar a Tabela 5.16 com a Tabela 5.15, observando que os resultados são bem diferentes quando se tem a presença do interferente. A partir das amostras com interferente (hidrólises 1, 2 e 3) não pode-se concluir para qual hidrólise obteve-se os melhores resultados.

5.2.2 FRACIONAMENTO

Para a precipitação da dextrana clínica foram realizados três fracionamentos com etanol 95% em concentrações diferentes. A seguir serão mostrados os resultados dos fracionamentos.

Primeiro estudo de fracionamento

O primeiro estudo de fracionamento foi nas concentrações de etanol entre 33,25 e 57%, sendo seus resultados mostrados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana no sobrenadante obtida no 1º fracionamento

Etanol (%)	Distribuição da Massa Molecular de Dextrana no Sobrenadante (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
Inicial	41,7	25,7	32,6
33,25	49,1	21,2	29,7
38,00	73,5	21,8	4,7
42,75	89,8	9,9	0,3
47,50	85,6	13,8	0,6
52,25	79,7	19,5	0,8
57,00	64,2	31,5	4,3

Neste primeiro fracionamento mostrado na Tabela 5.17, observa-se que próximo a 38% de etanol precipita-se a dextrana de alta massa molecular, e que a dextrana clínica permaneceu em solução. Quando aumentada a concentração de etanol, ocorre a precipitação de dextrana clínica. A partir da concentração de 47,5% ocorre um aumento na concentração de dextrana clínica na solução, e isso deve-se ao fato de a dextrana de baixa massa molecular estar precipitando também, fazendo com a que solução fique com uma concentração de dextrana muito baixa (menor que 0,4%), interferindo no resultado da distribuição da massa molecular.

Segundo estudo de fracionamento

Com os resultados do primeiro fracionamento, foi realizado um segundo, onde as concentrações de etanol variaram entre 38 e 47%, sendo estes os melhores resultados obtidos. Na Tabela 5.18 são mostrados os resultados do segundo fracionamento.

Tabela 5.18: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana no sobrenadante obtida no 2º fracionamento

Etanol (%)	Distribuição da Massa Molecular de Dextrana no Sobrenadante (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
Inicial	63,9	26,1	10,0
38,0	89,4	13,5	1,6
39,5	90,6	9,1	0,3
41,0	95,3	4,6	0,1
42,5	97,8	2,2	0
44,0	99,1	0,9	0
45,5	99,6	0,4	0
47,0	99,5	0,5	0

Neste fracionamento nota-se que na faixa de 38 a 39,5% de etanol consegue-se eliminar a dextrana de alta massa molecular, com alguma perda de dextrana clínica, tendo que ser melhor observada esta faixa. Para a precipitação de dextrana clínica, a concentração de etanol ideal está próxima a 45,5%, tendo também que ser melhor investigada.

Terceiro estudo de fracionamento

Com o objetivo de identificar as duas concentrações para separar a dextrana clínica, foi realizado o terceiro fracionamento, nas concentrações de etanol entre 38,5 e 46%. Os resultados deste fracionamento são mostrados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana no sobrenadante obtida no 3º fracionamento

Etanol (%)	Distribuição da Massa Molecular de Dextrana no Sobrenadante (%)		
	< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
Inicial	65,4	23,4	11,2
38,5	85,8	13,7	1,1
39,0	89,1	10,5	0,4
39,5	90,4	9,3	0,3
40,0	92,8	7,1	0,1
45,0	97,3	2,7	0
45,5	97,1	2,9	0
46,0	96,7	3,3	0

No terceiro fracionamento consegue-se verificar as concentrações de etanol para a obtenção da dextrana clínica. Mesmo com uma precipitação da dextrana clínica no momento da precipitação de dextrana de alta massa molecular, o percentual de 39,5% elimina toda a dextrana de alta massa molecular. Para a precipitação da dextrana clínica deve ser utilizada a concentração entre 45,0 e 45,5%

de etanol. A partir destes resultados nota-se a necessidade de estudos mais detalhados.

5.2.3 FRAÇÃO CLÍNICA

A fração clínica foi feita com o intuito de se obter a dextrana clínica propriamente dita. Foram realizadas duas precipitações a partir do hidrolisado para verificar se as concentrações de etanol obtidas no fracionamento são as melhores para a separação da dextrana clínica.

Primeiro estudo de precipitação

A partir de uma alíquota do hidrolisado foi realizada a precipitação com o primeiro percentual de etanol. Ao sobrenadante, foi acrescentado etanol até chegar ao segundo percentual de etanol. As concentrações de etanol utilizadas foram 39,5 e 45,5%. Os resultados estão mostrados na Tabela 5.20.

Tabela 5.20: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 1ª fração clínica

Etanol (%)		Distribuição da Massa Molecular de Dextrana (%)		
		< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
Inicial		65,4	23,4	11,2
39,5	Precipitado	24,5	42,9	32,6
	Sobrenadante	89,0	10,5	0,5
45,5	Precipitado	54,3	38,9	6,8
	Sobrenadante	97,8	2,2	0

Observa-se nos resultados da primeira fração clínica que com o primeiro percentual de etanol ocorreu precipitação quase que completa da dextrana de alta massa molecular, porém precipitou uma grande quantidade de dextrana clínica. A

quantidade de dextrana em solução pode estar abaixo de 0,4%, prejudicando a precisão do resultado. Com o segundo percentual de etanol, ocorreu a precipitação de dextrana clínica, ficando apenas 2,2% em solução. A partir destes resultados foi realizada a segunda fração clínica, com diferentes concentrações de etanol.

Segundo estudo de precipitação

A partir de outra alíquota do hidrolisado foi realizado o segundo estudo de precipitação, sendo da mesma maneira que o primeiro. Os resultados são mostrados na tabela 5.21.

Tabela 5.21: Distribuição percentual da massa molecular de dextrana obtida na 2ª fração clínica

Etanol (%)		Distribuição da Massa Molecular de Dextrana (%)		
		< 30.000 Da	Clínica	> 100.000 Da
Inicial		65,4	23,4	11,2
39,0	Precipitado	28,5	36,2	35,3
	Sobrenadante	85,9	13,1	1,0
46,0	Precipitado	52,4	42,4	5,4
	Sobrenadante	100	0	0

Os resultados do segundo estudo mostram que com um menor percentual de etanol (39%) precipita-se uma menor quantidade de dextrana clínica, porém permanece em solução 1% de dextrana de alto molecular. No segundo percentual de etanol, uma maior concentração proporcionou a precipitação de toda a dextrana clínica em solução, permanecendo no sobrenadante apenas a dextrana de baixa massa molecular.

O segundo estudo de precipitação da fração clínica apresentou resultados melhores do que o primeiro, porém ainda não se encontrou as concentrações ideais

de etanol. Seria necessário mais estudos com este objetivo. Nestes estudos deve-se pensar em precipitações seletivas de dextrana clínica com o intuito de purificar a mesma.

5.3 RENDIMENTOS

Foram realizados os cálculos de rendimentos de dextrana de alta massa molecular e frutose para o processo convencional e o processo enzimático. Do processo enzimático, o rendimento foi feito tanto utilizando a enzima bruta, como a enzima purificada.

5.3.1 RENDIMENTO DE DEXTRANA

Processo Convencional

No processo convencional foi realizado uma pré-fermentação, que foi utilizada como inóculo, e uma fermentação. A obtenção da massa de dextrana bruta produzida foi realizada por precipitação com etanol em concentração maior que 75%, e seca em estufa à 105°C até peso constante. O resultado obtido foi de 50 g/L de dextrana de massa molecular maior que 30.000 Da.

$$m_D = 125g$$

$$m_S = 100g / L * 0,25L + 180g / L * 2,5L = 475g$$

pré-fermentação fermentação

$$\%_{D>30} = 45,00$$

$$Y_{D>30/S} = 0,118$$

Processo Enzimático

No processo enzimático foram realizadas duas pré-fermentações e a fermentação propriamente dita. Foi considerada a alimentação de sacarose e NaOH.

Neste processo foi considerado a quantidade total de enzima obtida, tanto de enzima bruta, como de enzima purificada, após o processo de purificação. Em ambas as sínteses foi considerada uma concentração enzimática de 40 UDS/mL.

*** Enzima Bruta:**

- Produzidos 152.000 unidades de dextrana-sacarase;
- Produz-se 3,8 L de síntese com concentração enzimática de 40 UDS/mL

$$m_{SS} = 50 \text{ g / L} * 3,8 \text{ L} = 190 \text{ g}$$

síntese

$$\%_{D>30} = 49,9$$

$$m_S = 2 * \left(40 \text{ g / L} * 0,15 \text{ L} \right) + 50 \text{ g / L} * 1,5 \text{ L} + 200 \text{ g / L} * 0,515 \text{ L} + 50 \text{ g / L} * 3,8 \text{ L} = 380 \text{ g}$$

duas pré-fermentações fermentação a alimentação síntese

$$Y_{D>30/S} = 0,118$$

*** Enzima Purificada**

- Produzidos 221.000 unidades de dextrana-sacarase;
- Produz-se 5,5 L de síntese com concentração enzimática de 40 UDS/mL

$$m_{SS} = 50 \text{ g / L} * 5,5 \text{ L} = 275 \text{ g}$$

síntese

$$\%_{D>30} = 70,4$$

$$m_S = 2 * \left(40 \text{ g / L} * 0,15 \text{ L} \right) + 50 \text{ g / L} * 1,5 \text{ L} + 200 \text{ g / L} * 0,515 \text{ L} + 50 \text{ g / L} * 5,5 \text{ L} = 465 \text{ g}$$

duas pré-fermentações fermentação a alimentação síntese

$$Y_{D>30/S} = 0,197$$

Comparando os resultados de rendimento de dextrana, o processo enzimático utilizando a enzima purificada apresenta um rendimento de 0,197g de dextrana/g de sacarose. Este resultado é 67% superior que o processo enzimático utilizando a enzima bruta e o processo convencional. Este rendimento é muito importante, pois quanto maior a quantidade de dextrana de alta massa molecular, maior será o percentual de dextrana clínica após a hidrólise ácida.

5.3.2 RENDIMENTO DE FRUTOSE

Processo Convencional

$$m_F = 42,2g / L * 2,5L = 105,5g$$

fermentação

$$m_S = 475g$$

$$Y_{F/S} = 0,222$$

Processo Enzimático

* Enzima Bruta:

$$m_F = 34,5g / L * 1,8L + 13,0g / L * 3,8L = 111,5g$$

fermentação síntese

$$m_S = 380g$$

$$Y_{F/S} = 0,293$$

* Enzima Purificada:

$$m_F = 34,5 \text{ g / L} * 1,8 \text{ L} + 24,4 \text{ g / L} * 5,5 \text{ L} = 196,3 \text{ g}$$

fermentação síntese

$$m_S = 465 \text{ g}$$

$$Y_{F/S} = 0,422$$

Os resultados acima mostram um maior rendimento de frutose para o processo enzimático utilizando a enzima purificada na síntese. Com relação ao processo convencional, houve um ganho de 90% de rendimento, e com relação ao processo enzimático utilizando a enzima bruta, o aumento de rendimento foi de 44%. Tanto para o rendimento de dextrana de alta massa molecular, como para o rendimento de frutose, o processo enzimático utilizando a enzima purificada mostrou-se mais eficiente.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados e observações experimentais desenvolvidas neste trabalho levam as seguintes conclusões:

- A produção de dextrana-sacarase mostrou-se eficiente com o processo de batelada alimentada, onde conseguiu-se um máximo de 160.000 UDS;
- O processo de purificação da enzima dextrana-sacarase e adição de Ca^{++} ocasionou um ganho de 64% na atividade da enzima;
- No processo de síntese enzimática de dextrana a concentração inicial de 50 g/L de sacarose apresentou a mesma produtividade e um maior rendimento de dextrana de alta massa molecular, quando comparada com a concentração inicial de 100 g/L de sacarose;
- A síntese enzimática com enzima purificada apresentou rendimento de dextrana de alta massa molecular de 67% superior ao processo de síntese enzimática com enzima bruta e rendimento de frutose de 90% superior ao processo convencional;
- O ácido sulfúrico apresentou-se como um interferente do método de análise da distribuição da massa molecular de dextrana por cromatografia de permeação em gel (GPC);
- A hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica mostrou seus melhores resultados de rendimento com temperatura 76°C e pH 1,0, num tempo de processo de 4,5 horas;

- O processo de diálise mostrou-se eficaz na retirada do interferente;
- O fracionamento e a fração clínica não mostraram resultados ideais para a precipitação e purificação da dextrana clínica, porém servem como base para trabalhos futuros.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem que sejam feitas as seguintes sugestões:

- Estudar a utilização de outro ácido para a hidrólise da dextrana bruta produzida na síntese enzimática, objetivando a não interferência na análise de dextrana por cromatografia de permeação em gel.
- Otimizar as condições de hidrólise ácida para obtenção de um maior rendimento de dextrana clínica;
- Estudar mais profundamente as condições de concentrações de dextrana em solução, temperatura e concentração de etanol para precipitação seletiva do polímero;
- Realizar testes e estabelecer as melhores condições de purificação da dextrana clínica com precipitações seletivas, levando em consideração a presença de metais na solução;
- Verificar o melhor método de separação de frutose e testar a partir das soluções obtidas após a precipitação da dextrana de interesse;
- Realizar um “Scale-up” do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. **Progress in Industrial Microbiology**, v.18, p.1-44, 1983.
02. BARKER, P. E.; GANETSOS, G. Production of high purity fructose from barley syrups using semi-continuous chromatography. **Journal of Chemical technology and Biotechnology**, v.35B, p.217-228, 1985.
03. BAZÁN, J. H. V. **Estudo de produção enzimática da dextrana clínica**. Campinas, 1993. 123p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
04. CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 1996. p.137-144.
05. CHENG, Y. L.; LEE, T. Y. Separation of fructose and glucose mixture by zeolite Y. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.498-504, 1992.
06. CURRALERO, I. C. B. **Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática, para obtenção de ferro-dextrana**. Campinas, 1993. 164p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
07. DE BELDER, A. N. Dextran. In: **Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Ed.5°. Weinheim: W. Gerhart, 1987. v.A8, p.449-454.

08. GUIMARÃES, D. P. **Otimização das condições de síntese e hidrólise ácida de dextrana.** Campinas, 1997. 34p. 1º Relatório de Iniciação Científica (FAPESP), processo 96/07436-1. Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade estadual de Campinas.
09. GUIMARÃES, D. P.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 1999. [in press]
10. HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.724S-732S, 1993.
11. HASHIMOTO, K.; ADACHI, S.; NOUJIMA, H.; MARUYAMA, H. Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber. **Journal of Chemical Engineering Japan**, v.16, n.5, p.400-406, 1983.
12. JEANES, A. Dextran. In: **Encyclopedia of Polymer Science and Technology.** John Wiley & Sons Inc., 1966. v.4: p.805-824.
13. KABOLI, H.; REILY, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.1055-1069, 1980.
14. KOEPEL, H. J.; TSUCHIYA, H. M. Enzymatic synthesis of dextran. **Journal of Bacteriology**, v.63, p.293-295, 1952.
15. LAWFORD, G. R.; KLIGERMAN, A.; WILLIAMS, T. Dextran biosynthesis and dextranase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1121-1131, 1979.
16. MARTINEZ-ESPINDOLA, J. P.; LOPEZ-MUNGUÍA, C. A. On the kinetics of dextranase and dextran synthesis in batch reactors. **Biotechnology Letters**, v.7, n.7, p.483-486, 1985.

17. MILLER, A. W.; ROBYT, J. F. Activation and inhibition of dextransucrase by calcium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.880, p.32-39, 1986.
18. MITSUYA, H.; LOONEY, D. J.; KUNO, S.; UENO, R.; WONG-STAL, F.; BRODER, S. Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4⁺ cells. **Science**, v.240, p.646-649, 1988.
19. 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. **Carbohydrate Research**, v.149, p.433-441, 1986.
20. PAWAN, G. L. S. Fructose. In: BIRCH, G. G.; GREEN, L. F. **Molecular Structure and Function of Food Carbohydrate**. 1973. Cap.5: p.65-78.
21. PEREIRA, A. M. **Estudo da influência da glicose na síntese “in vitro” de dextrana**. Campinas, 1996. 127p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
22. QUEIRÓZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. Campinas, 1987. 118p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
23. ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. Production, purification and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate Research**, v.68, p.95-111, 1979.
24. RUBY, J. E.; FUJISAWA, T.; KRETCHMER, N. Fructose absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.748S-753S, 1993.

25. SANTOS, V. M. **Estudo das condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica.** Campinas, 1996. 108p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
26. SILVA, C. F. **Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção da frutose.** Campinas, 1998. 96p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
27. TSUCHIYA, H. M.; JEANES, A.; BRICKER, H. M.; WILHAM, C. A. Dextran-degrading enzymes from molds. **Journal of Bacteriology**, v.64, p.513-519, 1952 A.
28. TSUCHIYA, H. M.; KOEPEL, H. J.; CORMAN, J.; BRYANT, G.; BOGARD, M. O.; FEGER, V. H.; JACKSON, R. W. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, v.64, p.521-526, 1952 B.
29. WOLF, I. A.; MEHLTRETTER, C. L.; MELLIES, R. L.; WATSON, P. R.; HOFREITER, B. T.; PATRICK, P. L.; RIST, C. E. Production of clinical-type dextran: partial hydrolytic depolymerization and fractionation of the dextran from *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-512. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.46, p.370-377, 1954.
30. ZIEF, M.; BRUNNER, G.; METZENDORF, J. Fractionation of partially hydrolyzed dextran. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.48, p.119-121, 1956.