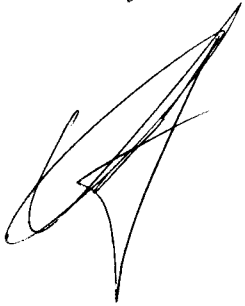


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Juan Heraldo Viloche
Bazán e aprovada pela Comissão Julgadora
em 14.12.93.



ESTUDO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA
DA DEXTRANA CLÍNICA

Aluno : Juan Heraldo Viloche Bazán 712

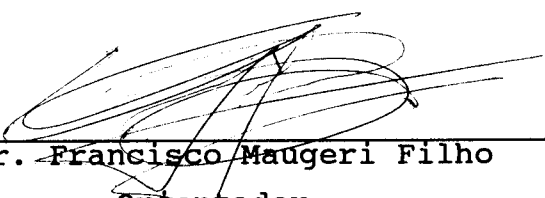
Orientador : Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (1-)

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

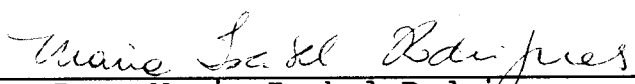
CAMPINAS

1993

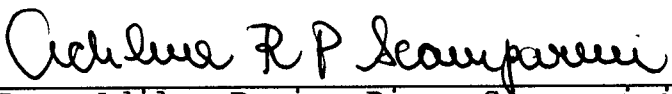
BANCA EXAMINADORA



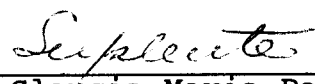
Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador



Dra. Maria Isabel Rodriguez
Membro



Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Membro



Dra. Glaucia Maria Pastore
Membro

Campinas, 14 de dezembro 1993

*Dedico este trabalho
à minha filha Ofelia
e a minha esposa Yda.*

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO, por sua orientação durante o trabalho experimental, ensinamentos e amizade.
- À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA que possibilitou o desenvolvimento da pesquisa.
- Ao Conselho Nacional de pesquisa - CNPq pela bolsa concedida.
- Aos colegas da pós graduação pelo companherismo e colaboração
- Aos funcionarios e a todos aqueles que contribuíram direta o indiretamente para a realização deste trabalho

ÍNDICE GERAL

Índice de gráficos.....	iv
Índice de tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Summary.....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Generalidades.....	4
2.2. Dextrana-sacarase	5
2.2.1. Propriedades.....	5
2.2.2. Cinética enzimática.....	10
2.2.3. Definição de atividade enzimática.....	12
2.2.4. Imobilização.....	12
2.2.5. Mecanismo de ação catalítica.....	14
2.2.6. Produção.....	19
2.3. Dextrana.....	21
2.3.1. Propriedades.....	21
2.3.2. Usos.....	23
2.3.3. Produção.....	27
2.3.4. Fatores que afetam o peso molecular da dextrana.....	30
2.3.5. Peso molecular e polidispersão.....	35
2.3.6. Métodos para determinar pesos moleculares..	37
a) Dispersão da luz.....	36
b) Ultracentrifugação.....	37
c) Cromatografia de permeação em gel.....	37

3.	Materiais e métodos.....	39
3.1.	Reagentes.....	39
3.2.	Metodologia.....	39
3.2.1.	Condições de cultura para produção de dextrana-sacarase.....	39
a)	Meio padrão de cultura.....	39
b)	Inóculo.....	40
c)	Alimentação.....	40
c)	Fermentação.....	40
d)	Extração de dextrana-sacarase.....	42
3.2.2.	Planejamento experimental.....	41
3.2.3.	Análise estatística dos resultados.....	43
3.2.4.	Produção de dextrana.....	46
3.3.	Métodos analíticos.....	46
3.3.1.	Crescimento celular.....	46
3.3.2.	Determinação de açúcares redutores.....	46
a)	Preparação do reagente DNS.....	46
b)	Curva padrão.....	47
c)	Determinação de açúcares redutores em uma amostra desconhecida.....	47
d)	Determinação de açúcares redutores totais.....	47
e)	Determinação de sacarose.....	48
3.3.3.	Determinação de atividade.....	48
3.3.4.	Precipitação de dextrana.....	49
3.3.5.	Preparação de dextrana para HPLC.....	49
3.3.6.	Curva de calibração e cromatogramas.....	50
3.3.7.	Determinação do rendimento do processo.....	50
3.3.8.	Determinação do peso molecular médio.....	51
4.	Resultados e discussões.....	53
4.1.	Produção da enzima.....	53

4.2. Purificação da enzima.....	57
4.3. Produção de dextrana.....	57
4.3.1. Usando como acceptor a maltose.....	57
4.3.2. Usando dextrana de baixo peso molecular....	57
4.4. Efeito da concentração da sacarose, relação R e temperatura durante o processo de síntese enzimática da dextrana clínica.....	65
4.4.1. Análise de efeitos.....	68
4.4.2. Análise de superfície de resposta para o rendimento.....	69
a) Efeito da temperatura e da relação R....	69
b) Efeitos da temperatura e da concentração da sacarose.....	69
c) Efeitos da relação R e da concentração de sacarose.....	71
4.4.3. Análise de superfície de resposta para pesos moleculares.....	73
a) Efeito da temperatura e a relação R....	73
b) Efeitos de temperatura e sacarose.....	74
c) Efeitos da relação R e sacarose.....	76
5.0. Conclusões.....	76
6.0. Bibliografia.....	78
7.0. Apêndice	83
Apêndice A.....	83
Apêndice B.....	91
Apêndice C.....	96
Apêndice D.....	107
Apêndice E.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Efeito do pH na atividade da dextrana-sacarase a 30°C: (o) solúvel; (Δ) imobilizada.....	9
Figura 2.	Efeito da temperatura na atividade da enzima dextrana-sacarase a pH 5.2: (o) solúvel; (Δ) imobilizada.....	9
Figura 3.	Variação da velocidade inicial de síntese de dextrana com concentrações de sacarose à diferentes temperaturas.....	11
Figura 4.	Efeitos da maltose como acceptor nas constantes cinéticas da dextrana-sacarase.....	11
Figura 5.	Esquema do mecanismo de síntese de dextrana proposto por Robyt et al. (1974).....	18
Figura 6.	Esquema do mecanismo de formação de ramificações proposto por Robyt & Tanigushi (1976).....	18
Figura 7.	Esquema do mecanismo para reação dos aceptores na síntese de dextrana proposto por Robyt & Walseth (1978).....	19
Figura 8.	Cromatografia de permeação em gel de dextrana sintetizada com dextrana-sacarase livre.....	32
Figura 9.	Peso molecular médio (M_w) da dextrana em presença de maltose como acceptor.....	34
Figura 10.	Peso molecular médio da dextrana em presença de oligossacarídeos como aceptores.....	34
Figura 11.	Curva de calibração de cromatografia de permeação em gel.....	38
Figura 12.	Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . Alimentação = sacarose 80 g/l e 28°C.....	53
Figura 13.	Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART)	

	e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . Alimentação = sacarose 180 g/l e 28°C.....	54
Figura 14.	Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . Alimentação = sacarose 160 g/l e 29°C.....	54
Figura 15.	Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . Alimentação = sacarose 160 g/l e 27°C.....	55
Figura 16.	Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . Alimentação = sacarose 200 g/l e 28°C.....	55
Figura 17.	Cromatograma de dextrana produzida usando como acceptor a maltose correspondente ao experimento 15 da Tabela 13.....	59
Figura 18.	Determinação do peso molecular médio da dextrana usado como acceptor por cromatografia de permeação em gel usando o software GPCPLUS.....	59
Figura 19.	Distribuição de pesos moleculares da dextrana correspondente ao experimento 1 da Tabela 13.....	63
Figura 20.	Dextrana correspondente ao experimento 1 da Tabela 13: a) Alto peso molecular (16 milhões de daltons); b) Alto peso molecular (2 milhões de daltons); c) Médio peso molecular (29.611 daltons).....	64
Figura 21.	Análise de efeitos para o modelo de 1a. ordem para o rendimento do processo de síntese	

enzimática de dextrana usando como aceptor dextrana de 4676 daltons.....	68
Figura 22. Efeitos da temperatura e da relação R no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana numa concentração de sacarose de 133,6 g/l.....	69
Figura 23. Efeito da temperatura e da concentração de sacarose no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0,0384$	70
Figura 24. Efeito da relação R e da concentração de sacarose no rendimento no processo de síntese enzimática de dextrana a $T = 18,3^{\circ}\text{C}$	71
Figura 25. Efeitos da temperatura e da relação R no peso molecular do processo de síntese enzimática de dextrana numa concentração de sacarose de 133,6 g/l.....	72
Figura 26. Efeito da temperatura e da concentração de sacarose no peso molecular do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0,0216$	73
Figura 27. Efeito da temperatura e da concentração de sacarose no peso molecular do processo e síntese enzimática da dextrana a $R = 0,0300$	74
Figura 28. Efeito da temperatura e da concentração de sacarose no peso molecular do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0,0384$	74
Figura 29. Efeito da relação R e da concentração de sacarose no peso molecular do processo de síntese enzimática de dextrana a $T = 18,3^{\circ}\text{C}$	75
Apêndice A. Cromatogramas de dextrana produzida usando como aceptor a maltose.....	83
Apêndice B. Curvas de calibração da dextrana.....	91
Apêndice C. Cromatogramas correspondente à Tabela 16 para determinar o rendimento.....	96

Apêndice D. cromatogramas correspondente à Tabela 16	
para determinar pesos moleculares.....	107
Apêndice E. Determinação dos modelos, efeitos, rendimento	
e análise de variância.....	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Efeitos de íons metálicos e outros reagentes na atividade enzimática da dextrana-sacarase	8
Tabela 2.	Porcentagem do total de D-glicose da sacarose incorporados nos produtos de reação da enzima dextrana-sacarase com aceptores.....	17
Tabela 3.	Porcentagem de ligações entre os resíduos glicosídicos das dextranas (linhagens e microrganismos).....	22
Tabela 4.	Usos da dextrana.....	25
Tabela 5.	Usos de derivados de dextrana.....	26
Tabela 6.	Parâmetros da síntese enzimática usando dextrana-sacarase livre (efeitos da adição dos aceptores).....	31
Tabela 7.	Resultados da produção de dextrana da Tabela 6....	31
Tabela 8.	Rendimento das frações de carboidratos com várias concentrações de sacarose no final da reação	33
Tabela 9.	Variáveis e níveis de variação.....	42
Tabela 10.	Planejamento experimental 1 para quatro (valores reais)variáveis usando maltose como acceptor.....	44
Tabela 11.	Planejamento experimental 2 para três variáveis usando dextrana de 4676 daltons como acceptor.....	45
Tabela 12.	Atividade enzimática e ART no final da fermentação do <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	56
Tabela 13.	Síntese enzimática de dextrana usando como acceptor a maltose.....	58
Tabela 14.	síntese de dextrana usando como acceptor dextrana de 4676 daltons.....	61
Tabela 15.	síntese de dextrana usando como acceptor dextrana de 4676 daltons.....	61

Tabela 16. Planejamento experimental 2 para três variáveis com as respostas.....	62
Tabela 17. Análise de variância para o peso molecular e rendimento para produção de dextrana clínica.....	63
Tabela 18. Cálculo dos efeitos para o rendimento (%) e pesos moleculares.....	68

R E S U M O

Este trabalho consiste na obtenção "in vitro" de dextrana clínica a partir da sacarose utilizando a enzima dextrana-sacarase obtida pela fermentação do *Leuconostoc mesenteroides* linhagem NRRL B512-F. A dextrana clínica, de peso molecular médio 40.000 daltons, tem sua aplicação consagrada como expansor volumétrico de sangue humano.

A enzima foi produzida por fermentação e purificada usando ultrafiltração, separada com o uso de polietilenoglicol de peso molecular 1500 daltons e estocada a -10°C.

O estudo da produção de dextrana clínica foi feito obedecendo 2 etapas de síntese, sendo que para cada uma delas foi realizado um delineamento experimental. No primeiro usou-se maltose como aceptor e no segundo dextrana de peso molecular 4676 daltons. O objetivo do primeiro delineamento foi otimizar as condições para obtenção de dextrana de peso molecular próximo a 5000 daltons e no segundo para obtenção da dextrana clínica propriamente dita.

Determinou-se o rendimento e a distribuição de pesos moleculares da dextrana produzida por um sistema de cromatografia de permeação em gel (HPLC). Os resultados do processo de síntese enzimática de dextrana, foram utilizados para obtenção dos modelos de rendimento e distribuição de pesos moleculares em função da concentração de sacarose, relação R ($[\text{aceptor}]/[\text{sacarose}]$) e temperatura.

Através da metodologia de superfície de resposta conclui-se que a concentração de sacarose é a variável que mais influencia no processo de síntese enzimática de dextrana. Os parâmetros, para produzir dextrana em torno de 40.000 daltons com maior rendimento, foram altas concentrações de sacarose (133,6 g/l), altos valores da relação R (0.0384) e baixas temperaturas (18.3°C).

SUMMARY

This study consists of the "in vitro" production of clinical dextran from sucrose using the enzyme dextransucrase obtained from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. Clinical dextran, whose average molecular weight is 40,000 daltons, is extensively used as a volume expander of human blood.

The enzyme was produced by fermentation, purified by ultracentrifugation, separated using polyethyleneglycol (mol. weight 1500 daltons) and stored at -10°C.

The study of the production of clinical dextran was carried out according to the two steps of synthesis, an experimental design being produced for each step. In the first step maltose was used as an acceptor and in the second, dextran with a molecular weight of 4676 daltons. The objective of the first design was to optimize the conditions to obtain dextran with a molecular weight of about 5000 daltons, and the second design aimed at obtaining the actual clinical dextran.

The yield and the molecular weight distribution of the dextran produced was determined by a high performance gel permeation chromatography system (HPLC). The results of the process for the enzymatic synthesis of dextran were used to obtain models for the yield and the molecular weight distribution as conditions of sucrose concentrations, the ratio R and temperature.

Using surface response methodology, it was concluded that the sucrose concentration was the variable that most affected the enzymatic synthesis of dextran. The parameters required to produce greater yields of dextran with a molecular weight of about 40,000 daltons were: high concentrations of sucrose (133,7 g/l), low temperatures (18,3°C) and high values to the relationship $R \text{ (acceptor)}/[\text{sucrose}]$ of 0,0384.

1. INTRODUÇÃO

De forma geral um biopolímero é uma macromolécula que é produzida por algum processo biológico, sendo o ADN, as proteínas e os polissacarídeos, os produtos mais importantes estudados pela biotecnologia. Os biopolímeros são de especial interesse, pois sendo de origem microbiana, também conhecidos como gomas, possuem propriedades reológicas que em alguns casos, superam as características funcionais de origem vegetal.

Os polissacarídeos têm a capacidade de modificar as propriedades da água para formar soluções, suspensões viscosas ou géis. Estes biopolímeros podem ser de origem animal (gelatinas, albuminas), microbiana (xantana, dextrana) ou vegetal, onde destacam-se: os exudados de plantas (arábica, tragacanto), os extratos de algas marinhas (agar, alginatos), os cereais (amidos) e os extratos de plantas (pectina, arabinogalactana).

Os polissacarídeos obtidos por processos microbianos têm algumas vantagens com relação aos extraídos de fontes naturais como algas ou plantas, porque sua produção não depende das condições climáticas, contaminação marinha, problemas de colheita, de mercado, etc. Em adição, os produtos obtidos são de maior uniformidade em suas propriedades, pureza e características de qualidade e sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Finalmente a nível microbiano, já existem técnicas que permitem modificar os microrganismos com a finalidade de sintetizar produtos com melhores características reológicas, o que é praticamente impossível com as espécies vegetais. As gomas microbianas têm como principal desvantagem seu elevado custo de produção, principalmente devido ao investimento inicial na aquisição dos equipamentos de fermentação e recuperação dos produtos.

Apesar da grande quantidade de polissacarídeos microbianos reportados na literatura, somente dois deles,

dextrana e xantana, são produzidos em grande escala. Isto se deve às facilidades técnicas de substituir, a custos similares, algumas gomas já existentes. Em potencial ou em desenvolvimento estão os seguintes polissacarídeos: Alginato microbiano (*Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*); polissacarídeo de *Erwinia tahitica*; Indicana (*Beinjerinckia indicus*); Pululana (*Pullularia pullulans*); Curdlan (*Alcaligenes faecalis*, *Agrobacterium sp.*). No momento a xantana é, sem dúvida alguma, o polissacarídeo de maior importância comercial; produzida pela bactéria *Xantomonas campestris*, sendo um polímero ramificado com unidades monoméricas de Glicose, Manose e ácido Glucurônico.

A dextrana é outro biopolímero de interesse comercial devido a sua grande aplicabilidade tanto na indústria petroquímica, de alimentos, química ou farmacêutica. As aplicações da dextrana dependem principalmente do peso molecular. Com peso molecular superior a 25 milhões de daltons pode ser empregada na extração do petróleo, como agente de impermeabilização e viscosidade, ou ainda na recuperação secundária do petróleo. A dextrana de peso molecular médio é usada na indústria de alimentos como agente de textura gelificante e estabilizante. Na indústria química encontra-se uma importante aplicação na fabricação de tamis molecular utilizado no isolamento e purificação de produtos biológicos. Na indústria farmacêutica, a dextrana de baixo peso molecular é usada há mais de trinta anos, para fins clínicos. Com um peso molecular de 70.000 daltons pode ser substituto do plasma, pelo fato de suas propriedades em solução aquosa serem semelhantes às do plasma sanguíneo ou com um peso molecular de 40.000 daltons como expansor do sangue, aumentando sua fluidez e auxiliando a circulação nos vasos capilares. O uso é intravenoso e uma vez no organismo a dextrana é metabolizada, não apresentando efeitos tóxicos ou alérgicos.

Este polissacarídeo é um biopolímero linear formado por unidades de glicose de origem bacteriana, principalmente do gênero *Leuconostoc*, espécie *mesenteroides* e *dextranicum*. Estas

báctérias produzem extracelularmente a enzima dextrana-sacarase responsável pela síntese de dextrana a partir de sacarose. A produção industrial de dextrana é feita pela enzima excretada pelo microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 F, apresentando 95 % das ligações glicosídicas do tipo α -(1,6), 5% de ligações α -(1,3) e boa solubilidade, propriedade esta que lhe garante uma grande variedade de aplicações comerciais.

O objetivo deste trabalho foi o de estudar a síntese de dextrana clínica "in vitro" , através da adição no meio de reação de compostos (aceptores) que agem limitando a extensão da cadeia controlando o peso molecular do polímero, bem como a influencia da temperatura. As condições ideais do processo foram obtidas através de análise de superfície de resposta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES

Desde o século passado, o processamento de açúcar tem sido afetado por transformações que acontecem nos caldos açucarados nas diversas etapas de produção de açúcar. Além das perdas de sacarose, essas transformações provocam um aumento da viscosidade do caldo, dificultando etapas de clarificação, filtração, bombeamento e principalmente por interferir na cristalização da sacarose (NEELY, 1960).

Durante muito tempo ninguém pode explicar este fenômeno, até que em 1861, PASTEUR (segundo ALSOP, 1993) demonstrou que essas transformações eram de origem microbiana.

O Termo DEXTRANA foi usado pela primeira vez em 1874, por SCHEIBLER, para designar certos polissacarídeos, isolados de caldos açucarados, que apresentavam a característica de serem dextro-rotatórios, propondo a fórmula molecular de $(C_6H_{10}O_5)$ (NEELY, 1960); a fórmula molecular do polissacarídeo agora é conhecido como $(C_6H_{10}O_5)_n$, constituindo-se em um polímero de glicose produzido por vários microrganismos, com diferentes estruturas e propriedades. Atualmente o termo dextrana é usado para designar toda uma classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares, compostos quase exclusivamente de resíduos glicosídicos ligados principalmente por ligações α -(1,6)

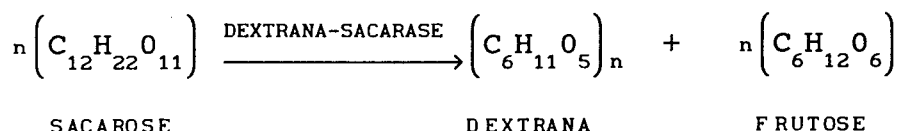
Em 1878, VAN TIEGHEN (ALSOP, 1983) isolou o microrganismo responsável pela produção de dextrana ao que chamou de *Leuconostoc mesenteroides*. Em 1941, HEHRE e pouco depois em 1942, STACEY (HEHRE, 1946) obtiveram pela primeira vez dextrana na ausência de células, utilizando-se o caldo de cultura de *Leuconostoc mesenteroides*, prevendo a síntese enzimática do polímero a partir da sacarose. Os autores também postularam que as ligações entre as moléculas de glicoses seriam, do tipo α -(1,6). em 1944, HESTRIN & AVINERI-SHAPIRO, denominaram DEXTRANA-SACARASE a enzima responsável pela produção de dextrana

(NEELY, 1960).

2.2. DEXTRANA-SACARASE

2.2.1. PROPRIEDADES

A dextrana-sacarase (1,6- α -D-glucan 6- α -glucosyl transferase, EC 2.4.1.5) é a enzima responsável pela conversão de de sacarose em dextrana de acordo à seguinte equação:



É uma enzima extracelular produzida por muitos microrganismos do tipo *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. A sacarose é o único substrato conhecido capaz de induzir a produção da enzima. Outros açúcares como: glicose, frutose, manose, lactose, etc, promovem um crescimento vegetativo da bactéria, mas sem produção da enzima (ALSOP, 1983 e BARKER, 1991).

As propriedades, mecanismo de reação, métodos de produção e purificação da enzima estão relativamente caracterizados principalmente a enzima produzida de *Leuconostoc mesenteroides* da linhagem NRRL B - 512 F. Ainda existem dúvidas quanto à sua composição química e ao peso molecular da enzima. Os primeiros estudos mostraram que a enzima tinha um peso molecular aproximado de 280.000 daltons (EBERT & SCHENK, 1968). Estudos mais recentes mostraram que a enzima está sempre associada com a molécula de dextrana, aparentando um peso molecular maior. KOBAYASHI & MATSUDA (1980), usando dextranases para eliminar a dextrana ligada à enzima obtiveram um peso molecular equivalente a 65.000 daltons, com um conteúdo de 17% de carboidratos.

ROBYT (1980) submeteu a dextrana-sacarase purificada a

uma hidrólise ácida, obtendo que a fração de carboidratos estava constituída por manose. Com adição de Concanavalin A, a enzima foi inativada, fato que o levou a sugerir que a enzima era uma glicoproteína.

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

Quanto à especificidade, durante muitos anos a sacarose foi o único substrato conhecido para produção dextrana, levando alguns pesquisadores a afirmarem que a dextrana-sacarase era absolutamente específica, capaz de polimerizar grupos de D-glicose somente a partir de sacarose (HEHRE, 1946). Estudos posteriores mostram que alguns compostos contendo uma ligação α -D-glicosídica, com energia similar à da sacarose servem como substrato para a dextrana-sacarase (BINDER & ROBYT, 1983).

A dextrana-sacarase catalisa a síntese de dextrana a partir de sacarose, numa ampla faixa de temperatura, desde valores em torno a 0 °C até próximo de 40°C (EBERT & SCHENK, 1968). A reação não envolve intermediários fosforilados e a energia necessária para a formação das unidades glicosídicas é fornecida pela hidrólise da ligação entre a glicose e frutose. Este fato constitui uma diferença fundamental com o mecanismo geral de síntese dos polissacarídeos intracelulares, onde um considerável número de intermediários são utilizados, como o caso do glicogênio e amido (SABATIE et al., 1986).

A enzima bruta e liofilizada retém a atividade por vários anos, quando estocada a temperaturas abaixo de 5°C (HEHRE, 1955). Em solução vários fatores influenciam na estabilidade da enzima, sendo a temperatura e o pH dois parâmetros fundamentais. Alguns autores mostram que a enzima em solução, perde a atividade rapidamente, com um tempo de meia vida de 3 minutos a 35°C, 13 minutos a 30°C e aproximadamente 2 horas a 27°C (segundo QUEIROZ, 1987). ROBYT & WALSETH (1979) mostram que mesmo a temperaturas de

4°C e -15°C, em solução, a enzima é instável, podendo perder 50 % da atividade em 20 dias. Segundo os mesmos autores, acima da temperatura ótima de 30°C a queda de atividade é mais drástica para enzima livre que para enzima imobilizada. Entretanto a temperaturas abaixo de 4°C outros pesquisadores relatam que em solução, a enzima apresenta maior estabilidade (LOPEZ, 1979).

KABOLLY & REILLY (1980) estudaram o comportamento da enzima numa faixa de pH de 4,0 a 6,4 não observando diferenças no valor de pH de atividade máxima entre enzima livre e imobilizada (Figura 1). Os autores localizaram o pH ótimo da enzima em 5,2, uma faixa onde a enzima tem maior estabilidade entre pH 5,0 a 6,0 e uma temperatura ótima de 30 °C. KOBAYASHI & MATSUDA (1980) mostraram que a enzima tem maior estabilidade a pH 4,0 e 8,0 com o ótimo em 6,0. MILLER et al. (1976) apresentam valores próximos, na faixa de 4,0 a 7,5 com o ótimo em 5.5.

As figuras 1 e 2 mostram o efeito do pH e temperatura na atividade da dextrana-sacarase.

MILLER & ROBYT (1984), verificaram que a presença de dextrana, polímeros neutros como polietilenoglicol (PEG), metil-celulose e detergentes neutros aumentam significativamente a estabilidade da dextrana-sacarase. No caso de dextrana e PEG em concentrações acima de 0.5 % foi verificada uma relação entre o efeito de estabilização e o peso molecular.

TSUMURAYA et. al. (1976) estudaram os efeitos causados, de íons de metais pesados e outros reagentes na atividade da dextrana-sacarase. A enzima foi testada com estas substâncias a 30°C por 5 minutos, e uma concentração enzimática de 0.56 UDS/ml. Verificou-se que a enzima é inibida por p-cloroaminobenzoato, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , e EDTA. Quando é inativada por EDTA, pode ser recuperada pela adição de íons cálcio mas muito pouco com Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , etc. A Tabela 1 resume os efeitos de íons de metais pesados e outros reagentes na atividade da enzima.

A força iônica pode ser um fator de inibição da enzima.

LOPEZ (1979) mostrou que a velocidade de reação da dextrana-sacarase diminuia a medida que a molaridade do tampão aumentava de 0.01 a 0.5 M.

Tabela 1: Efeito de íons metálicos e outros reagentes na atividade enzimática de dextrana-sacarase.
TSUMURAYA et. al. (1976)

A D I T I V O S	CONCENTRAÇÃO FINAL (M)	ATIVIDADE RESIDUAL %
Pura		100
NaCl	10^{-3}	100
CaCl	10^{-3}	100
MgCl ₂	10^{-3}	100
BaCl ₂	10^{-3}	100
MnCl ₂	10^{-3}	100
FeCl ₂	10^{-4}	25
	5×10^{-3}	10
	10^{-3}	0
FeSO ₄	10^{-3}	40
ZnSO ₄	10^{-3}	50
Cu(CH ₃ CO ₂) ₂	10^{-4}	70
	10^{-3}	0
Hg ₂ Cl ₂	10^{-5}	85
	10^{-4}	0
EDTA ^a	10^{-6}	90
	10^{-4}	50
	10^{-3}	30
PCMB ^b	10^{-5}	95
	10^{-4}	40
	5×10^{-4}	0
2-ME ^c	10^{-4}	100
UREA	10^{-1}	100

a ethylendiamino tetra acetico

b p - cloromercuribenzoato

c 2 - mercaptoethanol

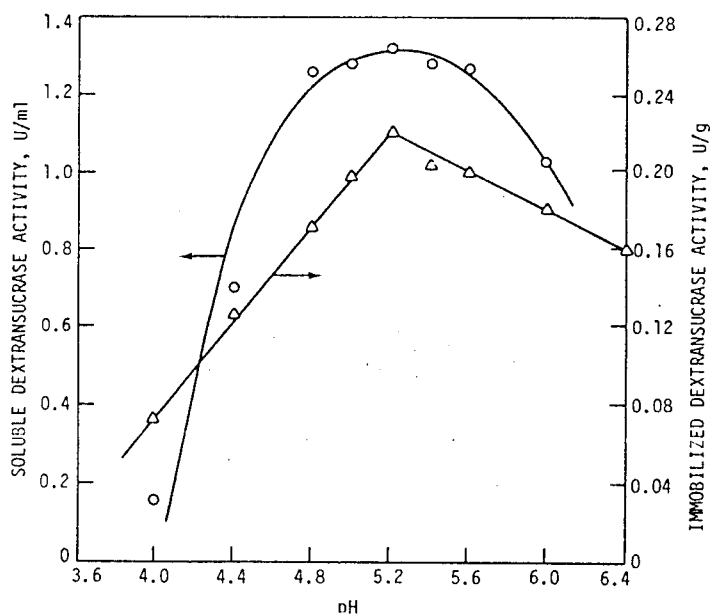


Figura 1: Efeitos do pH na atividade da dextrana-sacarase a 30 °C (o) solúvel; (Δ) imobilizada. (KABOLI & REILLY, 1980).

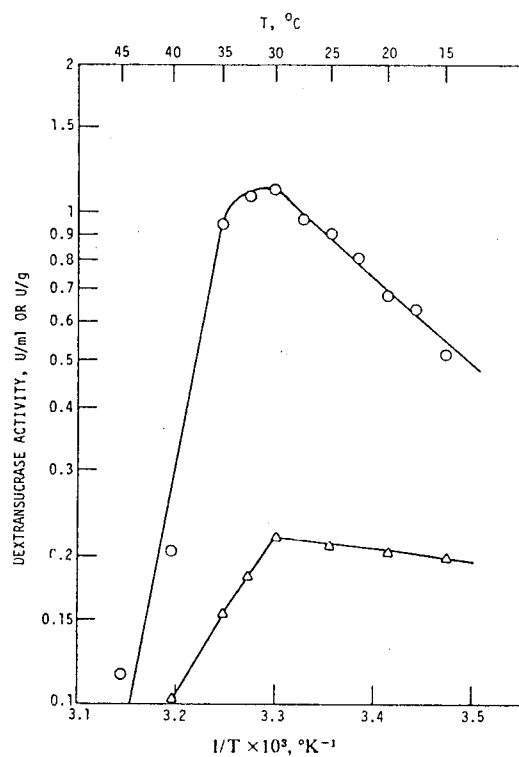


Figura 2: Efeitos da temperatura na atividade da enzima Dextrana-sacarase a pH 5.2 (o) solúvel; (Δ) imobilizada. (KABOLI & REILLY, 1980)

2.2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

A energia de ativação da reação da dextrana-sacarase, ainda não está bem definida, encontrando-se na literatura valores entre 5.0 e 11 Kcal/mol. KABOLI & REILLY (1980) determinaram a energia de ativação para a dextrana-sacarase livre como $8,57 \pm 1,23$ Kcal/mol e $1,65 \pm 0,96$ Kcal/mol para a enzima imobilizada trabalhando numa faixa de temperatura de 15 a 45°C.

EBERT & SCHENK (1968) determinaram que a concentração da sacarose influencia bastante a velocidade de reação, sendo que a velocidade máxima é atingida em concentrações próximas a 200 mM. A concentrações maiores ocorre uma inibição pelo substrato, como pode ser visto na figura 3.

MARTINEZ-ESPINDOLA & LOPEZ-MUNGUÍA (1985), verificaram que a cinética de dextrana-sacarase é descrita pelo modelo de Michaelis-Menten a concentrações de 10 a 15 % de sacarose, quando a saturação da enzima é alcançada. Assim mesmo mediram a velocidade inicial entre 0 e 400 g/l de sacarose, verificando que o modelo de inibição pelo substrato se adequa bem aos dados cinéticos e determinaram o valor de K_m igual 5,12 g/l e K_i igual a 4321 g/l.

PAUL et al. (1986) verificaram o efeito da maltose na cinética de reação na presença de maltose, a velocidade máxima (V_{max}) da reação foi 3 vezes superior e a constante aparente de Michaelis-Menten aumentou de 12 mM para 163 mM, quando a concentração do receptor passou de 0 a 568 mM. A Figura 4 ilustra o efeito da maltose como receptor nas constantes cinéticas da dextrana-sacarase.

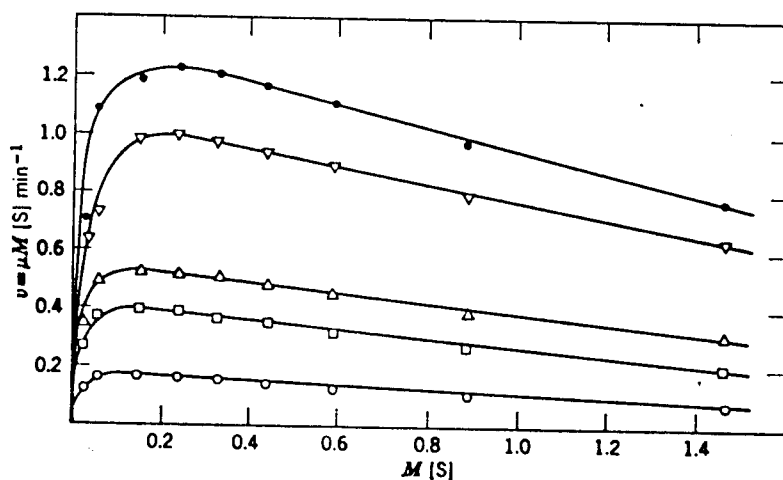


Figura 3 :Variação da velocidade inicial de síntese de dextrana com a concentração de sacarose à diferentes temperaturas (o) 0°C; (□) 8°C; (Δ) 15°C; (▽) 25°C e (●) 30°C. (EBERT & SCHENK, 1968)

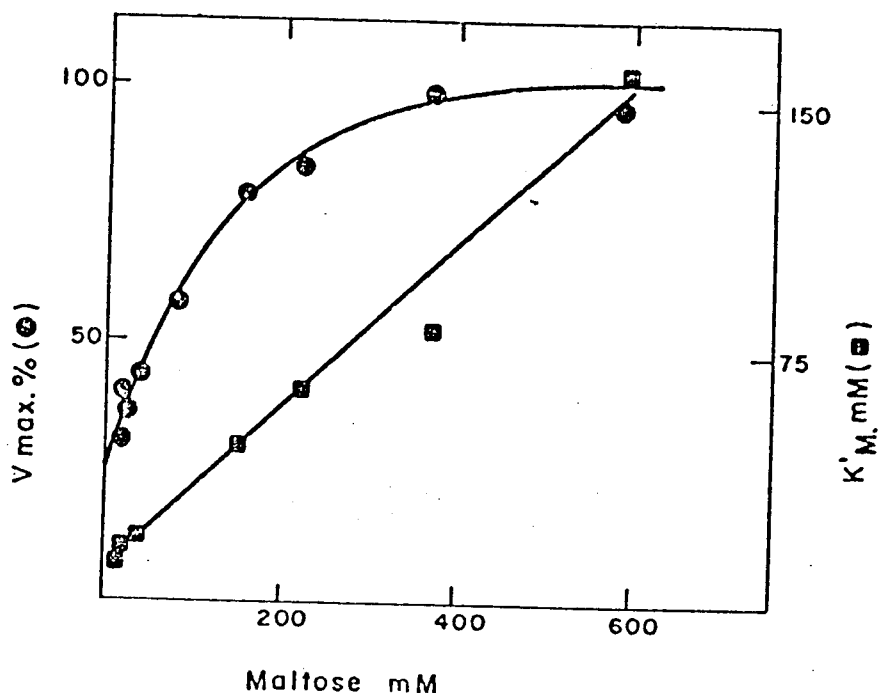


Figura 4: Efeitos da Maltose como Aceptor nas constantes cinéticas da dextrana-sacarase (PAUL et al. (1986)

2.2.3. DEFINIÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática pode ser medido em unidades de de dextrana-sacarase (UDS) e é definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana, em uma hora, liberando 0.52 mg de frutose, a pH 5.2 e temperatura de 30 °C (HEHRE, 1955).

KABOLI & REILLY (1980) definiram a atividade em Unidades Internacionais (UI), como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcar redutor em 1 minuto, a pH 5.2 e temperatura de 30°C.

ROBYT & WALSETH (1979) consideraram a atividade enzimática como a quantidade de enzima necessaria para incorporar 1 μ mol de D-glicose no polissacarídeo em 1 minuto a 25°C e pH 5,5.

A maioria dos trabalhos utiliza a definição de UDS, embora em estudos mais recentes a unidade internacional venha sendo utilizada (UI = 20.27 UDS).

2.2.4. IMOBILIZAÇÃO

A imobilização de dextrana-sacarase é um assunto recente, que começou a ser estudado somente há alguns anos. OGYNO (segundo QUEIROZ, 1987) imobilizou a enzima colocando-a em contato com resinas de troca iônica na síntese da dextrana.

CHEN & KABOLI (segundo QUEIROZ, 1987) estudaram a imobilização em papéis de filtro e sílica porosa. Os melhores resultados foram obtidos com sílica, atingindo uma atividade de 14 UDS/g de sílica. Os autores relataram uma grande perda de atividade quando a enzima entra em contato com o suporte. Continuando na mesma linha, KABOLY & REILLY (1980) fizeram um estudo comparativo das propriedades da enzima livre e imobilizada. Os resultados mostram pequenas variações quanto à estabilidade. Também foi analisado o efeito do pH e de presença de cálcio, não sendo observado diferenças significativas entre a

enzima imobilizada e a enzima livre. Os autores concluíram que a imobilização de dextrana-sacarase em sílica porosa é difícil, com índices de retenção muito baixos. A atividade específica máxima foi de 8 UDS/g de sílica.

MONSAN & LOPEZ (1981) imobilizaram a dextrana-sacarase em sílica porosa, atingindo índices de atividade da ordem de 800 UDS/g de sílica. LOPEZ (1979) constatou que a imobilização fornecia bons resultados com sílica de 6 m²/g. A medida que se aumentava a área específica, a quantidade de enzima imobilizada diminuía. Adição de maltose também facilitou a imobilização, principalmente na sílica com poros menores. Neste caso, a reação da maltose (aceptor) com o complexo enzima-dextrana, deixa a enzima livre, facilitando a penetração e ligação com suporte (LOPEZ, 1979).

A reação de síntese utilizando a enzima imobilizada, foi testada na presença de dextrana de baixo peso molecular como receptor. Com esta técnica, MONSAN & LOPEZ (1981b) conseguiram o rendimento de praticamente 100 % de polímero de baixo peso molecular.

A imobilização é um caminho promissor para se conseguir maior rendimento e produção contínua de dextrana, aumentando a produtividade. Não se encontra na literatura, referências a processos industriais, que utilizam esta técnica atualmente. Em escala piloto ALSOP (1983), relatou a produção de dextrana de forma contínua, utilizando enzima imobilizada. O autor não detalha as condições e o suporte utilizado. Informa apenas que a atividade específica é de 800 UDS/ml e que com 10 Kg de suporte converte-se 8 Kg de sacarose em dextrana por hora.

Este método ainda está em desenvolvimento e é muito interessante controlar a síntese de dextrana em termos do seu peso molecular. Isto exige um controle de uma série de fatores como: concentração do substrato, tempo de reação, força iônica, tipos de aceptores, atividade enzimática, temperatura e pH.

2.2.5. MECANISMO DE AÇÃO CATALÍTICA

A dextrana-sacarase catalisa a produção de dextrana mediante duas funções distintas: a *atividade hidrolítica e a glicosiltransferase*. A primeira função é responsável pela quebra de ligações entre a glicose e a frutose, formando o grupo D-glicosil e a segunda, transfere o grupo glicosil para a cadeia do polímero em formação.

• SEM ACEPTORES

O mecanismo de ação da dextrana-sacarase tem sido muito discutido. NEELY (1960), propôs que a enzima teria dois centros ativos: *doador* (d) e *receptor* (M). O mecanismo de crescimento do polissacarídeo se daria a partir da extremidade não redutora, envolvendo os seguintes passos:

- a) Ligação simultânea de duas moléculas de sacarose aos dois sítios ativos d e M. Nesse caso, a molécula ligada ao sítio d seria *doadora* de resíduos D-glucopiranosil e a outra molécula *Aceptora* iniciaria a cadeia..
- b) Transferência do grupo D-glucopiranosil da sacarose, ligada ao sítio d , para a sacarose ligada ao sítio M, liberando uma molécula de frutose.
- c) sucessivas transferências de grupos D-glucopiranosil da sacarose para o final não redutor da cadeia em crescimento, ligado ao sítio M , formando ligações α -(1,6).
- d) Dissociação ou inativação do complexo dextranosil, terminam a síntese da molécula de dextrana.

Este mecanismo explica o crescimento da cadeia principal mas não as ramificações.

EBERT & SCHENK (1968)] admitiram a hipótese dos dois centros ativos proposto por NEELY, mas assumiram que o crescimento se dá pela extremidade redutora da cadeia. Em seus

estudos concluíram que não é necessário "ativadores" para iniciar o crescimento do polímero.

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

Primeira etapa.-Dois nucleófilos, localizados nos sítios ativos (X_1 e X_2), fazem um ataque nucleofílico em duas moléculas de sacarose, formando dois grupos complexos enzima-glicosil. Estes complexos estão formados por ligações covalentes através dos nucleófilos e o carbono 1 da glicose.

Crescimento da cadeia.-a hidroxila do carbono 6, de uma das unidades de glicose (do complexo enzima-glicosil), faz um ataque nucleofílico à outra glicose formando uma ligação α -(1,6), liberando um nucleófilo, que ataca outra molécula de sacarose, formando novo grupo glicosil. Em seguida, a hidroxila do carbono 6, do novo glicosil formado, faz um ataque no carbono 1 do isomaltosil formado na etapa anterior. Na presença de sacarose o mecanismo se repete continuamente com os dois sítios catalíticos X_1 e X_2 , formando alternadamente, complexos covalentes com a glicose e a cadeia de dextrana em crescimento.

Fim da cadeia.-Quando o acceptor natural (glicose ou frutose) estiver numa concentração suficiente para concorrer ao nível do sítio ativo com a sacarose, a dextrana é liberada, cessando o alongamento da cadeia. Neste mecanismo, um grupo hidroxila do receptor efetua um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 da cadeia de dextrana.

A formação das ligações α -(1,3) se dá quando um grupo hidroxila do carbono 3 da dextrana livre em solução produz um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 na extremidade redutora do complexo dextranosil-enzima liberando a dextrana do complexo (ROBYT & TANIGUCHI, 1976).

• COM ACCEPTOR

A ação dos aceptores (carboidratos de baixo peso molecular) na síntese de dextrana tem importância fundamental, pois além de alguns aumentarem a velocidade de reação, influem de forma decisiva no peso molecular da dextrana formada.

EBERT & SCHENK (1968) utilizaram aceptores marcados radioativamente (C_{14}) e estudaram a cinética de reação e os pesos moleculares dos produtos obtidos. Os autores acreditam que o final da cadeia se dá pela quebra da ligação entre a enzima e a cadeia em crescimento, devido à ação do acceptor que desfaz o complexo enzima-cadeia, impedindo que se refaça o complexo. A competição do acceptor com a sacarose explica a formação de dextrana de baixo peso molecular e de polissacarídeos.

ROBYT & WALSETH (1978) também investigaram o papel dos aceptores, usando açúcares marcados com carbono radiativo. O mecanismo proposto por estes autores consideram que as hidroxilas dos aceptores fazem um ataque nucleofílico e liberam os grupos glicosil e dextrana da enzima, desfazendo o complexo formando ligações glicosídicas dando como produtos, respectivamente, oligossacarídeos e dextrana.

ROBYT & EKLUND (1983) estudaram o efeito dos aceptores, mostrando a eficiência relativa de cada um e a distribuição dos produtos da reação têm uma variação muito ampla, dependendo do receptor presente como podemos apreciar na Tabela 2.

Os diferentes mecanismos de reação de síntese de dextrana podem ser vistos nas figuras 5, 6 e 7.

Tabela 2: % do total de D-glicose da sacarose, incorporados nos produtos de reação da Dextrana-sacarase com aceptores ROBYT & EKLUND (1983)

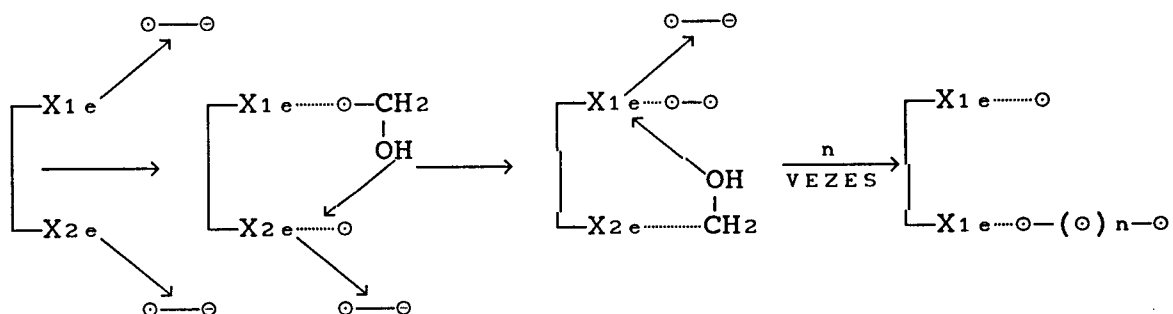
Aceptor	% Glicose nos Produtos de reação	% Glicose na Dextrana	% Glicose livre	% Leucrose e Isomal- tulose	Eficiencia relativa ao Aceptor ¹
Maltose	75,5	18,0	5,9	0.6	100,0
Isomaltose	67,0	26,2	6,0	0.8	88,7
Nigerose	43,9	48,7	6,3	1.1	58,1
MADG ⁽²⁾	38,9	53,1	6,7	1.3	51,5
DG ⁽³⁾	22,6	69,0	6,9	1.5	29,9
D-glicose	12,9	77,9	7,1	2.1	17,1
Furanose	10,1	80,7	7,3	1.9	13,4
MBDG ⁽⁴⁾	9,3	81,5	7,0	2.2	12,3
Lactose	8,1	82,1	7,5	2.3	10,7
Celobiose	6,8	83,6	7,5	2.1	9,0
D-frutose	4,8	85,6	7,4	2.2	6,4
Rafinose	3,3	86,8	7,5	2.4	4,4
Melibiose	3,2	87,4	7,2	2.2	4,2
L-sorbose	2,4	88,2	7,2	2.2	3,2
D-manose	2,2	88,3	7,2	2.0	2,0
D-galactose	1,3	88,9	7,3	2.5	1,7
D-xilose	0,4	89,9	7,5	2.2	0,5
sem receptor	-	90,6	7,3	2.1	-

1 em relação ao valor máximo obtido pela maltose

2 metil- α -D-glicosídeo

3 metil- β -D-glicosídeo

4 1,5-anidro-D-glucositol



$\circ-\circ$: sacarose
 $\circ$: glicose
 $\ominus$: frutose
 ϵ : nucleófilo
 $-$: ligação α -(1,6)
 X_1, X_2 : sitios ativos

Figura 5 : Esquema do mecanismo da reação de síntese da dextrana proposto por ROBYT et al. (1974).

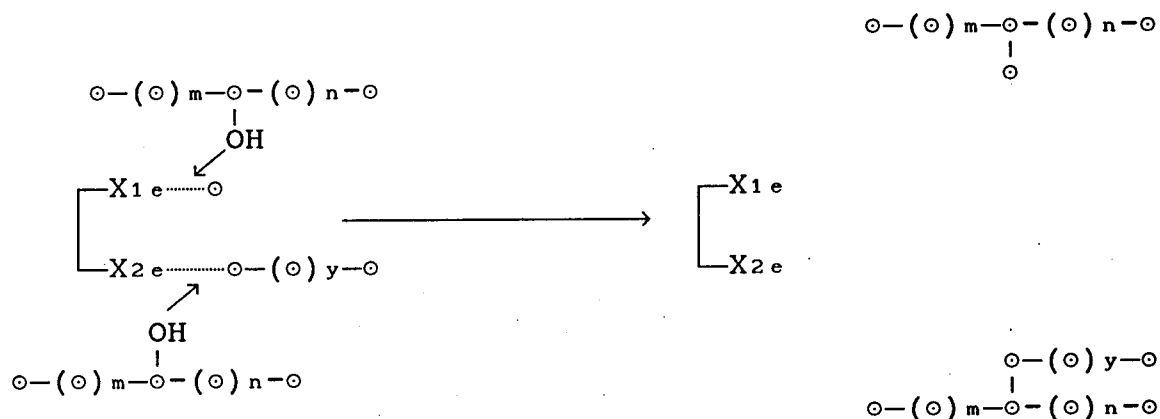
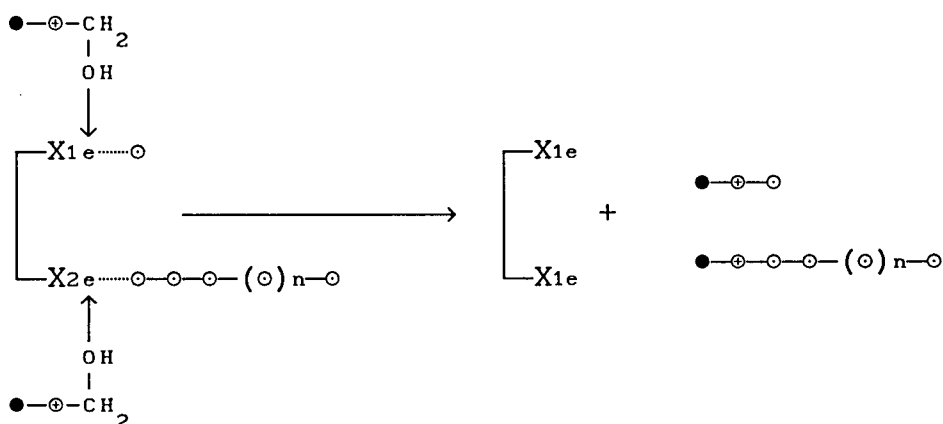


Figura 6 : Esquema do mecanismo de formação de ramificações proposto por ROBYT & TANIGUCHI (1976).



- ⊙ : glicose (aceptor marcado com C14))
- : glicose (carbono redutor marcado com C14)
- : ligação α-(1,6)

Figura 7: Esquema do mecanismo para reação dos aceptores na síntese da dextrana proposto por ROBYT & WALSETH (1978).

2.2.6. PRODUÇÃO

A dextrana-sacarase, produzida na indústria principalmente por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, é uma enzima indutiva e o único indutor conhecido é a sacarose (que também serve como fonte de carbono). Outros açúcares como glicose, frutose, manose, etc. promovem crescimento vegetativo normal, mas sem produção de enzima.

As condições de cultura para a obtenção desta enzima foram analisados por TSUCHIYA et al. (1952). Variando-se as concentrações de sacarose de 0.5 a 5% há um aumento na atividades enzimática máxima de 6 para 120 UDS/ml, no entanto, acima de 2% há uma indesejável produção de dextrana, dificultando a separação das células pelo aumento excessivo da viscosidade. Dessa forma, os autores consideram 2% a concentração ótima. Extrato de levedura (2%) ou água de maceração de milho são os nutrientes essenciais que servem como fonte de nitrogênio, vitaminas e

O fosfato entre 1 a 2% tem sido usado como tamponante do pH, mesmo quando o controle é automático, há uma necessidade de uma certa quantidade de fosfato, para evitar oscilações bruscas do pH. A dextrana-sacarase é bastante sensível a este parâmetro e o valor ótimo está em torno de 6,7 (LOPEZ, 1979).

O meio de cultura deve ser complementado com solução de sais, contendo sulfato de magnésio heptaidratado, cloreto de sódio, sulfato de manganês, sulfato ferroso e cloreto de cálcio (KABOLLI & REILLY, 1980)

Quanto a temperatura a enzima dextrana sacarase pode ser produzida a temperaturas entre 23 a 27°C.

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria aeróbica facultativa, desenvolvendo-se bem em anaerobiose. A injeção de oxigênio puro ou de dióxido de carbono inibe seu crescimento. Quando uma pequena quantidade de ar é injetada a produção de dextrana aumenta e sem aeração a atividade diminui (ALSOP, 1983).

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

A produção de dextrana-sacarase (DS) por fermentação contínua tem sido pouco estudada, normalmente é produzida por batela alimentada.

2.3. DEXTRANA

2.3.1. PROPRIEDADES

ESPINALL (1983) classifica a dextrana como um homopolissacarídeo de origem bacteriana, formado por uma cadeia principal linear com ligações α -(1,6) de unidades de glicose, apresentando diversidade quanto à proporção de ligações α -(1,3), α -(1,2) e α -(1,4) e graus de ramificações.

As características da dextrana dependem muito do microrganismo produtor. As bactérias produtoras estão agrupadas na família Lactobacillaceae e mais especificamente nos gêneros Lactobacillus, Streptococcus e Leuconostoc (SIDEBOTAHM, 1974).

A tabela 3 mostra alguns microrganismos produtores de dextrana e a proporção das ligações.

A dextrana produzida pela linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512-F é constituída somente por ligações α -(1,6) e α -(1,3) (NEELY, 1960). Este polímero é formado por uma cadeia principal de unidades de glicose com ligações α -(1,6) e com ramificações de glicose com ligações α -(1,3). As cadeias secundárias são curtas, sendo que 45% delas contém uma, 40% duas e somente 15% contém mais de duas unidades monoméricas de glicose (SABATIE et al., 1986).

O peso molecular da dextrana depende das condições de síntese tais como: temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares (ROBYT, 1980 e SABATIE et al., 1986). Quando ela é sintetizada somente com sacarose, denomina-se dextrana nativa e apresenta em média, um peso molecular entre 30 e 90 milhões de daltons e alta viscosidade. Baixos pesos moleculares são obtidos em presença de outros açúcares (aceptores), como maltose, isomaltose, etc ou pela hidrólise da dextrana nativa.

A dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512- F é bastante solúvel em água, metil sulfóxido, etilenoglicol e

Tabela 3: Porcentagem de ligações entre os resíduos glicosídicos das dextranas (linhagens e microrganismos). (SIDEBOTAN, 1974)

MICRORGANISMO	D E X T R A N A			
	% de ligações entre os resíduos glicosídicos			
	α -(1,6)	α -(1,4)	α -(1,3)	α -(1-2
L.mesenteroides				
NRRL B - 512F	95	...	5	...
B - 523S	93	3	4	...
B - 742S	64	8	28	...
B - 742L	95	4	...	...
B - 1064	95	2	3	...
B - 1299S	56	...	7	36
B - 1299L	49	...	19	32
B - 1355S	53	...	47	...
B - 1355 ^a	85	1	15	...
B - 1415	87	12	1	...
B -1416	83	7	10	...
IFO 12370	94	...	6	...
SF4	95	...	5	...
44	71	...	29	...
S. mutans:				
OMZ 176	16	...	84	...
Ingbritt A	37	...	63	...
S.sanguis 804	52	...	48	...
804				
Complexo Tibi ^b	90	2	9	...

^a Também chamado como L. dextranicum

^b Lactobacillus brevis/Saccharomyces cerevisae

glicerol. Em solução aquosa (3 a 10 %) apresenta rotação ótica característica em torno de +200°, apresentando uma solução clara e estável à esterilização por calor, ao congelamento e descongelamento (JEANES, 1974).

A dextrana em solução não tem a tendência de adotar uma

conformação ordenada devido à flexibilidade das ligações da cadeia principal. A interação entre as moléculas também é dificultada pelas estruturas das ramificações. Isto faz com que a viscosidade intrínseca seja extremamente baixa. O comportamento viscoso é bastante peculiar e até 5% (p/v) uma solução de dextrana apresenta-se como um fluido newtoniano (JEANES, 1974 e CURRALERRO, 1993).

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

2.3.2. USOS

Historicamente, a dextrana foi o primeiro polissacarídeo microbiano produzido industrialmente, sendo usado como substituto do plasma sanguíneo durante a segunda guerra mundial. Inicialmente este polissacarídeo surgiu como um problema da indústria açucareira, mas as pesquisas demonstraram sua grande aplicabilidade na indústria farmacêutica, química, petroquímica e alimentos. Atualmente é um dos polissacarídeos mais estudados, existindo várias patentes registradas para a produção de dextrana e derivados. Muitas pesquisas foram realizadas, mostrando os usos potenciais da dextrana, mas poucas alcançaram sucesso comercial.

Na indústria farmacêutica a dextrana de baixo peso molecular é usada há mais de 30 anos com fins clínicos, por apresentarem duas importantes características: são completamente metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos ou alérgicos. Dentre os usos clínicos, destacam-se:

a) Expansor do plasma sanguíneo

Conforme a seu peso molecular, a dextrana pode ser usada como substituto do plasma sanguíneo, com aplicações e

propriedades bastante semelhantes, à base de dextrana 40 (peso molecular médio de 40.000) e dextrana 70 (peso molecular médio de 70.000). A dextrana 40 (solução 10% p/v) produz uma expansão no volume sanguíneo menor que a dextrana 70 (solução 6% p/v). Esta, por apresentar propriedades osmóticas similares aos do plasma é mais utilizada para manter o volume sanguíneo e a pressão arterial em casos de choque por queimaduras ou hemorragias severas. A dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL b-512(F) é a única usada para finalidades clínicas as quais ultrapassam 300 aplicações (SANDFORD, 1983).

b) Dextrana-sulfato

A Dextrana-sulfato tem sido utilizada com sucesso como agente anti-coagulante, com propriedades semelhantes à heparina. Recentemente têm sido investigadas suas propriedades anti-virais, inclusive contra os vírus HIV (CURRALERRO, 1993).

c) Ferro-dextrana

Vários carboidratos foram testados para produção de soluções de ferro estáveis e facilmente assimiláveis, para infusão intramuscular ou intravenosa. Esses objetivos foram alcançados com a ferro-dextrana, onde as moléculas do polissacarídeo têm baixo peso molecular (5.000 a 2.500) (CURRALERRO, 1993).

A dextrana de peso molecular medio é muito utilizado tanto na industria de alimentos como na industria química. Na industria química a dextrana é usada para fabricação de redes moleculares cruzadas e empacotamento de colunas cromatográficas de exclusão molecular. Os produtos mais conhecidos são: SEPHADEX e DEAE-DEXTRANA (SANDFORD, 1983). Na industria de alimentos é usada como agente gelificante em gomas de mascar, como inibidor de cristalização em sorvetes, homogeneizador e espessante em doces e xaropes.

A dextrana de alto peso molecular é empregado na lama de perfuração e recuperação secundária do petróleo (MARIBONA,

1966).

Os usos principais da dextrana e derivados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Usos da dextrana (MURPHY, 1973)

P R O D U T O S	A P L I C A Ç Õ E S
I Indústria Farmacêutica . Crioprotetor . Raio-X . Comprimidos . Cosméticos . Plasma Sintético	. Diminui os danos causados pelo congelamento em material biol. . Agente de suspensão . Agente ligante e de solubilização . Emulsificante e estabilizante . Expansor volumétrico
II Indústria de Alimentos . Doces e xaropes . Geléias e chicletes . Sorvetes . Confeitaria	. inibe a cristalização, promove a homogeinização e espessamento . agente gelificante. . inibe a formação de cristais e mantem o volume . espessante
II Extração de Petróleo . Lama de perfuração . Fluidos de extração	. colóide de proteção e lubrificante . Evita perda de água
IV Outros . Produção de alumínio . Produção de pó etálico. . Produção de combustível Nuclear	. agente de sedimentação . evita o crescimento de cristais formando gel precipitante . agente complexante

Tabela 5: Usos de derivados da dextrana (MURPHY, 1973)

DERIVADOS DE DEXTRANA	A P L I C A Ç Õ E S
-Esteres	
. Triacetato	.composição de filmes para embalagens
. Palmitatos e esteratos	.impermeabilizantes, regeneração de celulose.
	.ligantes entre placas metálicas e polietileno
. Sulfato-Dextrana	.Tratamento de bócio, úlcera péptica e anticoagulante.
. Dextrana-Fosfato	.gomas de alta viscosidade. Inibição de atividade péptica
. Dextrana-Nitrato	.explosivos e géis propelentes
-Benzil-Dextrana	.uso medicinal
-Hidroalquil-dextrana	.expansor do plasma sanguíneo com maior qualidades de estocagem.
Carboximetil-Dextrana ácido ou sal	.ligantes em medicamentos (comprimidos). Espessamento em xaropes, estabilizantes em sorvetes.
	.pesticida, carregador de princípios ativos-antibióticos.
	.emulsificante de tintas
	.filmes para embalagens biodegrad.
	.gel aquoso e organogéis
	.estabilizante de sucos
	.medicamentos de relaxamento com efeito retardado
-Dialdeido-Dextrana	.Prolonga a reação de drogas como Novocaína e tubazina
-Iôdo-Dextrana	.tratamento de bócio, não tóxico e não alérgico
-Ferro-Dextrana	.tratamento de anemia.

2.3.3. PRODUÇÃO

Apesar de existirem muitos microrganismos produtores de dextrana, a maioria dos processos industriais utilizam o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F). O microrganismo produz extracelularmente a enzima dextrana-sacarase e esta sintetiza a dextrana (SANDFORD, 1983). A produção de dextrana com esta linhagens atualmente pode ser feita por processo convencional ou por síntese enzimática.

• PROCESSO CONVENCIONAL

No processo tradicional ocorrem tres fenômenos simultâneos:

- crescimento celular.
- produção da enzima dextrana sacarase e
- síntese de dextrana.

A dextrana é produzida diretamente no meio de cultura de *Leuconostoc mesenteroides*, usando sacarose em excesso. O polissacarídeo é produzido durante o crescimento da bactéria num processo com controle simples de de temperatura. As condições de cultura estabelecidas por JEANES (1956 e 1965) alcançaram bons rendimentos e serviram de base para a produção industrial. JEANES (1956) descreve as condições de cultura para a produção de três diferentes dextranas, sendo duas hidrosolúveis (NRRL B-512(F) e B-1416 e uma insolúvel em água B-523S). As condições de cultura para o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) são as seguintes:

Sacarose	: 100 g/l
Extrato de levedura	: 2,5 g/l
MgSO ₄ .7h ₂ O	: 0.2 g/l
K ₂ HPO ₄	: 5.0 g/l
pH _{inicial}	: 7
Tempo	: 18 a 30 horas
Temperatura	: 25°C (durante a fermentação)

Durante o processo (fermentativo) o pH cai de 7,0 até 4,8. Quando a fermentação é interrompida, atinge-se máxima viscosidade, pesos moleculares de ordem de 100 milhões de Daltons e um rendimento (em relação à sacarose inicial) aproximadamente de 25%.

Para se extrair a dextrana o meio fermentado é diluído com água e centrifugado para separar as células. Então a dextrana presente no sobrenadante é precipitada com etanol (até 45 % v/v). O produto obtido por centrifugação é dissolvido em água e novamente precipitado com álcool. O produto final é chamado de dextrana nativa.

• PROCESSO ENZIMÁTICO

Este processo é conduzido em duas etapas: produção da enzima via fermentação do *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-512 e síntese de dextrana "in vitro". A síntese "in vitro" apresenta um potencial econômico enorme, devido a algumas características da enzima: é uma enzima extracelular, sem intermediários fosforilados, e para sintetizar a dextrana não é necessário energia adicional e além disso, a reação é irreversível.

As vantagens do processo de síntese enzimática de dextrana são:

- Simplificação do processo de purificação: no processo convencional o caldo adquire alta viscosidade (mais de 500 cp) dificultando a separação das células, o que não ocorre no processo enzimático onde a produção de dextrana "in vitro", causadora da alta viscosidade está livre dos microrganismos.
- Melhores condições de controle: no processo enzimático o controle de fermentação e da síntese enzimática é realizado com grande facilidade, o que não ocorre no processo tradicional.
- O rendimento teórico da síntese enzimática de dextrana é

100% em relação à glicose. Em condições industriais, o rendimento é menor, diminuindo com o aumento da concentração inicial de sacarose, fornecendo neste caso, quantidades significativas de produtos secundários.

Para fins clínicos, tanto a dextrana nativa produzida pelo processo convencional quanto processo enzimático (sem utilização de aceptores) atinge valores em torno de 100 milhões de Daltons, esta tem que passar pelo fracionamento para se chegar no final do processo com um peso molecular inferior de 100.000 daltons. Os processos de fracionamento são: hidrólise ácida ou alcalina, hidrólise enzimática, clivagens por ultrasson e depolimerização térmica.

A hidrólise ácida é feita normalmente com ácido sulfúrico ou clorídrico a 100°C e o controle é feito pela medida da viscosidade. Na hidrólise enzimática utiliza-se dextranases, produzidas extracelularmente de várias linhagens de bactérias, leveduras e fungos .

No processo de fracionamento da dextrana nativa usa-se também ultrafiltração e em escala industrial cromatografia líquida de permeação em gel.

Alguns autores (KOEPSELL et al., 1952; HEHRE, 1953; MONSAN & LOPEZ , 1981b e ROBYT & EKLUND, 1983) mostram a possibilidade de se produzir, diretamente no meio de cultura, dextrana de baixo peso molecular, alterando algumas condições como a concentração inicial da sacarose, adição de outros açúcares ou oligossacarídeos de baixo peso molecular, inclusive dextrana hidrolisada, Variando-se a concentração de sacarose entre 20 e 80% e adição de sacarídeos como glicose, frutose, maltose, oligossacarídeos ou dextrana, é possível produzir diretamente no meio de cultura, dextrana com peso molecular variando de 10.0000 a 300.000 daltons

2.3.4. FATORES QUE AFETAM O PESO MOLECULAR DA DEXTRANA

A síntese enzimática de dextrana é fortemente influenciada pela concentração da sacarose, a concentração enzimática, temperatura e presença de certos açúcares. Quando a dextrana é produzida usando somente sacarose como substrato, as moléculas deste polissacarídeo atingem valores em torno de 30 e 90 milhões de daltons (JEANES, 1974).

A concentração da sacarose é um dos parâmetros que mais influencia na produção enzimática. O produto principal de dextrana formada usando 10 % de concentração de sacarose foi de um peso molecular médio de muitos milhões, precipitando completamente com 38% de etanol. Por outro lado com concentrações de sacarose de 70%, produz-se dextrana de baixo peso molecular que precipita com 51 % de etanol. Com 70% de sacarose também forma-se glicose, frutose e oligossacarídeos que precipitam com 90 % de etanol. Com concentrações intermediárias, verifica-se uma distribuição bimodal de peso molecular, com uma porção de alto peso molecular que precipita com 38% de etanol e outra de baixo peso molecular que começa a precipitar com 48% de etanol (TSUCHIYA al et., 1955).

Com o desenvolvimento da técnica de cromatografia de permeação em gel (HPLC), confirmou-se que o parâmetro mais importante é a concentração da sacarose, controlando tanto o rendimento quanto a distribuição de pesos moleculares.

Muitos autores estudaram o comportamento da síntese enzimática na presença de vários açúcares como aceptores, como maltose, isomaltose, α -metil glicosídeo, glicose, frutose, melibiose, galactose, oligossacarídeos e outros. Maltose e isomaltose são considerados como os aceptores mais eficientes, aumentando a taxa de reação e produzindo dextrana de baixo peso molecular (HEHRE, 1953 e TSUCHIYA et al. 1955 e EBERT & SCHENK, 1968).

MONSAN & LOPEZ (1981), utilizando técnicas mais avançadas de determinação de pesos moleculares por cromatografia

de permeação em gel (HPLC), usando como aceptores: maltose, oligosacarídeos, dextrana de 9.400 e dextrana de 40.000 daltons conseguiram os resultados apresentados nas Tabelas 6, 7 e figura 8.

Tabela . Parâmetros da síntese enzimática usando enzima dextrana-sacarase livre (efeitos de adição dos aceptores) (MONSAN & LOPEZ, 1981).

Nº	°	Aceptor	Aceptor (g/l)	Atividade enzimática (U/ml)	Sacarose (g/l)
1	3	Maltose	10	.24	100
2	3	Maltose	20	3.17	200
3	3	Dextrana (M=9400)	10	.24	100
4	3	Dextrana (M=40000)	10	.24	100
5	3	Oligosacarideo ^b	20	.24	100
6		Oligosacarideo	20	.24	200
7	3	Oligosacarideo	20	3.17	200
8		Oligosacarideo	20	3.17	200

Tabela 7. Resultados da produção de dextrana da tabela 6.

Nº	Porcentagem de Dextrana ^a		
	M > 350.000 (%)	20.000 < M < 350.000 (%)	M < 20.000 (%)
1	52	0	48
2	0	0	100
3	100	0	0
4	100	0	0
5	41.70	5.60	52.70
6	13.70	8.50	77.80
7	29.40	4.20	66.40
8	0	40	60

a dextrana analisada por Ultrogel AcA 34 GPC.

b oligossacarídeo obtido usando maltose como aceptor nas condições dadas na linha 2.

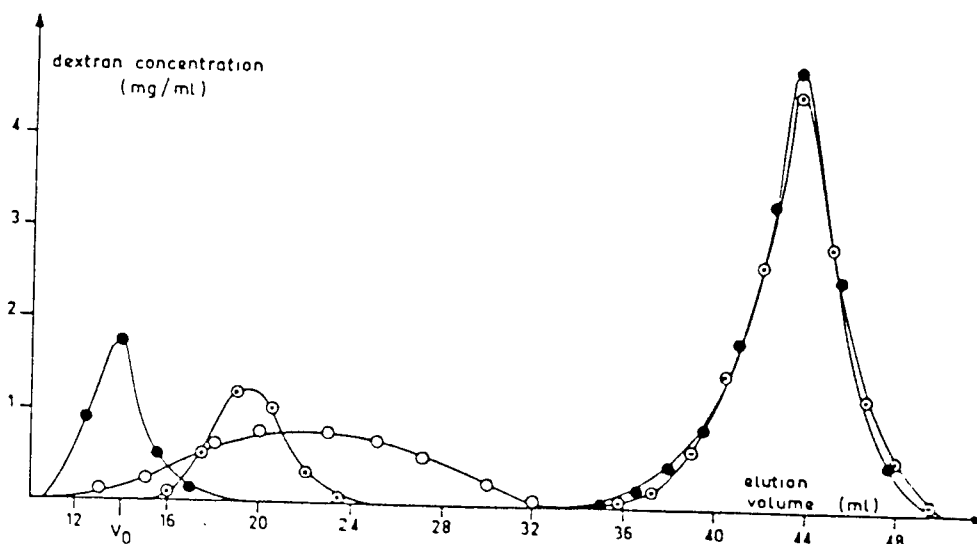


Figura 8. Cromatografia de permeação em gel de dextrana sintetizada com dextrana-sacarase livre.
 Condições de reação:
 Atividade de dextrana-sacarase 3,2 UDS/ml; concentração de sacarose 200 g/l (sem aceptor (—●—●—●—)) Temperatura 30°C; usando oligossacarídeos (Tabela 6) como aceptor à concentração de 20 g/l (—○—○—○—) temperatura 4 °C; (—○—○—○—) dextrana clínica ($\bar{M}$ = 75.000 daltons)..
 (MONSAN & LOPEZ, 1981)

ALSOP (1983) estudou o efeito de vários parâmetros da síntese enzimática em condições industriais, através de técnicas de cromatografia de permeação em gel (GPC), concluindo que o parâmetro mais importante é a concentração da sacarose, controlando tanto o rendimento quanto a distribuição de pesos moleculares. Um resumo dos resultados está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Rendimento das frações de carboidratos em várias concentrações de sacarose no final da reação (ALSOP, 1983).

Sacarose (% p/v)	Monossa- carídeos	Dissa- carídeos	Dextrana Total	Dextrana Alto P.M.	Dextrana Baixo P.M.
2	52,2	2,9	45,9	45,9	0
4	50,0	4,4	45,6	45,6	0
5	51,3	4,3	44,4	44,4	0
10	51,2	6,8	42,0	39,0	3,0
15	55,5	9,4	35,3	25,3	10,0
20	56,9	11,2	31,9	17,9	14,0
Teórico	52,6	0	47,4	47,4	0

Com o aumento da concentração de sacarose uma série de alterações ocorrem: (1) a quantidade de monossacarídeos (principalmente frutose) aumenta além do esperado; (2) a quantidade de dissacarídeos (principalmente leucrose, mais um pouco de sacarose e isomaltose) aumentam consideravelmente; (3) a quantidade de dextrana de baixo peso molecular ($PM < 5.000$) aumenta principalmente acima de 10% de sacarose. Como consequência disso o rendimento em dextransas de alto peso decresce bastante.

Posteriormente ORIOL et al. (1985), mostraram que o número de espécies com diferentes graus de polimerização aumenta com a diminuição da razão R ($[aceptor]/[sacarose]$). Para uma razão constante, o número de espécies moleculares formadas aumenta com o grau de polimerização do acceptor utilizado. O mesmo comportamento foi observado nos parâmetros cinéticos com relação à concentração e peso molecular do acceptor.

Finalmente PAUL et al. (1986), utilizando maltose, oligossacarídeos e dextrana como aceptores, relacionaram o peso molecular das espécies formadas com o peso molecular dos aceptores utilizados e a relação R ($[aceptor]/[sacarose]$) como pode ser visto nas figuras 9 e 10 e nas equações 1 e 2.

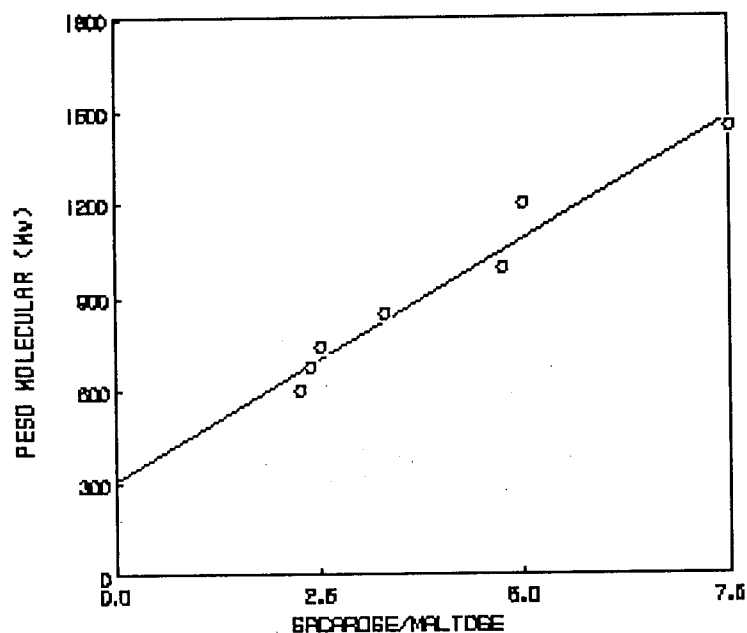


Figura 9. Peso molecular médio (M_w) de oligossacarídeos em presença de maltose como aceptor da relação [sacarose]/[maltose] (PAUL et al., 1986).

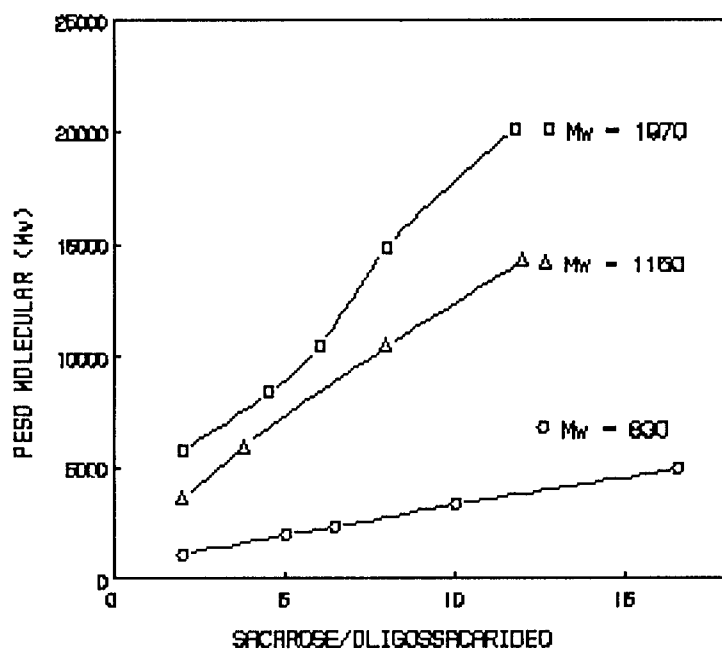


Figura 10. Peso molecular médio ($\bar{M}_w$) de dextrana presença de oligossacarídeos como aceptores em função da relação [sacarose]/[oligossacarídeos] (PAUL et al., 1986).

Com o uso de maltose foi obtida a seguinte correlação:

$$M_w = 340 \left(1 + 0.474 \frac{\text{Sacarose}}{\text{Maltose}} \right) \quad (1)$$

Com o uso de oligossacarídeo de diferentes pesos moleculares como aceptores, foi obtida a seguinte correlação:

$$M_w = M_{w,A} \left(1 + 0.474 \frac{\text{Sacarose}}{\text{Aceptor}} \right) \quad (2)$$

2.3.5. PESO MOLECULAR E POLIDISPERSÃO (ALSOP, 1977).

Qualquer polímero ou uma dextrana heterogênea ou polidispersa pode ser caracterizada pelo conhecimento dos seguintes parâmetros:

a) Peso molecular médio ($\bar{M}_w$)

Representa uma média na qual cada molécula presente é pesada de acordo com sua fração em peso. É uma medida do espalhamento da luz relacionada com resistência à tração e dureza.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum (\text{Peso das moléculas} \times \text{Peso molecular})}{\text{Peso total das moléculas}}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (3)$$

Onde, n_i é o Número de moléculas com peso molecular M_i . $\bar{M}_w$, é sensível à mudança do conteúdo de dextrana de alto peso molecular e é uma importante indicadora do comportamento do polímero.

b) Média de pesos moleculares ($\bar{M}_n$)

Representa a razão do peso total de todas as moléculas e o de número total das moléculas. $\bar{M}_n$ está relacionado com as propriedades coligativas: elevação do ponto de ebulição, pressão osmótica, abaixamento do ponto de congelamento, número de radicais hidroxilados e equivalente epoxi. $\bar{M}_n$, é amplamente influenciado por

mudanças do conteúdo de dextrana de baixo peso molecular.

$$\bar{M}_n = \frac{\text{Peso total de todas as moléculas}}{\text{Número total de todas as moléculas}}$$

$$\bar{M} = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (4)$$

- c) I_d , conhecido como polidispersão, é uma medida da amplitude da distribuição de peso moleculares, sendo igual a 1 para sistemas monodispersos (como exemplo à glicose $\bar{M}_w = \bar{M}_v$) e maior que 1 para sistemas polidispersos. O índice de dispersão pode ser calculado por:

$$I_d = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_v} \quad (5)$$

- d) Peso molecular médio para cálculo da viscosidade ($\bar{M}_v$)

Está relacionado com a estabilidade e comportamento para moldagem.

$$\bar{M}_v = \left(\frac{\sum n_i (M_i)^a}{\sum n_i} \right)^{1/a} \quad (6)$$

- e) Viscosidade intrínseca, $[\eta]$

$$[\eta] = K(\bar{M}_v)^a \quad (7)$$

Onde, K e a são constantes de Mark-Houwink

2.3.6. METODOS PARA DETERMINAR PESOS MOLECULARES

Ha várias décadas, muitos métodos analíticos foram utilizados com sucesso, com poucas variações e sucesso, para determinar pesos moleculares da dextrana. Métodos absolutos, incluindo dispersão de luz, ultracentrifugação, osmometria e análise de grupos funcionais, foram propostos:

- a) Dispersão da luz

Quando uma solução de dextrana é irradiada com um raio de

luz, a intensidade de luz dispersa passa diretamente através da solução de dextrana podendo ser relacionada matematicamente com o peso molecular da dextrana. Esta técnica é mais usada para determinar medidas de $\bar{M}_w$.

b) Ultracentrifugação

A determinação de $\bar{M}_v$ de um polímero, está relacionado com a velocidade de sedimentação durante a centrifugação da solução. Esta técnica necessita aparelhos caros e não é aplicado no trabalho diário. Provavelmente o método usado com mais frequência para determinar $\bar{M}_w$ é a análise do grupo terminal ou grupo funcional. O fundamento do método baseia-se na determinação fotométrica do grupo aldeídico. A determinação de pesos moleculares pode ser feita por viscometria de soluções diluídas, mas precisa-se duma correlação de pesos moleculares de dextrana determinados por outros métodos. A cromatografia de permeação em gel difere dos outros métodos, pois oferece um método rápido e sensível para determinar pesos moleculares médios e uma distribuição completa de dados de pesos moleculares para os polímeros investigados.

c) Cromatografia de Permeação em Gel

É uma poderosa técnica de cromatografia líquida para separação de moléculas de acordo com seu tamanho (ou mais corretamente seu tamanho efetivo na fase móvel, o qual depende do peso molecular, tipo de ramificação, grau de solvatação e interações hidrofóbicas). Devido a sua estrutura porosa, as moléculas pequenas penetram no interior ocasionando um tempo de retenção maior. A cromatografia de permeação em gel pode ser definida por:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (8)$$

Onde:

K_d = Fração do volume do poro penetrado pela

molécula.

V_e = Volume de eluição da molécula.

V_o = Volume vazio da coluna

V_t = Volume total do recheio.

Em análises de dextrana V_t é definido pelo volume de eluição de uma molécula pequena tal como a glicose.

Uma curva de calibração típica pode ser observada na figura 11.

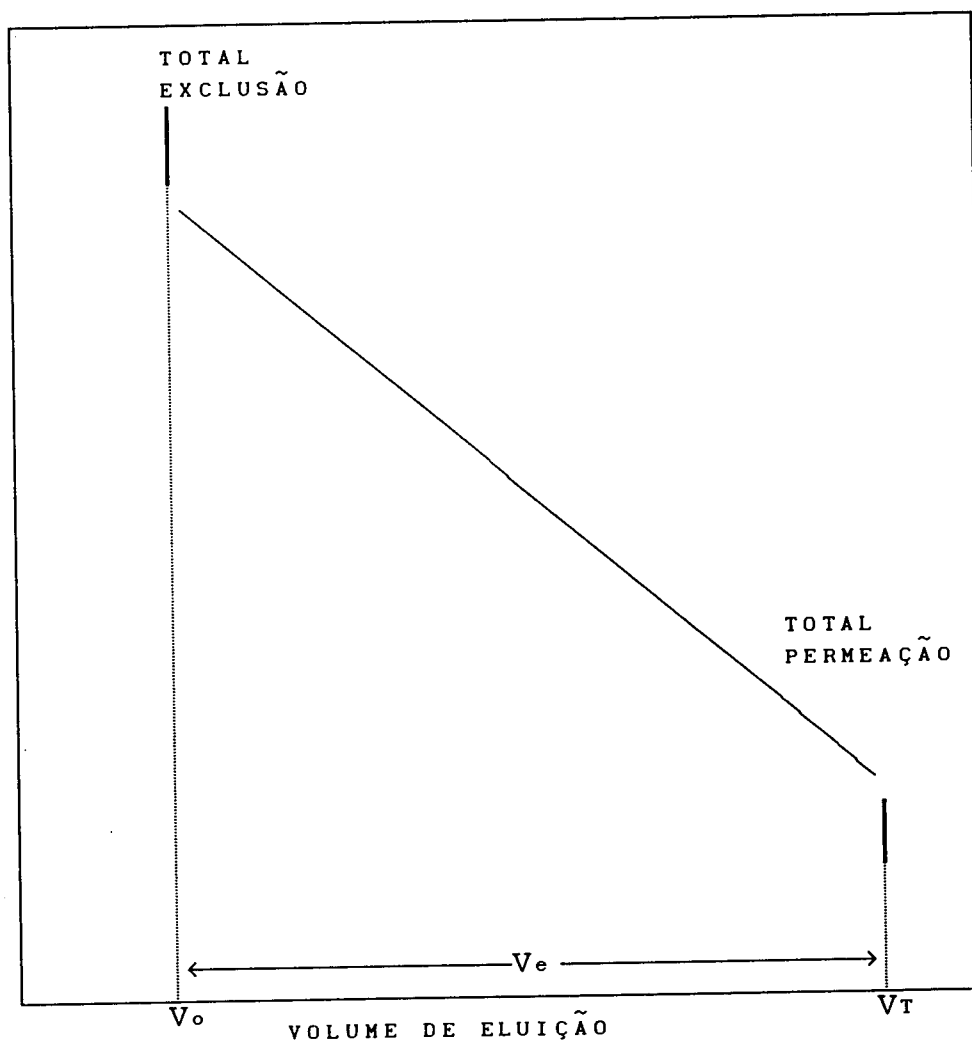


Figura 11. Curva de calibração de cromatografia de permeação em gel (ALSOP, 1977).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

Utilizou-se o açúcar cristal tanto na produção da enzima dextrana-sacarase, bem como na produção "in vitro" da dextrana. Outros reagentes usados nas análises foram de pureza analítica.

O microrganismo usado nas fermentações para produção da enzima dextrana-sacarase foi o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. CONDIÇÕES DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DA ENZIMA DEXTRANA-SACARASE

a) MEIO PADRÃO DE CULTURA (QUEIROZ & MAUGERI, 1989)

Componentes	g/l
Sacarose	40
Extrato de levedura	20
Sulfato de Magnésio	0,2
Cloreto de Sódio	0,01
Sulfato Ferroso	0,01
Sulfato de Manganês	0,01
Cloreto de Calcio	0,02
fosfato de Potássio-dibásico	20

Os componentes do meio de cultura foram diluídos com água destilada (com exceção do fosfato) e o pH ajustado a 6,7 com HCl concentrado. O fosfato foi diluído separadamente e o pH ajustado também a 6.7. Ambas soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C por 15 min. e misturadas depois de frios.

b) inóculo

Em erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml do meio padrão estéril, inoculou-se um tubo de cultura estocado contendo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F. Após inoculação incubou-se a 27°C a 200 RPM por 12 horas.

c) ALIMENTAÇÃO

A adição de sacarose pode ser realizada de duas formas: a adição de sacarose combinada com o sistema controlador do pH e adição independente do pH. A primeira forma foi conduzida, colocando-se no mesmo frasco soluções de NaOH e sacarose. Na segunda forma as soluções de NaOH e sacarose são alimentadas separadamente. A solução de sacarose é alimentada continuamente na razão de 18 g/l.h e solução de NaOH de acordo com a produção de ácidos orgânicos. A velocidade de adição da solução de sacarose, pode ser calculada com base na velocidade máxima de consumo de substrato no ensaio com adição combinada de sacarose.

Foi escolhido o sistema de alimentação combinada, porque a demanda de sacarose está associada ao crescimento e o controle do pH é mais adequado. Com este sistema, usado por MONSAN & LOPEZ (1981), obtive-se melhores resultados na atividade da dextrana-sacarase. Preparou-se 400 ml de sacarose 200g/l e 100 ml de NaOH 5 N esterelizando-os separadamente a 121°C por 15 min e misturando-os depois de frios, para obter uma solução final com uma concentração de 160 g/l de sacarose e NaOH 1N.

d) FERMENTAÇÃO

Em um fermentador de 3 litros de capacidade contendo 900 ml do meio padrão estéril, foi adicionado o inóculo e incubado a 27°C com aeração de 0,5 l/min, agitação de 200 RPM e controle de pH. O pH foi mantido em $6.7 \pm 0,2$ pela adição da solução combinada, preparada de acordo com o item anterior, através da ação de uma bomba operada pelo controlador automático de pH do fermentador. Depois de 7 horas aproximadamente

cortava-se a alimentação para reduzir a quantidade de açúcares redutores totais e finalmente o caldo fermentado teve seu pH acertado a 5,2 com solução de HCL e a seguir centrifugado a 10.000 RPM a 4°C por 15 minutos, para eliminação das células da bactéria.

Durante a fermentação retirou-se amostras de 10 ml. para determinação do crescimento celular, açúcares redutores, açúcares totais e atividade.

e) EXTRAÇÃO DE DEXTRANA-SACARASE

Depois de centrifugar o caldo fermentado, o sobrenadante era colocado em banho de gelo e em seguida submetido a uma ultrafiltração. Ao concentrado, também a uma temperatura aproximadamente de 4 °C, adicionou-se lentamente uma solução de polietilenoglicol 1500 50% (PEG 1500). Quando a solução tornava-se turva, com o aparecimento de partículas esbranquiçadas, a adição de PEG era interrompida, centrifugando-se então o meio. A fase inferior rica em enzima dextrana-sacarase era rediluída numa solução tampão de acetato de sódio 200 mM, pH 5,2, contendo 0,05 g/l de cloreto de cálcio e estocada em frascos a -15°C.

3.2.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Tendo-se como objetivo a otimização das reações "in vitro" para obtenção de dextrana clínica com peso molecular ao redor de 40.000 daltons, foram realizados dos planejamentos experimentais, técnica esta amplamente discutida na literatura (COCHRAN & COX, 1964).

No planejamento fatorial experimental 1 (2^4), estudou-se 4 variáveis do processo: Atividade enzimática (X_1), temperatura (X_2), concentração de sacarose (X_3), e relação R (X_4) ($[\text{maltose}]/[\text{sacarose}]$), com objetivo de obter dextrana de peso molecular próximo a 5.000 daltons. A Tabela 10 apresenta o

planejamento experimental 1.

No segundo planejamento (central rotatorio composto de segunda ordem), utilizando-se dextrana de 4676 daltons de peso molecular, estudou-se a influência de 3 variáveis do processo: Concentração da sacarose (X_1), relação R ([dextrana]/[sacarose]) (X_2) e temperatura (X_3), mantendo-se constante a atividade da enzima em 20 UDS e pH 5,2

As variáveis foram estudadas a dos níveis, codificados como -1 e +1 e os valores reais correspondentes a esses níveis estão apresentados na Tabela 9, definido de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = \frac{X_i - \bar{X}}{\Delta X_i} \quad (9)$$

Onde:

x_i = valor codificado da variável X_i

X_i = valor real da variável.

$\bar{X}_i$ = valor real da variável no ponto central

ΔX_i = intervalo de variação de X_i .

Tabela 9: Variáveis e níveis de variação

Planejamento experimental 1: Usando a maltose como Aceptor		
VARIAVEIS	NIVEL (-)	NIVEL (+)
X_1 : Atividade (UDS/ml)	25	45
X_2 : Temperatura (°C)	22.5	27.5
X_3 : Sacarose (g/l)	150	350
X_4 : R	0.08	0.16
Planejamento experimental 2: Usando dextrana de 4676 daltons como acceptor.		
X_1 : Sacarose (g/l)	20	25
X_2 : R	0,025	0.035
X_3 : Temperatura (° C)	20	25

Os parâmetros máximos e mínimos de cada variável independente, na segunda etapa, foram escolhidos dentro das

possibilidades operacionais do processo de síntese enzimática de dextrana clínica tendo-se como os diversos ensaios preliminares realizados e apresentados nas Tabelas 14 e 15 no capítulo 4.

No planejamento experimental 2 (Tabela 11), para modelo de 2a. ordem, são necessários um mínimo de 20 ensaios para $K = 3$ (tres variáveis independentes) obedecendo às seguintes combinações de níveis de variáveis codificadas: 2^K fatoriais (combinam os níveis de +1 e -1), $2k$ axiais (combinam com $+\alpha$ ou $-\alpha$ com as outras em 0) e o restante dos ensaios no ponto central (nível 0) para obtenção do erro experimental. O valor de α dependente do número de pontos do conjunto fatorial e é definido pela equação (BOX, WILSON, 1951):

$$\alpha = (F)^{1/4} = (2^K)^{1/4} \quad (10)$$

Onde

F : correspondem ao conjunto fatorial

K : número de variáveis independentes,

As respostas estudadas no segundo planejamento experimental foram:

- Peso molecular médio (PM)
- Rendimento de dextrana ≈ 40.000 daltons (REND).

3.2.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

Para análise dos resultados experimentais foi empregada a metodologia de superfície de resposta (DRAPER & SMITH, 1966), a qual descreve o comportamento da variável dependente (Y) frente às mudanças nas variáveis independentes (X_k), no intervalo estudado. Em um sistema envolvendo uma resposta Y, que depende das variáveis $X_1, X_2, X_3, \dots, X_k$, a resposta pode ser descrita por:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_k) \quad (11)$$

Através de uma análise de regressão, pode ser ajustado para cada resposta (Y) um polinômio completo de 2a. ordem com as variáveis explicativas (X_k):

$$Y_i = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j \\ i < j}} B_{ij} X_i X_j \quad (12)$$

Onde:

Y_i = função resposta genérica

X_i = representa o valor da variável independente.

B_0 , B_i , B_{ii} , B_{ij} são coeficientes de ordem zero.

Tabela 10: Planejamento experimental 1 para quatro variáveis reais usando maltose como acceptor.

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	25	22.50	150	0.08
2	45	22.50	150	0.08
3	25	27.50	150	0.08
4	45	27.50	150	0.08
5	25	22.50	350	0.08
6	45	22.50	350	0.08
7	25	27.50	350	0.08
8	45	27.50	350	0.08
9	25	22.50	150	0.16
10	45	22.50	150	0.16
11	25	27.50	150	0.16
12	45	27.50	150	0.16
13	25	22.50	350	0.16
14	45	22.50	350	0.16
15	25	27.50	350	0.16

(*) o experimento 16 não foi realizado

X_1 = atividade enzimática (UDS/ml)

X_2 = temperatura (°C).

X_3 = concentração de sacarose (g/l)

X_4 = relação R ([Aceptor]/[sacarose])

Tabela 11: Planejamento experimental 2 para três variáveis usando dextrana como acceptor

ENSAIOS	VARIAVEIS INDEPENDENTES		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	80	0,025	20
2	120	0,025	20
3	80	0,035	20
4	120	0,035	20
5	80	0,025	25
6	120	0,025	25
7	80	0,035	25
8	120	0,035	25
9	66,36	0,030	22,50
10	133,64	0,030	22,50
11	100,00	0,0216	22,50
12	100,00	0,0384	22,50
13	100,00	0,030	18,30
14	100,00	0,030	26,71
15	100,00	0,030	22,50
16	100,00	0,030	22,50
17	100,00	0,030	22,50
18	100,00	0,030	22,50
19	100,00	0,030	22,50
20	100,00	0,030	22,50

X₁ = concentração de sacarose (g/l)

X₂ = relação R ([acceptor]/[sacarose])

a dextrana de 4676 daltons foi usado como acceptor.

X₃ = temperatura (°C).

A significância do modelo foi testada pela análise de variância (teste F) e do coeficiente de correlação. A partir da equação de regressão, variando-se dois parâmetros mantendo-se o outro constante, foi possível elaborar contornos de superfície de

resposta dentro dos intervalos estudados.

O processamento de dados e análise estatística assim como os gráficos de representação tridimensional foram elaborados com ajuda de planilla eletrônica e programas estatísticos.

3.2.4. PRODUÇÃO DE DEXTRANA

Num reator de vidro devidamente termostatizado adiciona-se (concentrações diferentes para cada ensaio de acordo com o planejamento experimental) sacarose, dextrana de 4.676 e a enzima dextrana-sacarase (20 UDS/ml no reator). Deixou-se reagir, medindo-se de tempo em tempo a liberação de frutose, até completar a conversão total da sacarose.

As soluções (sacarose, maltose, enzima e dextrana) foram preparadas por diluição com tampão fosfato a pH 5,2.

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. CRESCIMENTO CELULAR

Determinou-se espectrofotometricamente a concentração celular no meio de cultura, pela leitura de absorbância a 650 nm, utilizando-se água destilada para calibrar o aparelho.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DE ACÚCARES REDUTORES MÉTODO DNS (MILLER, 1959).

a) Preparação do reagente DNS

Dissolveu-se 10.16 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico em 1416 ml de água destilada. Adicionou-se a esta mistura 7.6 ml de fenol (fundido a 50°C) e 8,32 g de meta bissulfito de sódio. Guardou-se este reagente em frasco protegido da luz. Paralelamente, preparou-se solução de tartarato duplo de sódio e potássio 11,25 g/l e guarda-se em outro frasco.

b) Curva padrão

Preparou-se soluções de glicose, com concentrações na faixa de 0.1 a 1 g/l de açúcares redutores. tomando-se um ml destas soluções de concentração conhecida e adicionando em um tubo de ensaio contendo 1 ml de reagente DNS, levando em banho maria em ebulição por 5 minutos. Resfriou-se instantaneamente pela imersão dos tubos em banho de gelo fundente, adicionou-se, em seguida 16 ml de solução de tartarato duplo de sódio e potássio a 11.25 g/l para estabilizar a cor. Agitou-se o tubo para homogenizar a fez-se a leitura de absorbância 540 nm em espectrofotômetro. O branco foi feito conjuntamente com as amostras, substituindo-se a solução de açúcar redutor, por 1 ml de água destilada. Após obter as leituras da absorbância (ABS) construiu-se a curva padrão do tipo:

$$[g/l] = f(ABS) \quad (13)$$

c) Determinação de açúcares redutores em uma amostra desconhecida

As amostras foram diluidas de forma a se obter concentração de açúcares redutores na faixa de 0.1 a 1.0 g/l. Das amostras convenientemente diluida, tomava-se 1 ml e procedia-se da mesma forma descrita na curva padrão, determinando-se a absorbância. Com o auxílio da curva padrão ou da equação obtida, obtém-se a concentração de açúcares redutores.

d) Determinação de açúcares redutores totais

Para determinar açúcares redutores totais, primeiro foi feita a inversão da sacarose em açúcares

redutores pela hidrólise ácida. Misturava-se 1 ml da amostra com 1 ml de de HCl 2 N, levando-se ao banho maria em ebulição por 5 minutos. Após resfriamento, adicionava-se 1 ml de NaOH 2N (para neutralizar a amostra) e determinava-se os açúcares redutores totais da amostra. A curva padrão foi feita com sacarose invertida.

e) Determinação de Sacarose

A avaliação da concentração de sacarose durante a fermentação era feita pela diferença entre açúcares totais e açúcares redutores.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE

Determinou-se a atividade da enzima medindo-se velocidade inicial de produção de frutose, quando a enzima é colocada em contato com sacarose em condições controladas em um reator de vidro de 25 ml de volume, agitado magnéticamente e termostatizada a 30°C. Dentro do reator colocava-se entre 0.1 e 1 ml de solução enzimática, 0.5 ml de tampão acetato 200 mM a pH 5,2 (contendo 2,5 g/l de CaCl_2) e completava-se com água destilada a 10 ml. Adicionava-se 2 ml de solução de sacarose 600 g/l. Retirava-se amostras a cada 3 minutos para determinar frutose pelo método de açúcares redutores. Obtinha-se uma curva de absorbância versus tempo (QUEIROZ & MAUGERI, 1989).

A atividade pode ser determinada pela equação 14:

$$AT = \alpha \cdot \beta \cdot d \cdot 114 \quad (\text{UDS/ml}) \quad (14)$$

Onde:

α : coeficiente angular da curva ABS vs tempo

β : coeficiente angular da curva padrão padrão de AR.

d : volume de diluição final no reator de vidro.

3.3.4. PRECIPITAÇÃO DA DEXTRANA

Pesou-se aproximadamente 2 gramas das amostras de dextrana e adiciona-se 0,1 ml de ácido perclórico concentrado (para eliminar as proteínas) e depois de agitação vigorosa a amostra foi centrifugada a 12000 RPM por 10 minutos. Ao resfriar-se o sobrenadante a 5 °C, adicionou-se 16 ml de etanol 95 % também a 5 °C. Agitou-se por dois minutos e deixou-se no freezer por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 RPM durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e redissolveu-se a dextrana precipitada com água destilada. Repetiu-se o processo de precipitação duas vezes para eliminar restos de dissacarídeos como sacarose, maltose, etc. Finalmente liofilizou-se as amostras para posteriormente serem analisadas por um sistema de cromatografia de permeação em gel (HPLC).

3.3.5. PREPARAÇÃO DA DEXTRANA PARA HPLC

Dissolveram-se tanto os padrões como as amostras de dextrana produzida com água Milli-Qplus numa concentração de 0.3 % . Logo foram filtrados em membrana Millipore com 0,5 µm de porosidade e deaerados por ultra-som e agitação com aquecimento.

O sistema de Cromatografia líquida (HPLC) utilizado foi o seguinte:

- 1.- Um injetor automático Varian 9095.
- 2.- Uma bomba ternária VARIAN 9010.
- 3.- Um detetor de índice refração VARIAN RI 4,
- 4.- 3 colunas VARIAN série Micropak de 7.8 mm. de diâmetro interno e 300 mm de comprimento, colocados em serie na seguinte ordem:
 - TSK 5000 PWXL, TSK 4000 PWXL e TSK 2500 PWXL
- 5.- Um forno SPH 99
- 6.- Um integrador

3.3.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMAS

Colocou-se as colunas de permeação em gel montadas em série (na mesma ordem com que são citados no item 3,8) no forno e programou-se à temperatura de 40 °C e uma pressão na bomba de 40 Atm.. Passava-se a fase móvel, que consiste apenas em água tratada por um sistema Milli-Qplus da Millipore, pelo sistema até conseguir estabilizar o detector de índice de refração. Em seguida passa-se os diferentes padrões de dextrana de baixo índice de dispersão. Utilizando-se o software GPCPLUS construiu-se a curva de calibração $\log(PM)$ vs RT (tempo de retenção) que posteriormente será utilizado para determinar o peso molecular médio da fração de dextrana de médio peso molecular.

Depois de passar os padrões, nas mesmas condições da curva de calibração, injetou-se as amostras de dextrana produzida para obter os cromatogramas. Cada cromatograma apresenta um relatório com as porcentagens de cada uma das faixas de alto peso molecular, medio peso molecular e baixo peso molecular da dextrana produzida.

As porcentagens de cada uma das faixas de pesos moleculares determinou-se por integração dos cromatogramas.

Depois de cada cromatograma, usando um meio de comunicação chamado PROCOMM, estes são enviados através da interface RS-232 a um computador e armazenados em disquete.

3.3.7. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DO PROCESSO

• Rendimento Global

O rendimento global do processo de síntese enzimática de produção de dextrana determinou-se como a relação de dextrana precipitada e a dextrana teórica em uma determinada amostra.

$$R_g = \frac{W_d}{W_i} \times 100 \quad (15)$$

Onde:

- Rg = Rendimento global do processo (%)
Wd = Peso de dextrana precipitada produzida (g).
Wi = Dextrana teórica (calculado como a quantidade de g de glicose inicial na sacarose + g de dextrana).

• **Rendimento de dextrana de peso molecular médio**
(≈ 40.000 daltons).

Para determinar o rendimento da produção de dextrana com um peso molecular médio, tomou-se a porcentagem (Pc) diretamente dos cromatogramas de permeação em gel e efetua-se os cálculos da seguinte forma:

$$\text{REND} = Rg \cdot P_c \quad (16)$$

Onde:

- Rend = Rendimento de dextrana de médio peso molecular.
Pc = % da dextrana de médio peso molecular obtido dos cromatogramas.

3.3.8. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR MÉDIO

Depois da determinação dos cromatogramas, ativou-se o Software GPCPLUS do sistema de Cromatografia líquida, conferiu-se que a curva de calibração estava na memória do integrador, nas mesmas condições, injetou-se novamente cada uma das amostras de dextrana para determinação da distribuição de pesos moleculares, o peso molecular médio e o índice de polidispersão de cada uma das amostras.

O software GPCPLUS, com ajuda da curva de calibração, produz um fatiamento dos cromatogramas e um relatório onde vem especificado a distribuição de pesos moleculares, o peso molecular médio e o índice de polidispersão das amostras.

Como o integrador tem pouca memoria RAM (140 Kb), depois de passar cada uma das amostras, os cromatogramas eram enviados mediante a interface RS-232 a um computador e armazenados em disquetes até seu processamento.

Para determinar a distribuição de pesos moleculares enviou-se de novo os cromatogramas fatiados e os diferentes programas de GPCPLUS do computador ao integrador para refazer uma parte dos cromatogramas e determinar o peso molecular médio da faixa de peso molecular de nosso interesse, das diferentes amostras de dextrana produzida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. PRODUÇÃO DA ENZIMA

As fermentações com *Leuconostoc mesenteroides* foram feitas usando o meio nas condições dadas no capítulo de Materiais e Métodos, ou seja, a $pH_{inicial}$ de $6,7 \pm 0,2$, temperaturas de 27-28 °C, aeração de 0,5 l/min e 200 RPM. Os resultados são apresentados nas figuras 10, 11, 12, 13 e 14, e mostram que a produção da enzima dextrana-sacarase está associado ao crescimento celular do *Leuconostoc mesenteroides* e cessa na fase estacionária. Na maioria das fermentações procedeu-se ao corte da alimentação e controle do pH após 7 horas de fermentação, no final da fase exponencial, com a finalidade de favorecer a produção de enzima, assim como a diminuição da concentração residual do substrato (segundo ALSOP, 1983).

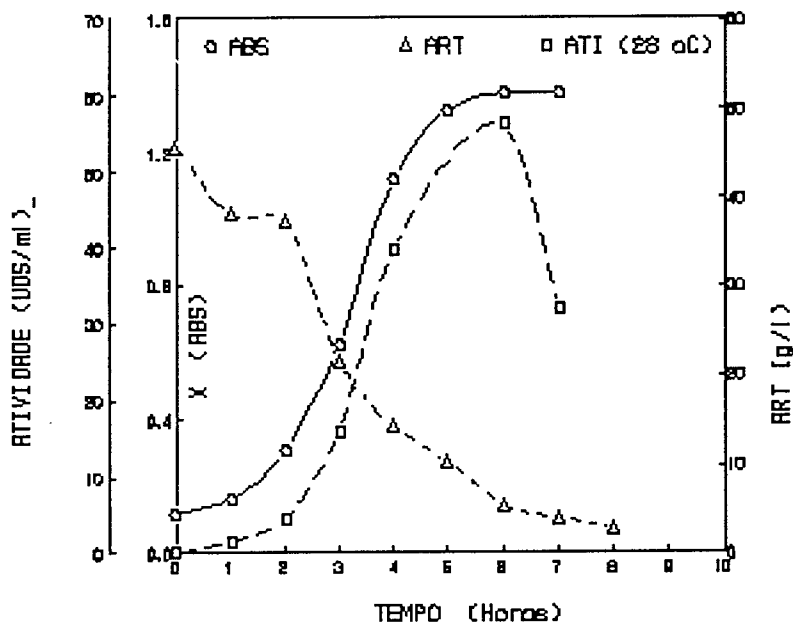


Figura 12. Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do *Leuconostoc mesenteroides*. Alimentação = sacarose 80 g/l e 28 °C.

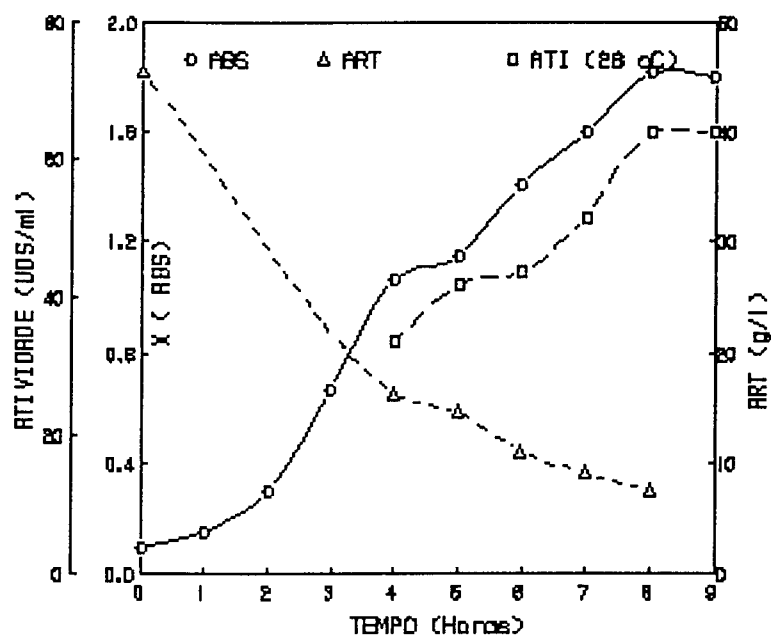


Figura 13. Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do *Leuconostoc mesenteroides*. Alimentação = sacarose 160 g/l e 28 °C.

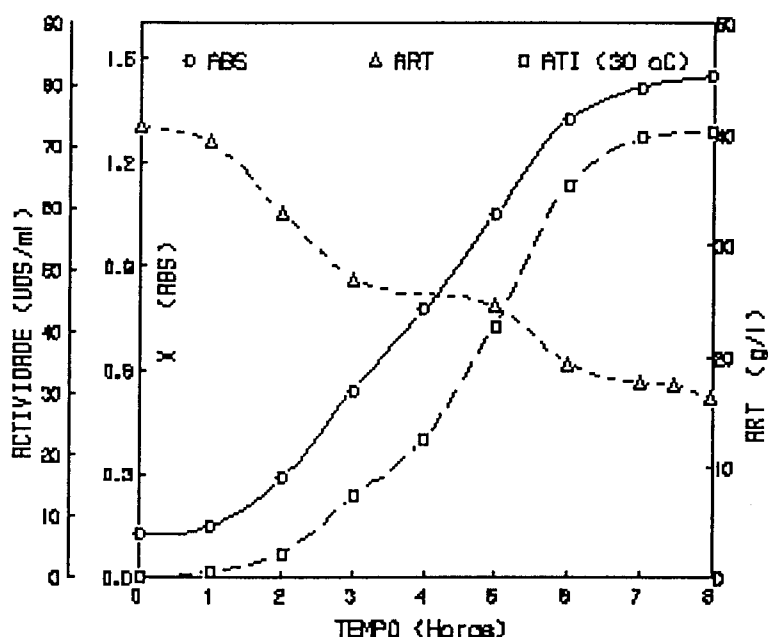


Figura 14. Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do *Leuconostoc mesenteroides*. Alimentação = sacarose 160 g/l e 29 °C.

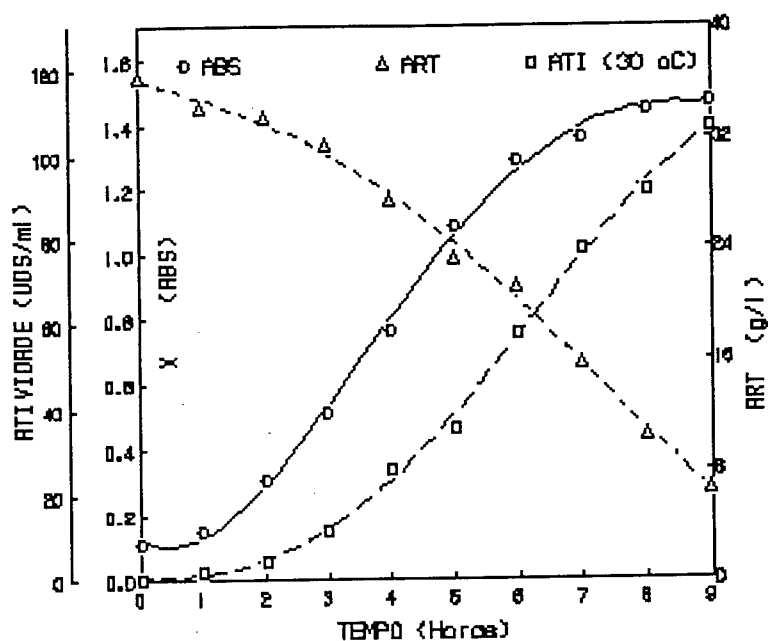


Figura 15. Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do *Leuconostoc mesenteroides*. Alimentação = sacarose 160 g/l e 27 °C.

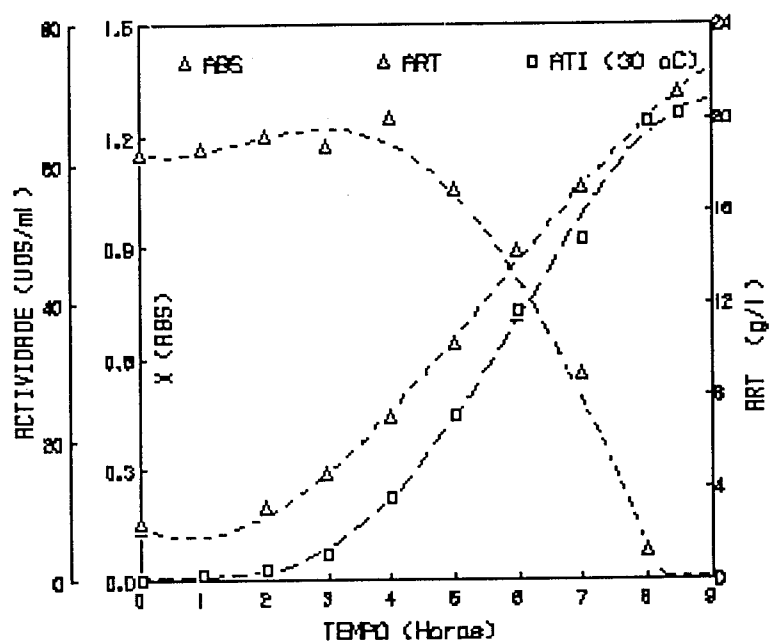


Figura 16. Evolução do crescimento celular (ABS), concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade enzimática (UDS/ml) durante a fermentação do *Leuconostoc mesenteroides*. Alimentação = sacarose 200 g/l e 28 °C.

Na figura 14 verifica-se que a atividade chegou a 106 UDS/ml e 6.54 g/l de ART, em constraste à figura 10, onde a atividade atingiu 56 UDS/ml e 2,74 ART depois de 6 horas, caindo para 32 UDS/ml após 7 horas. O decréscimo na atividade da enzima no final das fermentações é típico desta enzima, devido à sua baixa estabilidade nas condições de fermentação empregadas de temperatura (27 a 29°C) e pH (6,7).

Na figura 13 observa-se que a quantidade ART é de 16,13, o que significa que havia muito substrato no meio de fermentação, onde a enzima produz dextrana de alto peso molecular, produzindo um caldo fermentado de alta viscosidade, que não permitiu realizar o processo de ultrafiltração com perda da enzima. Um resumo da atividade enzimática e ART no final das fermentações são apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Atividade enzimática e ART no final da fermentação do *Leuconostoc mesenteroides*.

Fermentação	Atividade UDS/ml	ART g/l
Figura 11	56 (*)	2.74
Figura 12	64	7.00
Figura 13	78	16.13
Figura 14	106	6.54
Figura 15	66	1.24

(*) Atividade depois de 6 horas. No final da fermentação a atividade cai para 32 UDS/ml

Para a obtenção da enzima com máxima atividade e quantidades mínimas de ART no final da fermentação, de acordo com a tabela 12, a figura 14 foi o experimento que apresentou melhores condições para produção da enzima dextrana-sacarase por fermentação em batelada alimentada (sacarose de 160 (g/l), NaOH 1N e uma temperatura de 27 °C.), com maior atividade enzimática (106 UDS/ml) e menor quantidades de ART (6.54 g/l).

Com vistas a este resultados, adotou-se essas condições para produção da enzima dextrana-sacarase utilizada nos experimentos de produção de dextrana.

4.2. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

O rendimento desta etapa não foi quantificado devido às perdas de atividade pela temperatura, assim como pela perda do concentrado enzimático durante o processo de ultrafiltração. Atividades aproximadas de 400 UDS/ml foram atingidas no processo de ultrafiltração e 1000-1800 UDS/ml depois da precipitação com PEG 1500 50%

4.3. PRODUÇÃO DE DEXTRANA

4.3.1. USANDO COMO ACCEPTOR A MALTOSE

Inicialmente foi testada a produção de dextrana, usando como acceptor a maltose, em função dos parâmetros: Atividade enzimática (UDS/ml), temperatura, concentração de sacarose (g/l) e relação R ($[\text{acceptor}]/[\text{sacarose}]$).

Um resumo do rendimento da produção de dextrana usando como acceptor a maltose pode ser visto na tabela 13, um exemplo na figura 17 e os cromatogramas no anexo A.

Na maioria dos cromatogramas observa-se a formação de oligossacarídeos (junto com dissacarídeos, trissacarídeos, etc), dextrana de alto peso molecular e principalmente dextrana de baixo peso molecular em torno de 4.500-9.300 daltons.

O peso molecular visado foi obtido em tres experimentos: 3, 11 e 15 com pesos moleculares médios respectivamente de 4819, 4700 e 4556. Ressalta-se que o experimento 15 resultou num maior rendimento de dextranas de baixo peso molecular, 52.49 %.

4.3.2. USANDO DEXTRANA DE BAIXO PESO MOLECULAR

Foram realizados ensaios preliminares (Tabela 14 e 15) que serviram de base para o delineamento experimental descrito na Tabela 11. A atividade igual a 20 UDS/ml e pH 5,2 foram mantidos

constantes, variando-se as concentrações de sacarose, a relação R ([aceptor]/[sacarose]) e temperatura.

Tabela 13. Síntese enzimática de dextrana usando como acceptor a maltose

EXP.	ATIV UDS ml	T °C	S g/l	R	APM %	BPM %	DITR %	F %	PM (*) daltons
1	25	22.5	150	0.08	13.4	38.9	9.4	38.3	5795
2	45	22.5	150	0.08	12.4	43.3	9.0	34.8	5906
3	25	27.5	150	0.08	11.1	43.4	11.3	34.3	4819
4	45	27.5	150	0.08	18.4	38.1	8.7	34.8	5072
5	25	22.5	350	0.08	1.0	44.5	17.1	37.4	9240
6	45	22.5	350	0.08	0.0	38.3	17.0	44.7	7218
7	25	27.5	350	0.08	12.5	35.5	14.9	37.1	8906
8	45	27.5	350	0.08	0.7	41.6	16.9	40.9	8070
9	25	22.5	350	0.16	6.4	53.8	8.0	31.7	5834
10	45	22.5	150	0.16	16.2	52.7	5.6	25.5	5320
11	25	27.5	150	0.16	7.6	51.0	7.25	34.1	4700
12	45	27.5	150	0.16	0.9	45.0	15.8	38.3	6432
13	25	22.5	150	0.16	0.6	45.5	14.5	39.3	7001
14	45	22.5	350	0.16	0.0	46.4	14.6	38.9	6670
15	25	27.5	350	0.16	6.8	52.5	8.0	32.2	4556

PM = Peso molecular (daltons).

T = Tempo de retenção (min)

S = Sacarose (g/l)

T = Temperatura (°C)

R = Relação R ([aceptor]/[sacarose])

F = Frutose (g/l)

APM = Alto peso molecular (PM > 70.000 daltons)

BPM = Médio peso molecular (4.000 - 10.000 daltons)

DITRI = baixo peso molecular (180 < PM < BPM).

$$(*) \quad \text{Log}(\text{PM}) = 16,3387 - 1,02505 \cdot T + 0,03418 \cdot T^2 - 0,0005 \cdot T^3 \quad (17)$$

Os pesos moleculares da dextrana de baixo peso molecular foi calculado com a equação (17).

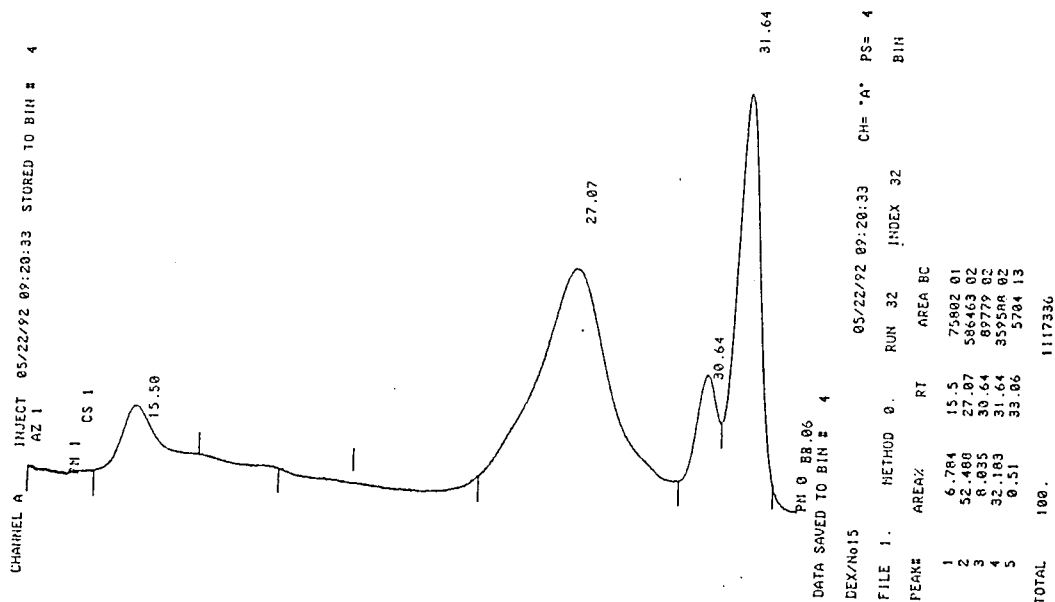


Figura 17. Cromatograma de dextrana produzida usando como aceptor a maltose correspondente ao experimento 15 da Tabela 13.

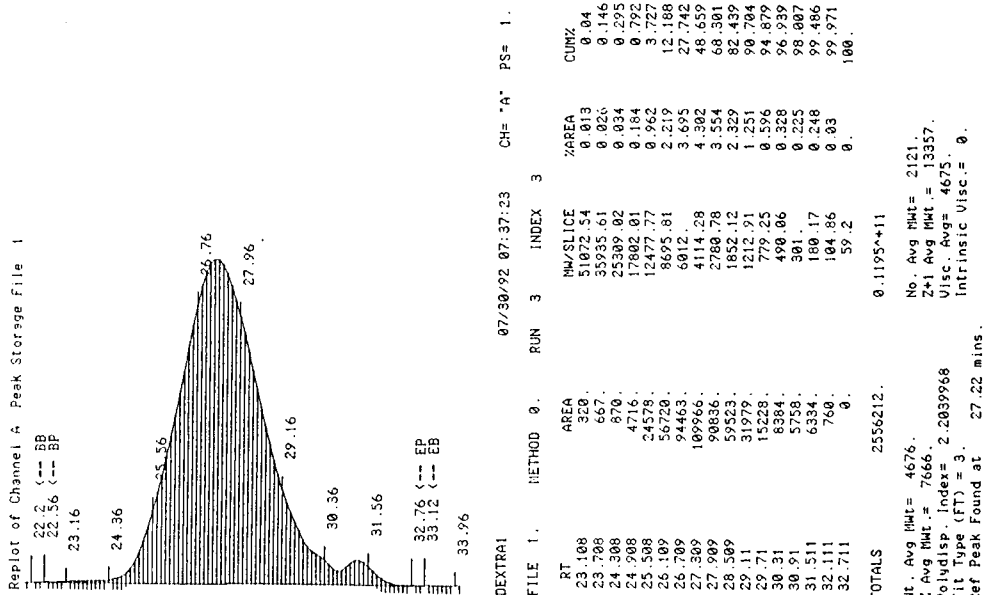


Figura 18. Determinação do peso molecular médio da dextrana, usada como aceptor (por cromatografia de permeação em gel usando o software GPCPLUS)

O aceptor usado foi dextrana com um peso molecular médio de 4676 daltons como pode ser visto na figura 18 e os resultados nas tabelas 14 e 15, onde observa-se o seguinte:

- Usando só sacarose em concentrações de 50 e 100 g/l e temperaturas de 27 °C foi produzida somente dextrana de alto peso molecular (APM) de vários milhões de daltons.
- Aumentando a concentração da sacarose, o rendimento da produção de dextrana de médio peso molecular (MPM) e baixo peso molecular (BPM) aumenta consideravelmente em detrimento da produção de dextrana APM, em todos os ensaios.
- Comparando ambas tabelas e mantendo constantes a relação R e a temperatura T, a concentrações de sacarose de 150 e 250 g/l foram obtidos maiores rendimentos de dextrana de MPM mas com quantidades razoáveis de dextrana de BPM e APM.
- A concentrações e temperaturas constantes, aumentando a relação R de 0,02 para 0,04, observa-se um aumento do rendimento da produção de dextrana de MPM, uma diminuição de dextrana APM e comportamento irregular na produção de dextrana de BPM.
- A influência da temperatura é menos significativa que a concentração da sacarose e a relação R.
- Com concentrações de sacarose de 50 e 100 g/l, foram obtidos maiores rendimentos de dextrana de alto peso molecular, com exceção dos ensaios 4 e 8 com 45,3 e 56,8 % de rendimento de dextrana de MPM.
- Finalmente com base dos ensaios 4 e 8 da tabela 15, o novo planejamento experimental (Tabela 11) foi proposto, e os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Os cromatogramas são apresentados no apêndice C para rendimento e no apêndice D para o peso molecular.

Tabela 14. Síntese da dextrana usando como acceptor dextrana de 4676 daltons

EXP.	S g/l	R	T °C	APM %	MPM %	BPM %	RT min	PM (**) daltons
1	150	0.02	17	36.16	48.63	15.2	24.35	24738
2	250	0.02	17	11.03	60.94	28.02	24.67	20507
3	150	0.04	17	27.26	60.60	12.14	24.27	25921
4	250	0.04	17	2.5	70.75	26.75	24.70	20148
5	150	0.02	27	41.28	40.96	17.76	24.53	22265
6	250	0.02	27	19.63	47.41	32.96	24.81	18883
7	150	0.04	27	29.06	50.22	20.72	24.74	19679
8	250	0.04	27	8.08	61.02	30.90	24.91	17800

Tabela 15. Síntese da dextrana usando como acceptor dextrana de 4676 daltons

EXP	S g/l	R °C	T %	APM %	MPM %	BPM %	RT min	PM (***) daltons
1	50	0.02	17	79.14	13.28	7.59	24.35	22796
2	100	0.02	17	56.50	32.40	11.10	24.46	21409
3	50	0.04	17	69.71	16.45	12.88	24.56	20220
4	100	0.04	17	38.52	45.30	16.18	24.54	20453
5	50	0.02	27	77.04	11.63	11.32	25.92	9167
6	100	0.02	27	65.68	22.95	11.37	24.59	19876
7	50	0.04	27	87.24	12.76	0.00	26.86	5190
8	100	0.04	27	23.33	56.79	19.89	24.80	17621
9	50	0.00	27	00.00	0.00	0.00	14.91	10452547
10	100	0.00	27	93.42	6.58	0.00	15.01	9604972

APM = Alto peso molecular (PM > 100.000)

MPM = Médio peso molecular (40.000 < PM < 70.000)

BPM = baixo peso molecular (180 < PM < MPM)

$$(*) \quad \text{Log}(\text{PM}) = 16,3387 - 1,02515 \cdot T + 0,03418 \cdot T^2 + 0,0005 \cdot T^3 \quad (18)$$

$$(**) \quad \text{Log}(\text{PM}) = 17,7452 - 12008 \cdot T + 0,04106 \cdot T^2 - 0,00059 \cdot T^3 \quad (19)$$

Tabela 16: Planejamento experimental 2 para três variáveis (valores reais) usando dextrana como acceptor.

ENSAIO	NÍVEIS DAS VARIÁVEIS			R E S P O S T A S	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ (*)	Y ₂
1	80	0,025	20	29611	30.67
2	120	0,025	20	31092	50.19
3	80	0,035	20	32546	35.57
4	120	0,035	20	37986	63.76
5	80	0,025	25	31261	32.47
6	120	0,025	25	35760	38.20
7	80	0,035	25	31162	29.13
8	120	0,035	25	32834	52.06
9	66,36	0,030	22,50	31840	27.73
10	133,64	0,030	22,50	38949	49.64
11	100	0,0216	22,50	35656	29.71
12	100	0,0384	22,50	35089	41.97
13	100	0,030	18,30	34107	42.55
14	100	0,030	26,71	29127	41.44
15	100	0,030	22,50	33929	49.15
16	100	0,030	22,50	34031	43.99
17	100	0,030	22,50	33233	42.66
18	100	0,030	22,50	34739	42.87
19	100	0,030	22,50	33799	44.35
20	100	0,030	22,50	33969	29.03

X₁ = concentração de sacarose (g/l)

X₂ = relação R ([acceptor]/[sacarose])

X₃ = temperatura (°C).

Y₁ = peso molecular médio (daltons)

Y₂ = rendimento (%).

acceptor: dextrana de 4676 daltons.

(*) A distribuição de pesos moleculares e pesos molecula médios foram calculados usando a curva de calibração do apêndice B.

Um exemplo como calcular a distribuição de peso moleculares e pesos moleculares médios, usando o software GPCPLUS, estão apresentados nas figuras 19 e 20.

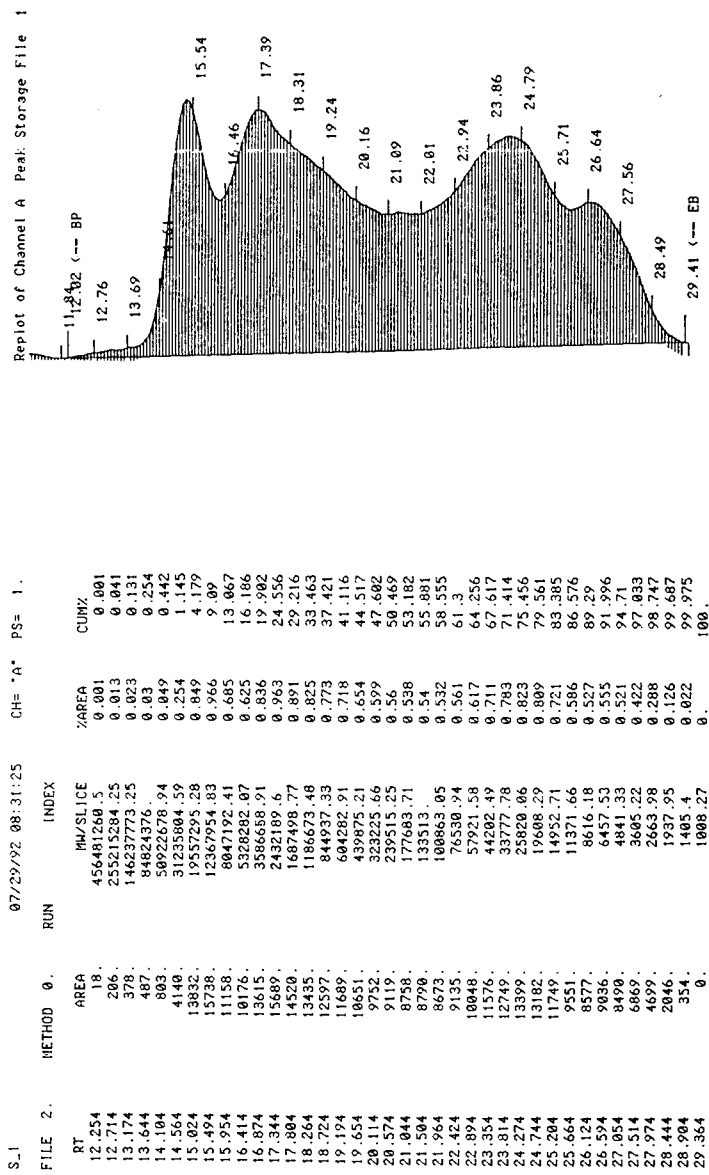
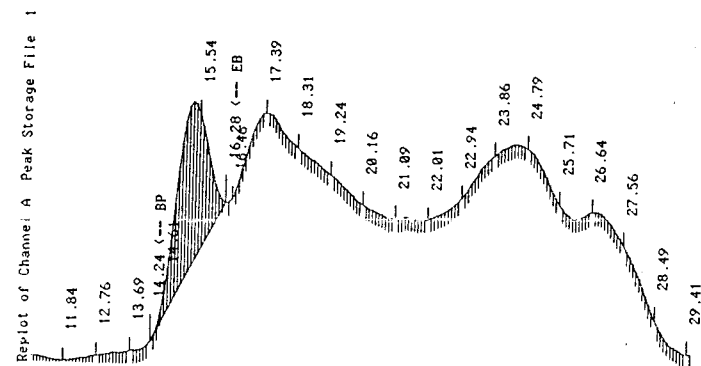
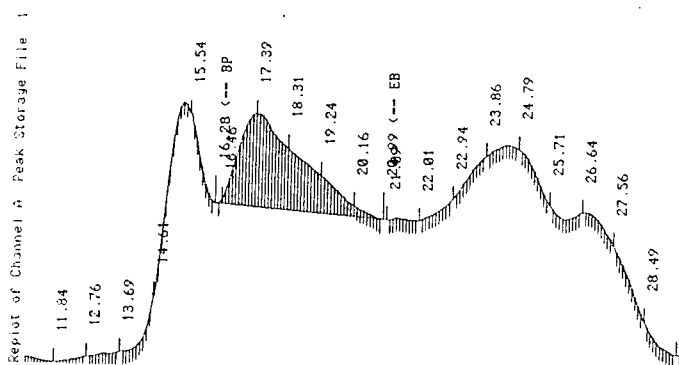


Figura 19. Distribuição de pesos moleculares da dextrana correspondente ao experimento 1 da Tabela 16.



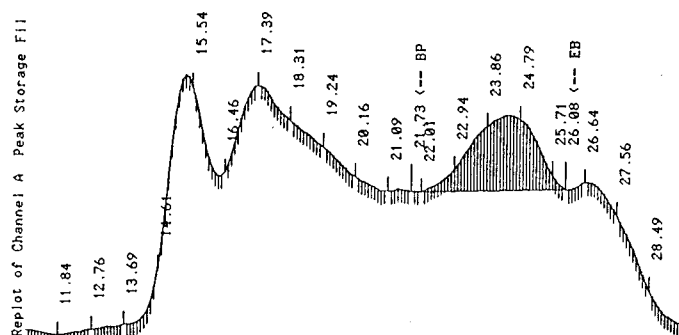
A

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX
RT	AREA	MW/Slice	%AREA
14.564	301.	31235804.59	0.329
15.024	8077.	19557295.28	8.826
15.494	8067.	12367954.83	8.815
15.954	1569.	8047192.41	1.715
TOTALS	91511.	0.1451*+13	
Wt. Avg MWt = 15859932.		No. Avg MWt = 14444426.	
Z Avg MWt = 17346634.		Z+1 Avg MWt = 18819115.	
Polydisp. Index = 1.0979967		Visc. Avg = 15859931.	
Fit Type (FT) = 3.		Intrinsic Visc. = 0.	
Ref Peak Found at 0. mins.			



B

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX
RT	AREA	MW/Slice	%AREA
16.414	0.	5328282.07	0.
16.974	4138.	3297812.08	3.371
17.524	5539.	2104518.54	4.513
18.084	3998.	1359873.78	3.257
18.634	3043.	982152.25	2.479
19.194	2217.	604282.91	1.806
19.744	1161.	413845.9	0.946
20.304	323.	285312.77	0.263
20.854	0.	200308.51	0.
TOTALS	122735.	0.2164*+12	
Wt. Avg MWt = 1762839.		No. Avg MWt = 1151172.	
Z Avg MWt = 2357167.		Z+1 Avg MWt = 2812349.	
Polydisp. Index = 1.5313426		Visc. Avg = 1762838.	
Fit Type (FT) = 3.		Intrinsic Visc. = 0.	
Ref Peak Found at 0. mins.			



C

FILE 2.	METHOD 0.	RUN	INDEX
RT	AREA	MW/Slice	%AREA
21.964	0.	100863.05	0.
22.524	494.	72107.62	0.485
23.074	1812.	52096.32	1.778
23.634	3530.	37523.26	3.463
24.184	4386.	27214.12	4.303
24.744	4252.	19608.29	4.172
25.294	2359.	14176.34	2.314
25.854	0.	10145.39	0.
TOTALS	101927.	0.3018*+10	
Wt. Avg MWt = 29611.		No. Avg MWt = 24604.	
Z Avg MWt = 35897.		Z+1 Avg MWt = 42890.	
Polydisp. Index = 1.2035092		Visc. Avg = 29610.	
Fit Type (FT) = 3.		Intrinsic Visc. = 0.	
Ref Peak Found at 0. mins.			

Figura 20. Dextrana correspondente ao experimento 1 da Tabela 13
 A) Alto peso molecular (16 milhões de daltons);
 B) Alto peso molecular (2 milhões de daltons);
 C) Médio peso molecular (29.611 daltons).

4.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA SACAROSE, RELAÇÃO R E TEMPERATURA DURANTE O PROCESSO DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DA DEXTRANA CLÍNICA

De acordo com os dados relativos aos ensaios 1 a 8 da tabela 16 foi possível realizar uma regressão multilinear obtendo um modelo de 1a. ordem. Para o ajuste de um modelo de 2a. ordem, adiciona-se os resultados dos ensaios 9 a 20.

Os polinômios que relacionam o rendimento da produção da dextrana clínica (40.000 daltons) em função da concentração da sacarose, relação R e temperatura, pode ser visto nas equações 20 e 21 respectivamente.

Modelo de 1a. ordem

$$\text{REND} = 3,9038 + 0,4773*S + 724,75*R - 1,42*T \quad (20)$$

Modelo de 2a. ordem

$$\begin{aligned} \text{REND} = & -119,2 + 0,9152*S + 3616*R + 3,56*R - 0,002*S^2 \\ & -72740*R^2 + 0,06*T^2 + 32,34*S*R - 0,0476*S*T \\ & -79,5*R*T. \end{aligned} \quad (21)$$

Com os dados da tabela 16e usando-se o mesmo procedimento, foi obtido os modelos de 1a. e 2a. ordem que relacionam o peso molecular em função da concentração da sacarose, relação R e temperatura, expressos pelas equações 22 e 23 respectivamente.

Modelo de 1a. ordem

$$\text{PM} = 19741 + 81,83*S + 170100*R - 10,9*T \quad (22)$$

Modelo de 2a. ordem

$$\begin{aligned} \text{PM} = & -135668 - 21*S + 2316810*R + 11814*T + 0,56*S^2 \\ & + 8660133*R^2 - 178*T^2 + 1415S*R - 1,87*S*T \\ & - 128540*R*T \end{aligned} \quad (23)$$

O procedimento para verificar a validade do modelo tem como princípio básico os criterios estatísticos de coeficiente de correlação e o teste F. O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância da propria população de pontos experimentais. Quanto mais próximo da unidade estiver o coeficiente de correlação , melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O teste F de significância é usualmente utilizado para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais comparando-se o valor estimado para F a partir dos dados experimentais. Assim se o valor F calculado for superior ao F tabelado, então a hipótese nula é rejeitada a um nível α de significancia e podemos afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada e o modelo é considerado válido.

Os resultados da análise de variância para os modelos de 1a. e 2a. ordem para rendimento e peso molecular estão apresentados na Tabela 17 e no apêndice E.

De acordo com a tabela 17, o modelo de 2a. ordem com 95% de confiança para o peso molecular, o modelo de 1a. ordem com 95% de confiança e o modelo de 2a. ordem com 95 e 99% de confiança para o rendimento, são válidos, por terem valores de F calculados maiores que os valores de F tabelados. Pela análise de resíduos do modelo de 1a. ordem para o rendimento (figura 21), por apresentar a característica de falta de termos quadráticos (DRAPER & SMITH, 1966) e um coeficiente de correlação menor que o modelo de 2a. ordem, o modelo de 1a. ordem é rejeitado.

Com os critérios anteriores foram escolhidos os modelos de 2a. ordem tanto para o peso molecular como para o rendimento do processo de produção enzimática de dextrana clínica.

Tabela 17. Análise de variância para o peso molecular e rendimento para produção de dextrana clínica.

Modelo de 1a. ordem (Peso molecular)				
Fonte de Variação	SQR	G.l.	SQM	F
regressão	27217800	3	9072600	1,36
desvios	26639880	4	7693954	
Total	53857680			
$R^2 = 0.5054$ $R = 0.7109$ $F_{95,3,4} = 6,59$ $F_{99,3,4} = 16,69$				
Modelo de 2a. ordem (Peso molecular)				
Fonte de Variação	SQR	G.l.	SQM	F
regressão	95445406	9	10605045	4,4197
desvios	23998102	4	6659969	
Total	119455508	19		
$R^2 = 0.7991$ $R = 0.8939$ $F_{95,3,4} = 3,02$ $F_{99,3,4} = 4,94$				
Modelo de 1a. ordem (Rendimento)				
Fonte de Variação	SQR	G.l.	SQM	F
regressão	934,42	3	311,47	8,53
desvios	146,02	4	36,50	
Total	1080,44			
$R^2 = 0.8649$ $R = 0.9300$ $F_{95,3,4} = 6,59$ $F_{99,3,4} = 16,69$				
Modelo de 2a. ordem (Rendimento)				
Fonte de Variação	SQR	G.l.	SQM	F
regressão	1380,6	9	153,40	12,94
desvios	118,52	10	11,85	
total	1499,18	19		
$R^2 = 0.9209$ $R = 0.9597$ $F_{95,3,4} = 3,02$ $F_{99,3,4} = 4,94$				

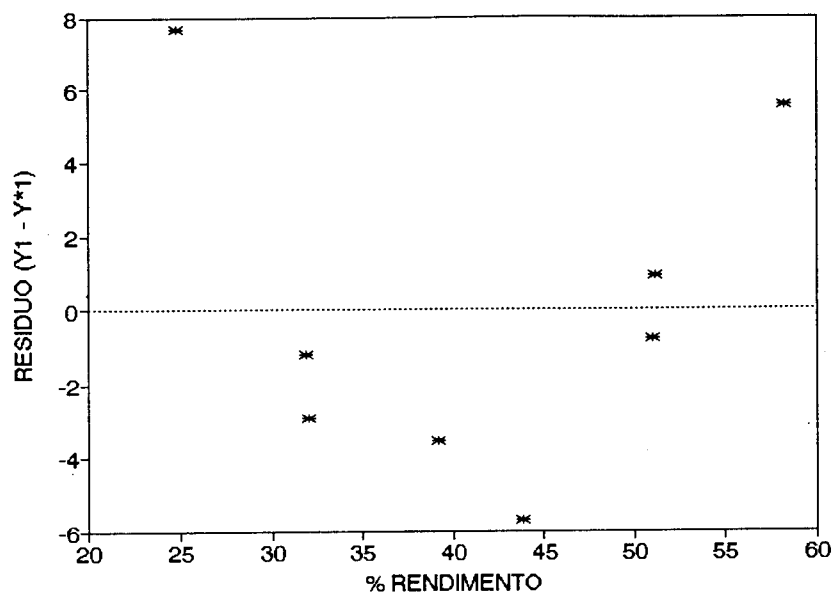


Figura 21. Análise de resíduos para o modelo de 1a. ordem para o rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana usando como acceptor dextrana de 4676 daltons

4.4.1. ANÁLISE DE EFEITOS

Tabela 18. Cálculo de efeitos para o rendimento e pesos moleculares

Para o rendimento							
Variável	S	R	SR	T	ST	RT	SRT
Efeito	19,1	7,2	6,5	-7,1	-4,6	-2,0	2,1
Para o peso molecular							
Variável	S	R	SR	T	ST	RT	SRT
Efeito	3272	1701	283	-55	-188	-3214	-1697

Das tabelas 18 (obtido da tabela 1 e 2 do apêndice F) podemos afirmar que a sacarose e a relação R são os parâmetros que têm mais influencia durante o processo de síntese enzimática de dextrana clinica usando como acceptor dextrana de 4676 daltons. A temperatura causa uma diminuição de pesos moleculares e do rendimento. As interações da concentração da sacarose com a relação R, tanto para o rendimento como para pesos moleculares são mais favoráveis para formação de dextrana clínica. As

interações da concentração da sacarose com a temperatura e a relação R com a temperatura, causam uma diminuição tanto para o rendimento como para os pesos moleculares.

4.4.2. ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO

a) Efeito da temperatura e da relação R

A figura 22 ilustra o efeito da temperatura e da relação R para uma concentração constante de sacarose de 133.6 g/l. no rendimento.

De uma maneira geral o rendimento da produção de dextrana clínica é influenciado fortemente com aumentos de R e bem pouco com a diminuição da temperatura. Isto ocorre devido ao fato de que a baixas temperaturas a velocidade de reação diminui favorecendo a formação de dextrana de médio peso molecular. Na região de baixas temperaturas e altos valores de R atinge-se máximos rendimentos.

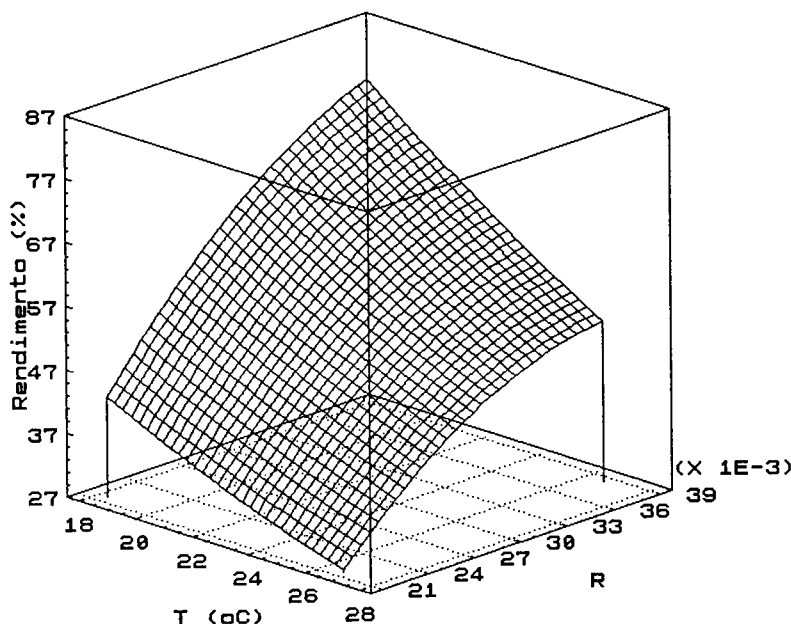


Figura 22. Efeito da temperatura (T) e de R [aceptor]/[sacarose] no Rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana numa concentração sacarose de 133.6 g/l.

b) Efeitos da temperatura e da concentração de sacarose

A figura 23 apresenta o efeito de temperatura e concentração da sacarose a um valor constante de R de 0,0384 para o rendimento.

O efeito mas importante, sem dúvida alguma, é a concentração da sacarose. A variação da temperatura não causa efeitos significativos no rendimento, diferentemente da concentração de sacarose, que aumenta significativamente o rendimento da produção de dextrana clínica, atingindo máximos valores a altos valores de concentração de sacarose.

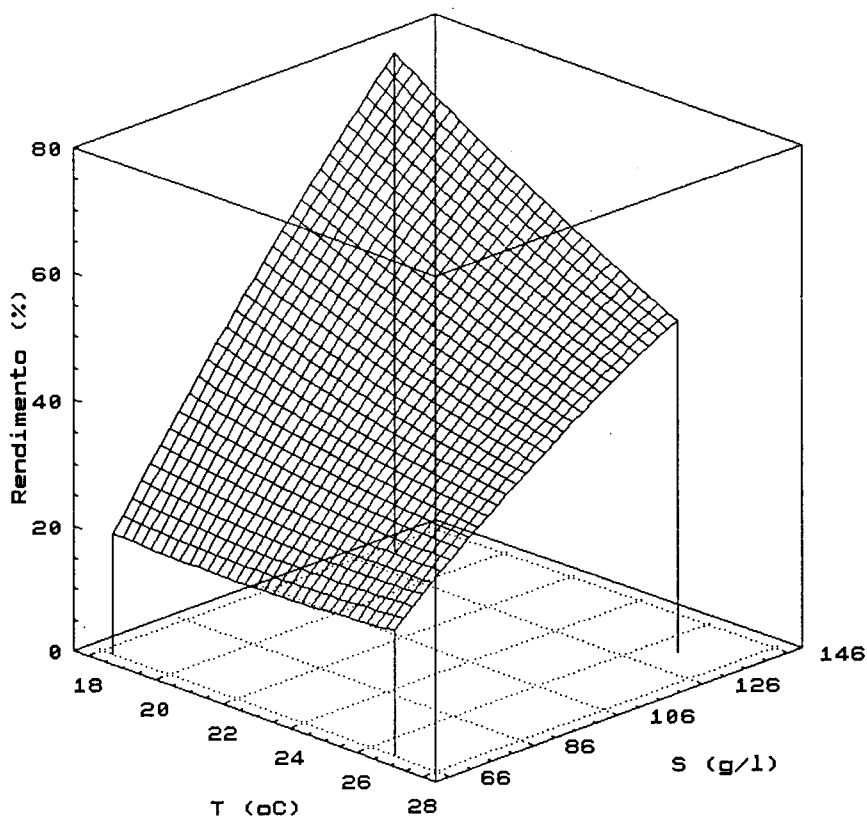


Figura 23. Efeito da temperatura (T) e concentração de sacarose (S) no no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0.0384$

c) Efeitos da relação R e a concentração de sacarose

A figura 24 estuda os efeitos da relação R e a concentração de sacarose numa temperatura constante de 18.3 °C para o rendimento.

Da mesma forma que na análise anterior o rendimento aumenta consideravelmente com o aumento da concentração da sacarose mas é pouco influenciado pela variação da relação R. Máximos rendimentos são observados para altos valores da relação R e para altos valores da concentração de sacarose.

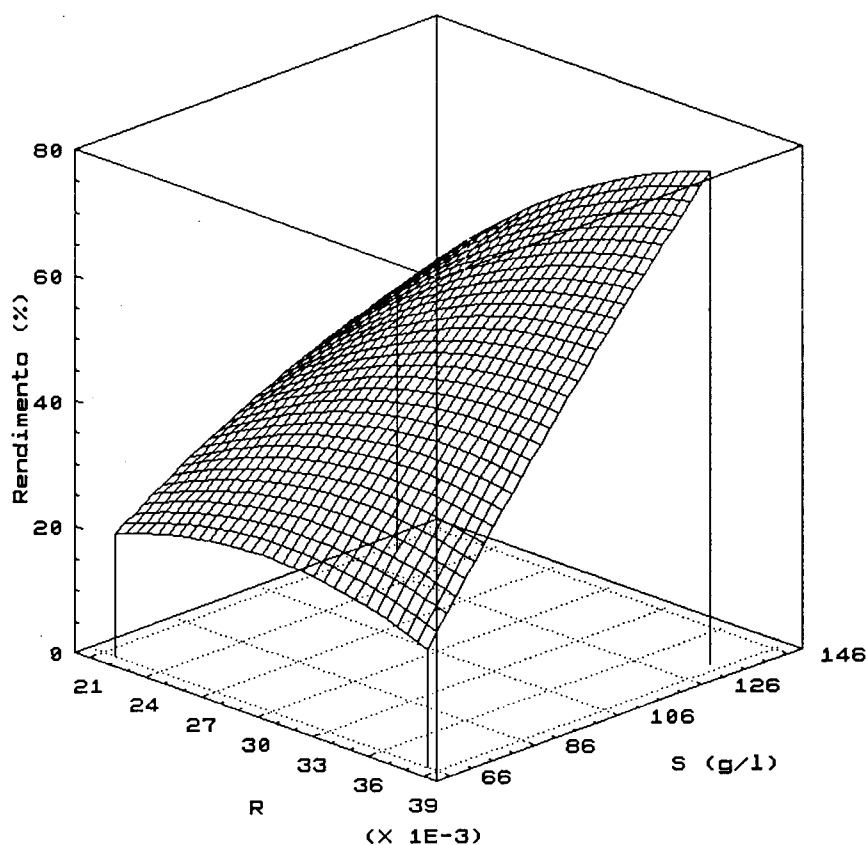


Figura 24. Efeito de R ([acceptor]/[sacarose]) e concentração de sacarose (S) no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana a $T = 18,3\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.4.3. ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA PESOS MOLECULARES.

a) Efeito da temperatura e a relação R

A figura 25 ilustra o efeito da temperatura e a relação R para uma concentração constante de sacarose de 133.6 g/l. nos pesos moleculares obtidos.

Observa-se que o peso molecular aumenta com o aumento do valor de R e a diminuição da temperatura, atingindo máximos pesos moleculares a baixas temperaturas e altos valores de R.

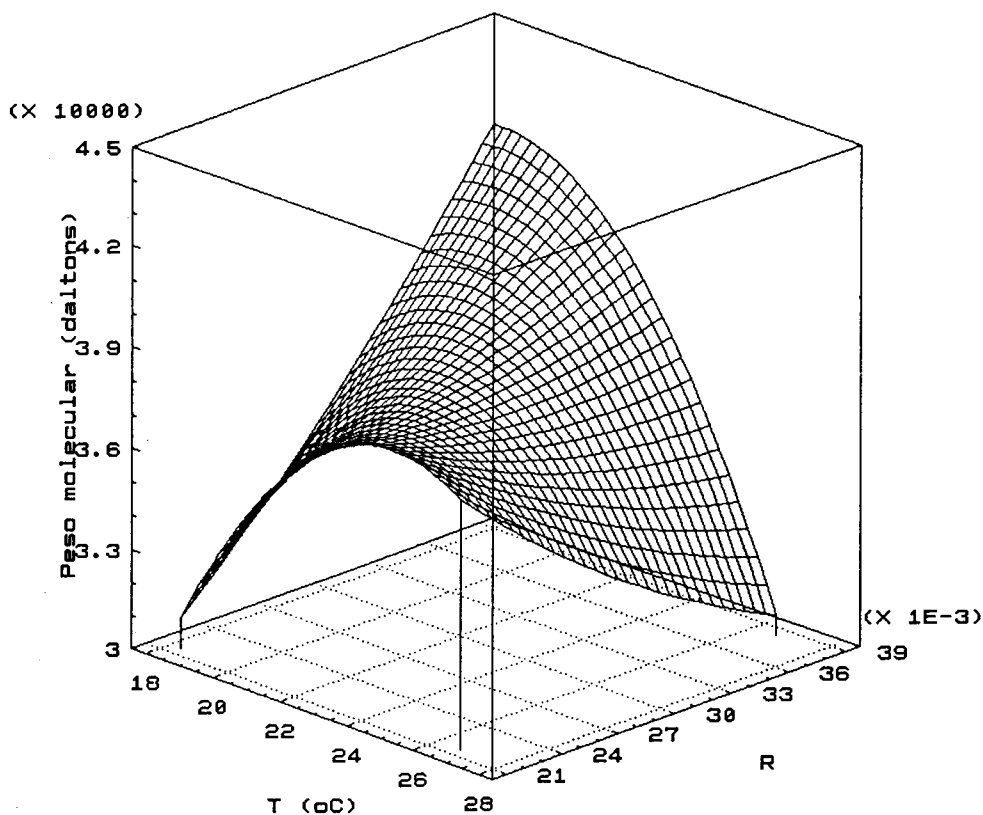


Figura 25. Efeito da temperatura (T) e de R [acceptor]/[sacarose] no Peso molecular do processo de síntese enzimática de dextrana numa concentração sacarose de 133.6 g/l.

b) Efeitos da temperatura e da concentração de sacarose

As figuras 26, 27 e 28 apresentam o efeito da temperatura e concentração de sacarose a valores constante de R de 0,0384, 0,030 e 0.0216 respectivamente nos pesos moleculares obtidos.

Nas figuras citadas anteriormente, observa-se que o peso molecular aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de sacarose. Com respeito à temperatura na figura 26, observa-se que o peso molecular aumenta até uma temperatura aproximadamente de 22 °C e depois não tem aumento considerável. Na figura 27, à temperaturas menores, o peso molecular aumenta ligeiramente até atingir valores máximos a 22 °C e depois decresce. Na figura 28 acontece o contrario da figura 26 e o peso molecular aumenta com a diminuição da temperatura.

Máximos rendimentos foram obtidos a baixas temperaturas e altas concentrações de sacarose.

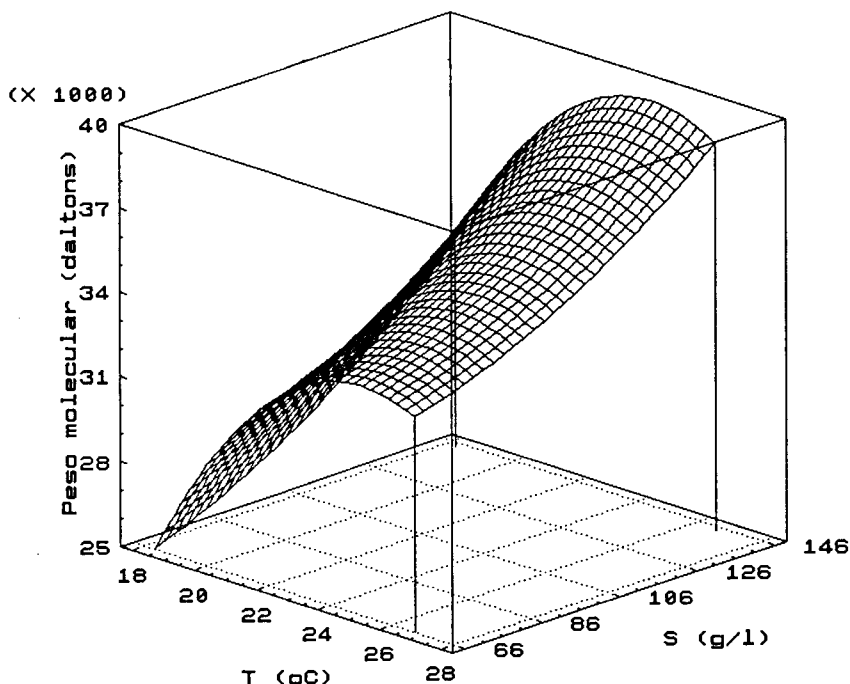


Figura 26. Efeito da temperatura (T) e concentração da sacarose (S) no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0.0216$

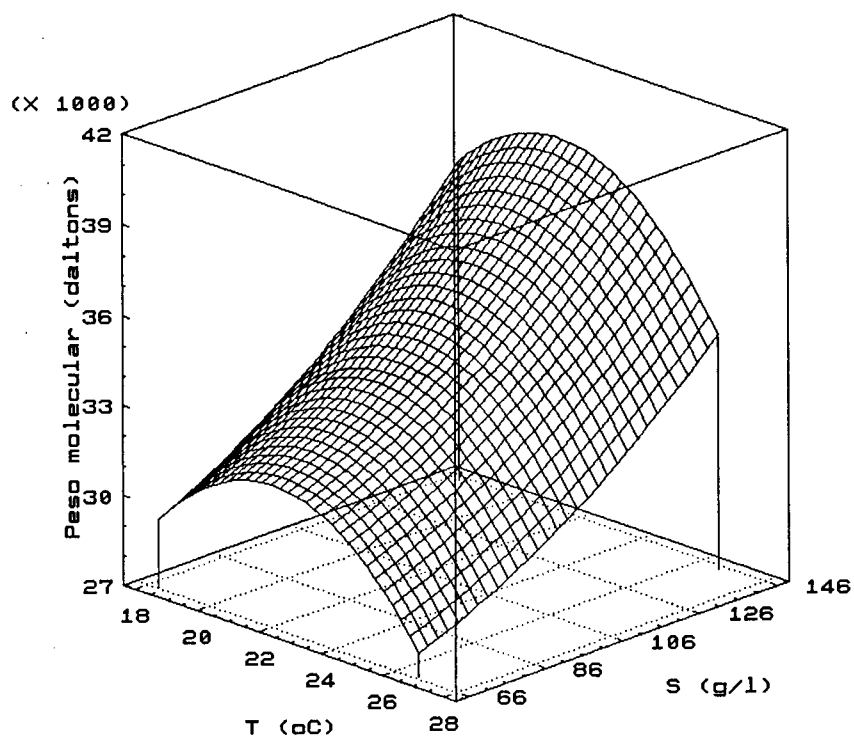


Figura 27. Efeito da temperatura (T) e concentração da sacarose (S) no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0.0300$

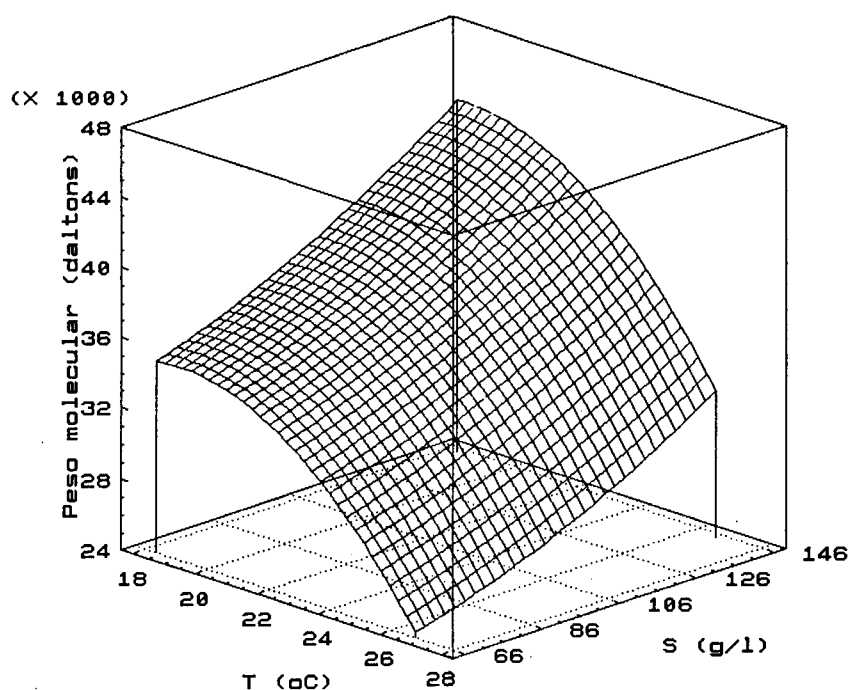


Figura 28. Efeito da temperatura (T) e concentração da sacarose (S) no rendimento do processo de síntese enzimática de dextrana a $R = 0.0384$

c) Efeitos da relação R e da concentração de sacarose

A figura 29 estuda os efeitos da relação R e a concentração de sacarose para pesos moleculares numa temperatura constante de 18.3 °C.

Os pesos moleculares incrementam-se com os aumentos dos valores de R e concentrações de sacarose.

Máximos valores de pesos moleculares são obtidos a valores de R e concentrações de sacarose altos.

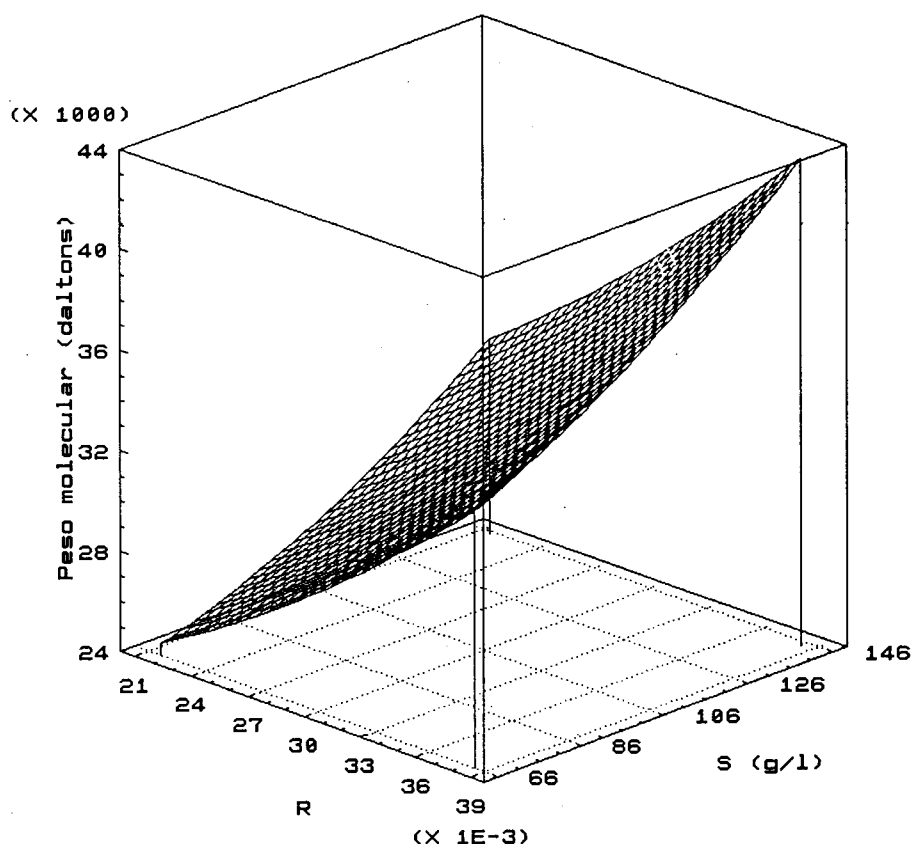


Figura 29 Efeito de R ($[acceptor]/[sacarose]$) e concentração de sacarose (S) no rendimento do processo desíntese enzimática sde dextrana a $T = 18,3\text{ }^{\circ}\text{C}$

5. CONCLUSÕES

5.1. Produção da enzima dextrana-sacarase

Dos resultados obtidos pode-se concluir que a enzima dextrana-sacarase produzida por fermentação em batelada alimentada do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, com uma alimentação de sacarose de 160 g/l e NaOH 1N, temperatura de 27°C e pH, atinge máximos valores de atividade enzimática e mínimas quantidades de açúcares redutores. Estas condições favoreceu os processos de ultrafiltração e precipitação com PEG 1500 50%.

5.2. Uso de maltose como acceptor

A produção de dextrana de baixo peso molecular usando como acceptor a maltose, na faixa de 4.500 a 4.800, foi obtido em tres experimentos: 3, 11 e 15 com pesos moleculares médios respectivamente de 4.819, 4.700 e 4.556 daltons (Os parâmetros dos experimentos 3, 11 e 15 são apresentados na Tabela 13). O experimento 15 resultou num maior rendimento de dextranas de baixo peso molecular de 52.49 %.

5.3. Efeitos da concentração de sacarose, relação R e temperatura durante o processo de síntese enzimática de dextrana clínica.

Através da metodologia de superfície de resposta conclui-se que a concentração de sacarose é a variável que mais influencia o processo de síntese enzimática de dextrana clínica. Tanto o rendimento como o peso molecular médio da dextrana produzida são favorecidos com o aumento da concentração da sacarose. A concentrações baixas de sacarose são obtidos apenas dextranas com maior proporção de alto peso molecular, rendimentos baixos de dextranas de médio peso molecular e pesos moleculares médios muito menores de 40.000 daltons.

A Relação R ($\frac{[acceptor]}{[sacarose]}$) tem um efeito semelhante ao efeito produzido pela concentração de sacarose, mas em menor grau de influência. Quanto maior é a relação R maior é o rendimento.

Com respeito à temperatura, podemos afirmar que a diminuição da temperatura incrementa o rendimento. O seja a diminuição da temperatura, favorece a formação de dextrana clínica devido a diminuição da velocidade de reação. Altas temperaturas favorecem a formação de dextrana de alto peso molecular com maior rendimento em detrimento do rendimento de dextrana de médio peso molecular, não atingindo a formação de dextrana clínica.

Os parâmetros, para produzir dextrana clínica (em torno de 40.000 daltons) com maior rendimento, foram altas concentrações de sacarose (133.6 g/l), baixas temperaturas (18°C) e altos valores da relação ($\frac{[acceptor]}{[sacarose]}$) de 0,0384.

6. BIBLIOGRAFIA

01. ALSOP, L. Industrial productions of dextran. Progress. Ind. Microbiol. 18: 1-44, 1983.
02. ALSOP, R.M.; BYRNE, G.A.; DONE, J.N.; EARL, I.E.; GIBBS, R. Quality assurance in clinical dextran manufacture by molecular weight characterisation. Proc Biochem. : 15 - 35, Dez.1977.
03. ASPINALL, G.O. Classifications of polisaccharides. in the polisaccharides, 2: 1 - 44, New York, Academic Press, 1983.
04. BARKER, P.E. AJONGWEN, N. The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentations techniques. Biotechnol. Bioeng. 37: 703 -707, 1991.
05. BINDER, T.P. & ROBYT, J.F. P -nitrophenyl alfa-d-gluco pyranoside a new substrate for glucansucrases. Carbohydr. Res. 124: 287 - 299, 1983.
06. BOX, G.E.P. & WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimun condition. J. Royal Stat. 13 : 1-45, 1951.
07. COCHRAN, W.G. & COX, G.M. Experimental Designs. 2da. New York, John Wiley, 1964.
08. CURRALERO, I.C.B. Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática para obtenção de Ferro dextrana. Campinas 1993. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.
09. DRAPER, N.R. & SMITH, H. Applied regression analysis. New York, John Wiley, 1996. 407 p.
10. EBER, K.H. & SCHENK, G. Mechanisms of biopolymer growth: the formation of dextran e levan. Adv. Enzimol. 330: 179 - 221, 1968.
11. HEHRE, E.J. Studies on the enzymatic Syntesis of dextran

- from sucrose. J. Biol. Chem. 163: 221-233, 1946.
12. HEHRE, E.J. Low molecular weight dextran as a modifier of dextran synthesis. J. Am. Chem. Soc. 75: 4866, 1953.
 13. HEHRE, E.J. Polysaccharide syntesis from disaccharides In: COLOWICK S.P. & KAPLAN N.O. Methods in Enzymology, New York, Academic Press, 1955. v.1 p. 178-184, 1955.
 14. JEANES, A.R. Characterization of dextran from four types of *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 71: 167 - 173, 1956.
 15. JEANNES, A.R. Preparation of dextran from growing *Leuconostoc mesenteroides*. Methods in Carbohyd. Chem. 5: 118 - 132, 1965.
 16. JEANES, A.R. Extracellular microbial polysscharides new hydrocolloides of interest to the food industry". Food Technol. 28: 34 - 40, 1974.
 17. KABOLI, H. & REILLY, P.J. Immobilization and propriertes of *Leuconostoc mesenteroides* dextran sucrase. Biotechnol. Bioeng. 22: 1055 - 1069, 1980.
 18. KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Purification and properties of the extracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 1299. J. Biochem. 79: 1301 - 1308, 1976.
 19. KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. Characterization of the multiplred forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 F. Biochim. Biophys. Acta. 614: 46 - 62, 1980.
 20. KOEPESEL, H.J.; TSUCHIYA, H.M.; HELLMAN, N.N.; KASENKO, A.; HOFFMAN, C.A.; SHARPE, E.S.; JACKSON, R.W. Enzimatic Syntesis of dextran. Aceptor specificity and chain initiation. J. Biol. Chem. 200: 793 - 801, 1952.
 21. KOEPESEL, H.J. & TSUCHIYA, H.M. Enzymatic syntesis of dextran. J. Bacteriol. 63: 293 - 295, 1952.

22. LOPES, A. Production, purifications et imobilization de la dextran-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides*. [Produção purificação e imobilização da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides*]. Toulouse, 1979. Tese (Doctor)-Institut National des Sciencies Aplicates (INSA).
23. MARIBONA, J.L. & BELLO, O.M. La dextrana. Asociación de técnicos azucareros de Cuba Boletín Oficial. 21: 65 - 73, 1966.
24. MARTINEZ-ESPINDOLA & LOPEZ-MUNGUIA. On the Kinetics of Biotechnol. Bioeng. 7: 483 - 486, 1985.
25. MILLER, A.W.; EKLUND, S.H.; ROBYT, J.F. Milligram to gram Scale purification and characterization of dextransucra from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F. Carbohydr. Res. 147: 119 - 133, 1986.
26. MILLER, A.W. & ROBYT, J.F. Stabilization of dextran-sucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512F by nonioc detergents, polyethylene glycol an high molecular weight dextran. Biochem. Biophys. Acta. 785: 89 -96, 1984.
27. MILLER, A.W. & ROBYT, J.F. Activations and inibition of dextransucrase by calcium". Biochem. Biophys. Acta. 880: 32 - 39, 1986.
28. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426 - 428, 1959.
29. MONSAN, P. & LOPEZ, A. On the prodution of dextran by free and imobilized dextransucrase. Biotechnol. Bioeng. 23: 2027 - 2037, 1981b.
30. MURPHY, P.T. & WHISTLER, R.L. Dextran in R.L. & Bemiller, J.N. eds. Industrial gums: polissaccharides an their derivatives., 2ed. New York, Academic Press, 1973, p. 513-542.
31. NEELY, W.B. J. Dextran Structure and syntesis. Adv. Carbohydr. Chem. 15: 341 - 369, 1960.

32. QUEIROZ, J.H. Contribuição ao estudo da produção de Dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Campinas 1987. Tese (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidad Estadual de Campinas.
33. QUEIROZ, J.H. & MAUGERI, F. Otimização da produção dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* à partir de melaço como fonte de carbono. Rev Microbiol. 20: 150-156
34. PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Acceptor reaction of highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides, application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextran. Carbohydr. Res. 149: 433 - 441, 1986.
35. ORIOL, E.; PAUL, F.; MONSAN, P. Transfer reactions of glucosyl residues to maltose and pure oligosaccharides using highly active *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F dextransucrase. Relatório técnico, Toulouse, INSA, 1984. 10 p.
36. ROBYT, J.F. Mechanism of action of dextransucrase. In Proceedings. Symposium. Mechanism of saccharide polymerisation and depolymerisation. Miami Beach, 1978. Miami Beach. Academic Press, 1980. p. 43-45
37. ROBYT, J.F. & EKLUND, S.H. Relative quantitative effects of acceptors in the reaction of *L. mesenteroides* NRRL B512 F dextransucrase. Carbohydr. Res. 121: 279 - 286, 1983.
38. ROBYT, J.F. & EKLUND, S.H. Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextransucrase in synthesis of dextran and the formation of acceptor products. Bioorg. Chem. 11: 115 - 132, 1982.
39. ROBYT, J. & TANIGUCHI, H. The mechanism of dextransucrase action: biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. Arch. Biochem.

Biophys. 174: 129 - 135.

- 40 ROBYT, J.F. & WALSETH, T.F. The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B - 512 F dextransucrase. Carbohydr. Res. 61: 443 - 445, 1978.
- 41.- ROBYT, J.F. & WALSETH, T.F.. Production, purification and properties of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides*. Carbohydr. Res. 68: 95 - 111, 1979.
42. ROBYT, J.F.; KIMBLE, B.K.; WALSETH, T.H. The mechanism of dextransucrase action: direction of dextran biosynthesis, Arch. Biochem. Biophys. 165: 634 - 640, 1974.
43. SABATIE, J.; CHOPLIN, L.; MONSAN, P.; PAUL, F. The effect of synthesis temperatura on the rheological properties of native dextran. Biotechnol. Letts. 8: 425 - 430, 1986.
44. SANDFORD, P.A. & BAIRD, J. Industrial utilization of polysacchrarides. The Polysaccharides, New York, Academic Press. 1983. v.2, p. 412 - 490.
45. SIDEBOTHAM, R.L. Dextran. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30: 371 - 444, 1974.
46. TSUCHIYA, H.M.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.; BRYANT, G., BOGARD,; M.O., FEGER, V.H.; JACKSON, R.W. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrse by *Leuconostoc mesenteroides*. J. Bacteriol. 64: 521 - 527, 1952.
47. TSUCHIYA, H.M.; HELLMAN, N.N.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.; BRYANT, G.; STRINGER, C.S.; ROGOVIN, S.P.; BOGARD, M.O.; BRYANT, G.; FEGER, V.H.; HOFFMAN, C.A.; SENTI, F.R.; JACKSON, R.W. Factors affecting molecular weight of enzymatically shyntesized dextran. J. Am. Chem. Soc. 77: 2412 - 2419, 1955
48. TSUMURAYA, Y.; NAKAMURA, N.; KOBAYASHI, T. Dextransucrase and the role of methalic ions the formations of branch link in dextran synthesis. Agric. Biol. Chem. 40: 1471 - 1477, 1976.

APÊNDICE A
CROMATOGRAMAS DA DEXTRANA PRODUZIDA
USANDO COMO ACCEPTOR A MALTOSE

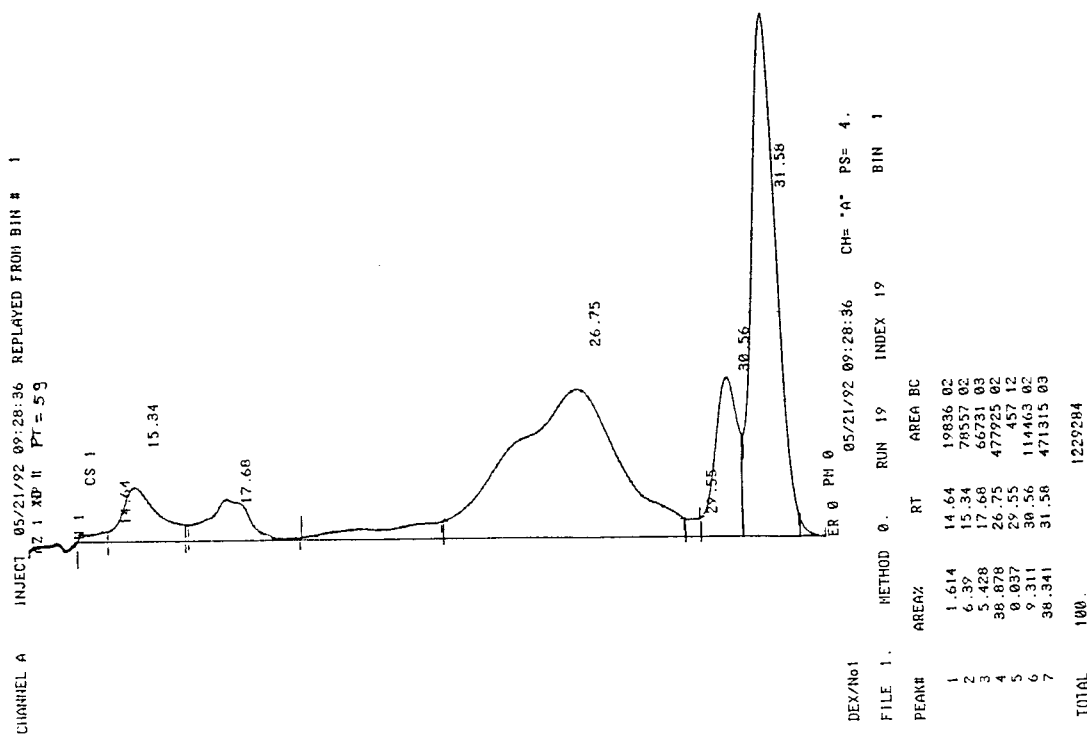


Figura 1. Cromatograma correspondente ao experimento 1 da Tabela 13.

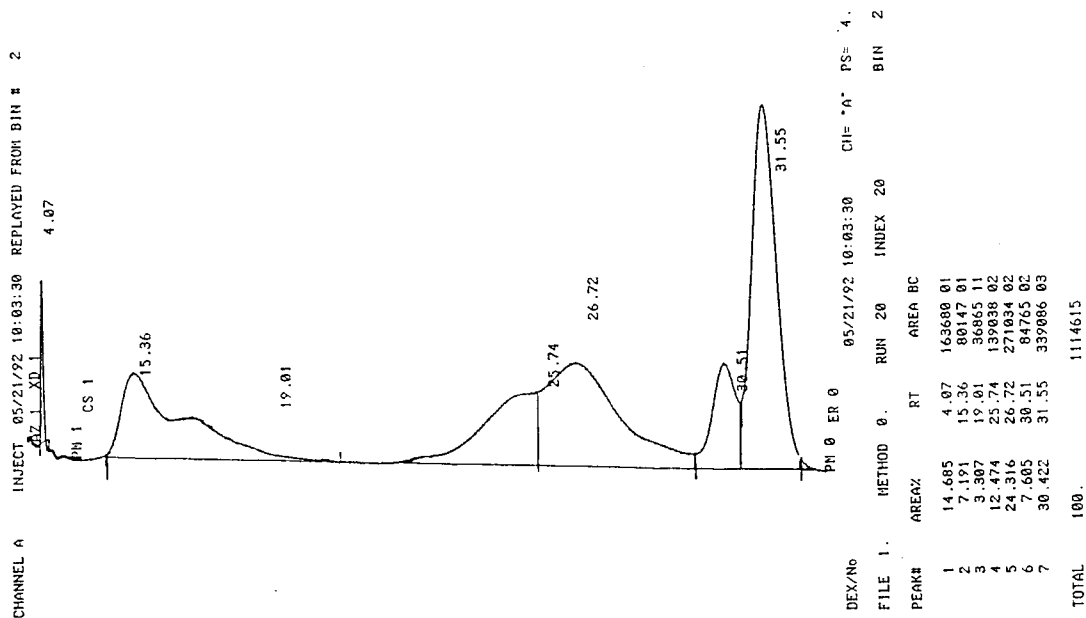


Figura 2. Cromatograma correspondente ao experimento 2 da Tabela 13.

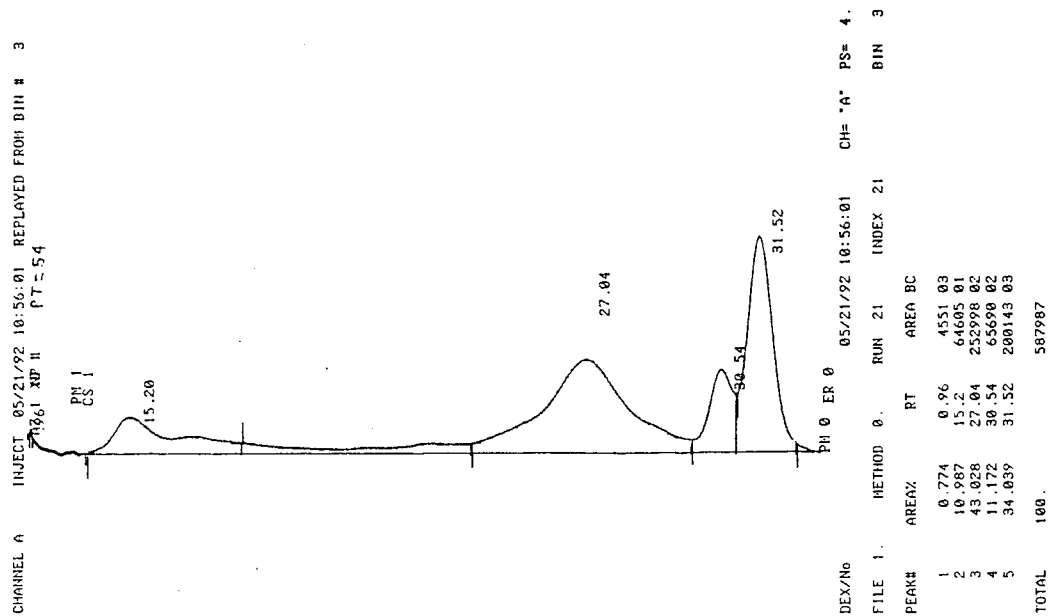


Figura 3. Cromatograma correspondente ao experimento 3 da Tabela 13.

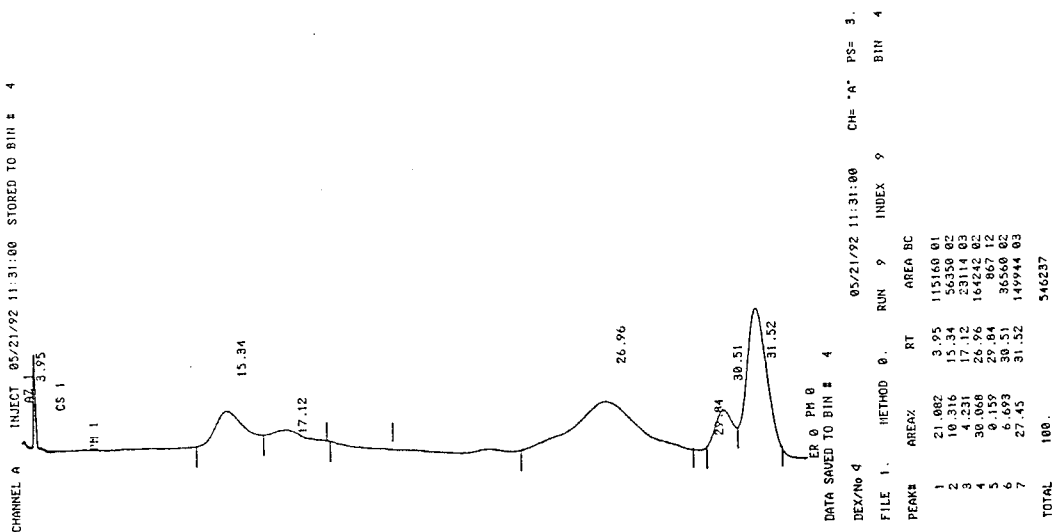


Figura 4. Cromatograma correspondente ao experimento 4 da Tabela 13.

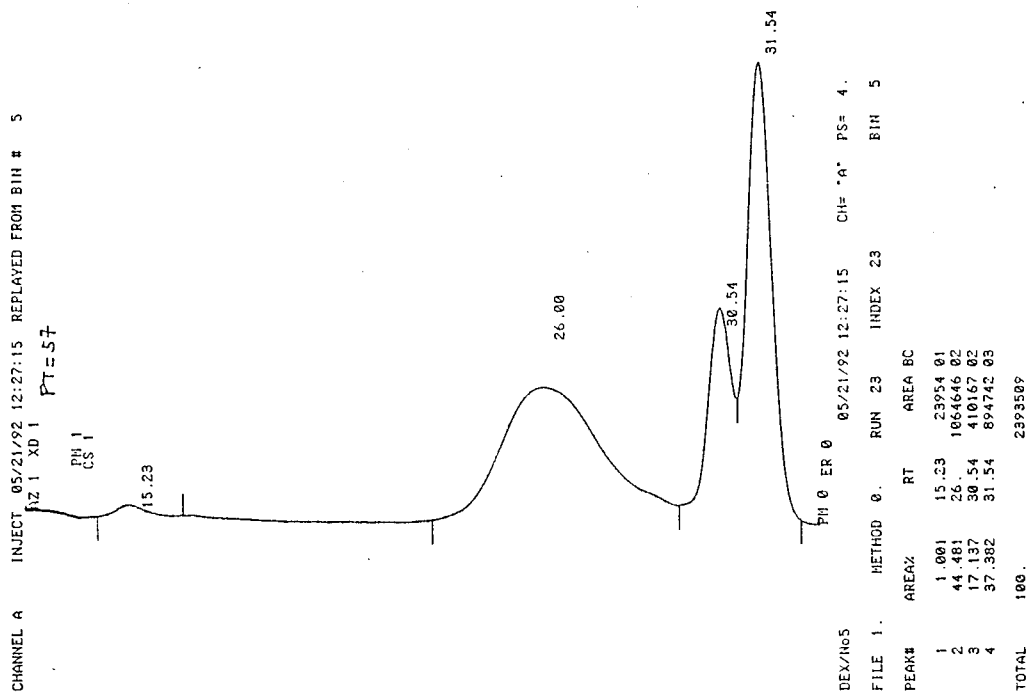


Figura 5. Cromatograma correspondente ao experimento 5 da Tabela 13.

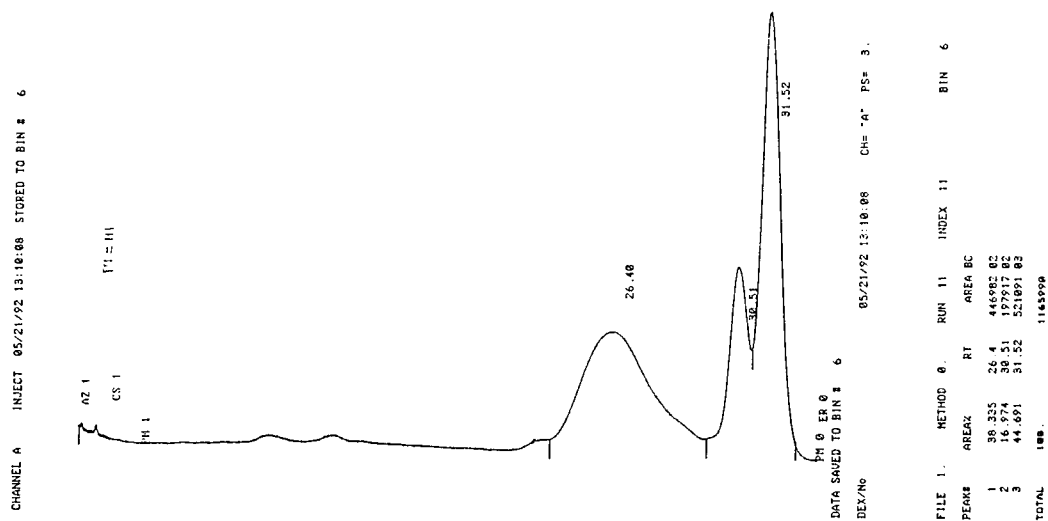


Figura 6. Cromatograma correspondente ao experimento 6 da Tabela 13.

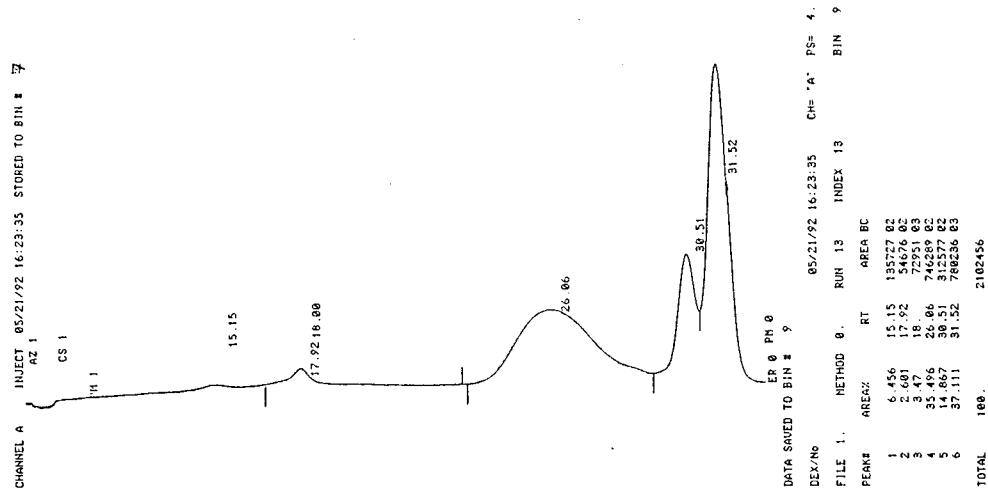


Figura 7. Cromatograma correspondente ao experimento 7 da Tabela 13.

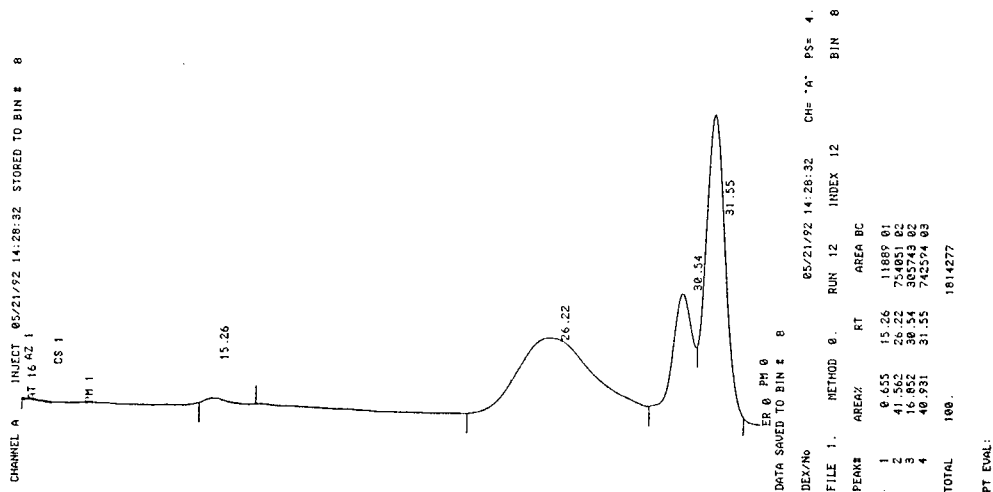


Figura 8. Cromatograma correspondente ao experimento 8 da Tabela 13.

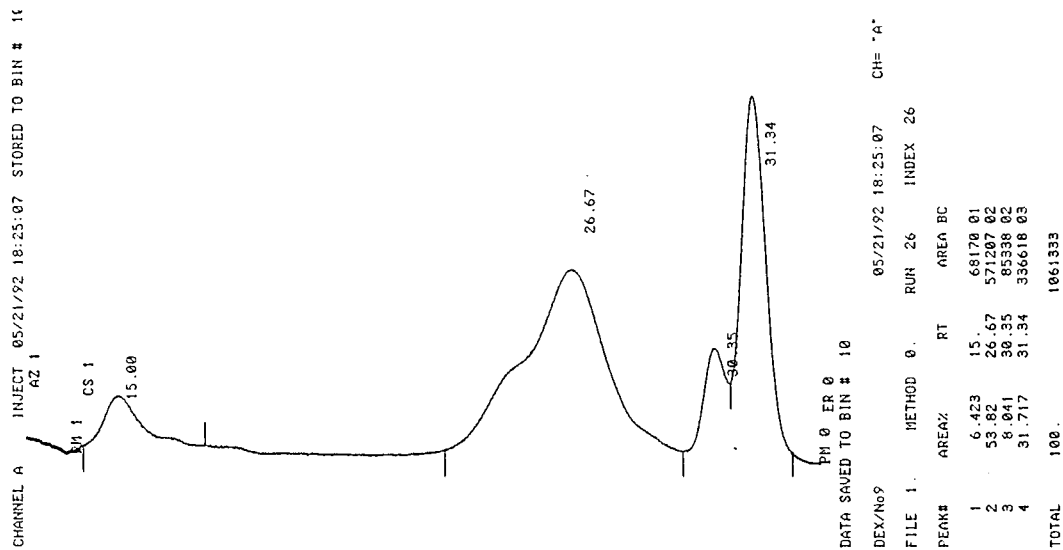


Figura 9. Cromatograma correspondente ao experimento 9 da Tabela 13.

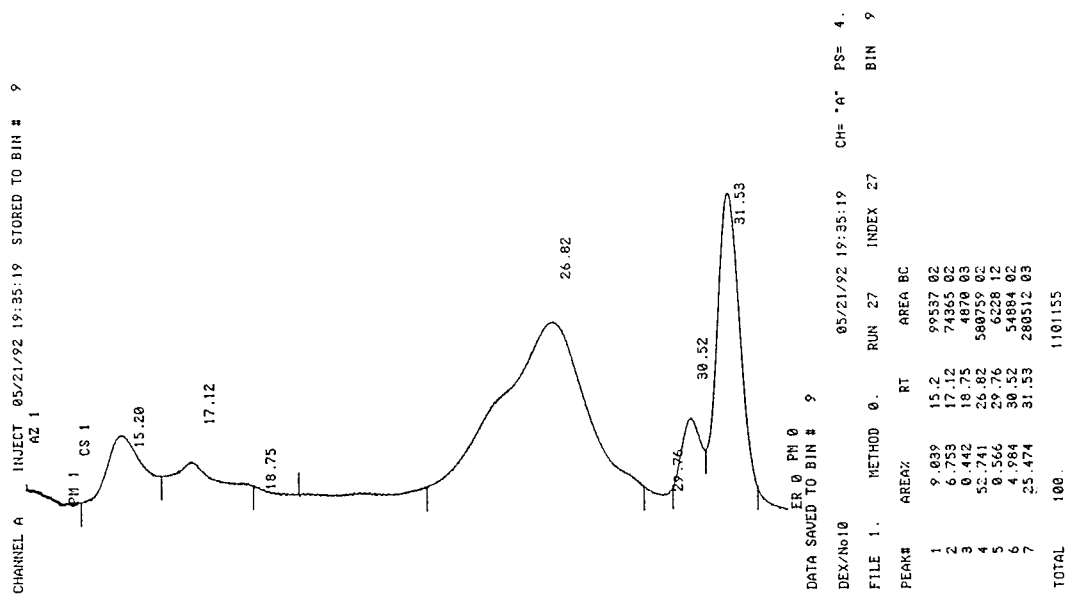


Figura 10. Cromatograma correspondente ao experimento 10 da Tabela 13.

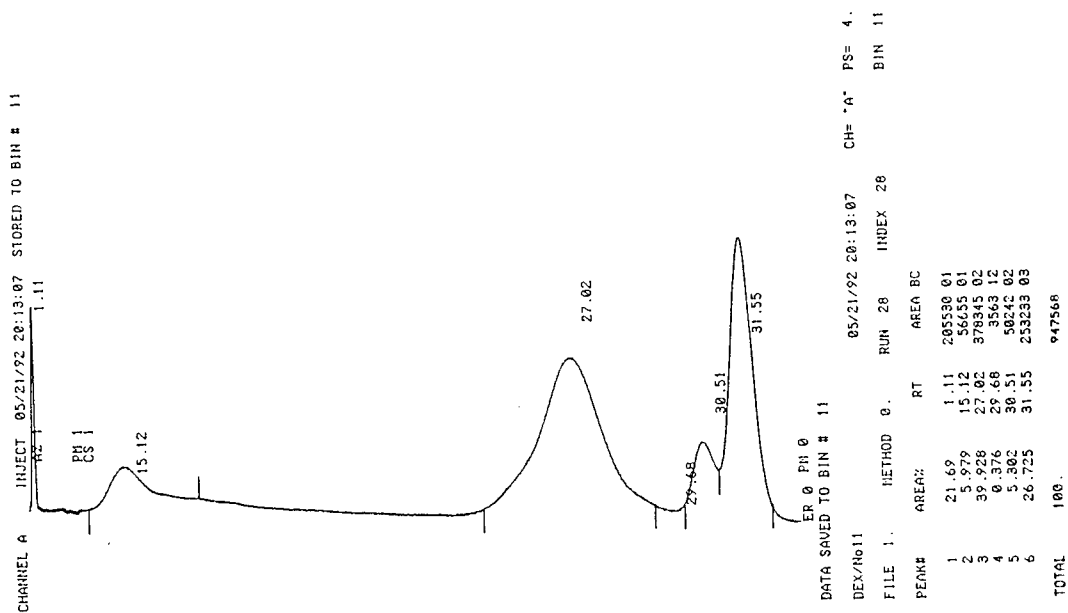


Figura 11. Cromatograma correspondente ao experimento 11 da Tabela 13.

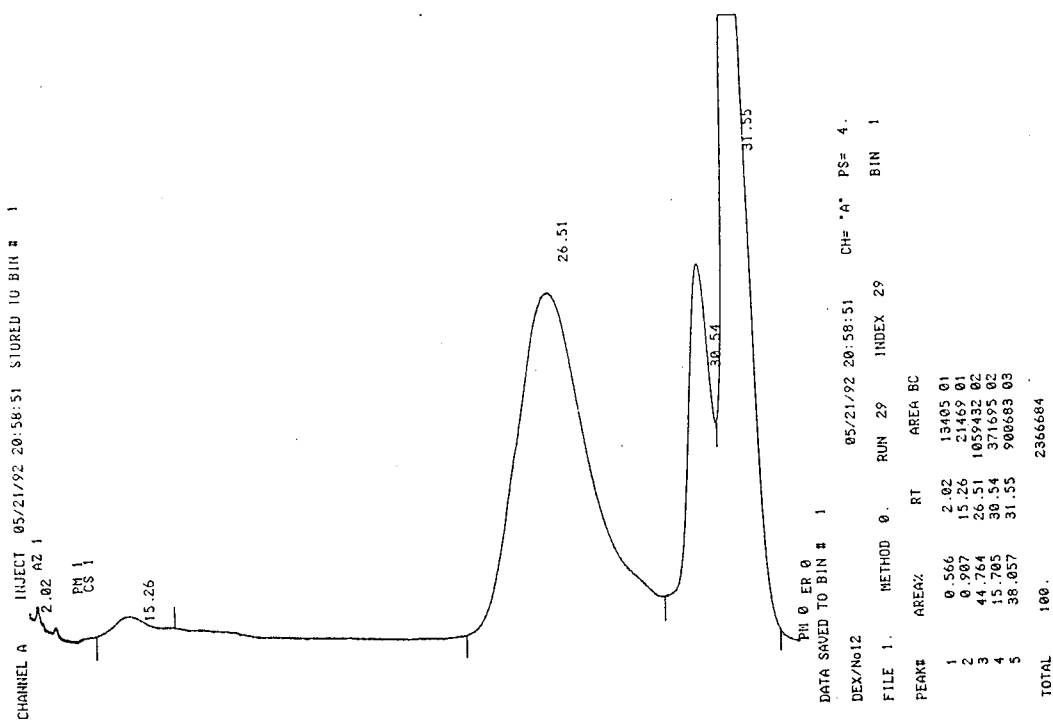


Figura 12. Cromatograma correspondente ao experimento 12 da Tabela 13.

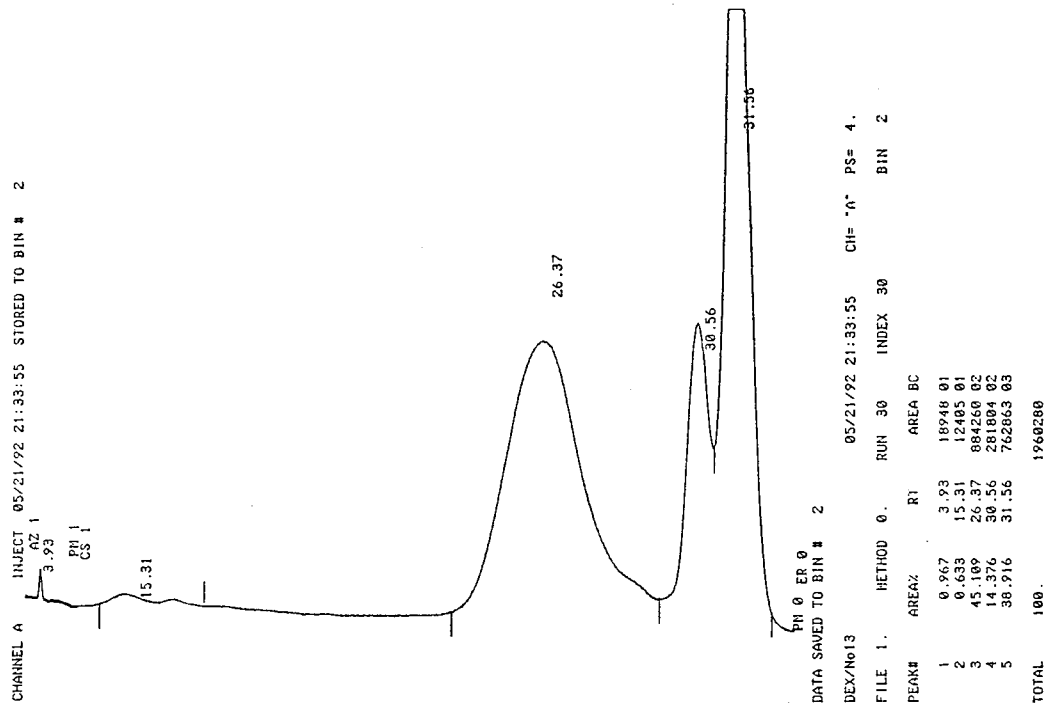


Figura 13. Cromatograma correspondente ao experimento 13 da Tabela 13.

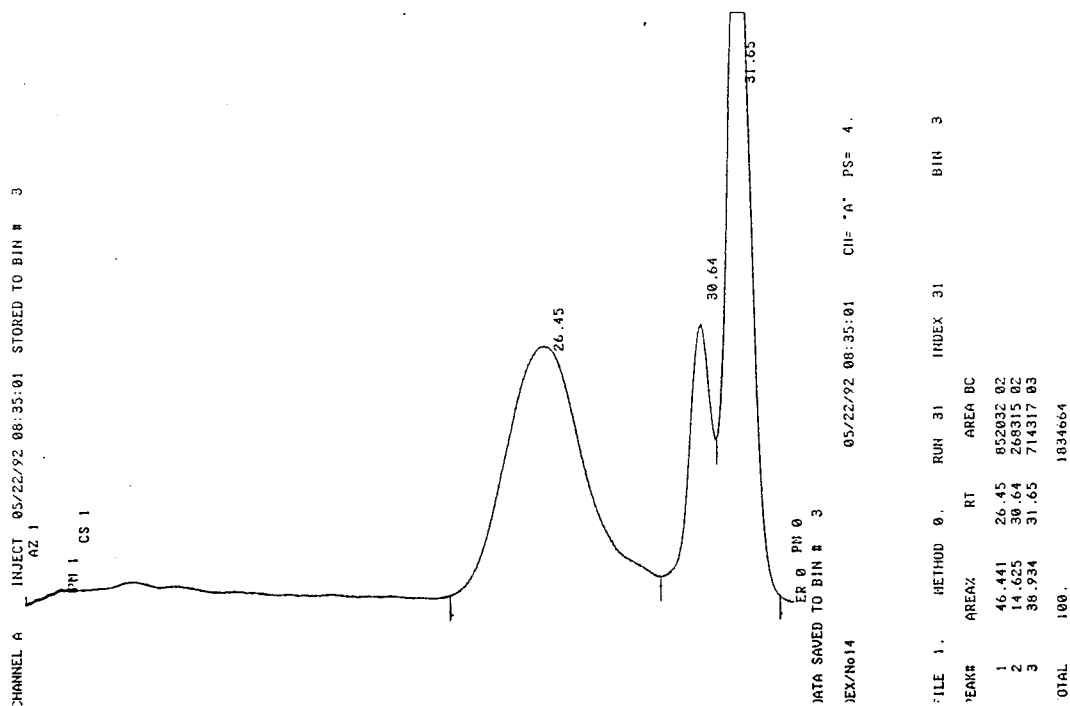


Figura 14. Cromatograma correspondente ao experimento 14 da Tabela 13.

APÊNDICE B

CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DEXTRANA

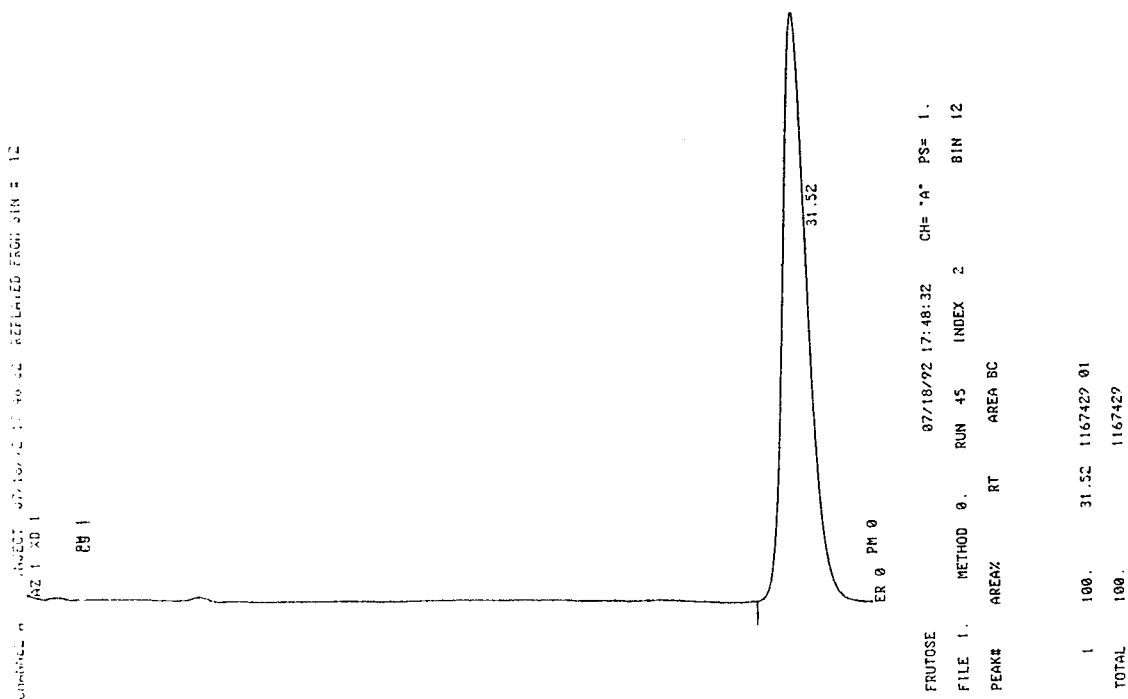


Figura 1. Cromatograma para determinação da curva padrão peso molecular 180 (frutose)

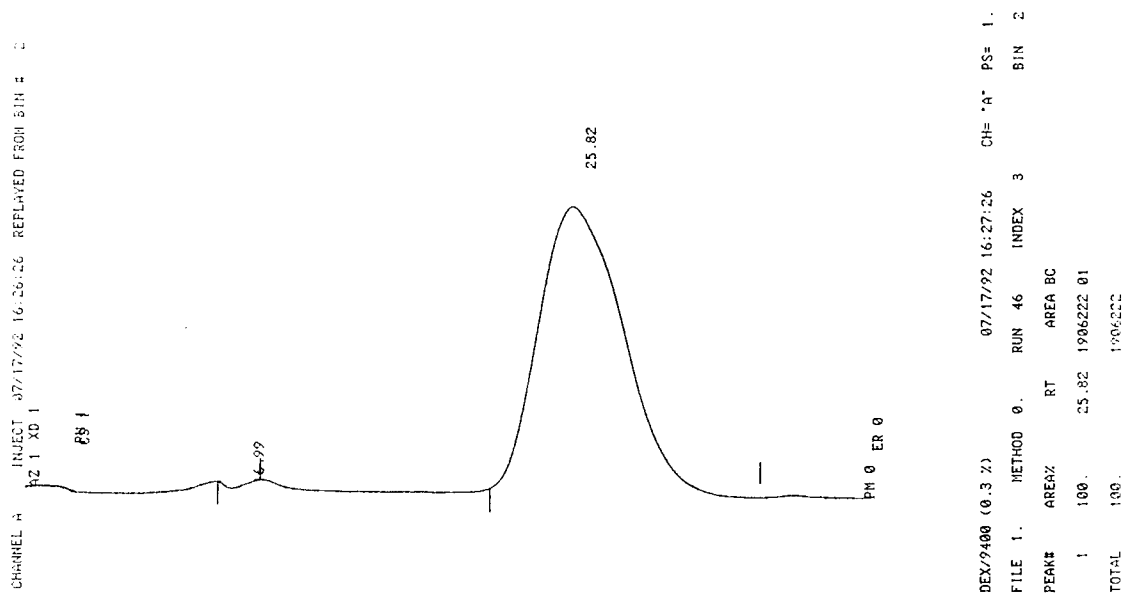


Figura 3. Cromatograma para determinação da curva padrão peso molecular 9.400 daltons

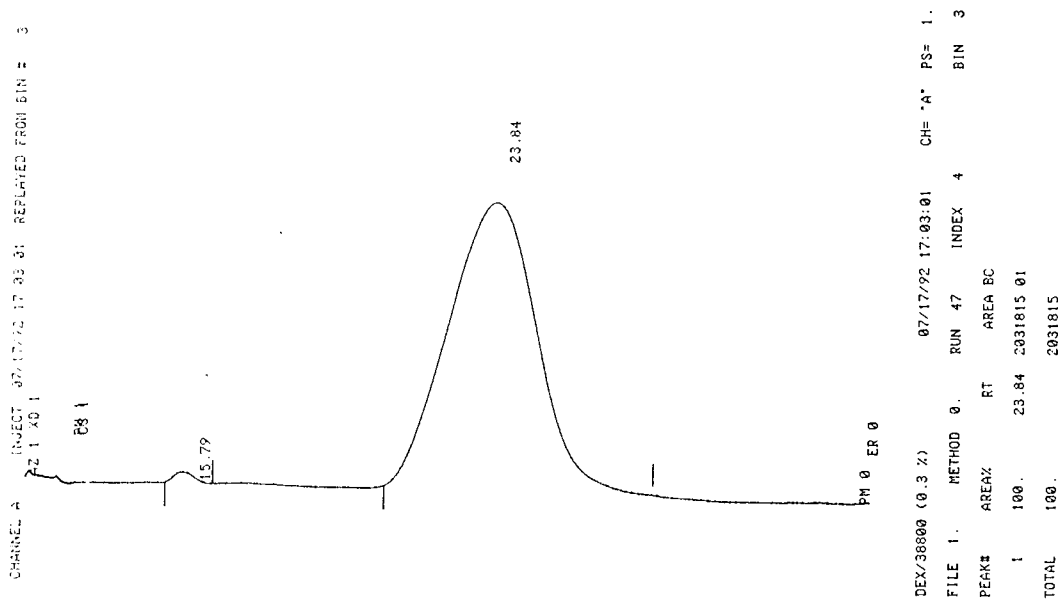


Figura 4. Cromatograma para determinação da curva padrão peso molecular 38.800 daltons.

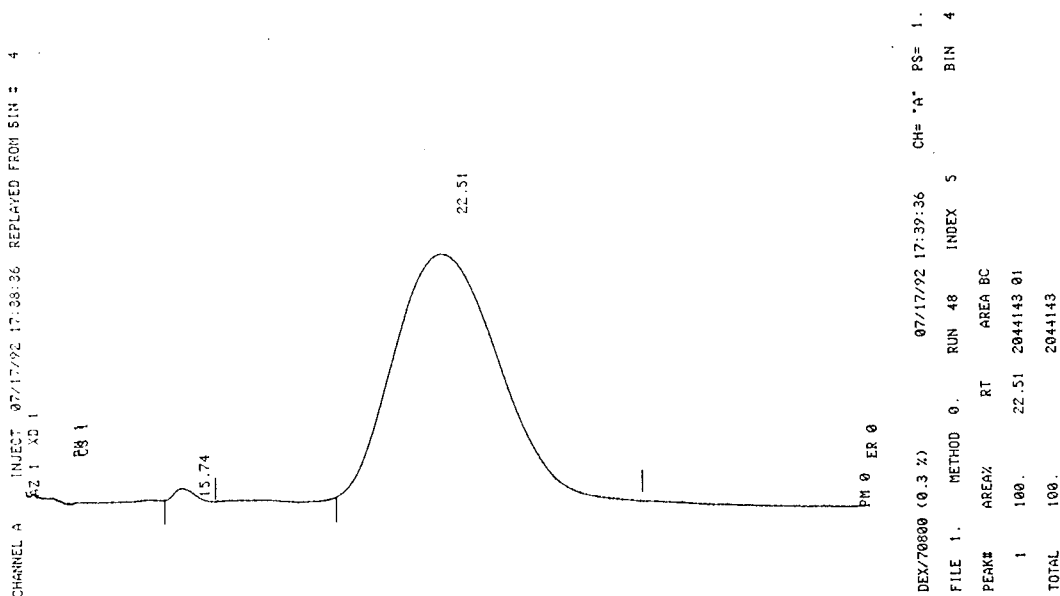


Figura 5. Cromatograma para determinação da curva padrão peso molecular 70.800 daltons.

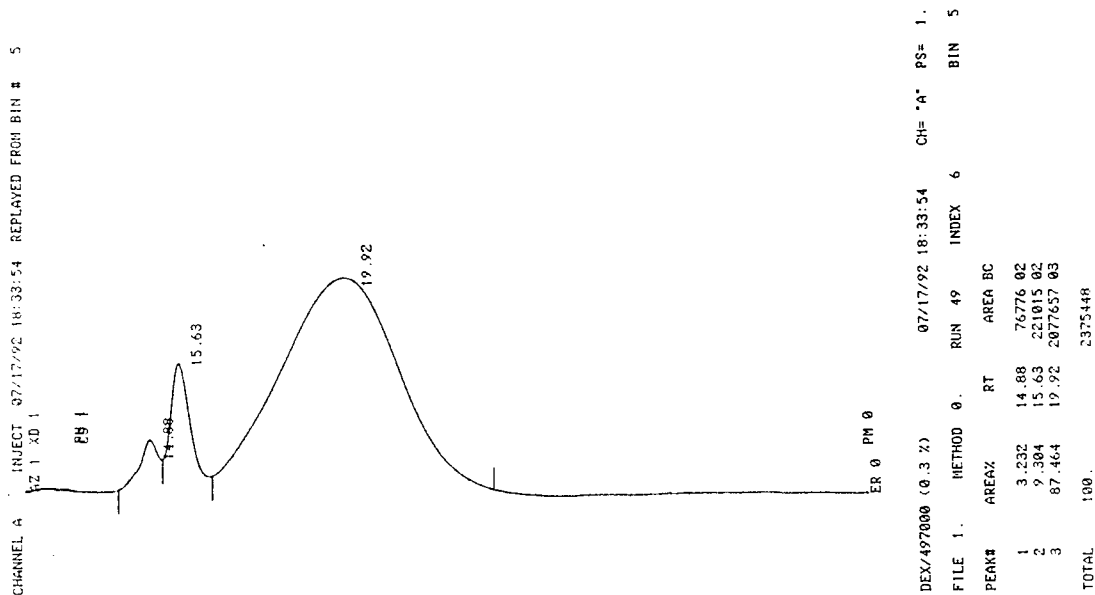


Figura 6. Cromatograma para determinação da curva padrão peso molecular 497.000 daltons

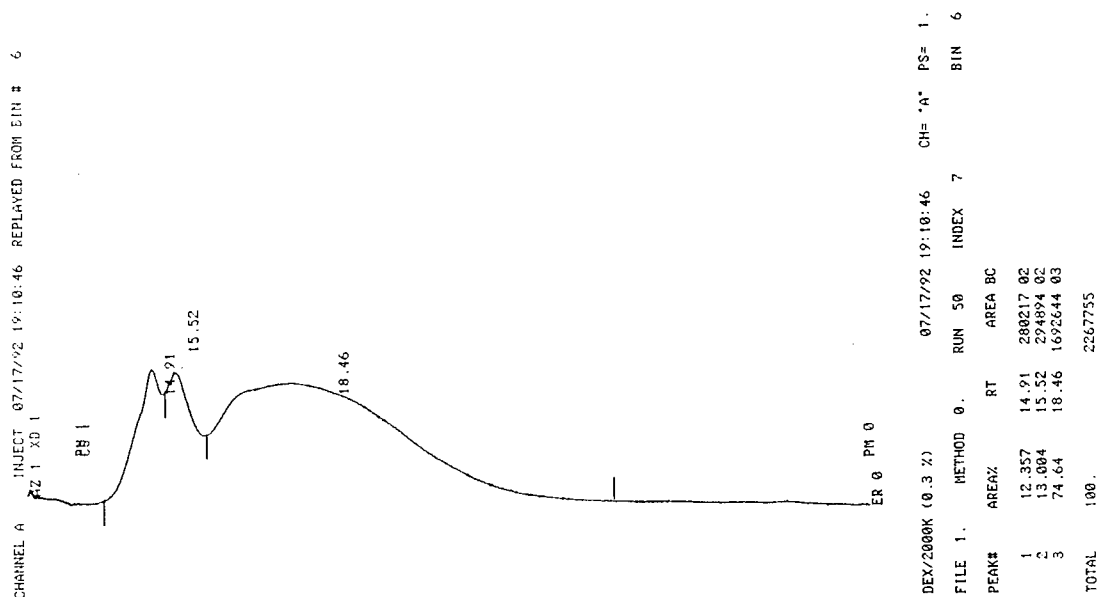
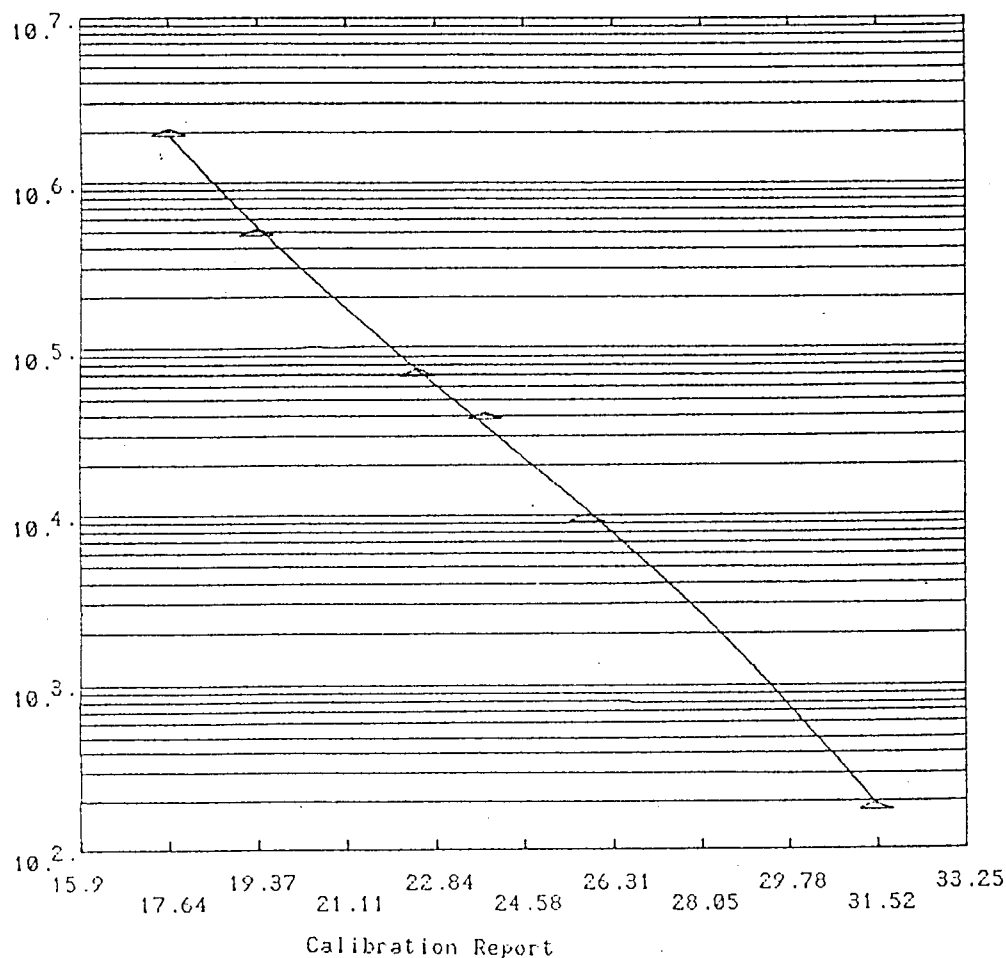


Figura 7. Cromatograma para determinação da curva padrão peso molecular 2 milhões de daltons.



Elution Time	Actual M.Wt.	Linear	Quad.	Cubic
17.64	2000000.	1880178.	1720864.	1918952.
19.36	497000.	604805.	592923.	538144.
22.51	70800.	75771.	80133.	72700.
23.84	38800.	31522.	33759.	33264.
25.82	9400.	8542.	9125.	10354.
31.52	180.	199.	183.	179.

Regression Analysis

Coefficients	Linear	Quad.	Cubic
KA	11.326043	10.4983	20.846847
KB	-.2863857	-.2166771	-1.5404807
KC		-.0014152	0.0537028
KD			-.000747
Correlation (r^2)	0.9979446	0.9978089	0.9992122
Std. Error of Est.	0.0718566	0.0856678	0.0629136

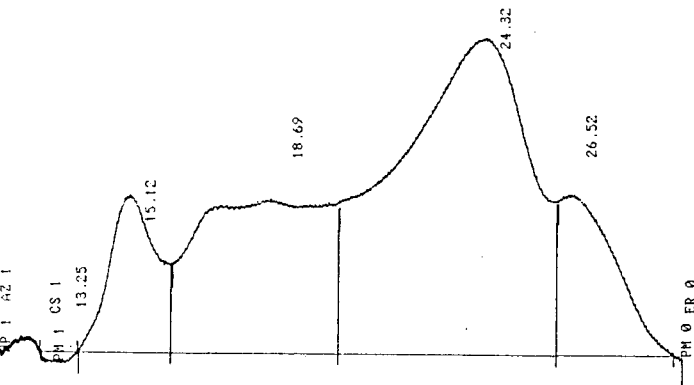
Figura 9. Curva de calibração da dextrana para determinar distribuição de pesos moleculares e pesos moleculares médios da Tabela 16.

ÂPENDICE C

CROMATOGRAMAS CORRESPONDENTES A TABELA 16

PARA DETERMINAR RENDIMENTO

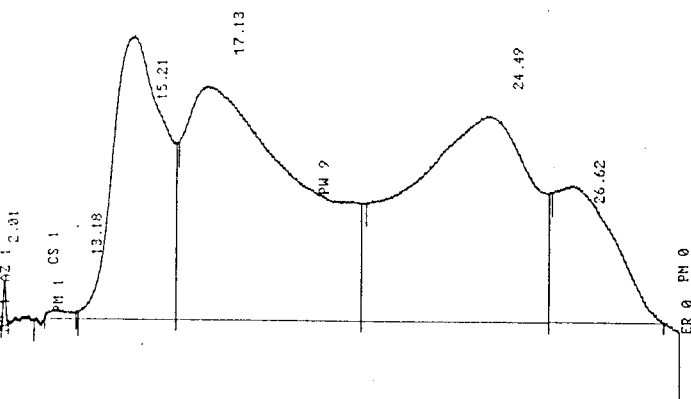
CHANNEL A INJECT 07/19/92 15:21:39 REPLAYED FROM BIN # 2



C_2	07/19/92	15:21:39	CH= "A"	PS= 1.
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 53	INDEX 53	BIN 2
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	9.39	15.12	156226.02	
2	25.511	18.69	424462.02	
3	53.767	24.32	894594.02	
4	11.332	26.52	188540.03	
TOTAL	100.		1663822	

Figura 2. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 2 da Tabela 16

CHANNEL A INJECT 08/05/92 07:51:42 REPLAYED FROM BIN # 5



C_1	08/05/92	07:51:42	CH= "A"	PS= 1.
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 46	INDEX 46	BIN 5
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	19.092	15.21	301788.02	
2	35.761	17.13	565281.02	
3	34.088	24.49	538636.02	
4	11.059	26.62	174811.03	
TOTAL	100.		1580716	

Figura 1. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 1 da Tabela 16

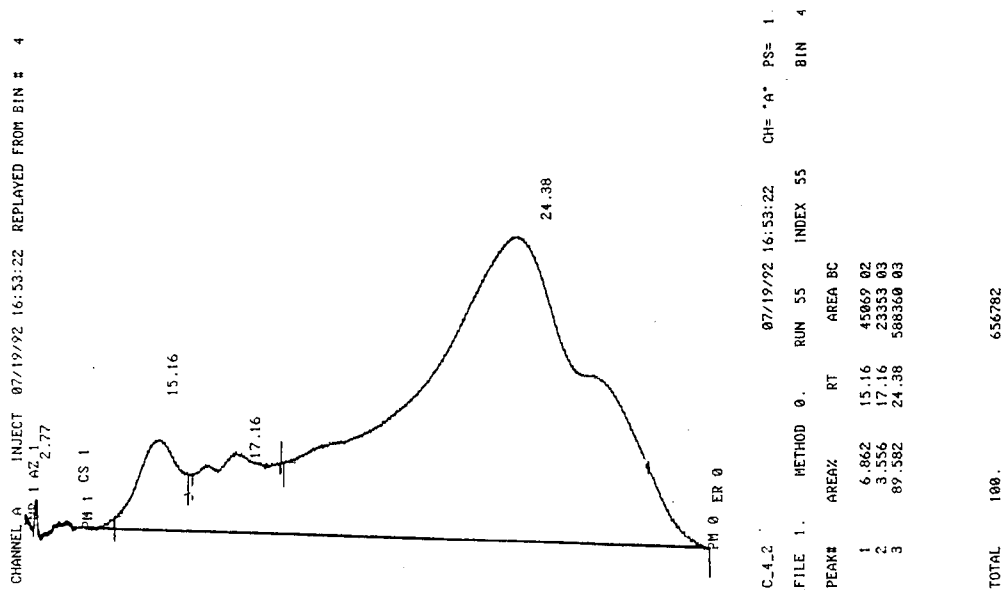


Figura 4. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 4 da Tabela 16

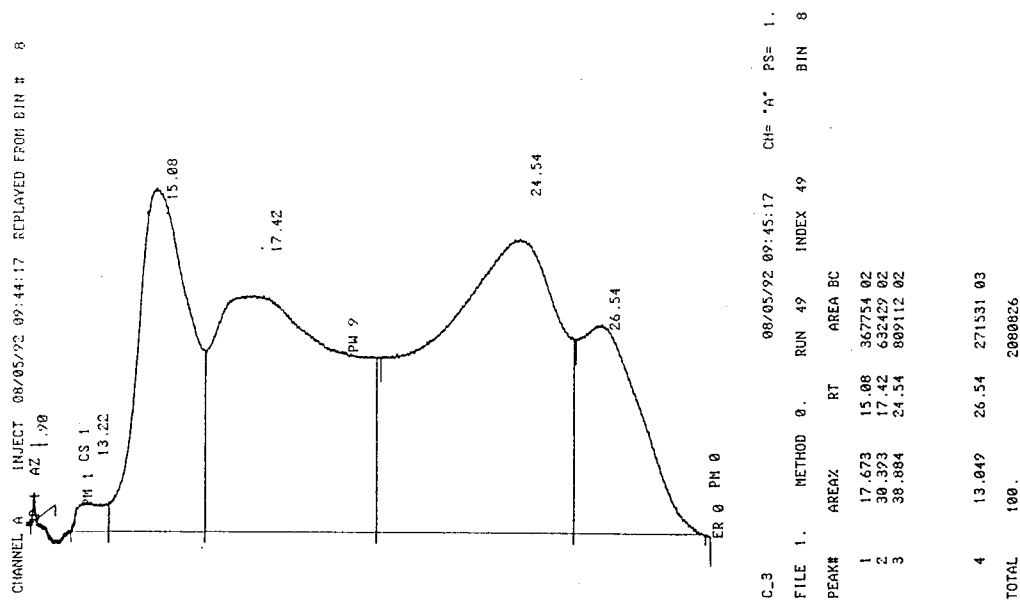


Figura 3. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 3 da Tabela 16

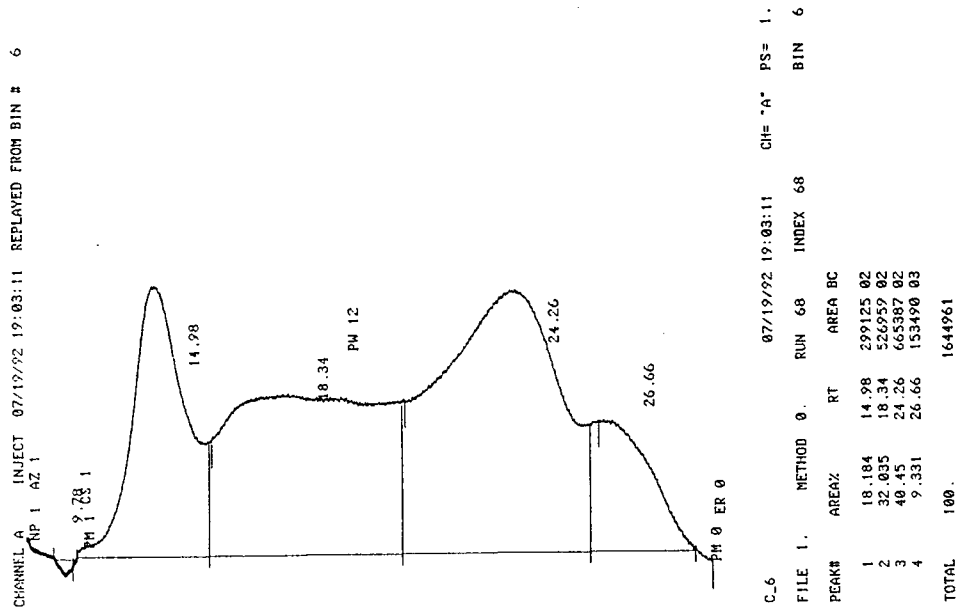


Figura 6. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 6 da Tabela 16

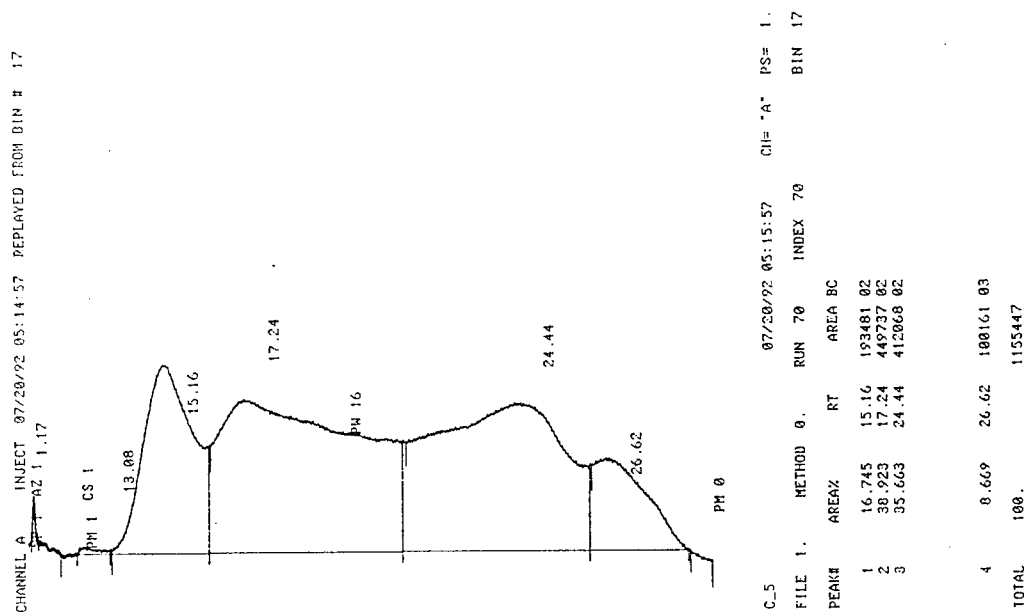


Figura 5. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 5 da Tabela 16

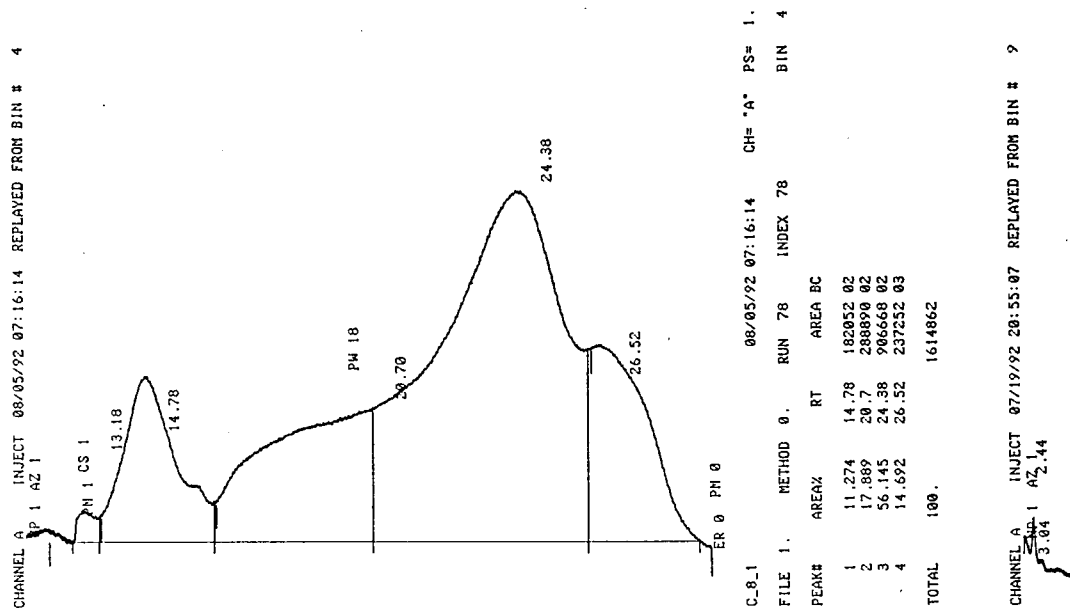


Figura 8. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 8 da Tabela 16

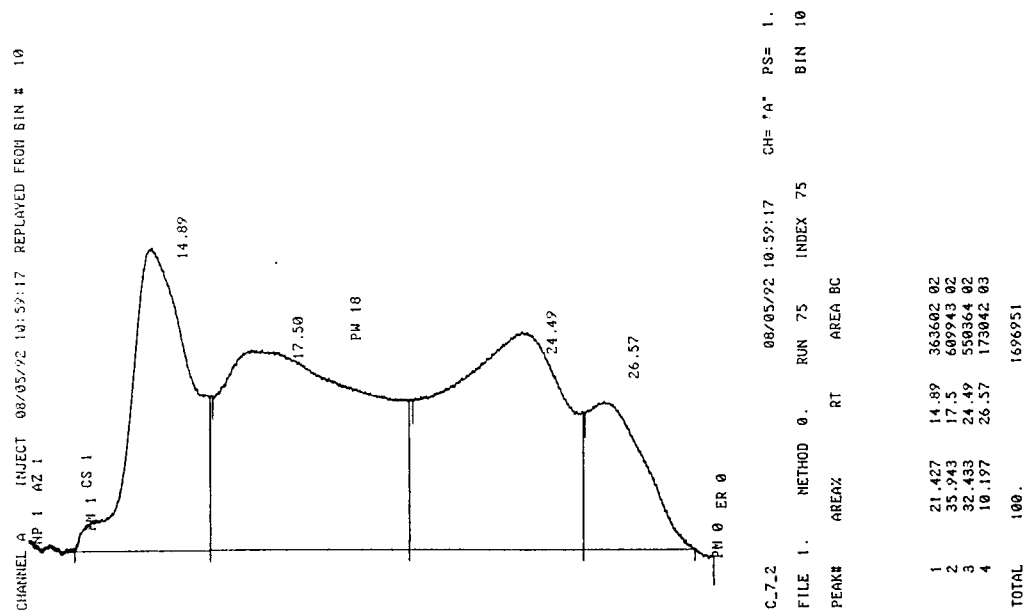


Figura 7. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 7 da Tabela 16

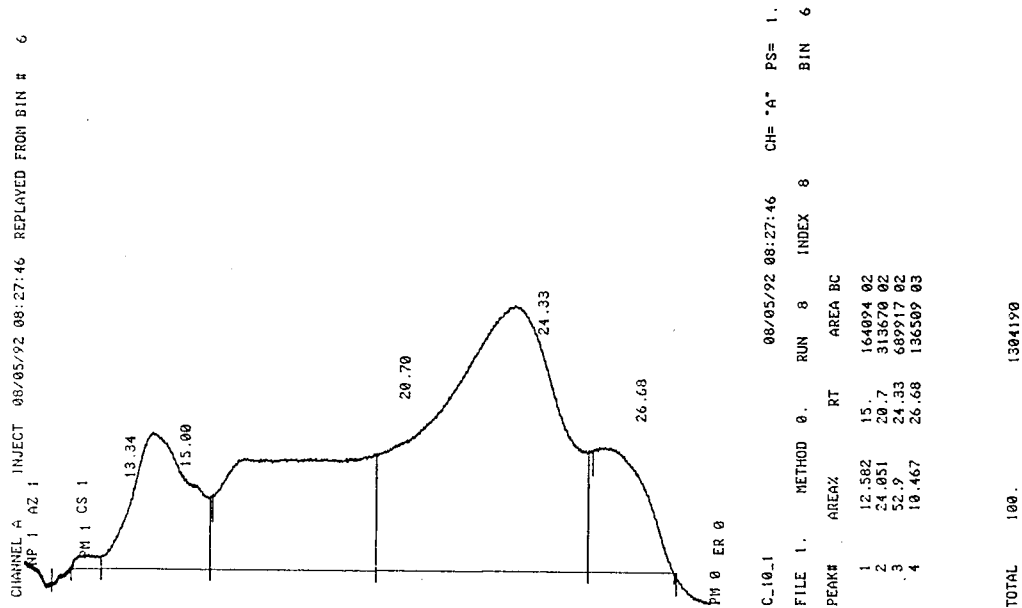


Figura 10. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 10 da Tabela 16

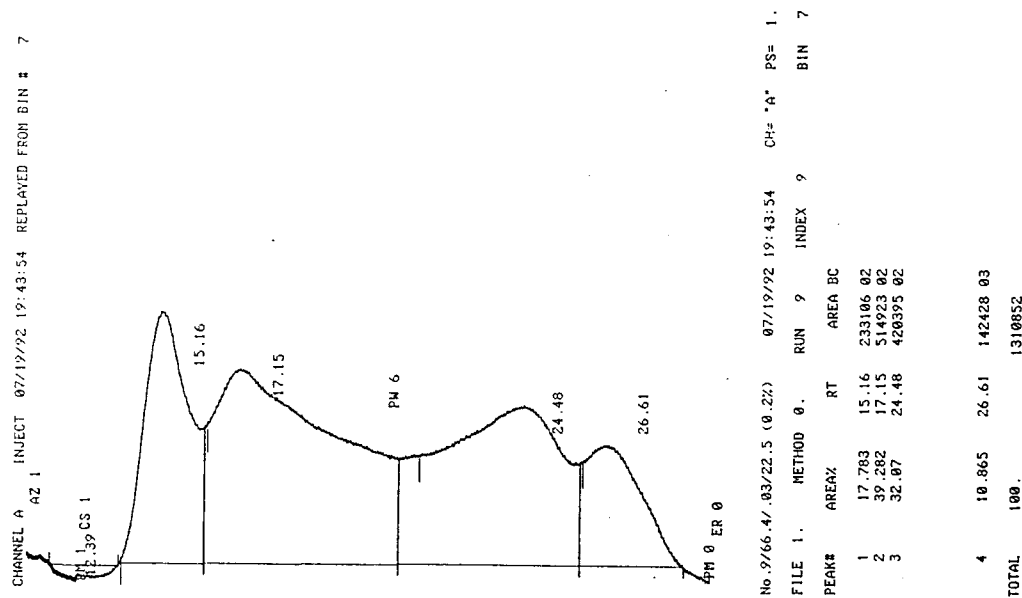


Figura 9. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 9 da Tabela 16

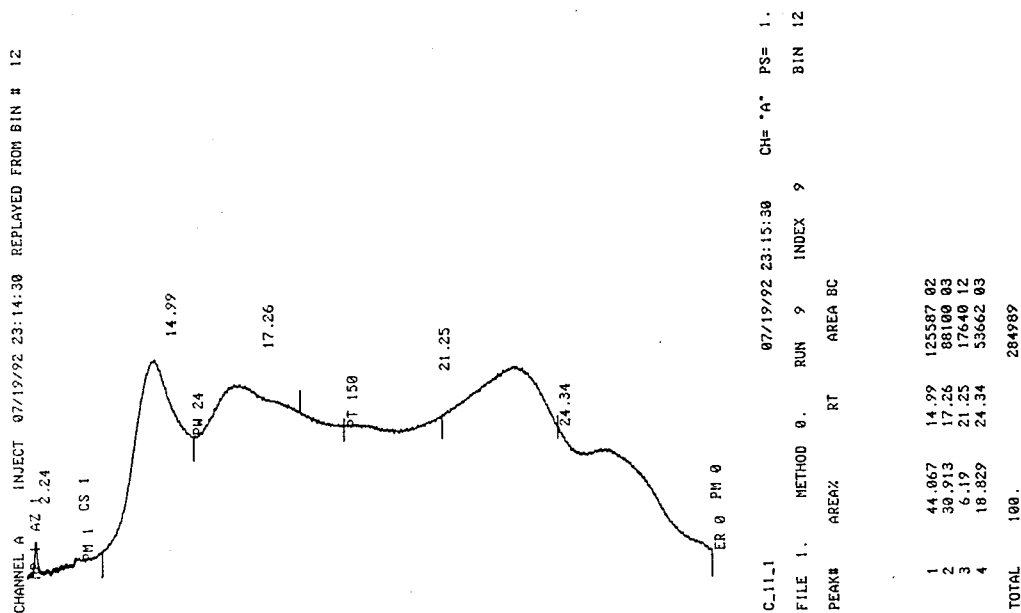


Figura 11. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 11 da Tabela 16

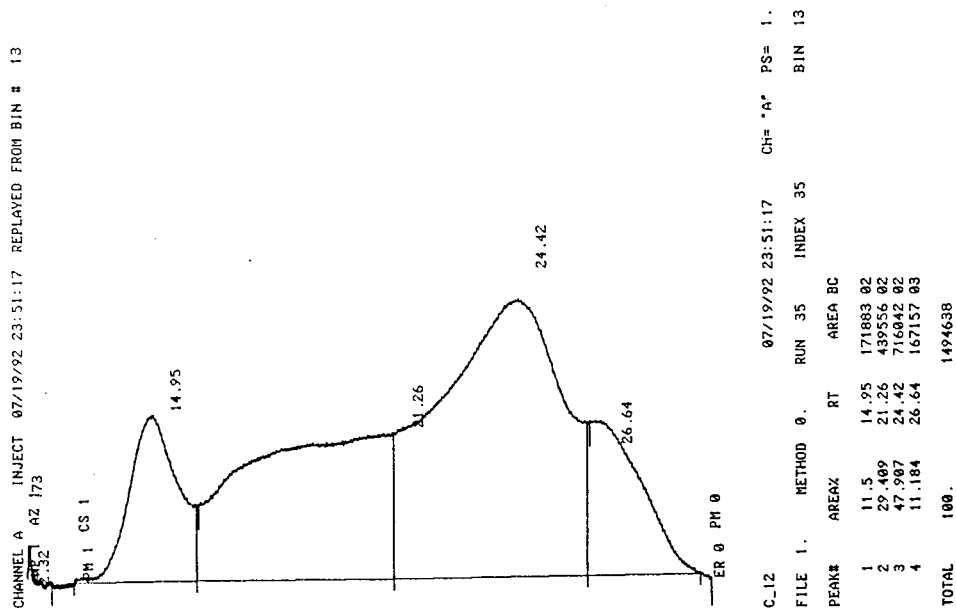
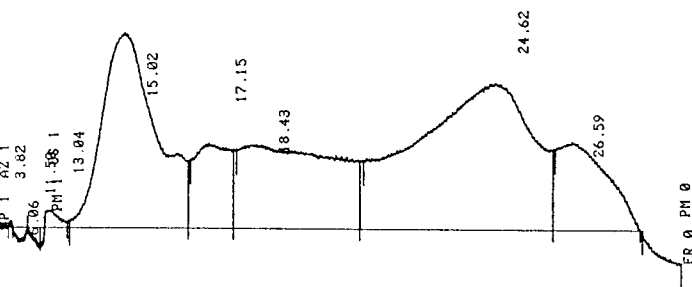


Figura 12. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 12 da Tabela 16

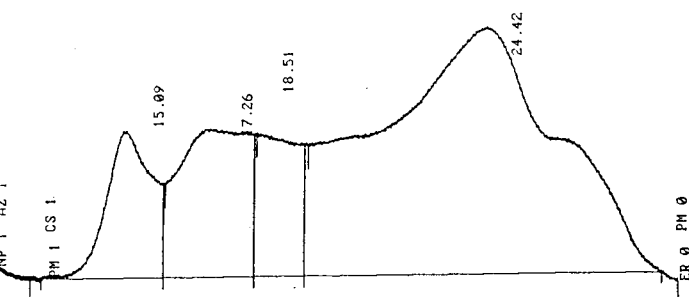
CHANNEL A INJECT 08/06/92 02:45:48 REPLAYED FROM BIN # 13



C_14_1	08/06/92 02:45:48	CH= "A"	PS= 1.
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 62	INDEX 62
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	26.039	15.02	217355 02
2	20.111	18.43	167875 02
3	42.737	24.62	356740 02
4	11.112	26.59	92757 03
TOTAL	100.		834727

Figura 14. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 14 da Tabela 16

CHANNEL A INJECT 07/20/92 00:32:10 REPLAYED FROM BIN # 14



C_13	07/20/92 00:32:10	CH= "A"	PS= 1.
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 49	INDEX 49
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	9.927	15.09	140578 02
2	15.496	17.26	218174 02
3	8.731	18.51	123651 02
4	65.936	24.42	933768 03
TOTAL	100.		1416171

Figura 13. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 13 da Tabela 16

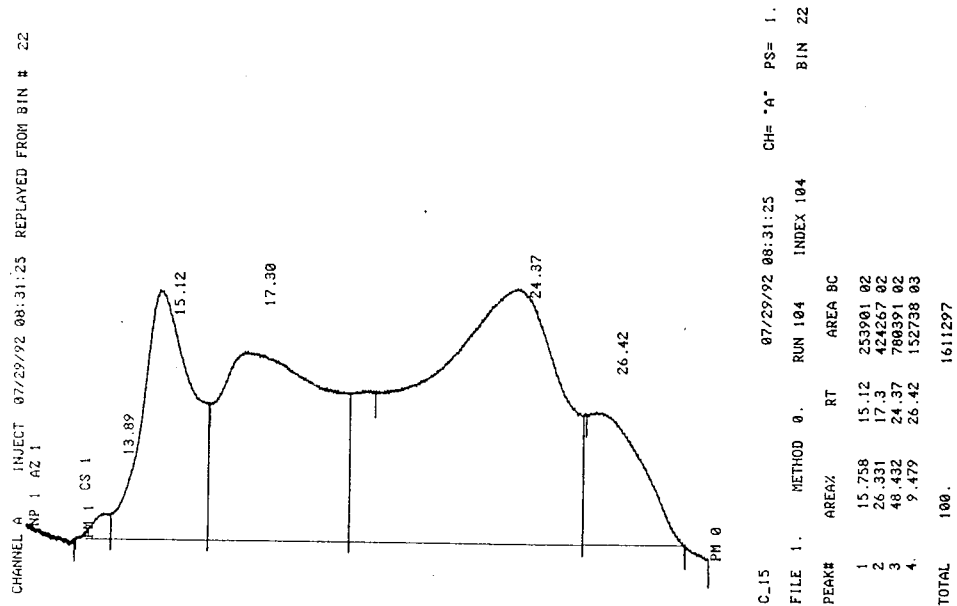


Figura 15. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 15 da Tabela 16

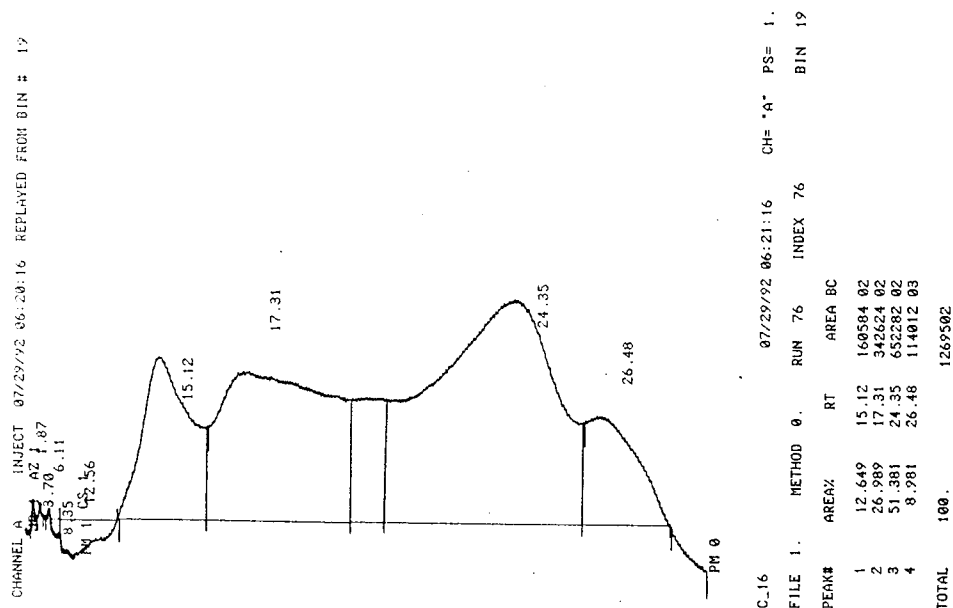


Figura 16. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 16 da Tabela 16

OUT OF PAPER - INSTALL NEW PAPER, ADJUST TO TOP OF PAPER GUIDE.
 PRESS (CTRL-SHIFT-T)

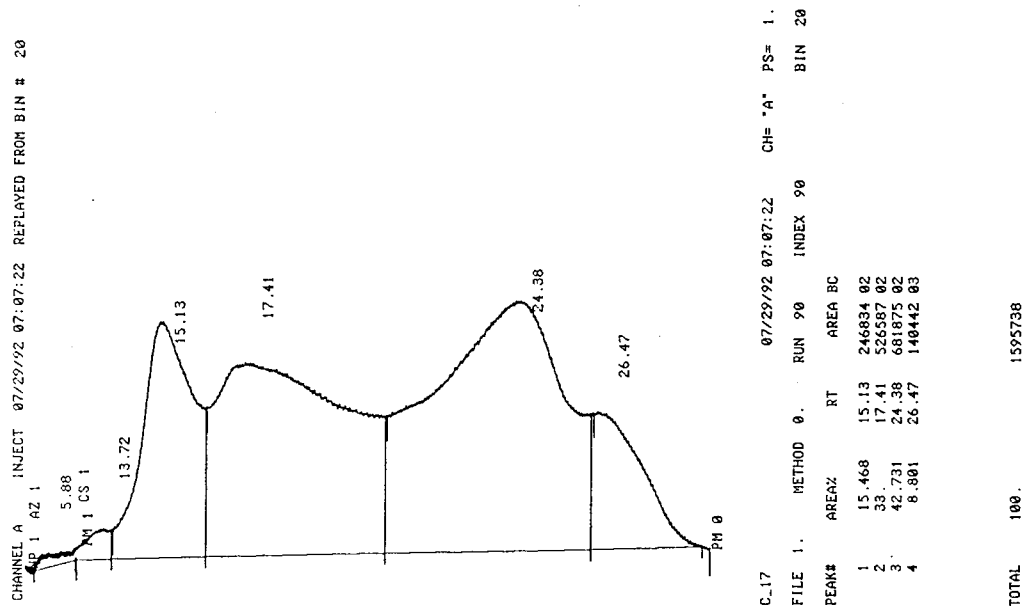


Figura 17. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 17 da Tabela 16

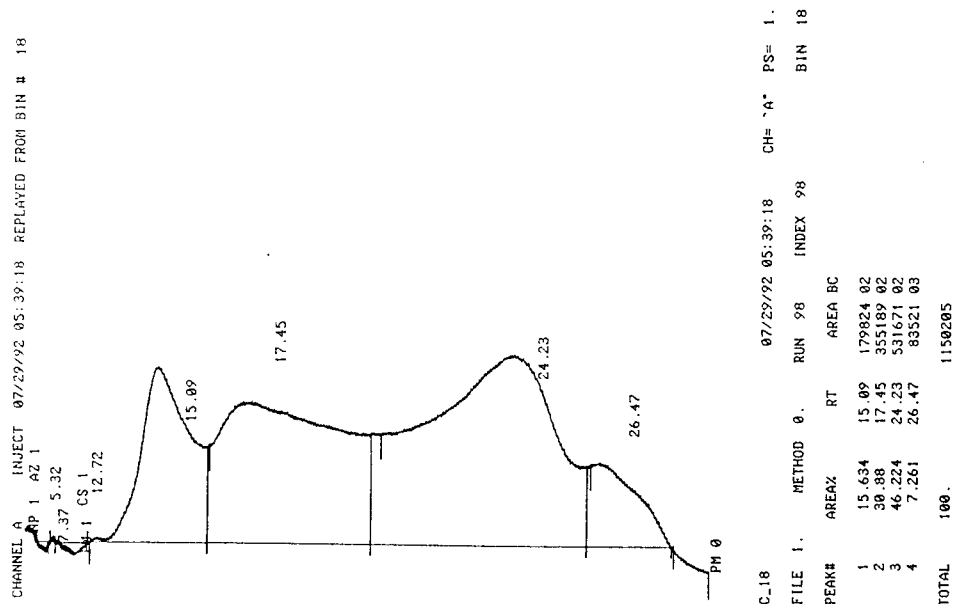


Figura 18. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 18 da Tabela 16

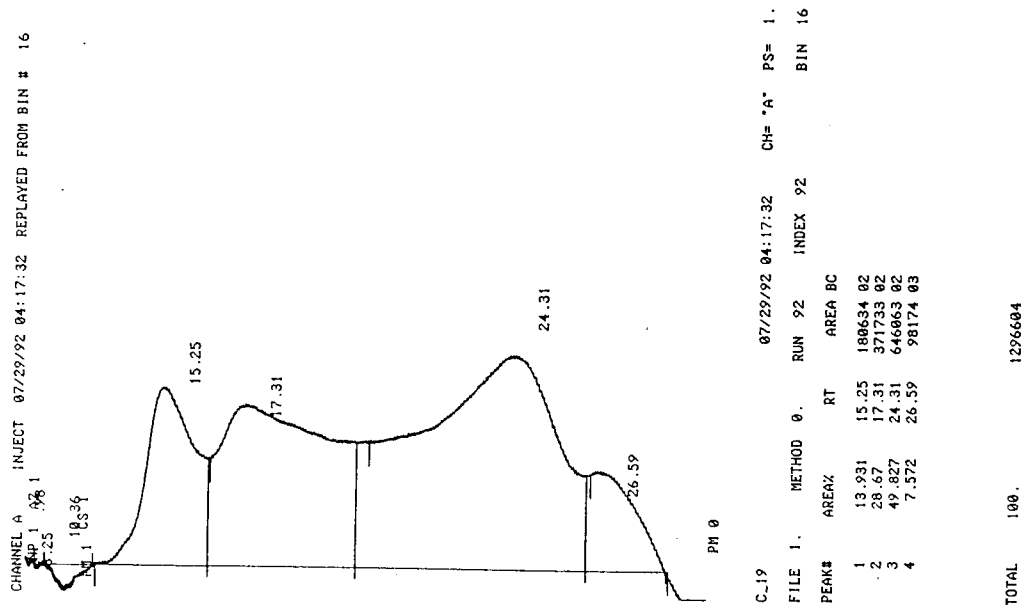


Figura 19. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 19 da Tabela 16

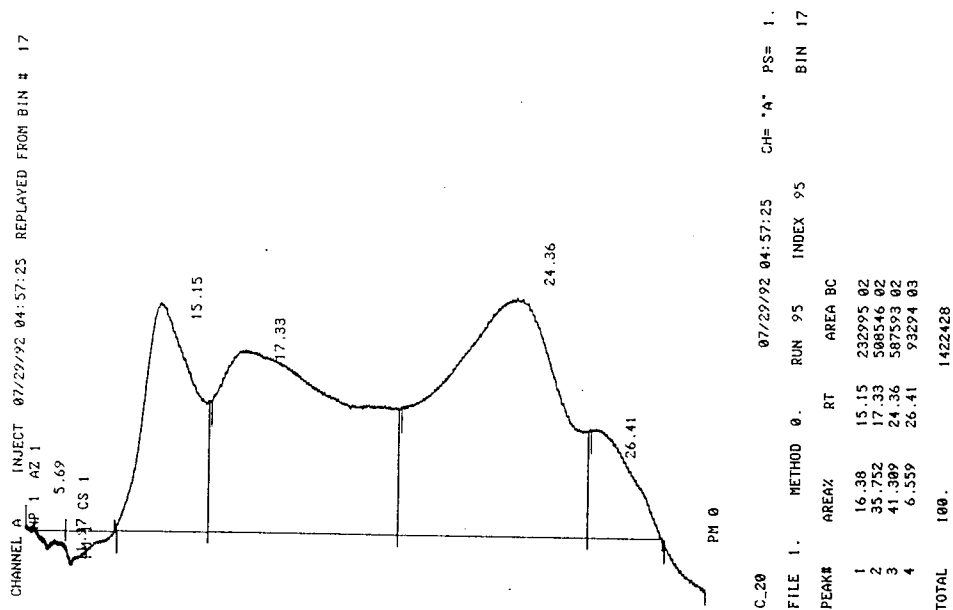


Figura 20. Cromatograma para determinar rendimento correspondente ao experimento 20 da Tabela 16

A N E X O D

CROMATOGRAMAS CORRESPONDENTES A TABELA 16

PARA DETERMINAR PESOS MOLECULARES

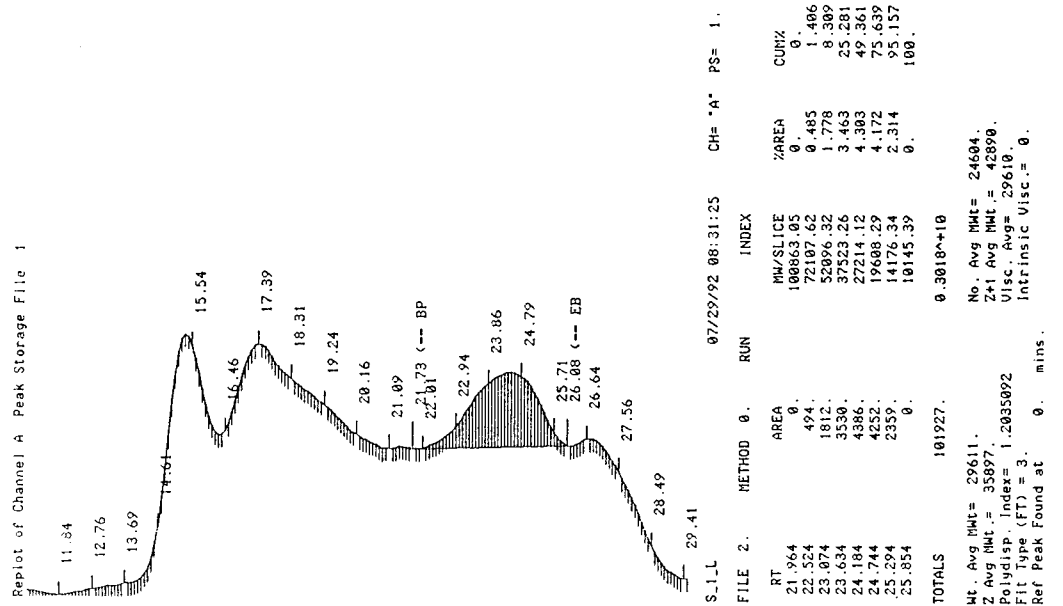


Figura 1. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 1 da Tabela 16

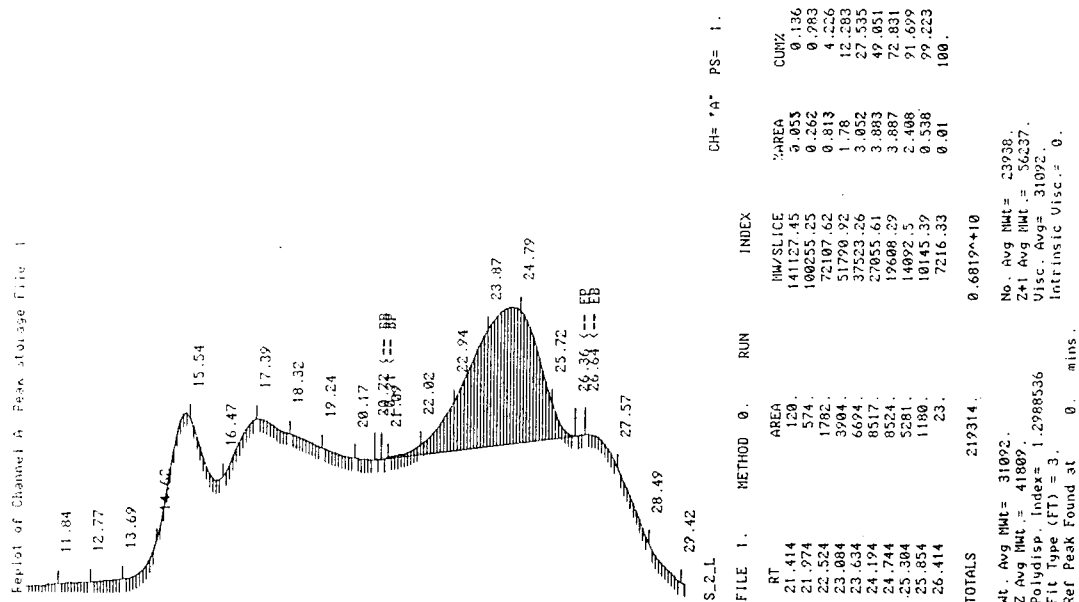


Figura 2. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 2 da Tabela 16

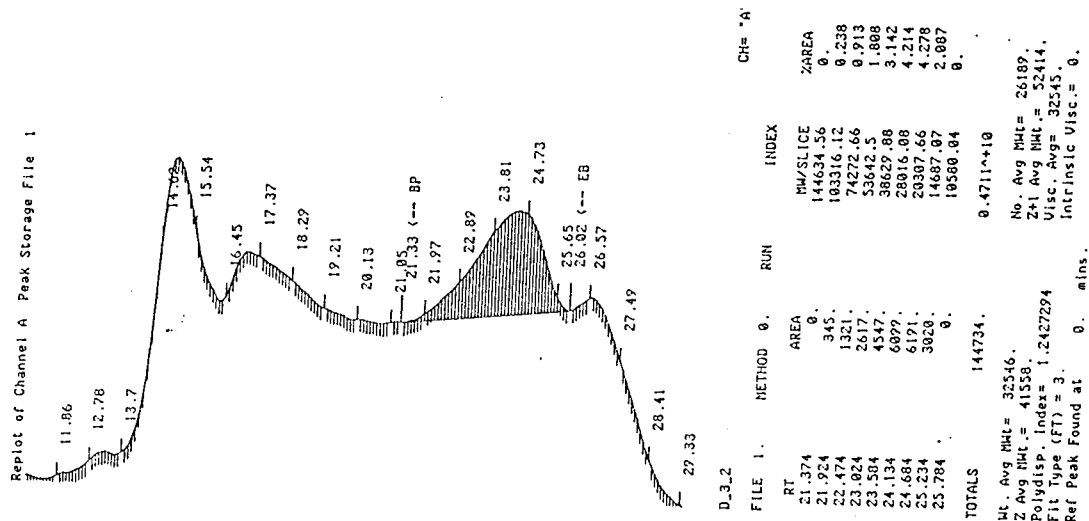


Figura 3. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 3 da Tabela 16

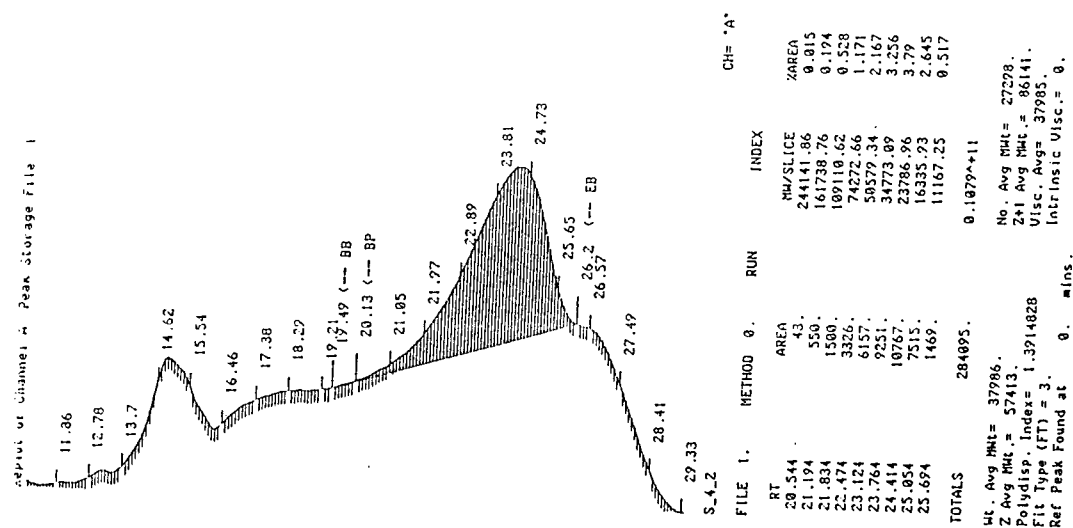


Figura 4. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 4 da Tabela 16

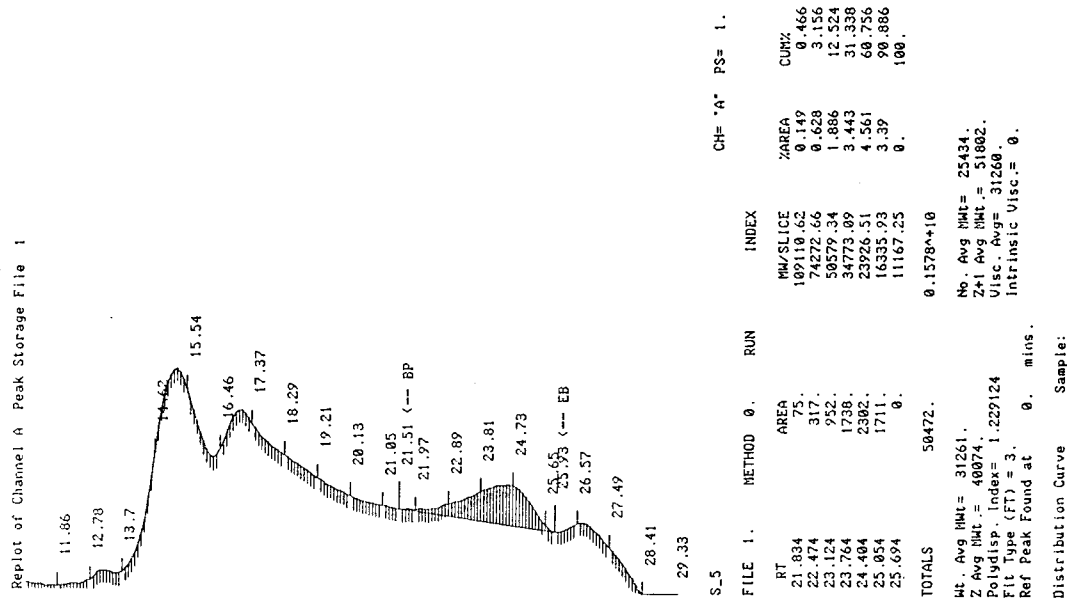


Figura 5. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 5 da Tabela 16

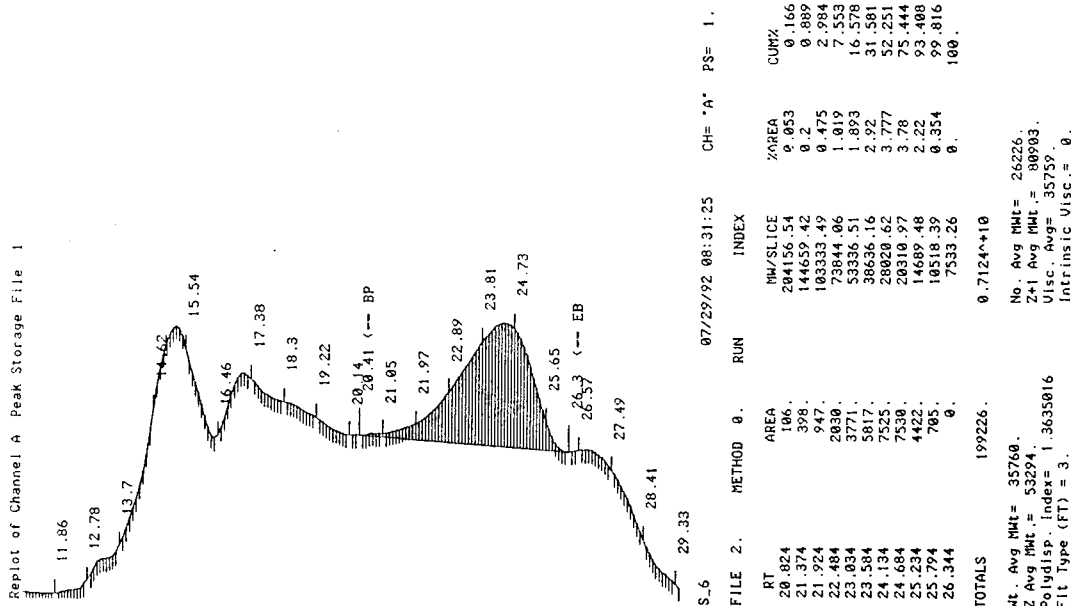
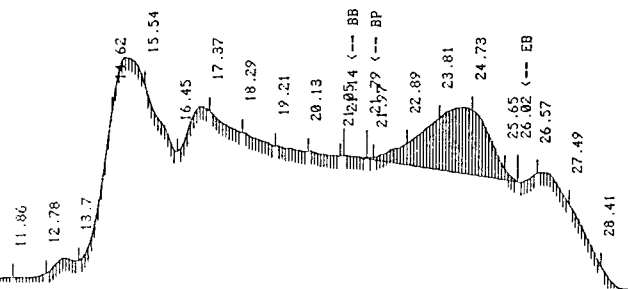


Figura 6. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 6 da Tabela 16

Replot of Channel A Peak Storage File 1



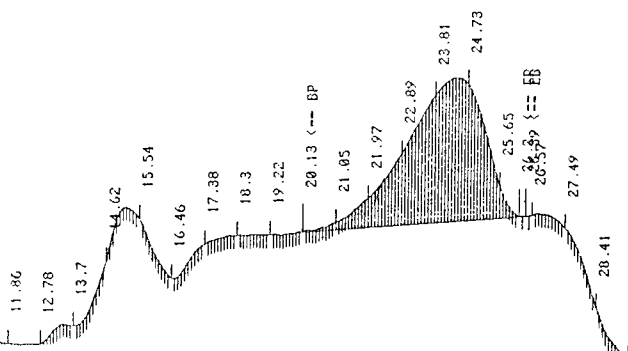
CH= *A* PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX	MM/S/LICE	%AREA	CUM%
RT	AREA					
21.834	116.			109110.62	0.128	0.128
22.474	833.			74272.66	0.953	3.533
23.124	1804.			50579.34	1.958	13.389
23.764	3134.			34773.09	3.471	33.434
24.404	4836.			23926.51	4.471	62.414
25.054	2985.			16335.93	3.216	98.786
25.694	96.			11167.25	0.106	100.
TOTALS	90287.			0.2875**10		

MT. Avg Mwt = 25772.
Z. Avg Mwt = 30377.
Polydisp. Index = 1.235432
Uisc. Avg = 31839.
Intrinsic Visc. = 0.
Fit Type (FT) = 3.
Ref Peak Found at 0. mins.

Figura 9. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 9 da Tabela 16

Replot of Channel A Peak Storage File 1



CH= *A* PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX	MM/S/LICE	%AREA	CUM%
RT	AREA					
20.544	33.			244141.86	0.013	0.018
21.174	521.			161738.76	0.297	0.804
21.834	1619.			109110.62	0.642	3.813
22.484	3163.			73931.85	1.255	10.51
23.124	5615.			50579.34	2.228	22.275
23.764	8056.			34773.09	3.197	42.463
24.414	9868.			23786.96	3.598	66.92
25.054	6653.			16335.93	2.64	89.301
25.694	1447.			11167.25	0.574	99.244
TOTALS	252025.			0.9816**10		

MT. Avg Mwt = 38949.
Z. Avg Mwt = 59544.
Polydisp. Index = 1.4209757
Uisc. Avg = 38948.
Intrinsic Visc. = 0.
Fit Type (FT) = 3.
Ref Peak Found at 0. mins.

Figura 10. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 10 da Tabela 16

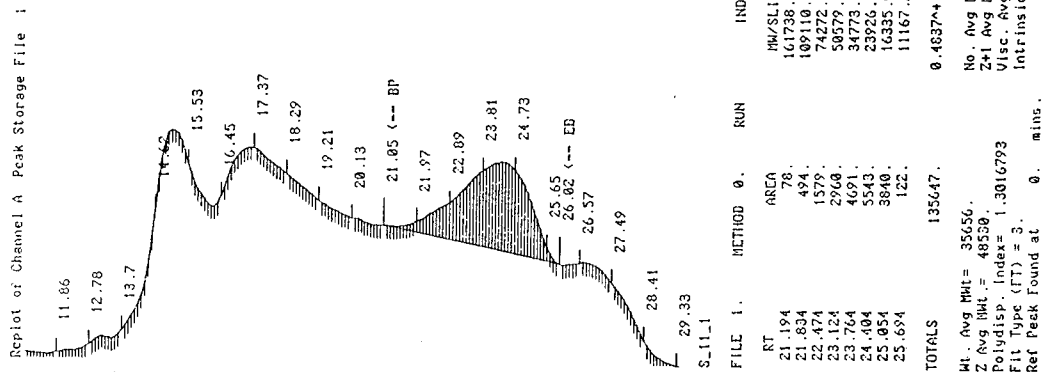


Figura 11. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 11 da Tabela 16

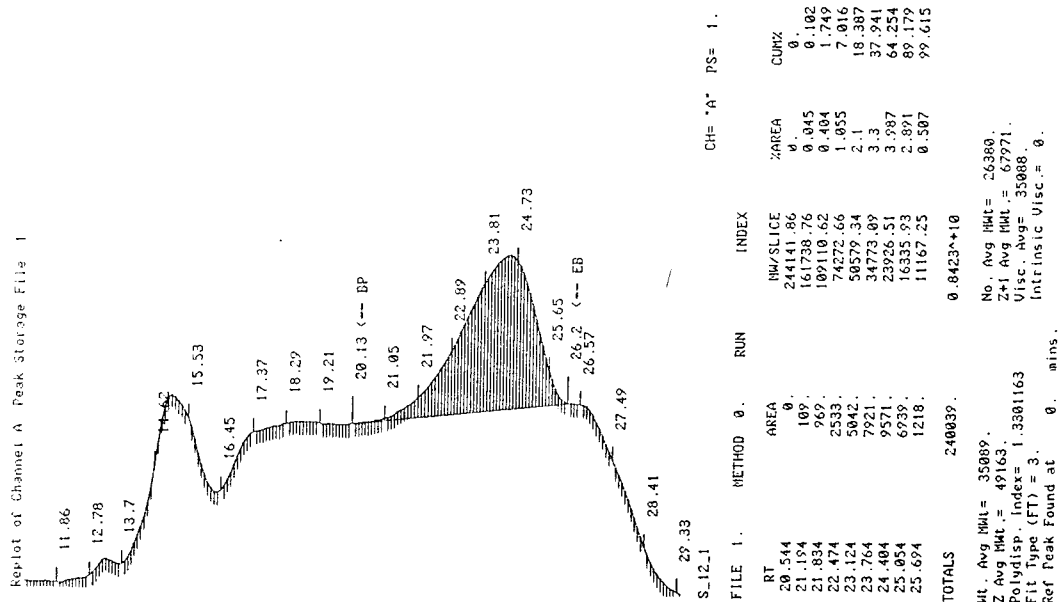


Figura 12. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 12 da Tabela 16

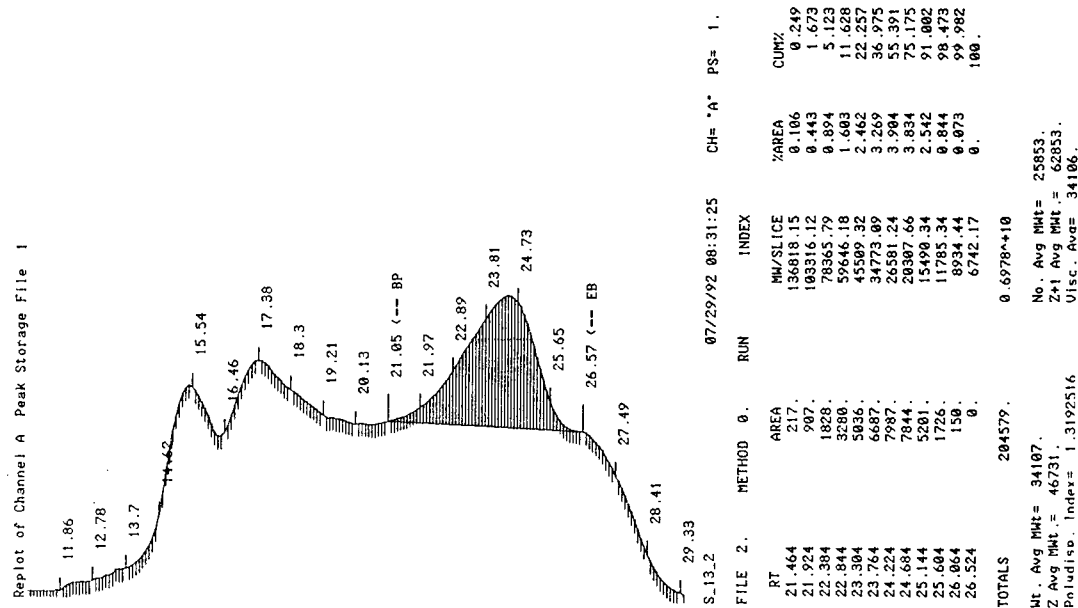


Figura 13. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 13 da Tabela 16

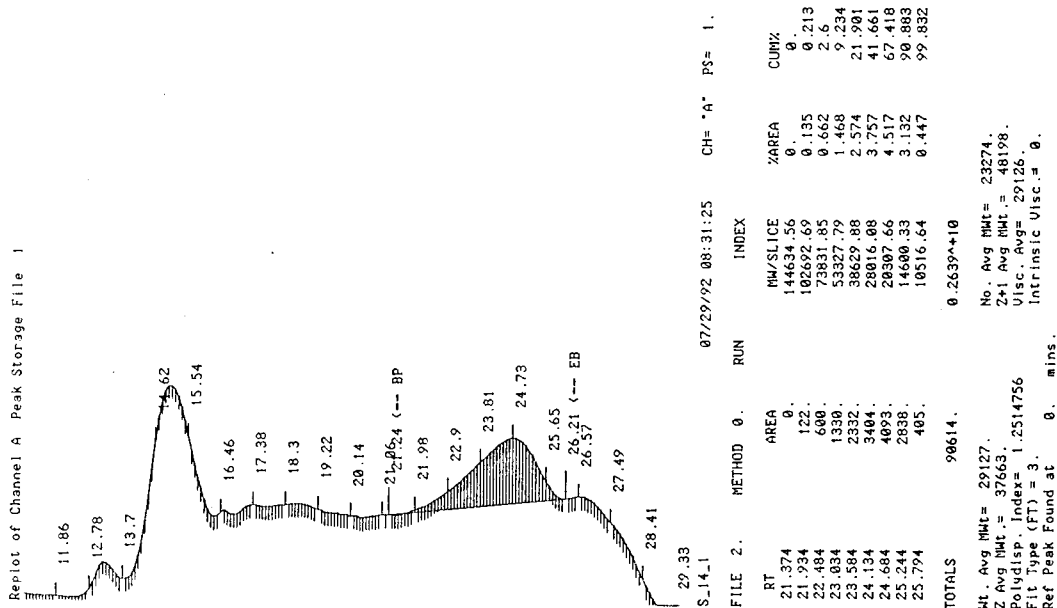
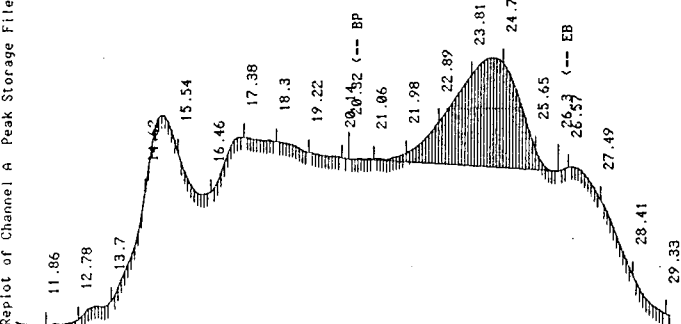


Figura 14. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 14 da Tabela 16

Replot of Channel A Peak Storage File 1



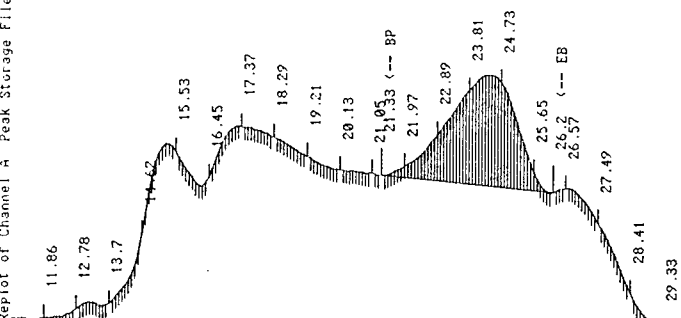
CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX	RT	AREA	HM/Slice	%AREA	CUM%
S_15				20.554	41.	242574.51	0.024	0.02
				21.194	125.	161738.76	0.074	0.38
				21.834	413.	109110.62	0.243	1.27
				22.484	1564.	73831.85	0.921	5.39
				23.124	3569.	58579.34	2.181	16.36
				23.764	5780.	34773.09	3.402	36.40
				24.414	6964.	23786.96	4.899	63.70
				25.054	5018.	16335.93	2.953	89.24
				25.704	785.	11100.51	0.462	99.64
				26.344	0.	7531.97	0.	100.
TOTALS		169987.				0.5765*10		

No. Avg Hmt= 25982.
 2+1 Avg Hmt= 71579.
 Polydisp. Index= 1.3058851
 Fit Type (FT) = 3.
 Ref Peak Found at 0. mins.
 Intrinsic Visc.= 0.

Figura 15. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 15 da Tabela 16

Replot of Channel A Peak Storage File 1



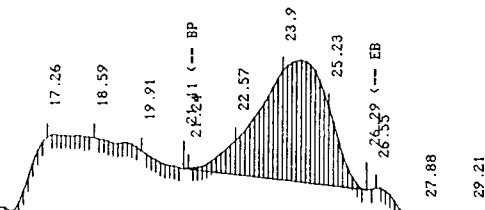
CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX	RT	AREA	HM/Slice	%AREA	CUM%
S_16				21.834	475.	189110.62	0.279	0.691
				22.474	1726.	74272.66	1.014	5.338
				23.124	3772.	58579.34	2.215	17.197
				23.764	5876.	34773.09	3.451	37.697
				24.404	7844.	23926.51	4.137	65.323
				25.054	4785.	16335.93	2.81	90.533
				25.694	638.	11167.25	0.37	99.829
TOTALS		170276.				0.5795*10		

No. Avg Hmt= 26593.
 2+1 Avg Hmt= 57668.
 Polydisp. Index= 1.2796724
 Fit Type (FT) = 3.
 Ref Peak Found at 0. mins.
 Intrinsic Visc.= 0.

Figura 16. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 16 da Tabela 16

Replot of Channel A Peak Storage File 1



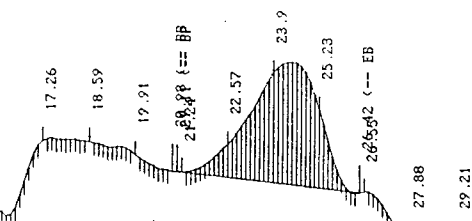
S-19

CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX	%AREA	CUM%
RT	AREA				
21.174	74.		16361.17	0.008	0.008
21.844	781.		16977.57	0.42	0.428
22.594	2781.		17976.97	3.58	4.008
23.164	5636.		4941.94	16.19	16.19
23.834	9548.		33388.26	5.254	21.444
24.494	10419.		22700.65	5.254	26.698
25.164	5533.		15312.02	3.393	30.091
25.824	585.		10531.16	0.168	100.
TOTALS	181739.		0.6143*10		
Mt. Avg Hmt=	33799.		No. Avg Hmt=	26220.	
Z Avg Hmt=	45818.		Z+1 Avg Hmt=	58931.	
Polydisp. Index=	1.2890413		Visc. Avg=	33798.	
Fit type (FT)=	3.		Intrinsic Visc.=	0.	

Figura 19. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 19 da Tabela 16

Replot of Channel A Peak Storage File 1



S-20

CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN	INDEX	%AREA	CUM%
RT	AREA				
21.445	171.		138432.24	0.09	0.184
21.845	866.		108386.14	0.458	0.642
22.235	2018.		85678.58	1.067	1.709
22.635	3370.		67498.2	1.783	3.492
23.035	5221.		53297.3	2.762	6.254
23.435	7340.		42148.68	3.883	10.137
23.835	9771.		33361.19	5.168	15.305
24.235	10008.		26411.38	5.717	21.022
24.625	10596.		21022.85	5.605	26.627
25.025	8172.		16618.05	4.323	30.95
25.425	4015.		13113.16	2.124	33.079
25.825	649.		10322.53	0.343	33.422
26.225	0.		8100.84	0.	100.
TOTALS	189052.		0.6422*10		
Mt. Avg Hmt=	33969.		No. Avg Hmt=	26050.	
Z Avg Hmt=	45972.		Z+1 Avg Hmt=	61277.	
Polydisp. Index=	1.30396		Visc. Avg=	33968.	
Fit type (FT)=	3.		Intrinsic Visc.=	0.	
Ref Peak Found at	0.	mins.			

Figura 20. Cromatograma para determinar peso molecular correspondente ao experimento 20 da Tabela 16

APÊNDICE E
DETERMINAÇÃO DOS MODELOS, EFEITOS
RENDIMENTO E ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Tabela 1. Determinacao do rendimento de dextrana clinica

N	S	DEX/SAC	Wpes	Wteor	Wprec	Rendg	Pc	REND
	g/l		g	g	g	%	%	%
1	80	0.0250	2.4790	0.0956	0.0860	0.8998	0.3409	30.67
2	120	0.0250	2.2660	0.1286	0.1200	0.9334	0.5377	50.19
3	80	0.0350	2.4180	0.0951	0.0870	0.9149	0.3888	35.57
4	120	0.0350	2.4700	0.1429	0.1310	0.9164	0.6957	63.76
5	80	0.0250	2.4780	0.0955	0.0870	0.9106	0.3566	32.47
6	120	0.0250	2.4820	0.1408	0.1330	0.9445	0.4045	38.20
7	80	0.0350	2.4630	0.0969	0.0870	0.8982	0.3243	29.13
8	120	0.0350	2.2550	0.1305	0.1210	0.9272	0.5615	52.06
9	66.4	0.0300	2.4190	0.0786	0.0680	0.8647	0.3207	27.73
10	133.6	0.0300	2.2660	0.1439	0.1350	0.9384	0.5290	49.64
11	100	0.0216	2.4640	0.1171	0.0979	0.8363	0.3553	29.71
12	100	0.0384	2.3240	0.1142	0.1000	0.8760	0.4791	41.97
13	100	0.0300	2.3250	0.1123	0.1037	0.9232	0.4609	42.55
14	100	0.0300	2.3020	0.1112	0.1000	0.8991	0.4274	41.44
15	100	0.0300	2.2850	0.1104	0.0984	0.8909	0.4843	43.15
16	100	0.0300	2.3400	0.1131	0.0968	0.8562	0.5138	43.99
17	100	0.0300	2.1560	0.1042	0.1040	0.9984	0.4273	42.66
18	100	0.0300	2.3430	0.1132	0.1050	0.9276	0.4622	42.87
19	100	0.0300	2.3720	0.1146	0.1020	0.8901	0.4983	44.35
20	100	0.0300	2.3870	0.1153	0.1150	0.9972	0.3914	39.03

Tabela 2. Modelo linear para o rendimento

N	Rexp	Rmod	Desvio	S	R	T
1	30.67	31.88	-1.21	80.0	0.0250	20.00
2	50.19	50.97	-0.78	120.0	0.0250	20.00
3	35.57	39.12	-3.55	80.0	0.0350	20.00
4	63.76	58.22	5.54	120.0	0.0350	20.00
5	32.47	24.80	7.67	80.0	0.0250	25.00
6	38.20	43.89	-5.69	120.0	0.0250	25.00
7	29.13	32.04	-2.91	80.0	0.0350	25.00
8	52.06	51.13	0.93	120.0	0.0350	25.00
S.C.	1080.439	934.4232	146.0154			
	SCT	SCM	SCD			
	g.l	7	3	4		

Regression Output

Constant	3.9038	R = 0.9300
Std Err of Y Est	6.04	
R Squared	0.864855	
No. of Observations	8	
Degrees of Freedom	4	

X Coefficient(s)	0.4773	724.75	-1.42	Fcal	Ftab	
Std Err of Coef.	0.11	427.22	0.85		95%	99%
Fonte de Varia?ao	S.C.	g.l.	C.M.	8.53	6.59	16.69
Regressao	934.42	3	311.47			
Desvios	146.02	4	36.50			
Total	1080.44	7	154.35			

N	Rexp	S	R	SR	T	ST	RT	SRT
1	30.67	-1	-1	1	-1	1	1	-1
2	50.19	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	35.57	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	63.76	1	1	1	-1	-1	-1	-1
5	32.47	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	38.20	1	-1	-1	1	1	-1	-1
7	29.13	-1	1	-1	1	-1	1	-1
8	52.06	1	1	1	1	1	1	1
Soma(+)	204.21	180.52	178.96	151.86	156.50	162.05	170.29	
Soma(-)	127.84	151.53	153.09	180.19	175.55	170.00	161.76	
Efeitos	19.09	7.25	6.47	-7.08	-4.76	-1.99	2.13	
S.C.=(Efec*Efec/8	364.52	52.53	41.83	50.16	22.68	3.95	4.55	
Graus de libertad	1	1	1	1	1	1	1	
Relac.C.M(F)	80.16	11.55	9.20	11.03	4.99	0.87	1.00	
T"	8.95	3.40	3.03	3.32	2.23	0.93	1.00	

Fpref	0.3480	F(95,6,9) = 3.37
		F(99,6,9) = 5.80

Tabela 3. Modelo quadratico para o rendimento

N	Rexp	Rmod	Desvio	S	R	T	S*S	R*R	T*T	S*R	S*T	R*T
1	30.67	30.49	0.18	80.0	0.025	20.0	6400	0.0006	400	2.0	1600	0.50
2	50.19	45.38	4.81	120.0	0.025	20.0	14400	0.0006	400	3.0	2400	0.50
3	35.57	33.28	2.29	80.0	0.035	20.0	6400	0.0012	400	2.8	1600	0.70
4	63.76	61.10	2.66	120.0	0.035	20.0	14400	0.0012	400	4.2	2400	0.70
5	32.47	32.82	-0.35	80.0	0.025	25.0	6400	0.0006	625	2.0	2000	0.63
6	38.20	38.18	0.02	120.0	0.025	25.0	14400	0.0006	625	3.0	3000	0.63
7	29.13	31.63	-2.50	80.0	0.035	25.0	6400	0.0012	625	2.8	2000	0.88
8	52.06	49.92	2.14	120.0	0.035	25.0	14400	0.0012	625	4.2	3000	0.88
9	27.73	26.39	1.34	66.4	0.030	22.5	4409	0.0009	506	2.0	1494	0.68
10	49.64	54.26	-4.62	133.6	0.030	22.5	17849	0.0009	506	4.0	3006	0.68
11	29.71	31.38	-1.67	100.0	0.022	22.5	10000	0.0005	506	2.2	2250	0.49
12	41.97	43.59	-1.62	100.0	0.038	22.5	10000	0.0015	506	3.8	2250	0.86
13	42.55	47.35	-4.80	100.0	0.030	18.3	10000	0.0009	335	3.0	1830	0.55
14	41.44	39.92	1.52	100.0	0.030	26.7	10000	0.0009	713	3.0	2670	0.80
15	43.15	42.58	0.57	100.0	0.030	22.5	10000	0.0009	506	3.0	2250	0.68
16	43.99	42.58	1.41	100.0	0.030	22.5	10000	0.0009	506	3.0	2250	0.68
17	42.66	42.58	0.08	100.0	0.030	22.5	10000	0.0009	506	3.0	2250	0.68
18	42.87	42.58	0.29	100.0	0.030	22.5	10000	0.0009	506	3.0	2250	0.68
19	44.35	42.58	1.77	100.0	0.030	22.5	10000	0.0009	506	3.0	2250	0.68
20	39.03	42.58	-3.55	100.0	0.030	22.5	10000	0.0009	506	3.0	2250	0.68
	1499.1	1380.6	118.5									
S.C	SCT	SCM	SCD									
g.l	19	9	10									

Regression Output:

Constant	-119.2	R = 0.95965
Std Err of Y Est	3.44	
R Squared	0.9209	
No. of Observations	20	
Degrees of Freedom	10	

X Coefficient(s)		0.9152	3616	3.56	-0.0020	-72240	0.060	32.34	-0.0476	-79.5	
Std Err of Coef.		0.8011	3327.0	7.6	0.0023	36333.0	0.145	12.2	0.0	97.4	
% R		a	S	R	T	S*S	R*R	T*T	S*R	S*T	R*T
66.4	-67.2		5763	0.40		-72240	0.060				-79.5
100	-47.6		6850	-1.20		-72240	0.060				-79.5
133,6	-32.5		7937	-2.80		-72240	0.060				-79.5
0.0216		-74.8	1.61		1.85	-0.002		0.060		-0.0476	
0.03		-75.7	1.89		1.18	-0.002		0.060		-0.0476	
0.0384		-86.9	2.16		0.51	-0.002		0.060		-0.0476	
18.3		-33.9	0.04	2161		-0.002	-72240		32.34		
22,5		-8.7	-0.16	1827		-0.002	-72240		32.34		
26,7		18.7	-0.36	1494		-0.002	-72240		32.34		

An lises de Varianci

			F exp		F Tab	
Fonte de Varia?ao	S.C.	g.l.	C.M.		95%	99%
Regresion	1380.6	9	153.396	12.9423	3.02	4.94
Desvios	118.52	10	11.8523			
Total	1499.1	19	78.8993			

Tabela 4. Modelo Linear para pesos moleculares

N	PMexp	PMmod	Desvios	S	R	T
1	29611	30322	-711	80	0.025	20
2	31092	33595	-2503	120	0.025	20
3	32546	32023	523	80	0.035	20
4	37986	35296	2690	120	0.035	20
5	31261	30267	994	80	0.025	25
6	35760	33540	2220	120	0.025	25
7	31162	31968	-806	80	0.035	25
8	32834	35241	-2407	120	0.035	25
	53857680	27217800	26639880			
S.C.	SCM	SCM	SCD			
g.l.	7	3	4			

Regression Output:

Constant	19741
Std Err of Y Est	2581
R Squared	0.5054
No. of Observations	8.0000
Degrees of Freedom	4
X Coefficient(s)	81.825 170100 -10.9
Std Err of Coef.	45.6 182482 365.0

Analise de Variancia

Fonte de Variacao	S.C.	g.l.	C.M.	F Cal	F Tab	
					95%	99%
Regressao	27217800	3	9072600.2	1.36	3.02	4.94
Desvios	26639880	4	6659969.9			
Total	53857680	7	7693954.3			

Calculo dos Efeitos

N	PMexp	S	R	SR	T	ST	RT	ABC
1	29611	-1	-1	1	-1	1	1	-1
2	31092	1	-1	1	-1	0	1	0
3	32546	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	37986	1	1	1	-1	-1	-1	-1
5	31261	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	35760	1	-1	-1	1	1	-1	-1
7	31162	-1	1	-1	1	-1	1	-1
8	32834	1	1	1	1	1	1	1
Soma(+)		137672	134528	131692	131017	130751	124699	127733
Soma(-)		124580	127724	130560	131235	131501	137553	134519
Efeitos		3273	1701	283	-55	-188	-3214	-1697
S.C.=(Effect /8)		1339066	361675	10011	371	4.39E+03	1290823	359764
graus de liberdade		1	1	1	1	1	1	
Relac.C.M.(F)		3.7221	1.0053	0.0278	0.0010	1.22E-02	3.59	
"T" =====>		1.9293	1.0027	0.1668	3.2E-02	1.11E-01	1.89	

S.C = Soma dos quadrados

MC = Media da soma dos quadrados

SCM = Soma dos quadrados do modelo cerregido

g.l = graus de liberdade

SCT = Soma dos quadrados do modelo t

SCD = Soma dos quadrados dos desvios

Tabela 5. Modelo Quadrático para pesos moleculares

N	PMexp	PMmod	Desvios	S	R	T	S*S	R*R	T*T	S*R	S*T	R*T	
1	29611	30129	-518	80.0	0.0250	20.00	6400	0.0006	400	2.00	1600	0.50	
2	31092	33703	-2611	120.0	0.0250	20.00	14400	0.0006	400	3.00	2400	0.50	
3	32546	33917	-1371	80.0	0.0350	20.00	6400	0.0012	400	2.80	1600	0.70	
4	37986	38057	-71	120.0	0.0350	20.00	14400	0.0012	400	4.20	2400	0.70	
5	31261	32271	-1010	80.0	0.0250	25.00	6400	0.0006	625	2.00	2000	0.63	
6	35760	35470	290	120.0	0.0250	25.00	14400	0.0006	625	3.00	3000	0.63	
7	31162	29632	1530	80.0	0.0350	25.00	6400	0.0012	625	2.80	2000	0.88	
8	32834	33398	-564	120.0	0.0350	25.00	14400	0.0012	625	4.20	3000	0.88	
9	31840	31546	294	66.4	0.0300	22.50	4409	0.0009	506	1.99	1494	0.68	
10	38949	37711	1238	133.6	0.0300	22.50	17849	0.0009	506	4.01	3006	0.68	
11	35656	33886	1770	100.0	0.0216	22.50	10000	0.0005	506	2.16	2250	0.49	
12	35089	35327	-238	100.0	0.0384	22.50	10000	0.0015	506	3.84	2250	0.86	
13	34107	31908	2199	100.0	0.0300	18.30	10000	0.0009	335	3.00	1830	0.55	
14	29127	29794	-667	100.0	0.0300	26.70	10000	0.0009	713	3.00	2670	0.80	
15	33929	33995	-66	100.0	0.0300	22.50	10000	0.0009	506	3.00	2250	0.68	
16	34031	33995	36	100.0	0.0300	22.50	10000	0.0009	506	3.00	2250	0.68	
17	33233	33995	-762	100.0	0.0300	22.50	10000	0.0009	506	3.00	2250	0.68	
18	34739	33995	744	100.0	0.0300	22.50	10000	0.0009	506	3.00	2250	0.68	
19	33799	33995	-196	100.0	0.0300	22.50	10000	0.0009	506	3.00	2250	0.68	
20	33969	33995	-26	100.0	0.0300	22.50	10000	0.0009	506	3.00	2250	0.68	
SC	1.19E+08	9.5E+07	2.4E+07										
	SCT	SCM	SCD										
	g.l.	19	9	10									
Regression Output:													
Constant			-135668										
Std Err of Y Est			1549										
R Squared			0.799104										
No. of Observations			20										
Degrees of Freedom			10										
X Coefficient(s)	-21	2316810	11814	0.56	8660133	-178	1415	-1.87	-128540				
Std Err of Coef.	360	1497053	3408	1.02	16348913	65	5477	10.95	43816				
PM	a	S	R	T	S*S	R*R	T*T	S*R	S*T	R*T			
66.4	-134569		2410766	11689		8660133	-178				-128540		
100	-132128		2458310	11626		8660133	-178				-128540		
133.6	-128421		2505854	11563		8660133	-178				-128540		
0.022	-81585	10		9037	0.56		-178		-1.87				
0.03	-58370	22		7957	0.56		-178		-1.87				
0.038	-33933	34		6878	0.56		-178		-1.87				
18.3	20824	-55	-35472		0.56	8660133		1415					
22.5	39895	-63	-575340		0.56	8660133		1415					
26.7	52677	-71	-1115208		0.56	8660133		1415					
Analise de Variancia				R = 0.893926				Fcal		Ftab			
Fonte de Variaçao				SC	g.l.	CM			95 %	99 %			
Regressao				95457406	9	10606378	4.419674	3.02	4.94				
Desvios				23998102	10	2399810							
Total				119455508	19								