Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

Laboratório de Engenharia de Bioprocessos

SEPARAÇÃO DE GLICOSE, FRUTOSE, OLIGOSSACARÍDEOS E DEXTRANAS UTILIZANDO ZEÓLITAS

Autor: Carlos André Veiga Burkert

Engenheiro Químico, FURG, 1991

Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Carlos André Veiga Burkert** aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de maio de 2003.

Campinas, 05 de maio de 2003.

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Campinas – SP

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
B917s
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 54524
PROC. 16.124/03
C ☐ D ☒
PREÇO R$ 11,00
DATA 02/07/03
Nº CPD ____

CM00189595-6
bibid 300871

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

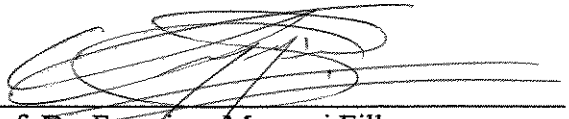
B917s

Burkert, Carlos André Veiga
Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas / Carlos André Veiga Burkert. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

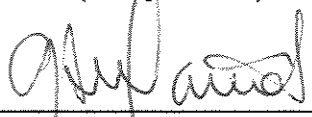
1.Frutose. 2.Dextranas. 3.Oligossacarídeos. 4.Zeólitas. I.Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador
(FEA/DEA/UNICAMP)

Profa. Dra. Beatriz Vahan Kilikian
Membro
(DEQ/EPUSP)



Profa. Dra. Gabriela Alves Macêdo
Membro
(FEA/DCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
Membro
(FEQ/DPQ/UNICAMP)

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco
Membro
(FEQ/DPQ/UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Membro
(FEA/DEA/UNICAMP)

Prof. Dr. César Costapinto Santana
Membro
(FEQ/DPB/UNICAMP)

00222229

DEDICATÓRIA

À Janaína
Foi difícil...Mas conseguimos!!!
Obrigado por tudo o que você é!

Aos meus pais, Fernando e Jocelina
Obrigado pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- *Ao Mestre Jesus e à espiritualidade amiga. Obrigado por fazerem-me redescobrir a fé.*

- *Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pela orientação segura, amizade, confiança e apoio durante todos estes anos. Os bons exemplos sempre ficam registrados em nossos corações.*

- *À Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, sempre trazendo harmonia ao nosso laboratório. Obrigado pela força e palavras amigas.*

- *À Banca Examinadora, pela atenção, sugestões e correções.*

- *À CAPES, pelo apoio financeiro.*

- *À Fundação Universidade Federal do Rio Grande, por ter possibilitado meu afastamento no período de realização do curso.*

- *À Profa. Dra. Nádia Machado, da Universidade Estadual de Maringá, pelos esclarecimentos e auxílio no início deste trabalho.*

- *A Bayer do Brasil S. A., pelo fornecimento da zeólita.*

- *À minha irmã Rozania e minha sobrinha Fernanda. Obrigado pelo apoio e carinho.*

- *À minha família natalense (a turma toda). Sempre atenciosos e carinhosos. Conto os dias para voltar a Cajueiro!*

- *Aos casais de amigos Flávio e Kity, Enilene e Freiria, Alessandra e Mauro. Sem vocês não teria chegado aqui. Sejam felizes! Isso é o que importa.*

- *À Susana e ao Medeiros, pela amizade que sempre foi possível contar. E ao Bruninho também, pelo convívio tão alegre com os titios.*

- *Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos: Bernardo, Daniel, Eliana, Fernanda, Fifa, Helen, Keli, Lia, Luciano, Marcio, Saartje, Thiany e Yemiko. Os momentos compartilhados com vocês são boas lembranças que levo de Campinas.*

- *Aos amigos da Casinha. Tanto carinho...Tanto amor...Que Deus ilumine a todos...*

- *Ao Reinaldo, que ajudou bastante no primeiro ano de laboratório.*

- *À Dona Maria, Seu Aparecido, Edinho e Cosme, apoios sempre importantes.*

- *Aos colegas, funcionários e professores da FEA/UNICAMP.*

SUMÁRIO

Nomenclatura xii

Resumo xv

Abstract xvii

Capítulo 1 – Introdução 1

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica 6

2.1. Monossacarídeos e Oligossacarídeos 7

2.1.1. Aspectos Gerais 7

2.1.2. Frutose 8

2.1.3. Glicose 12

2.1.4. Oligossacarídeos 13

2.2. Dextranas 16

2.3. Produção de Oligossacarídeos e Dextranas 18

2.3.1. Aspectos Gerais 18

2.3.2. Transglicosilases 18

2.3.3. Enzima Dextrana-Sacarase 19

2.3.3.1. Características da Enzima Dextrana-Sacarase 19

2.3.3.2. Produção da Enzima Dextrana-Sacarase 22

2.3.4. Síntese Enzimática de Oligossacarídeos e Dextranas 23

2.4. Zeólitas 28

2.4.1. Definição 28

2.4.2. Histórico 30

2.4.3. Aspectos Estruturais 30

2.4.4. Zeólitas X e Y 34

2.5. Separação de Açúcares por Adsorção 35

2.5.1. Teoria da Adsorção 35

2.5.1.1. Isotermas de Adsorção 35
2.5.1.2. Operação em Leito Fixo 37
2.5.2. Mecanismos Envolvidos na Adsorção de Açúcares por Zeólitas 38
2.5.2.1. Zeólitas como Peneiras Moleculares 38
2.5.2.2. Interações entre Cátions e Açúcares 38
2.5.3. Separação de Açúcares 40
2.6. Comentários 51

Capítulo 3 – Material e Métodos 52
3.1. Material 54
3.1.1. Microrganismo 54
3.1.2. Zeólita 54
3.1.3. Reagentes 54
3.2. Métodos 54
3.2.1. Troca Iônica da Zeólita 54
3.2.2. Testes Preliminares para Seleção de Uma Zeólita Adequada à Adsorção de Frutose 55
3.2.3. Caracterização da Zeólita Selecionada 55
3.2.4. Determinação das Isotermas de Adsorção de Frutose e Glicose em Banho Finito 56
3.2.5. Aspectos Cinéticos da Adsorção em Banho Finito 57
3.2.6. Ensaios Preliminares em Coluna de Leito Fixo 58
3.2.6.1. Montagem Experimental para Estudos de Adsorção em Leito Fixo 58
3.2.6.2. Determinação das Curvas de Ruptura 59
3.2.6.3. Análise de Respostas a Pulsos Cromatográficos 59
3.2.7. Caracterização do Leito de Partículas 60
3.2.7.1. Determinação da Porosidade do Leito 60
3.2.7.2. Determinação do Tamanho Médio das Partículas 61
3.2.7.3. Composição da Zeólita Trocada 61
3.2.8. Análise de Sensibilidade de Parâmetros na Separação de Glicose-Frutose e Dextrana-Frutose 62

3.2.9. Produção da Enzima Dextrana-Sacarase 63
3.2.9.1. Manutenção do Microrganismo 63
3.2.9.2. Produção da Enzima 63
3.2.10. Reações Enzimáticas com a Enzima Dextrana-Sacarase 65
3.2.11. Separação dos Produtos da Reação Enzimática 66
3.2.12. Determinação dos Coeficientes de Partição e Parâmetros de Transporte em Coluna de Leito Fixo 66
3.2.13. Métodos Analíticos 67
3.2.13.1. Determinação da Atividade de Dextrana-Sacarase 67
3.2.13.2. Determinação de Açúcares Redutores pelo Método 3,5 DNS (Miller, 1959) 68
3.2.13.3. Determinação de Açúcares Redutores pelo Método de Somogyi-Nelson (Reguly, 1983) 68
3.2.13.4. Análise de Frutose e Glicose por CLAE 69
3.2.13.5. Análise do Peso Molecular por Cromatografia de Permeação em Gel 70
3.2.13.6. Quantificação de Oligossacarídeos e Dextranas por CLAE 72

Capítulo 4 - Resultados e Discussões 73
4.1. Testes Preliminares para Seleção de Uma Zeólita Adequada à Adsorção de Frutose 74
4.1.1. Testes dos Métodos Analíticos 74
4.1.2. Testes Iniciais para Escolha da Zeólita e Metodologia para os Experimentos em Banho Finito 75
4.2. Caracterização da Zeólita Baylith WE894 76
4.3. Isotermas de Adsorção em Banho Finito 80
4.3.1. Modelos de Adsorção 80
4.3.2. Considerando o Modelo Linear 83
4.3.3. Considerações sobre os Mecanismos de Adsorção 89
4.4. Aspectos da Cinética de Adsorção 90
4.5. Ensaios Preliminares em Coluna de Leito Fixo 91
4.5.1. Curvas de Ruptura 91

4.5.2. Análise de Respostas a Pulsos Cromatográficos 93
4.6. Caracterização do Leito 95
4.6.1. Determinação da Porosidade do Leito 95
4.6.2. Determinação do Tamanho Médio das Partículas 100
4.6.3. Composição da Zeólita Trocada 101
4.7. Análise de Sensibilidade 101
4.7.1. Fatores de Sensibilidade dos Parâmetros da Coluna na Separação Glicose-Frutose 102
4.7.2. Fatores de Sensibilidade dos Parâmetros da Coluna na Separação Dextrana-Frutose 108
4.8. Síntese Enzimática 114
4.8.1. Síntese Sem a Presença de Aceptor 114
4.8.2. Síntese na Presença do Aceptor Maltose 116
4.8.3. Síntese na Presença do Aceptor Glicose 118
4.9. Separação dos Produtos de Síntese 119
4.9.1. Separação dos Produtos da Reação sem Aceptor 119
4.9.2. Separação dos Produtos da Reação com Aceptor Maltose 123
4.9.3. Separação dos Produtos da Reação com Aceptor Glicose 125
4.9.4. Comentário Sobre a Separação dos Produtos de Síntese 126
4.10. Parâmetros de Equilíbrio e Transporte na Coluna 127
4.10.1. Modelagem Matemática de Uma Coluna Submetida a um Pulso Cromatográfico 127
4.10.2. Determinação dos Coeficientes de Partição 130
4.10.2.1. Coeficiente de Partição da Frutose 130
4.10.2.2. Coeficiente de Partição da Glicose 133
4.10.2.3. Coeficiente de Partição da Dextrana 9300 135
4.10.3. Parâmetros de Transporte 137
4.10.3.1. Cálculo da Difusividade Efetiva e Dispersão Axial para Frutose 137
4.10.3.2. Cálculo da Difusividade Efetiva e Dispersão Axial para Glicose 138
4.10.3.3. Cálculo da Difusividade Efetiva e Dispersão Axial para Dextrana 9300 139

4.10.4. Comentário Sobre a Determinação dos Parâmetros de Equilíbrio e Transporte da Coluna 140

Capítulo 5 – Conclusões 141

Capítulo 6 – Sugestões e Recomendações 145

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas 147

NOMENCLATURA

C - concentração do soluto em solução na alimentação (ML^{-3})

C_0 - concentração do soluto na alimentação (ML^{-3})

C_m – concentração do soluto na fase móvel (ML^{-3})

c - concentração do soluto em solução (MM^{-1})

c_0 – concentração inicial do soluto em solução (MM^{-1})

c_{BET} – constante do modelo BET

D_m - difusividade molecular (L^2T^{-1})

D_p - difusividade efetiva (L^2T^{-1})

E_b - coeficiente de dispersão axial (L^2T^{-1})

ES – eficiência de separação

HETP – altura equivalente a um prato teórico (L)

K - coeficiente de partição

K_d - constante de dissociação para adsorção (modelo de Langmuir) (MM^{-1})

K_f - constante da isoterma de Freundlich

k_f - coeficiente convectivo de transferência de massa (LT^{-1})

L – comprimento do leito (L)

Mn – peso molecular numérico

Mw – peso molecular ponderal médio

n - constante do modelo de Langmuir-Freundlich

$\mathbf{n_f}$ – índice da isoterma de Freundlich

PM – peso molecular de oligossacarídeos e dextranas

PST - percentual de troca de íons Na^+

q - concentração do soluto na fase porosa (MM^{-1})

$\mathbf{q_m}$ – quantidade máxima adsorvida (modelo de Langmuir) (MM^{-1})

R - rendimento da reação enzimática (%)

r – distância radial (L)

$\mathbf{R_p}$ - raio da partícula (L)

S - fator de sensibilidade

T – temperatura (°C)

$\mathbf{t_0}$ - tempo de injeção da amostra (T)

t – tempo (T)

$\bar{\mathbf{t}}$ - tempo de retenção médio (T)

v - velocidade intersticial (LT^{-1})

$\mathbf{v_0}$ - velocidade superficial (LT^{-1})

$\mathbf{v_m}$ = volume requerido para camada monomolecular de N_2 (L^3/M)

Vp - volume do pulso injetado (L^3)

Vc - volume do leito da coluna (L^3)

z - distância axial (L)

Termos Gregos

ε_b - porosidade do leito

ε_p - porosidade da partícula

μ - primeiro momento (T)

σ^2 - segundo momento (T^2)

Índices

***** - equilíbrio

1,2 - componente

i – componente

L - leito

SZ - sem zeólita

CZ - com zeólita

gli - glicose

fru - frutose

dext – dextrana

n – número da fração

RESUMO

Dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* pode produzir, a partir da sacarose, dextrana na ausência de aceptores, e oligossacarídeos na presença de maltose ou outros açúcares como aceptores, tendo como subproduto a frutose. Entre as diversas cepas produtoras, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F é a mais estudada. O valor comercial destes produtos aumenta com a pureza, tornando interessante a sua recuperação e purificação. Para tal, técnicas cromatográficas de separação são aplicadas, em que zeólitas, aluminosilicatos cristalinos com elementos dos grupos IA e IIA, podem ser utilizadas como adsorventes.

A zeólita de partida (forma sódica), Baylith WE-894, foi caracterizada, determinando sua composição, área superficial, tamanho e distribuição de poros e densidade.

Zeólitas modificadas por troca iônica com diferentes cátions de compensação (Ba^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} e K^{+}) foram obtidas, determinando-se os dados de equilíbrio para adsorção de glicose e frutose puras. A influência do cátion de compensação na capacidade de adsorção e seletividade na adsorção de frutose, bem como a descrição do equilíbrio da adsorção com modelos de isotermas, foram estudados. Os melhores resultados foram obtidos com a zeólita trocada com íons Ba^{2+}, com os dados ajustando-se melhor ao modelo linear. Esta zeólita apresentou alta capacidade de adsorção de frutose (K = 0,82), superior ao mencionado para resinas de troca iônica, e baixa capacidade de adsorção de glicose (K = 0,12).

O comportamento da adsorção em coluna de leito fixo foi estudado, por análise frontal e respostas a pulsos cromatográficos, utilizando misturas de glicose e frutose. Foi possível confirmar a melhora do processo pela troca iônica, ao comparar-se com a zeólita de partida, tanto em termos de tempo de ruptura na análise frontal como em eficiência de separação nos perfis de eluição obtidos pela injeção de um pulso. O leito de zeólitas foi caracterizado, determinando sua porosidade e as propriedades da zeólita modificada, incluindo composição e distribuição de tamanho de partícula.

Foi avaliada a separação de misturas sintéticas em coluna de leito fixo (glicose-frutose e dextrana-frutose), verificando a influência dos parâmetros temperatura, concentração de componentes, relação entre o volume injetado na coluna e o volume da coluna (Vp/Vc), velocidade superficial e peso molecular da dextrana na eficiência de separação dos componentes, utilizando a análise de sensibilidade. A temperatura mostrou efeito pronunciado na separação de glicose-frutose, tendo um aumento desta melhorado a eficiência de separação. Já na separação de dextrana-frutose, temperatura e volume injetado mostraram um efeito pronunciado, sendo o peso molecular da dextrana também um importante fator a ser considerado no processo. Os melhores resultados na separação de glicose e frutose foram obtidos a 40 ^{0}C, 20 g/L de cada componente, velocidade superficial de 0,127 cm/min (vazão de 0,1 mL/min) e Vp/Vc igual a 0,1 com uma eficiência de separação de 1,94. Na separação dextrana-frutose os melhores resultados foram obtidos nas mesmas condições anteriores e um peso molecular de 9300 (menor valor utilizado), com eficiência de separação de 2,72. Em ambos os casos de separação, as eficiências de separação obtidas puderam ser consideradas elevadas, sobretudo no caso da separação dextrana-frutose, com valores muito superiores aos encontrados para resinas de troca iônica.

Também foi estudada a separação dos produtos de reação obtidos pela ação da enzima dextrana-sacarase sobre sacarose na ausência e presença de aceptores, em coluna de leito fixo, a 40 ^{0}C, Vp/Vc igual 0,1 e vazão de 0,1 mL/min , tendo-se obtido resultados promissores, sendo que o peso molecular dos produtos de síntese e sua concentração mostraram-se fatores importantes a serem considerados.

Os parâmetros de equilíbrio, cinéticos e de transporte de frutose, glicose e dextrana 9300 em coluna de leito fixo a 40 ^{0}C foram determinados, calculando-se o coeficiente de partição, difusividade efetiva e dispersão axial. Os valores obtidos para os coeficientes de partição foram 0,71 para frutose, 0,31 para glicose, com seletividade de 2,33; e 0,13 para dextrana 9300, com seletividade de 5,46. Com relação à dispersão axial esta mostrou-se dependente da velocidade intersticial. Os valores para difusividade efetiva foram $1{,}02.10^{-6}$ cm^2/min para frutose, $5{,}59.10^{-7}$ cm^2/min para glicose e $7{,}79.10^{-8}$ cm^2/min para dextrana 9300.

ABSTRACT

Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* synthesizes dextran from sucrose in the absence of aceptors, and oligosaccharides with maltose or other sugars as aceptors. Fructose is also produced as a by-product. Among several producer strains *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F is the most studied. The commercial value of these products increases with the purity. Therefore, it is interesting to recover and purify the products, using chromatographic techniques of separation. Zeolites, crystalline aluminosilicates with elements of the groups IA and IIA, can be used as adsorbents.

No modified zeolite (sodium form), Baylith WE-894, was characterized, and its composition, superficial area, pore size distribution and density were determined.

Modified zeolite by ion exchanging with different introduced cations (Ba^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} and K^{+}) was obtained and its equilibrium data for pure fructose and glucose adsorption in finite bath were evaluated. The influence of introduced cation on the adsorption capacity and selectivity in the fructose adsorption, as well as the description of the adsorption equilibrium through adequate isotherm models were studied. The best results were obtained with the zeolite changed with barium ions, whose data fitted well a linear model. This zeolite presented high fructose adsorption capacity (K = 0.82), higher than ion exchange resins according to the literature, and low glucose adsorption capacity (K = 0.12).

The adsorption in fixed bed column was studied, using both frontal analysis and pulse response techniques, with glucose-fructose mixtures. Modified zeólita was shown to be more efficient compared to the no-modified zeolite (sodium form), in terms of breakthrough time and separation efficiency. The porosity of the zeolite bed was measured and the properties of the modified zeolite, including composition and particle size distribution, were determined.

The separation of synthetic mixtures (glucose-fructose and dextran-fructose) in fixed bed column was evaluated. The influence of parameters such as temperature, components concentration, injected volume to column volume (Vp/Vc) ratio, superficial velocity and molecular weight in the separation efficiency was studied. The temperature

has shown to be the most significant parameter in the glucose-fructose separation. An increase on it leads to the improvement of the separation efficiency. In the separation of dextran and fructose, the effect of temperature and injected volume has shown to be significant, whereas the molecular weight of the dextran was considered an important factor in the process. The best results in the separation of glucose and fructose were obtained at 40 ^{0}C, 20 g/L of each component, superficial velocity of 0.127 cm/min (flow rate of 0.1 mL/min) and Vp/Vc of 0.1, with a separation efficiency of 1.94. In the dextran-fructose separation the best results were obtained in the same previous conditions and with a dextran molecular weight of 9300, with a separation efficiency of 2.72. In both cases, the separation efficiencies were better than the ones with ion exchange resins.

Also, the separation of the products of dextransucrase action on sucrose, in the absence and presence of aceptors (glucose and maltose), was studied, leading to interesting results. The molecular weight and product concentration are important factors to be considered.

The equilibrium, kinetic and transport parameters of fructose, glucose and dextran 9300 in fixed bed column at 40 ^{0}C were determined. The partition, effective diffusivity and axial dispersion coefficients were estimated and shown to be satisfactory. The values for the partition coefficients were 0.71 for frutose, 0.31 for glucose, with selectivity of 2.33, and 0.13 for dextran 9300, with selectivity of 5.46. The axial dispersion coefficient was dependent on the intersticial velocity. The values for effective diffusivity were $1.02.10^{-6}$ cm^2/min for fructose, $5.59.10^{-7}$ cm^2/min for glucose e $7.79.10^{-8}$ cm^2/min for dextran 9300.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos a respeito das dextranas datam do século XIX, pelos problemas que sua presença causava em indústrias açucareiras, como o entupimento de filtros e bombas e interferência na cristalização da sacarose. Em 1861 Pasteur demonstrou que a formação de películas era causada pela ação de microrganismos (Neely, 1960), sendo o termo dextrana adotado por Scheibler, em 1874, quando verificou que o problema era causado por um carboidrato de fórmula empírica $C_6H_{10}O_5$, com rotação ótica positiva. Van Tieghem, em 1878, atribuiu à bactéria responsável pela formação da dextrana o nome *Leuconostoc mesenteroides*. Mais tarde, pesquisadores mostraram que a dextrana podia ser produzida por muitos microrganismos, e o termo "dextranas" começou a ser adotado para denominar a classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares compostos quase exclusivamente de unidades monoméricas de α-D-glicopiranose unidas por ligações α-(1→6), com uma fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Alsop, 1983).

Nesses estudos preliminares verificou-se que a dextrana tratava-se de um polímero bacteriano com características versáteis, passando a ser o alvo de intensivas pesquisas para

a produção do polímero em escala comercial e sua aplicação em diversos segmentos: petroquímico, alimentos, químico e farmacêutico. Segundo Alsop (1983) nenhum outro grupo de polissacarídeos têm sido tão intensivamente estudado e têm sido atribuídas tantas aplicações.

Em 1941, Henhe iniciou o estudo da produção enzimática da dextrana, sendo que Hestrin e Avineri-Shapiro, em 1944, denominaram dextrana-sacarase a enzima envolvida na síntese de dextrana. A produção comercial de dextrana começou em 1950, sendo que os processos de produção e aplicações vêm sendo aperfeiçoados continuamente.

A enzima dextrana-sacarase é hoje produzida por fermentação utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, como primeira etapa do processo. A enzima produzida, bruta ou purificada, é utilizada na síntese "in vitro" da dextrana, tendo como subproduto a frutose.

As inúmeras aplicações das dextranas estão relacionadas ao peso molecular. Quando produzida pela ação direta da dextrana-sacarase sobre sacarose, as dextranas apresentam alto peso molecular, podendo ser convertidas a peso moleculares menores por hidrólise. Alternativamente, o peso molecular pode ser controlado durante a reação, com o uso de aceptores. Dextranas de baixo peso molecular, obtidas por fracionamento, são utilizadas na indústria farmacêutica como expansores de plasma e auxiliadores do fluxo sanguíneo. Na indústria química, dextranas são usadas na produção de peneiras moleculares (Sephadex e DEAE-dextrana). Na indústria de alimentos, aplicações como agente gelificante, inibidores de cristalização e espessante são importantes.

Nos últimos anos, os oligossacarídeos têm atraído a atenção dos pesquisadores. Ao lado de usos tradicionais, como fonte de energia e adoçante, têm sido aplicados na indústria de alimentos como estabilizantes, agentes de volume e como compostos adicionados em alimentos funcionais que estimulam o crescimento de bactérias benéficas da flora intestinal (Bifidobacterium). Aplicações em imunologia, saúde humana e animal têm sido estudadas. No presente, companhias japonesas dominam a produção mundial de oligossacarídeos (cerca de 85000 toneladas em 1995), mas tem-se verificado o interesse crescente de empresas européias (Crittenden & Playne, 1996).

Dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* pode produzir oligossacarídeos a partir de sacarose na presença de maltose ou outros açúcares como aceptores, envolvendo reação de transferência de grupos glicosil e tendo como subproduto a frutose. Entre as diversas cepas produtoras, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F é a mais estudada, sendo que Pereira (1996) indicou o uso de glicose como aceptor da reação, enquanto que Paul et al. (1986) adotaram a maltose com esta finalidade.

Alternativamente, frutose pode ser obtida da hidrólise enzimática da sacarose por invertases, resultando no açúcar invertido, mistura equimolecular de glicose e frutose. Xaropes ricos em glicose e frutose podem então ser obtidos pela separação cromatográfica destes dois açúcares.

O valor econômico da frutose é aproximadamente três vezes maior que a sacarose, sendo que xaropes de frutose têm rapidamente substituído a sacarose como adoçante nos mercados do Japão e Estados Unidos, onde é produzida a partir do milho ("High Fructose Corn Syrup" – HFCS), com um consumo estimado em 13,6 milhões de toneladas no ano 2000 (Vuilleumier, 1997).

O valor comercial destes produtos aumenta com a pureza. Portanto, torna-se interessante a recuperação dos produtos da ação de dextrana-sacarase sobre sacarose, utilizando técnicas cromatográficas, obtendo-os com elevada pureza, tendo-se, a partir de uma matéria-prima de menor custo (sacarose), produtos de alto valor comercial, com boas perspectivas econômicas.

Estudos têm demonstrado que zeólitas, aluminosilicatos cristalinos com elementos dos grupos IA e IIA, adsorvem frutose seletivamente em misturas de glicose e frutose (Ching et al., 1987; Ho et al., 1987; Ching & Ruthven, 1988; Cheng & Lee, 1992; Schöllner et al., 1993; Buttersack et al., 1993; Martinelli et al., 2000).

No entanto, não são registrados estudos que proponham a recuperação de oligossacarídeos, dextranas e frutose pelo uso destes adsorventes. No trabalho de Silva (1998), ensaios preliminares mostraram a possibilidade de adsorver frutose seletivamente em uma mistura de dextrana e frutose.

O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas tem um respeitável histórico em estudos envolvendo a produção de dextranas e oligossacarídeos com a enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Dissertações de mestrado (Queiroz, 1987; Rodrigues, 1989; Curralero, 1993; Bazán, 1993; Souza, 1993; Pereira, 1996; Santos, 1996; Silva, 1998; Cavenaghi, 1999; Mibielli, 2001; Hernalsteens, 2002) e tese de doutorado (Curralero, 2000) abordaram temas relacionados a este processo. O presente trabalho vem contribuir nestes estudos, propondo os seguintes objetivos:

Avaliar zeólitas sintéticas, verificando a potencialidade de seu uso na adsorção de frutose, visando a seleção de uma zeólita adequada para o estudo proposto.

Caracterizar a zeólita selecionada, em termos de composição, porosidade, área superficial e densidade.

Obter dados de equilíbrio para adsorção de frutose e glicose puras em banho finito, utilizando zeólitas modificadas por troca iônica com diferentes cátions de compensação, verificando aspectos da influência do cátion de compensação sobre a capacidade de adsorção e seletividade na adsorção de frutose, bem como descrevendo o equilíbrio da adsorção com modelos de isotermas adequados.

Verificar o comportamento da adsorção em coluna de leito fixo, por análise frontal e desenvolvimento de eluição (respostas a pulsos cromatográficos), a fim de selecionar o método mais adequado de trabalho, confirmar a melhora do processo pela troca iônica e testar a adsorção de misturas de glicose e frutose.

Caracterizar o leito de zeólitas, determinando sua porosidade, o tamanho de partículas e composição da zeólita modificada.

Avaliar a separação das misturas sintéticas glicose-frutose e dextrana-frutose em coluna de leito fixo, verificando a influência de parâmetros como temperatura, concentração de componentes, volume injetado na coluna, velocidade superficial e peso molecular na eficiência de separação dos componentes, utilizando a análise de sensibilidade.

Avaliar a separação dos produtos de reação obtidos pela ação da enzima dextrana-sacarase sobre sacarose na ausência e presença de aceptores (glicose e maltose) em coluna de leito fixo, utilizando o método de respostas a pulsos cromatográficos.

Determinar parâmetros de equilíbrio, cinéticos e de transporte de glicose, frutose e dextrana em coluna de leito fixo, calculando o coeficiente de partição, a difusividade efetiva e a dispersão axial para cada carboidrato, usando o método de respostas a pulsos cromatográficos.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordadas definições e propriedades de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas, açúcares diretamente relacionados a este trabalho, bem como as características da enzima utilizada, dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, seu mecanismo de ação, obtenção e usos na síntese de dextranas e oligossacarídeos. Em seguida, as zeólitas são definidas e caracterizadas como adsorventes, os mecanismos e aspectos teóricos da adsorção são comentados e os principais trabalhos envolvendo separação de açúcares são apresentados.

2.1. Monossacarídeos e Oligossacarídeos

2.1.1. Aspectos Gerais

Os monossacarídeos, quimicamente, são definidos como polihidroxialdeídos ou polihidroxicetonas que possuem cadeia não ramificada. A partir da formação de ligações entre o grupo lactol de um monossacarídeo e um grupo lactol ou hidroxila de outro monossacarídeo, denominadas ligações glicosídicas, e posterior alongamento da cadeia, tem-se a formação de compostos que, até dez unidades monoméricas, recebem o nome de oligossacarídeos, podendo a cadeia apresentar ramificações (Belitz & Grosch, 1988).

Os monossacarídeos e oligossacarídeos possuem, com poucas exceções, sabor doce, apresentando-se como sólidos cristalinos, incolores e solúveis em água.

Os açúcares diferenciam-se entre si tanto do ponto de vista da qualidade como da intensidade de sabor. A intensidade do sabor diminui nos oligossacarídeos conforme aumenta o tamanho da cadeia.

A obtenção de dados sobre a intensidade de sabor dá-se mediante a determinação dos limites de reconhecimento e detecção, ou por comparação com uma substância de referência (sacarose) em soluções de mesmo sabor doce.

Os limites de reconhecimento e detecção apresentam relação direta com a afinidade da molécula doce pelo receptor de sabor. No entanto, para efeitos práticos, o mais útil é o segundo método, pois a dependência entre concentração e intensidade gustativa é normalmente muito diferente para distintos açúcares. A tabela 2.1 mostra o poder edulcorante de alguns açúcares em relação à sacarose.

A qualidade e intensidade de sabor dos açúcares dependem não só de sua estrutura, mas de outros parâmetros, como temperatura, pH e presença simultânea de outros compostos, doces ou não.

Tabela 2.1: Poder edulcorante de açúcares e poliálcoois em relação à sacarose (solução aquosa a 10 %). Fonte: Belitz & Grosch (1988).

Composto	Poder Edulcorante Relativo
Sacarose	100
D-frutose	114
D-galactose	63
D-glicose	69
Açúcar Invertido	95
Lactose	39
D-maltose	46
D-xilose	67
D-manose	59
D-ramnose	33
Rafinose	22
D-glucitol	51
D-manitol	69
Dulcitol	41
Xilitol	102

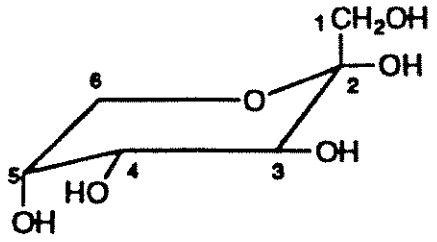
2.1.2. Frutose

A frutose, uma cetohexose, é considerada o açúcar mais doce encontrado na natureza, estando presente na forma livre em frutas e mel, e polimerizada no polissacarídeo inulina, encontrada na alcachofra de Jerusalém, chicória, dália e dente de leão.

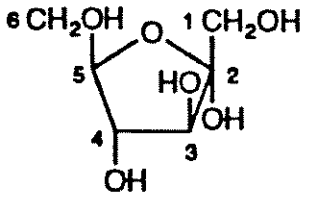
A figura 2.1 apresenta as principais formas tautoméricas da frutose. No estado cristalino, somente β-D-frutopiranose está presente. Contudo, com a dissolução em água, rápida mutarrotação ocorre, resultando na formação dos tautômeros β-D-frutofuranose, α-D-frutofuranose e α-D-frutopiranose.

Conforme Osberger (1991) o pH, a temperatura e a concentração em solução são fatores importantes que influenciam o sabor doce de soluções de frutose em água. Destes, só a temperatura tem efeito pronunciado sobre a transformação da forma mais doce, β-D-frutopiranose, a um estado de equilíbrio em que as formas menos doces estão presentes,

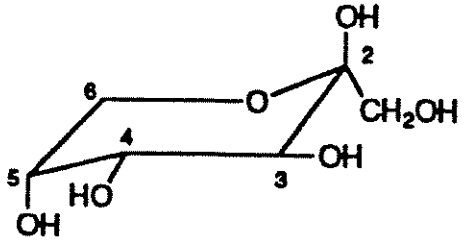
podendo o efeito ser minimizado por baixas temperaturas e condições de baixa acidez. O efeito da temperatura no equilíbrio tautomérico da frutose em solução é mostrado na tabela 2.2.



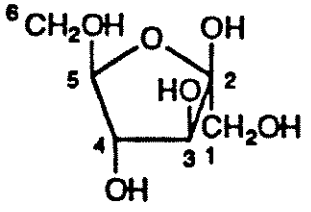
α-D-frutopiranose (α-p-$^2C_5$)



α-D-frutofuranose (α-f)



β-D-frutopiranose (β-p-$^2C_5$)



β-D-frutofuranose (β-f)

Figura 2.1: Formas tautoméricas da frutose em solução. Fonte: Schöllner et al. (1993).

Tabela 2.2: Equilíbrio tautomérico da frutose em diferentes temperaturas. Fonte: Osberger (1991).

Temperatura	α-D-frutofuranose	β-D-frutofuranose	β-D-frutopiranose
20 ^{0}C	7 %	24 %	69 %
40 ^{0}C	7 %	31 %	62 %
60 ^{0}C	9 %	33 %	58 %
80 ^{0}C	11 %	38 %	51 %

A frutose, assim como a glicose, reduz o ponto de congelamento dos alimentos, pela menor massa molecular quando comparada a de oligossacarídeos (Dills, 1993). Apresenta solubilidade elevada (4 g/g água a 25 ^{0}C), dificilmente ocorrendo a cristalização em soluções aquosas (Hanover & White, 1993). A frutose em alimentos resulta em atividade de água mais baixa, aumentando a estabilidade microbiológica sem remover a água necessária à obtenção de uma textura desejada.

O uso da frutose na alimentação humana, em comparação à glicose e sacarose, resulta em efeito glicêmico reduzido, podendo ser usada como adoçante em dietas de pacientes com hipoglicemia. Sua ingestão causa uma menor variação nos níveis de glicose, insulina, glucagon e hormônios. Pelo seu sabor mais doce, podendo adoçar 70 % mais que uma mesma quantidade de sacarose, a frutose é empregada com vantagem em alimentos com teor calórico reduzido, com redução de até 33 % (Osberger, 1991). A tabela 2.3 mostra os principais produtos comerciais à base de frutose. Tais produtos são obtidos por três processos distintos:

- Hidrólise enzimática do amido de milho pelas enzimas α-amilase e amiloglicosidase, resultando em dextrose, que é isomerizada a frutose pela enzima glicose-isomerase, convertendo 45 % da dextrose em frutose (Long, 1996).

- Hidrólise enzimática da sacarose pela enzima invertase e isomerização da glicose em frutose pela enzima glicose-isomerase.

- Hidrólise enzimática da sacarose pela enzima invertase e separação cromatográfica da glicose e frutose.

Tabela 2.3: Classificação dos produtos comerciais à base de frutose.

Fonte: Osberger (1991).

Propriedades	**Frutose Cristalina**	**HFCS 42 %**	**HFCS 55 %**	**HFCS 90 %**	**Frutose Líquida**
Estado Físico	cristalino	líquido	líquido	líquido	líquido
Descrição Química	cetohexose	dextrose, frutose e outros*	dextrose, frutose e outros	dextrose, frutose e outros	frutose pura, água
% Frutose	99,5	29,8	42,4	69,3	77,0
% Água	0,2	29	23	23	23
Poder Edulcorante**	130-180	90-95	95-100	100-106	110-120

* dissacarídeos e oligossacarídeos

** referente à sacarose (poder edulcorante 100)

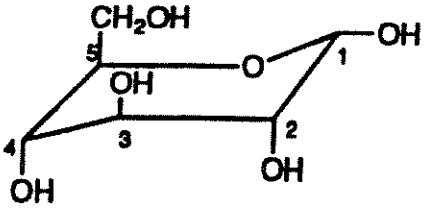
A frutose é utilizada em mistura para bolos, gelatinas e pudins dietéticos, balas, sobremesas geladas, bebidas energéticas e para o aumento da funcionalidade do amido.

O consumo mundial de xarope de alta frutose (HFS) teve um crescimento de 700000 toneladas em 1975 para 10,2 milhões de toneladas em 1995, sendo que para 2000 Vuilleumier (1997) havia estimado um consumo de 13,6 milhões de toneladas. Cerca de 75,2 % é consumido pela indústria de bebidas, 8,5 % em conservas alimentícias, 7,7 % em panificação, 4,3 % em laticínios e os 4,3 % restantes em outras aplicações (Long, 1991).

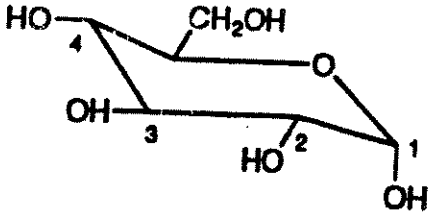
2.1.3. Glicose

A glicose é uma aldohexose de larga ocorrência na natureza, sendo encontrada, na forma livre, nas frutas e mel. Polimerizada, é encontrada no amido e glicogênio e, de forma abundante, na celulose, mais menos acessível pelas associações com a lignina.

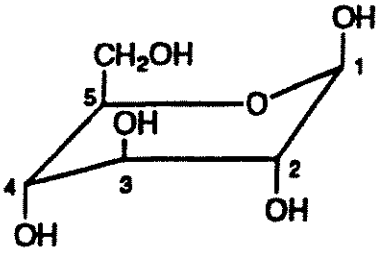
A figura 2.2 apresenta as principais formas tautoméricas da frutose. A 25 ^{0}C a forma β está presente na proporção de 62 %. (Schöllner et al., 1993).



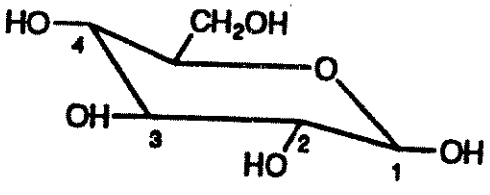
α-D-glicopiranose (α-p-$^1C_4$)



α-D-glicopiranose ((α-p-$^4C_1$)



β-D-glicopiranose (β-p-$^1C_4$)



β-D-glicopiranose ((β-p-$^4C_1$)

Figura 2.2: Formas tautoméricas da glicose em solução. Fonte: Schöllner et al. (1993).

A glicose tem menos doçura, menor solubilidade e menor viscosidade que a sacarose, no entanto é um melhor umectante e confere propriedades preservativas mais acentuadas, por resultar em baixa atividade de água, conferindo também propriedades organolépticas desejáveis (Pepper, 1990). Previne a cristalização em gomas, sorvetes e chocolates. Na indústria farmacêutica atua como veículo em inúmeros medicamentos, podendo ser usada em associação com outros carboidratos, como sacarose e sorbitol.

Industrialmente, a glicose é usualmente produzida a partir do amido por hidrólise enzimática. Alternativamente, é produzida a partir da sacarose por hidrólise, formando glicose e frutose, que são separadas. A glicose é comercialmente disponível na forma anidra e monohidratada. A forma monohidratada, contendo cerca de 9 % de água, é mais utilizada em confeitaria, enquanto que a forma anidra é preferida na manufatura de chocolates.

Os xaropes de glicose utilizados industrialmente podem conter na verdade menos de 1 % de glicose. Estes produtos consistem de monômeros de glicose, dímeros, oligossacarídeos e polissacarídeos, oriundos da hidrólise do amido, numa proporção que depende do processo de manufatura.

Os produtos de hidrólise são classificados de acordo com a dextrose equivalente (DE), medindo seu poder redutor e exprimindo-o por um equivalente em glicose pura (DE = 100). As maltodextrinas têm uma DE de 5 a 20, os xaropes de glicose utilizados para a cervejaria têm uma DE de 50 a 70 e os xaropes de glicose utilizados em confeitaria seca têm DE entre 36 e 42, e em confeitaria úmida têm DE de 60 (Scriban, 1985).

2.1.4. Oligossacarídeos

De acordo com Crittenden & Playne (1996) oligossacarídeos são definidos como glicosídeos contendo entre três e dez unidades de monossacarídeos. Contudo, muitos dissacarídeos possuem propriedades similares e são componentes importantes de oligossacarídeos de grau alimentar.

Os oligossacarídeos de grau alimentar não são produtos puros, mas misturas de oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização, polissacarídeos, dissacarídeos e açúcares monoméricos. São produzidas várias classes de produtos, sendo as de mais elevado grau aquelas com menores níveis de monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos contaminantes.

Os oligossacarídeos comerciais de grau alimentar são manufaturados por processos enzimáticos: reações de transglicosilação usando sacarose ou lactose, ou hidrólise de polissacarídeos, como amido, inulina ou xilanas. Substrato não reagido e monossacarídeos também estão presentes, podendo ser removidos por procedimentos cromatográficos ou de membranas, para formar produtos de maior grau, contendo oligossacarídeos mais puros. Exceções são os oligossacarídeos da soja, obtidos por extração, e lactulose, obtida por catálise alcalina.

Os oligossacarídeos são solúveis em água e levemente doces (0,3 – 0,6 vezes a sacarose). Seu menor poder adoçante é útil na produção de alimentos, quando um agente de volume com poder adoçante reduzido é desejável para ressaltar outros sabores.

Comparado com monossacarídeos e dissacarídeos, seu maior peso molecular confere aumento de viscosidade, implementando corpo e textura. Também podem ser usados para alterar a temperatura de congelamento de alimentos e controlar o escurecimento devido a reações de Maillard no processamento de alimentos. Os oligossacarídeos conferem alta capacidade de retenção de água, prevenindo o ressecamento excessivo, e uma baixa atividade de água, o que é conveniente para o controle da contaminação bacteriana.

Ao contrário do amido e açúcares simples, os oligossacarídeos de grau alimentar disponíveis não são utilizados pela microflora bucal para formar ácidos e poliglicanas, apresentando uso como substitutos de açúcares. Desta forma, conferem baixa cariogenicidade, sendo usados em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas. Muitos não são digeridos pelo homem, tornando-os úteis em alimentos dietéticos doces e para o consumo de indivíduos com diabetes. No caso de alimentos muito doces, podem ser usados

em conjunto com adoçantes artificiais, como aspartame, fenilalanina e sucralose, atenuando o sabor residual destes adoçantes. Outras aplicações incluem cosméticos e produtos para higiene bucal (Playne & Crittenden, 1996).

Desde 1980 seu uso como componente de alimentos funcionais foi reconhecido, fornecendo um substrato particularmente útil para o crescimento de bifidobacterias no trato intestinal, pois são resistentes às enzimas digestivas. Os efeitos benéficos das bifidobactérias incluem: proteção contra infecções gastrointestinais, redução do pH intestinal pela assimilação de açúcares, supressão de bactérias patogênicas e putrefativas, produção de vitaminas, ativação da função intestinal, auxílio à digestão e estimulação do sistema imunológico (Mizota, 1996).

Atualmente, companhias japonesas dominam a produção mundial de oligossacarídeos (cerca de 85000 toneladas em 1995), mas tem-se verificado o interesse crescente de empresas européias (Crittenden & Playne, 1996). Apenas no Japão o mercado de alimentos funcionais movimentou 4,5 bilhões de dólares em 1993 (O' Sullivan, 1996). A tabela 2.4 mostra os oligossacarídeos produzidos comercialmente.

Tabela 2.4: Oligossacarídeos de grau alimentar produzidos comercialmente. Fonte: Playne & Crittenden (1996).

Classe de Oligossacarídeos	Produção em 1995 (t)
Galactooligossacarídeos	15000
Lactulose	20000
Lactosacarose	1600
Frutooligossacarídeos	12000
Palatinose Oligossacarídeos	5000
Glicosil Sacarose	4000
Maltooligossacarídeos	10000
Isomaltooligossacarídeos	11000
Ciclodextrinas	4000
Gentiooligossacarídeos	400
Oligossacarídeos da Soja	2000
Xilooligossacarídeos	300

2.2. Dextranas

De acordo com Alsop (1983) dextrana é o nome coletivo dado a uma grande classe de polissacarídeos extracelulares bacterianos compostos quase completamente por unidades monoméricas de α-D-glicopiranose unidas principalmente por ligações α-(1→6). A figura 2.3 ilustra a estrutura molecular da dextrana.

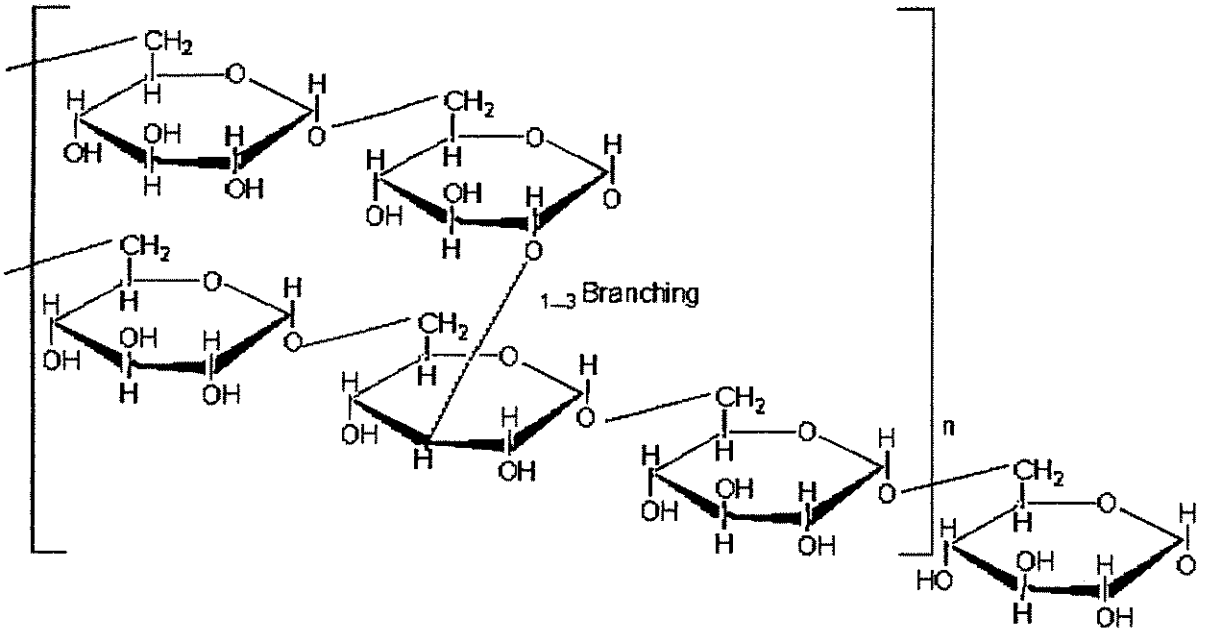


Figura 2.3: Estrutura molecular da dextrana. Fonte: Bazán (1993).

Dextranas com estruturas variando desde pouco ramificadas até altamente ramificadas podem ser obtidas por diferentes microrganismos ou por síntese enzimática. São principalmente produzidas por bactérias do gênero *Leuconostoc*, espécies *mesenteroides* e *dextranicum*, grupo *Streptococcoeace* e família *Lactobacillaceae*, sendo que o *Leuconostoc mesenteroides* da linhagem NRRL B-512F foi intensamente estudado. Esta linhagem produz dextranas contendo 95 % de ligações α-(1→6) e 5 % de ligações α-(1→3). No entanto, convém ressaltar que a dextrana não é um produto direto da fermentação bacteriana na presença de sacarose, mas sim resultante da ação enzimática da dextrana-sacarase produzida pelo microrganismo sobre a sacarose existente no meio.

Conforme Bazán (1993) a produção de dextrana pode ser feita por processo convencional ou por síntese enzimática. No processo convencional o polissacarídeo é produzido durante o cultivo da bactéria, ocorrendo, simultaneamente, crescimento celular, produção da enzima dextrana-sacarase e síntese da dextrana. Pelo processo enzimático tem-se duas etapas: produção da enzima via cultivo do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F e síntese "in vitro" da dextrana. Apresenta como vantagens a simplicidade do processo de purificação, as melhores condições de controle e o maior rendimento na síntese, sendo o processo atualmente utilizado.

A dextrana, quando sintetizada somente a partir da sacarose, denomina-se dextrana nativa e apresenta um peso molecular médio entre 30 e 90 milhões de Daltons e alta viscosidade. Na presença de outros açúcares, denominados aceptores, como maltose, isomaltose e outros, obtém-se dextranas de baixo peso molecular. Suas características e conseqüentes aplicações são afetadas fundamentalmente pela distribuição de peso molecular, estrutura e solubilidade em água.

Dextranas de baixo peso molecular têm sido utilizadas pela indústria farmacêutica, como expansor de plasma sangüíneo (peso molecular médio de 70000) e para aumentar a fluidez do sangue (peso molecular médio de 40000). Nesta faixa de peso molecular (75000 +/- 25000 Daltons) denomina-se dextrana clínica. Nestas aplicações apresentam as vantagens de serem absorvidas pelo organismo humano, não apresentando toxidez ou ação antigênica. Além disso, são estáveis à esterilização e estocagem (Alsop, 1983).

Dextrana-sulfato (peso molecular médio de 7300) tem atividade anticoagulante e ferro-dextrana apresenta grande uso no tratamento de anemias em seres humanos e animais. Dextrana-hemoglobina é utilizada como substituto do sangue, atuando como expansor do plasma e agindo na transferência do oxigênio.

Na indústria de alimentos são usadas como agente gelificante em gomas de mascar, como inibidor de cristalização em sorvetes, homogeneizador e espessante em doces e xaropes.

As dextranas também são utilizadas como peneiras moleculares, com inúmeras aplicações em cromatografia de exclusão molecular, sendo os produtos mais conhecidos Sephadex e DEAE-Dextrana, encontrando também aplicações na indústria de fotografia e na produção de cosméticos.

2.3. Produção de Oligossacarídeos e Dextranas

2.3.1. Aspectos Gerais

Recentes progressos em enzimologia têm demonstrado o uso potencial de hidrolases na catálise de reações reversas para a síntese de glucooligossacarídeos e galactooligossacarídeos. Contudo, os rendimentos da reação e a baixa especificidade da maioria das hidrolases têm limitado a aplicação desta tecnologia.

Outra técnica enzimática para produção de oligossacarídeos consiste no uso de reações de transferência catalisadas por transferases. Processos industriais enzimáticos são usados para sintetizar ciclodextrinas e frutooligossacarídeos.

Uma técnica bastante promissora consiste no uso de transglicosilases para síntese de oligossacarídeos. De acordo com Remeaud-Simeon et al. (1994) transglicosilases catalisam a transferência de unidades de glicose da sacarose para moléculas de aceptores, principalmente açúcares, resultando na síntese de oligossacarídeos. Na ausência de aceptores, tais enzimas produzem polissacarídeos, como as dextranas.

2.3.2. Transglicosilases

Conforme Whitaker (1972) a reação global de biossíntese de di, oligo e polissacarídeos é dada por:

Glicosil-O-X + HO-aceptor = glicosil-O-aceptor + HOX

No mecanismo proposto, o grupo X pode ser fosfato (por exemplo, aldose-1-

fosfato), um nucleosídeo pirofosfato (por exemplo, UDP-glicosídeos) ou um sacarídeo, com 1, 2 ou mais unidades monoméricas, tendo-se, respectivamente, enzimas fosforilases, nucleosídeo difosfato transglicosilases e transglicosilases.

Segundo Castillo et al. (1993) as transglicosilases são um dos mais estudados grupos de enzimas, havendo um crescente interesse na sua aplicação para síntese de novos açúcares e oligossacarídeos. Entre essas enzimas, dextrana-sacarase (α-1,6-glucan:D-frutose 2-glucosiltransferase, EC 2.4.1.5), produzida por espécies de *Leuconostoc*, é capaz de sintetizar eficientemente oligossacarídeos a partir de sacarose (doador) e aceptores de baixo peso molecular, como maltose e isomaltose. Neste caso, o produto pode servir como aceptor para as etapas seguintes, levando ao alongamento da cadeia por uma série de reações de transferência de grupos glicosil. O produto da reação tendo como aceptor frutose pode ser leucrose. A leucrose não é um aceptor da dextrana-sacarase e a reação é paralisada.

Na ausência de aceptores, o produto principal da reação é dextrana, um polímero composto por ligações α-(1→6) na cadeia linear e ramificações α-(1→2), α-(1→3) e α-(1→4), sendo a estrutura química dos oligossacarídeos e dextrana altamente dependente da cepa produtora de transglicosilase (Remeaud-Simeon et al., 1994).

2.3.3. Enzima Dextrana-Sacarase

2.3.3.1. Características da Enzima Dextrana-Sacarase

Segundo Monchois et al. (1997) a enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F é uma transglicosilase com alto peso molecular, em torno de 160.000 Daltons. É composta por um sítio catalítico N-terminal, responsável pela clivagem da sacarose (do aminoácido 268 ao 1134), e um sítio de ligação na região C-terminal (cerca de 300 a 400 aminoácidos), que não participa da reação mas tem efeito modulador sobre sua atividade. Os aminoácidos Asp - 511 e Asp - 551 são essenciais ao processo catalítico e His - 661 tem a função de formar ligações por pontes de hidrogênio.

A enzima não requer a presença de cofatores ou intermediários fosforilados. A energia requerida para condensação de duas unidades glicosil provém da hidrólise da sacarose, o que constitui uma diferença essencial no mecanismo comum da síntese de polissacarídeos (Monsan & Lopez, 1981).

Segundo Robyt et al. (1974) o mecanismo de ação da dextrana-sacarase requer: que a glicose da sacarose seja transferida para a extremidade redutora da dextrana; que glicose e dextrana estejam covalentemente ligadas à enzima; e que a glicose ligada à enzima sirva como um doador de glicose para a polimerização da dextrana.

A figura 2.4 esquematiza o mecanismo proposto por Robyt et al. (1974), mostrando a presença de dois grupos catalíticos X_1 e X_2. Ambos os grupos atacam a sacarose para formar complexos glicosil. O grupo C_6-OH de uma destas unidades de glicose faz um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 da outra unidade de glicose, formando uma ligação glicosídica α-(1→6). Este libera um dos grupos nucleofílicos, o qual ataca outra sacarose, formando um novo complexo glicosil-enzima. O grupo C_6-OH desta nova unidade glicosil ataca o carbono 1 da unidade isomaltosil formada na etapa anterior, originando o complexo isomaltotriosil-enzima. O processo continua com os dois grupos catalíticos formando, alternadamente, complexos covalentes com glicose e dextrana. A cadeia de dextrana cresce quando unidades de glicose são transferidas da sacarose ao centro ativo e são inseridas entre a enzima e a extremidade redutora da dextrana.

Na presença de sacarose, o alongamento da cadeia terminará quando a dextrana for liberada da enzima, e isso ocorrerá quando aceptores naturais, frutose ou glicose, por exemplo, atingem uma concentração suficiente para interagir no sítio de tal forma que um dos grupos hidroxila faz um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 da dextrana. Quando a sacarose for toda consumida, duas formas existirão: complexos glicosil-dextranosil-enzima e dextranosil-enzima.

A formação das ligações α-(1→3), conforme proposto por Robyt & Taniguchi (1976), se dá quando um grupo hidroxila do carbono 3 da dextrana livre em solução faz um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 na extremidade redutora do complexo.

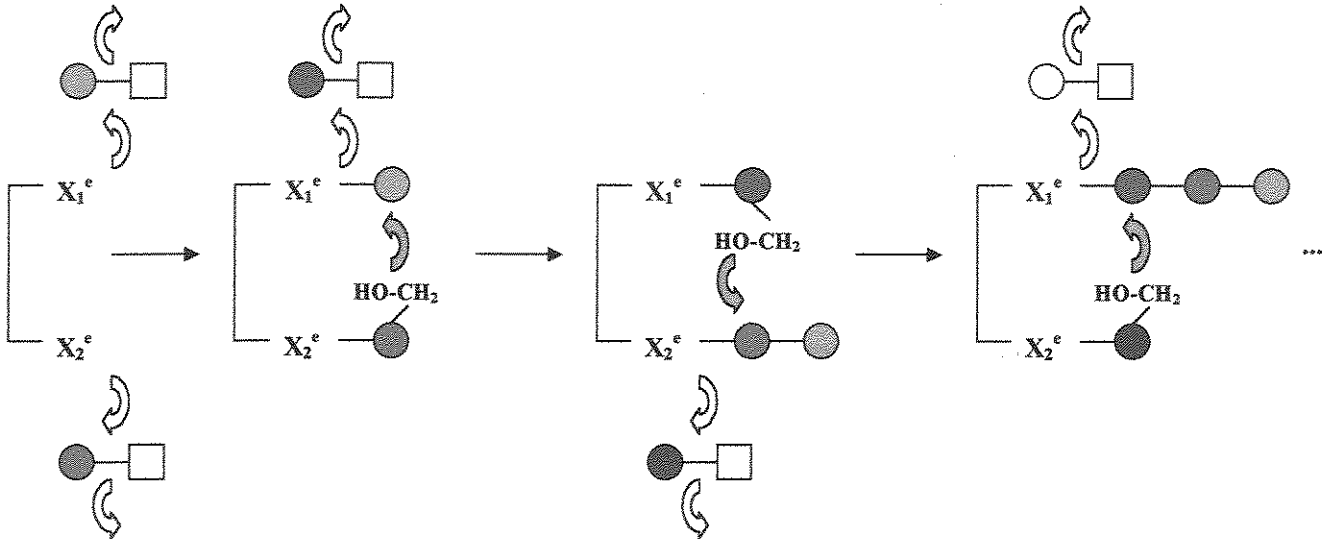


Figura 2.4: Mecanismo de ação da dextrana-sacarase. X_1 , X_2 (grupos nucleofílicos no sítio ativo); (O) glicose; (□) frutose; (O-□) (sacarose); (O-O) (unidades de glicose ligadas por ligação α-(1→6)). Fonte Robyt et al. (1974).

A ação aceptora da dextrana-sacarase consiste na transferência de grupos D-glicosil da sacarose para outros carboidratos e ocorre durante a síntese da dextrana (Robyt & Eklund, 1983). Esses carboidratos são chamados aceptores. Os aceptores agem como nucleofílicos nos quais um grupo hidroxila (C_6-OH para D-glicosil e maltose; C_5-OH para D-frutose) ataca o carbono 1 dos grupos glicosil e dextranosil no complexo com a enzima. Dextranas são obtidas pelo deslocamento do grupo dextranosil, e oligossacarídeos pelo deslocamento do grupo D-glicosil. Quando a concentração do produto proveniente da reação com o aceptor torna-se suficientemente alta, o aceptor desloca continuamente o grupo D-glicosil a partir da enzima, diminuindo ou impedindo a formação de dextrana.

A dextrana-sacarase catalisa a síntese de dextrana a partir da sacarose, numa ampla faixa de temperatura, desde 0 ^{0}C até próximo de 40 ^{0}C (Ebert & Schenk, 1968, citados por

Bazán, 1993). No entanto, a temperatura pode influenciar o rendimento e o peso molecular dos oligossacarídeos, conforme demostrado por Pereira (1998).

Quanto ao pH, o valor ótimo situa-se em 5,2 apresentando estabilidade na faixa de 5,0 a 6,0. A temperatura ótima é de 30 ^{0}C (Kabolly & Reilly, 1980, citados por Bazán, 1993).

2.3.3.2. Produção da Enzima Dextrana-Sacarase

Conforme Bazán (1993) a produção da enzima dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F é induzida pela presença de sacarose, que é também a fonte de carbono. Açúcares, como glicose, frutose, manose e outros, promovem o crescimento vegetativo da bactéria, sem produção da enzima.

Kim & Robyt (1994) mencionam mutantes de *Leuconostoc mesenteroides* que são constitutivos para inúmeras transglicosilases. Estes mutantes produzem as enzimas na presença de açúcares simples, como glicose ou frutose, não produzindo dextrana.

Queiroz & Maugeri Filho (1989) comentam que, além da sacarose como fonte de carbono e indutor da produção da enzima, é necessária a presença de nitrogênio amínico, geralmente suprido pelo extrato de levedura.

Alsop (1983) informa que a dextrana-sacarase pode ser produzida entre 23 e 27 ^{0}C. Quanto à aeração, um volume limitado de ar injetado aumenta a produção, e sem aeração a atividade diminui. Com a injeção de oxigênio puro ou dióxido de carbono o crescimento da bactéria é inibido.

Queiroz & Maugeri Filho (1989), estudando a produção da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, mostraram que a batelada alimentada (com solução combinada de sacarose e hidróxido de sódio) apresenta melhor desempenho que o processo em batelada simples, com ganho em produtividade (13 a 30 %, em relação à batelada simples). As altas concentrações residuais, que prejudicam o rendimento global,

foram evitadas com o corte da alimentação e do controle de pH no final da fase exponencial de crescimento do microrganismo. O pH final, próximo ao pH ótimo de estabilidade da enzima (pH 5,2), evitou a desnaturação desta nas horas finais da fermentação.

Bazán (1993), estudando a produção enzimática de dextrana clínica, verificou que a enzima dextrana-sacarase, produzida por fermentação em batelada de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, atingiu valores máximos de atividade enzimática com uma alimentação de sacarose de 160 g/L e hidróxido de sódio 1N, à temperatura de 27 ^{0}C, agitação de 160 rpm e aeração de 0,5 L/min, para um volume de trabalho de 1,5 litros. Estas condições favoreceram a ultrafiltração e precipitação com polietilenoglicol 1500 (50%) para purificação da enzima.

2.3.4. Síntese Enzimática de Oligossacarídeos e Dextranas

A produção de dextrana é feita tradicionalmente durante o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose e enriquecido com outros nutrientes. No entanto, atualmente, a produção é feita por via enzimática. A enzima dextrana-sacarase, purificada ou na forma de extrato enzimático bruto, age "in vitro", sintetizando a dextrana a partir de uma solução de sacarose. Este processo tem uma série de vantagens, pois possibilita o controle e otimização mais rigorosa, podendo o peso molecular ser controlado, não havendo necessidade de hidrólise posterior, além do maior rendimento (Queiroz & Maugeri Filho, 1989).

Castillo et al. (1993) comentam que a estrutura das dextranas produzidas por espécies de *Leuconostoc* depende da linhagem produtora da transglicosilase, com potenciais aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica. Doze cepas de *Leuconostoc mesenteroides* foram caracterizadas pelos autores, em termos de atividade enzimática, localização da atividade (solúvel ou associada a produtos insolúveis da cultura), solubilidade dos polissacarídeos sintetizados e tipo de oligossacarídeos produzidos quando açúcares aceptores foram usados na reação. Todas as linhagens foram cultivadas na

temperatura de 27-29 ^{0}C, pH inicial de 6,9 e em meio contendo 2 % de sacarose, 2 % de extrato de levedura, 2% de K_2HPO_4, 0,02% de sulfato de magnésio, 0,005% de cloreto de cálcio e sulfato ferroso, cloreto de sódio e sulfato de manganês a 0,001%. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados e em fermentadores. Em fermentador, o pH foi regulado em 6,7 com solução alcalina de sacarose (400 g/L em hidróxido de sódio 2 N). A agitação foi de 550-600 rpm e a aeração de 1 vvm. Quando necessário, maltose foi adicionada ao meio em uma relação S/M de 2.

O cultivo em batelada alimentada resultou em maior produção da enzima. Com as cepas NRRL B-523 e IB-101 foram obtidos produtos insolúveis, além de oligossacarídeos usuais. Os cromatogramas dos produtos solúveis mostraram que foram produzidos os produtos usuais do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (panose, tetrassacarídeos e pentassacarídeos). Somente as cepas IB-101, B-1299 e B-1355 produziram enzimas capazes de sintetizar oligossacarídeos diferentes em quantidades significantes. A figura 2.5 mostra esquematicamente estes produtos.

Monsan & Lopez (1981) produziram dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. O pH foi regulado a 6,7 com hidróxido de sódio 10 N. Uma solução de glicose foi adicionada continuamente (20 g/L.h) por 4 horas, obtendo-se 8,8 U/mL. O pH foi ajustado a 5, centrifugado e estocado a 4 ^{0}C. A enzima foi purificada por cromatografia de permeação em gel (Ultrogel AcA34) com 96,4 % de recuperação, usando tampão citrato pH 5,0 como eluente. A enzima foi imobilizada em suporte amino-spherosil ativado com glutaraldeído. Observou-se decréscimo na taxa de reação com a formação de dextrana, devido ao aumento das limitações de transferência de massa. Ao mesmo tempo, a massa molecular da dextrana aumentou. Dextrana clínica (massa molecular de 75000) foi sintetizada quando os oligossacarídeos produzidos na presença de maltose foram usados como aceptores numa segunda reação de síntese a 4 ^{0}C, com rendimento de 40 %. Na presença de aceptores o peso molecular foi consideravelmente reduzido, sendo esse efeito maior para a enzima imobilizada.

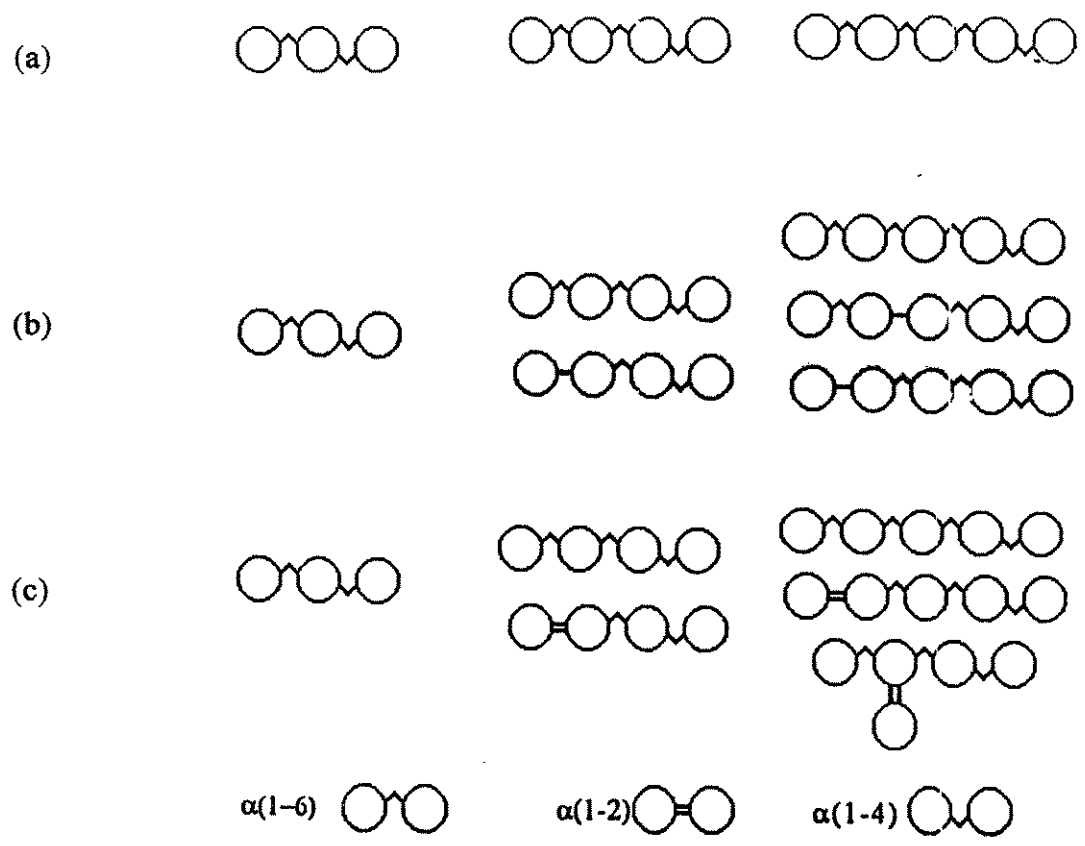


Figura 2.5: Esquema dos oligossacarídeos produzidos em função da cepa de *Leuconostoc mesenteroides*. (a) B-512F; (b) B-1355; (c) B-1299. Fonte: Castillo et al. (1993).

Robyt & Walseth (1978), usando maltose como aceptor da reação catalisada por dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, observaram como produto inicial panose (6-o-α-D-glucopiranosilmaltose), que atua como aceptor para formar um tetrassacarídeo (6-o-α-D-isomaltosilmaltose) e assim sucessivamente. Cada oligossacarídeo é o produto da transferência de uma unidade glicosil para um oligossacarídeo de grau de polimerização inferior, terminando com um resíduo maltosil na extremidade redutora.

Paul et al. (1986), utilizando a metodologia de Planejamento Experimental, estudaram a síntese de oligossacarídeos com dextrana-sacarase de *Leuconostoc*

mesenteroides NRRL B-512F, usando maltose e oligossacarídeos como aceptores para síntese de dextranas de peso molecular controlado. Na presença de maltose (200 g/L), K_m aumentou de 12 para 163 mM e V_{max} de 5,8 para 19,1 U/mL. Com 120 g/L de sacarose e 29 g/L de maltose o rendimento em oligossacarídeos observado foi de 93 %, além de 3,9 % de dextranas de alto peso molecular e 3,2 % de leucrose. A leucrose não é um aceptor da reação e sua síntese reduz o rendimento em oligossacarídeos. Observaram também que o peso molecular era uma função linear da relação sacarose/aceptor, e que a polidispersidade do produto aumentava com a relação sacarose/aceptor e com o peso molecular do aceptor. Alta concentração de sacarose levou a um maior rendimento em leucrose, dependendo também da relação sacarose/aceptor, pois a leucrose é um aceptor pouco eficiente. Portanto, para usar a mistura de oligossacarídeos como aceptor para síntese de dextrana de peso molecular controlado, a frutose deve ser removida, pois o rendimento cairia drasticamente pela formação de leucrose.

Oriol et al. (1987) investigaram o uso de oligossacarídeos (grau de polimerização de 3 a 6) como aceptores na reação de dextrana-sacarase com sacarose, observando um forte efeito do aceptor, com significante aumento da constante de Michaelis e da velocidade máxima de reação. Com 0,8 % p/p do aceptor, o peso molecular médio foi de 503 para maltose, 744 para panose, 937 para grau de polimerização (d.p) 4 e 1167 para d.p 5. Aumentando a concentração para 2 % p/p, os valores passaram, respectivamente, para 668, 990, 1152 e 1557.

Su & Robyt (1993) estudaram o efeito da relação maltose/sacarose (M/S) e de diferentes concentrações de maltose e sacarose na síntese de oligossacarídeos usando dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Usando relações de 0 a 100:1, para uma concentração total de carboidratos de 100 mM, observou-se que o aumento da relação M/S levava ao decréscimo de dextrana e aumento de oligossacarídeos, enquanto que o número de produtos distintos diminuía. Com uma relação de 5:1, formou-se 4,4 % de dextrana e 95,6 % de produtos aceptores: panose; um trissacarídeo (P3); um tetrassacarídeo, 6^2-o-α-isomaltosilmaltose (P4); e um pentassacarídeo, 6^2-o-α-isomaltotriosilmaltose (P5). Para uma relação de 100:1 não houve formação de dextrana e

somente dois produtos aceptores foram obtidos, 98,7% de P3 e 1,3% de P4. Os máximos rendimentos individuais de produtos mudaram com a relação M/S: P3 foi máximo para a relação 20:1; P4 para 2:1; e P5 e P6 para 1:3.

O principal efeito da concentração de substrato (1,25 até 300 mM), para uma relação M/S de 1:1, foi o decréscimo na dextrana formada. Quanto à concentração da enzima, observou-se que a dextrana diminuiu e os oligossacarídeos aumentaram com o incremento da concentração de enzima, para concentrações de sacarose na faixa de 12,5 a 200 mM. Para concentrações elevadas de enzima observou-se um aumento na formação de leucrose. Esta, no entanto, foi ausente para uma relação M/S maior que 2:1.

Böker et al. (1994) estudaram a cinética de formação da leucrose pela ação da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F sobre sacarose na presença de frutose como aceptor. Observaram que o consumo de sacarose diminuia com alta concentração inicial de frutose, mas foram obtidos altos rendimentos em leucrose (até 90 %), sendo a reação com aceptor a etapa lenta, determinante do processo. A reação foi favorecida por baixas temperaturas (69 % de rendimento a 25 ^{0}C e 75 % a 5 ^{0}C), havendo redução da produção de palatinose e trealulose, subprodutos da reação.

Pereira et al. (1998) comentam que a glicose pode ser usada como aceptor, não tão eficiente, mas com a vantagem do menor custo em relação à maltose. Nesta investigação, utilizaram a metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta para avaliar o efeito da temperatura, concentração de sacarose e relação glicose/sacarose na síntese de oligossacarídeos pela dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Observaram que com maior concentração de sacarose e relação glicose/sacarose ocorre aumento do rendimento, cerca de 45 % para a faixa estudada, podendo ser aumentado pelo aumento da concentração de sacarose e relação glicose/sacarose. O peso molecular foi obtido na faixa de 2700 e 3800 Daltons com a temperatura entre 10 ^{0}C e 30 ^{0}C. Para baixas temperaturas a concentração de sacarose influenciou muito o peso molecular, mas para baixas concentrações de sacarose a temperatura não afetou o peso molecular. O peso molecular pode ser controlado pela concentração de sacarose e relação glicose/sacarose, mantidos em níveis altos, e, para altos

rendimentos, a temperatura pode controlar o peso molecular.

Monchois et al. (1998) analisaram a seqüência C-terminal da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F e o efeito de deleções em suas propriedades bioquímicas. A enzima produziu, tendo maltose como aceptor, 13,1 % de panose, 33,3 % de oligossacarídeos de grau de polimerização (d.p) 4, 37,1 % de d.p 5 e 16,5 % de d.p 6. Com deleções na porção C-terminal ocorreu formação de oligossacarídeos com distribuições de peso molecular distintas, aumentando a proporção dos oligossacarídeos de maior peso molecular. Tendo frutose como aceptor, o rendimento em leucrose foi de 21 %, sendo que as deleções favoreceram a síntese da leucrose.

Quando aceptores não são utilizados, a redução de peso molecular pode ser feita por hidrólise ácida. Santos (1996) determinou as condições ótimas de hidrólise com ácido clorídrico, conseguindo um rendimento máximo de 95 % em pH 1,5 e temperatura de 75 ^{0}C, com 7 horas de hidrólise.

O fracionamento pode ser obtido por cromatografia de permeação em gel, onde uma amostra adequadamente diluída é passada através de uma coluna empacotada com gel, sendo a separação resultado do acesso limitado das moléculas maiores aos poros do recheio. Assim as moléculas que difundem para dentro do gel são retardadas na sua passagem através da coluna, comparadas às moléculas grandes que não podem difundir dentro do gel e movem-se continuamente na coluna, fluindo com o eluente. As moléculas com tamanho intermediário migram com velocidades entre estes dois extremos, sendo que possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada com seus tamanhos efetivos (Santos, 1996).

2.4. Zeólitas

2.4.1. Definição

Conforme definição de Flaningen (1991) zeólitas são sólidos tridimensionais, microporosos e cristalinos, de natureza inorgânica, contendo alumínio, silício e oxigênio

arranjados em uma estrutura altamente regular. Quimicamente, são aluminosilicatos cristalinos com elementos do grupo IA e IIA, tais como sódio, potássio, magnésio e cálcio, sendo representados pela seguinte fórmula empírica:

$$M_{2/n}O.Al_2O_3.ySiO_2.wH_2O$$

Onde y varia de 2 a 10, n é a valência do cátion e w representa o conteúdo de água dos poros da zeólita.

As zeólitas apresentam uma combinação de propriedades que as tornam interessantes para várias aplicações, diferindo-as de outros materiais inorgânicos cristalinos: caráter microporoso com dimensão de poro uniforme, seletividade de adsorção pelo tamanho molecular, propriedades de troca iônica, habilidade de desenvolver acidez interna (o que a torna interessante para a catálise de reações orgânicas), estabilidade térmica (acima de 500 ^{0}C) e facilidade de ser regenerada.

Aplicações importantes das zeólitas estão em processos de secagem, separação e purificação. São excelentes agentes dessecantes, tendo capacidade de adsorver até 25 % de seu peso em água, bem como amplamente utilizadas para remover compostos orgânicos voláteis do ar, separar isômeros e misturas de gases.

Como catalisadores, são amplamente utilizadas no refino de petróleo e produção de petroquímicos. Atuam como catalisadores ácidos e podem ser usadas como suporte para metais e reagentes ativos.

Em troca iônica, são utilizadas no tratamento de resíduos radioativos (remoção de radioisótopos do césio e estrôncio) e águas residuais (remoção de amônia e íons amônio).

Na atualidade o maior mercado é sua utilização como agente seqüestrante de íons cálcio e magnésio em formulações de detergentes, em substituição aos polifosfatos, prejudiciais ao meio ambiente.

2.4.2. Histórico

Em 1756, o mineralogista sueco Axel Fredrick Cronstedt descobriu a primeira zeólita mineral, "stilbite". Devido aos cristais exibirem entumescimento quando aquecidos, Cronstedt denominou o mineral como "zeólita", das palavras gregas "zeo" e "lithos", que significam "ferver" e "pedra".

As primeiras estruturas de zeólitas foram determinadas em 1930 por Taylor e Pauling. Em 1932, McBain estabeleceu o termo "peneira molecular" para definir materiais sólidos porosos que atuam como peneiras em escala molecular.

Ainda na década de 30 e década de 40, Barrer desenvolveu um trabalho pioneiro sobre adsorção e síntese de zeólitas, tendo em 1948 sintetizado a primeira zeólita, análoga à zeólita mineral Modernite.

Entre 1949 e 1954, baseado no trabalho de Barrer, R. M. Milton e D. W. Breck desenvolveram as zeólitas A, X e Y. Em 1954, a Union Carbide Corporation iniciou a comercialização de zeólitas sintéticas como uma nova classe de materiais para separação e purificação.

Nas décadas seguintes até a atualidade as aplicações industriais das zeólitas foram ampliadas (catalisadores, detergentes) e novos produtos, como as zeólitas beta e ZSM-5, foram desenvolvidos, bem como vem sendo amplamente investigada a modificação química das zeólitas.

2.4.3. Aspectos Estruturais

De acordo com Flaningen (1991) do ponto de vista estrutural as zeólitas são polímeros inorgânicos, cristalinos e complexos tendo como base estruturas de tetraedros, em geral de AlO_4^- e SiO_4, interligados por íons oxigênio. Estes tetraedros podem ser genericamente denominados TO_4, onde T pode ser Si, Al, P, Ga, B e Be, sendo esquematicamente representados na figura 2.6.

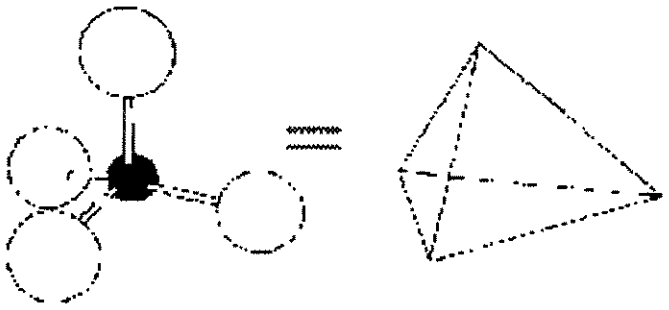


Figura 2.6: Tetraedros de AlO_4^- e SiO_4 (unidades de construção primária).

O tetraedro de SiO_4 é neutro ($Si^{4+}/4O^-$), mas o tetraedro de AlO_4^- resulta em uma carga negativa ($Al^{3+}/4O^-$), que é balanceada por cátions presentes durante a síntese.

A fórmula estrutural de uma zeólita é dada pela célula unitária cristalográfica, estrutura básica do cristal, representada por:

$$\mathbf{M_{x/n}[(AlO_4)_x(SiO_4)_y].wH_2O}$$

Onde n é a valência do cátion, w é o número de moléculas de água por célula unitária e X e y são o número de tetraedros por célula unitária, sendo y/x geralmente variando de 1 a 5.

As unidades de construção primárias, tetraedros de AlO_4^- e SiO_4, são arranjadas em unidades de construção secundárias, formando anéis e cavidades, como ilustrado na figura 2.7. A estrutura contém canais (até 50 % do volume total do cristal) que são ocupados por cátions e água. Os cátions são móveis e podem ser trocados por outros cátions, e a água pode ser removida reversivelmente por calor.

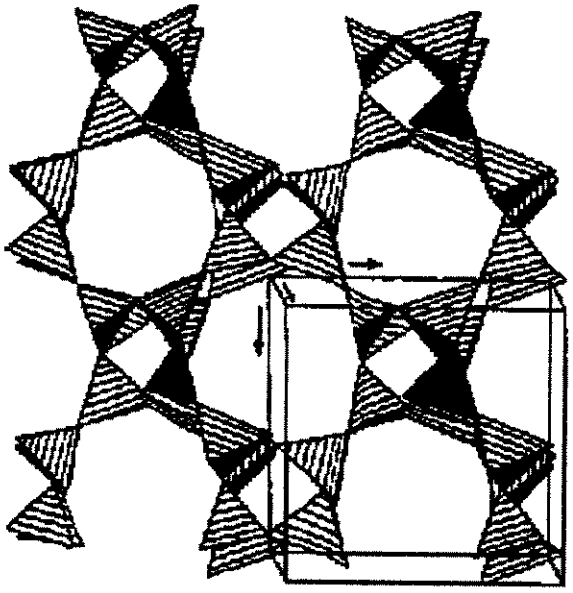


Figura 2.7: Unidades de construção primárias combinadas para formar as SBU's, unidades de construção secundárias.

As unidades de construção secundárias (SBU's) apresentam formas diversas como cubos, prismas hexagonais e octaedros, mostrados na figura 2.8. A estrutura final consiste de um arranjo de unidades secundárias, sendo conhecidas mais de 50 estruturas, que exibem poros de diâmetro de 3 a 8 $\overset{0}{A}$ e volume de poro de 0,10 a 0,35 cm^3/g. Incluem zeólitas de pequeno diâmetro de poro (3,5 – 4,5 $\overset{0}{A}$), denominadas 8-Ring (anel de 8 tetraedros), como a zeólita A, zeólitas de diâmetro de poro mediano (4,5 – 6,0 $\overset{0}{A}$), 10–Ring, como a zeólita ZSM-5, e zeólitas com diâmetro de poro grande (6,0 – 8,0 $\overset{0}{A}$), 12–Ring, como as zeólitas X e Y.

As zeólitas de baixa razão Si/Al, representadas pelas zeólitas A e X, são alumínio-saturadas, têm a maior concentração de cátions e ótimas propriedades de adsorção, em termos de capacidade, diâmetro de poro e sistema de canais tridimensional.

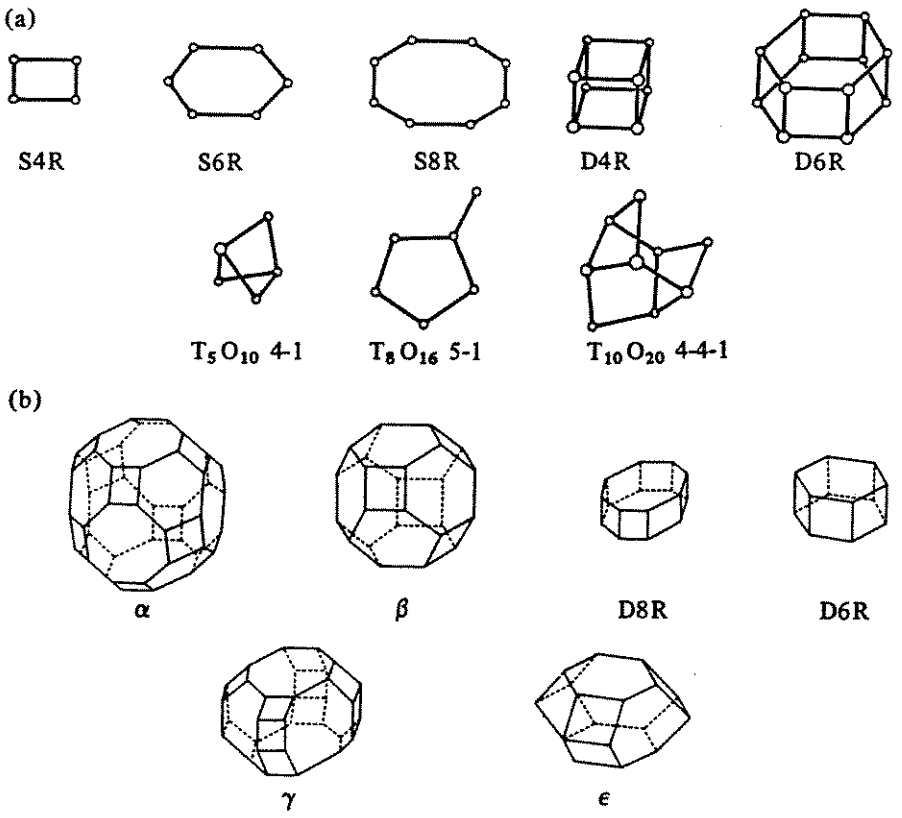


Figura 2.8: Classificação das unidades de construção secundárias (SBU's). (a) SBU's. (b) Alguns poliedros da estrutura zeolítica. Fonte: Breck (1974).

As zeólitas com razão Si/Al intermediária (Si/Al de 2 a 5) são as zeólitas naturais erionite, chabazite, clinoptilolite e mordenite, e sintéticas Y, mordenite, omega e L.

As zeólitas com razão Si/Al elevada (Si/Al de 10 a 100) são preparadas por modificação das zeólitas hidrofílicas (dealuminação). Outras são diretamente sintetizadas, como ZSM-5, -11, -12, -21 e –34, beta, NU-1 e FU-1. Caracterizam-se por apresentar elevada hidrofobicidade.

2.4.4. Zeólitas X e Y

As zeólitas X e Y e faujasitas têm estruturas de aluminosilicatos similares. As células unitárias das zeólitas X e Y são cúbicas com uma dimensão de aproximadamente 25 $\overset{0}{A}$, contendo 192 tetraedros de silício e alumínio, formando o maior volume de poro entre as zeólitas (cerca de 50 % do volume do cristal hidratado). Esta célula unitária é caracterizada por 8 octaedros truncados (sodalita ou cavidade β, β-cage) conectados por meio de 16 prismas hexagonais (double 6-ring, D6R) pela união das faces hexagonais destes octaedros. Lembra a estrutura do diamante (figura 2.9), formando uma grande cavidade com aproximadamente 13,7 $\overset{0}{A}$ de diâmetro livre (super-cavidade ou cavidade α, α-cage) (Breck, 1974).

A composição química está relacionada ao método de síntese, distinguindo-se pela composição, estrutura, propriedades químicas e físicas. Para as zeólitas X e Y, diferenças são observadas quanto à composição e distribuição do cátion, relação Si/Al e ordenação de Si e Al nos tetraedros.

O número de íons alumínio na célula unitária da zeólita X varia de 96 a 77 e na zeólita Y de 76 a 48, resultando em uma relação Si/Al para a zeólita X de 1 a 1,5 e para a zeólita Y de 1,5 a 3.

A zeólita X contém cerca de 86 cátions por célula unitária, enquanto a zeólita Y apresenta 56 cátions, os quais ocupam seis diferentes sítios na zeólita hidratada, com uma distribuição característica. O acesso a estes sítios varia conforme a natureza do cátion. Consequentemente, a seletividade varia com o grau de troca iônica.

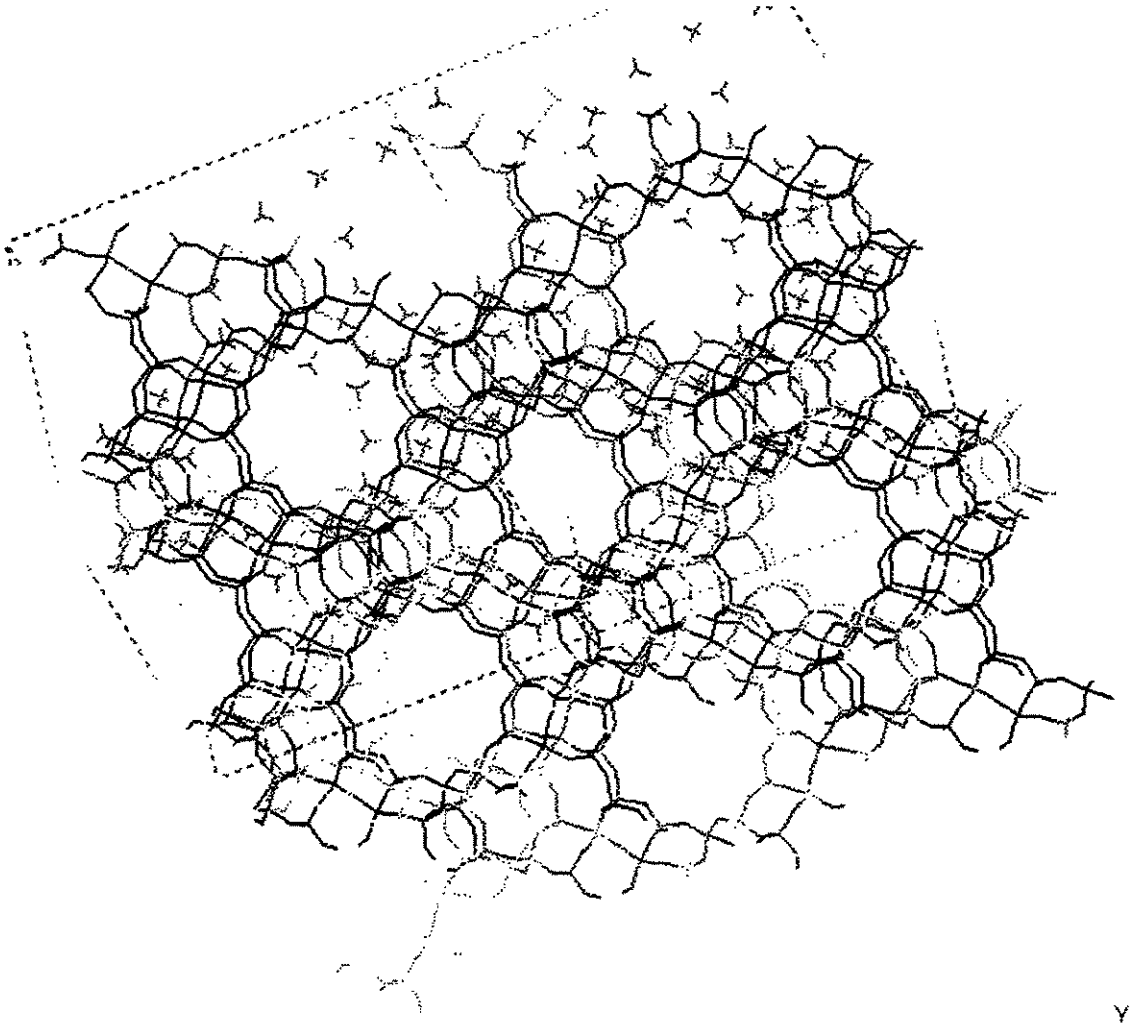


Figura 2.9: Estrutura das zeólitas X e Y.

2.5. Separação de Açúcares por Adsorção

2.5.1. Teoria da Adsorção

2.5.1.1. Isotermas de Adsorção

Brocklebank (1990) afirma que, nos processos de adsorção, a taxa que o soluto liga-se à superfície sólida deve exceder a taxa na qual o soluto deixa a superfície. Pode-se assumir que essas taxas são dependentes da concentração do soluto na solução e na superfície do sólido, e curvas experimentais para determinar as constantes dessas relações

são essenciais para predizer o comportamento da adsorção. Tais curvas são denominadas isotermas de adsorção. A abscissa dá a concentração do soluto na solução, usualmente em unidade de massa de soluto por volume de solução. A ordenada dá a concentração de soluto na superfície do adsorvente, geralmente expressa como massa de adsorbato por volume de fase sólida do adsorvente. Uma isoterma côncava em relação à abscissa é favorável, e forte adsorção ocorre mesmo em soluções diluídas. Uma isoterma côncava em relação à ordenada é descrita como não-favorável.

Gosling et al. (1989) comentam que as equações mais usadas para descrever fenômenos de adsorção são as de Langmuir e de Freundlich.

A isoterma linear é dada por:

$$q^* = K\, c^* \tag{2.1}$$

A isoterma de Freundlich descreve a adsorção de uma grande variedade de antibióticos, esteróides e hormônios, no entanto só é válida para soluções diluídas e não prediz a linearidade quando a concentração tende a zero. Devido à sua simplicidade, é umas das equações mais usadas para correlação de dados de adsorção. A equação (2.2) descreve esta isoterma.

$$q^* = K_f\, c^{*nf} \tag{2.2}$$

Na equação 2.2 K_f é a constante da isoterma de Freundlich e nf é o índice.

Gosling et al. (1989) mencionam que a isoterma de Langmuir foi inicialmente proposta para descrever a adsorção de gases sobre superfícies, mas pode ser aproximada para muitos sistemas, sendo bastante usada para descrever adsorção por afinidade. Esta isoterma considera um número finito de sítios ativos na superfície do sólido e a inexistência de interações soluto-soluto, resultando em uma monocamada de material adsorvido.

Vermeulen et al. (1963), citados por Gosling et al. (1989), comentam que a equação de Langmuir é uma descrição válida para troca iônica de íons monovalentes.

Segundo Atkins (1986) o modelo de Langmuir considera que a habilidade das partículas em ligar-se aos sítios da superfície independe do fato de sítios próximos estarem ou não ocupados.

A isoterma de Langmuir é expressa pela equação (2.3):

$$q^* = \frac{q_m c^*}{K_d + c^*} \tag{2.3}$$

Na equação 2.3 q_m é a capacidade máxima de adsorção e K_d a constante de equilíbrio.

2.5.1.2. Operação em Leito Fixo

Yang & Tsao (1982), citados por Kalil (2000), apresentam as três categorias em que a cromatografia é subdividida de acordo com a técnica usada no processo.

No desenvolvimento de eluição, ou resposta a pulsos cromatográficos, uma pequena quantidade da amostra é alimentada na coluna. O eluente, que não tem afinidade com o adsorvente, é introduzido. A separação é atingida em forma de bandas. Esta técnica é mais comumente utilizada para proposta analítica. No entanto, a técnica tem sido utilizada tanto no estudo de variáveis que influenciam o processo de separação (Cheng & Lee, 1992), como também na determinação de dados de equilíbrio (Cremasco et al., 2000) e parâmetros de transporte (Ching & Ruthven, 1988; Cremasco et al., 2000).

Na análise frontal, a amostra é continuamente alimentada, obtendo-se as curvas de ruptura. Neste experimento, é admitido que o soluto é aplicado à coluna com concentração constante, e o leito está sem material adsorvido. A concentração na saída da coluna é medida em função do tempo. Esta concentração é inicialmente zero, e permanece pequena por certo tempo, pois a maior parte do soluto é adsorvida. Em seguida, aumenta abruptamente, eventualmente atingindo a concentração de alimentação. Quando este aumento brusco ocorre, ou ruptura, o fluxo é interrompido. O material adsorvido é então

eluído, por lavagem do leito com água a um determinado pH ou com um solvente específico.

No desenvolvimento de deslocamento, como na eluição, uma pequena amostra é alimentada na coluna e a eluição se inicia, mas o eluente tem maior afinidade pelo adsorvente do que pela amostra. Componentes concentrados podem ser obtidos a partir de misturas diluídas.

2.5.2. Mecanismos Envolvidos na Adsorção de Açúcares por Zeólitas

2.5.2.1. Zeólitas como Peneiras Moleculares

As zeólitas apresentam uma área superficial interna muito elevada para adsorção, devido aos canais ou poros distribuídos uniformemente no volume do cristal, de tal forma que a superfície externa contribui muito pouco para o processo de adsorção.

O efeito de peneira molecular é causado pelas diferenças de dimensão e forma entre os poros dos cristais e as moléculas a serem adsorvidas, conferindo seletividade, ou seja, adsorção ou exclusão para distintas moléculas. Este efeito pode ser total ou parcial. Se total, a difusão de uma espécie para o interior da partícula é impedida, enquanto que a difusão de uma segunda espécie ocorre; se parcial, ambos componentes da mistura difundem-se no interior da partícula, mas a diferentes taxas.

De acordo com Buttersack et al. (1993) o volume aparente de uma molécula de sacarose dissolvida em água é de 0,353 ηm^3. Considerando geometria esférica, este volume corresponde a um diâmetro de 0,88 ηm. A zeólita Y tem um diâmetro de poro de 0,81 ηm, não podendo haver difusão da sacarose para o interior da partícula.

2.5.2.2. Interações entre Cátions e Açúcares

De acordo com Carta et al. (1992) a força de interação entre cátions e açúcares depende da conformação do açúcar. A proporção dos tautômeros no equilíbrio é diferente

para diferentes açúcares, sendo influenciada pela temperatura. A glicose somente sofre mutarrotação lentamente, entre as formas α-piranosídica e β-piranosídica, com a relação de equilíbrio destas duas formas independente da temperatura. A frutose sofre uma rápida interconversão piranose-furanose, com a mistura no equilíbrio contendo principalmente β-frutopiranose e β-frutofuranose, em uma proporção que decresce com a temperatura.

Conforme Goulding (1975) a interação entre açúcares piranosídicos e íons cálcio, presente em uma resina de troca iônica, depende da formação de um complexo bidentado com a seqüência axial-equatorial do grupo hidroxila. β-D-frutopiranose tem duas destas seqüências, enquanto que β-D-glucopiranose tem uma e α-D-glucopiranose não apresentam esta seqüência. As formas furanosídicas também podem formar fracos complexos com cálcio. Como resultado, a frutose é mais fortemente adsorvida que a glicose. O coeficiente de partição para glicose varia pouco com a temperatura, enquanto que para frutose esta variação é mais acentuada, pela conversão da forma piranosídica em furanosídica com o aumento da temperatura.

Symons et al. (1984) comentam que em todos os casos duas hidroxilas estão envolvidas, a forma mais comum envolvendo grupos OH adjacentes nos anéis piranosídicos, um axial e um equatorial, resultando em complexação fraca. Em certos casos, dois grupos cis axiais separados por um grupo -CH(OH)- resultam em complexos comparáveis. Para piranoses, forte complexação ocorre, havendo um arranjo axial-equatorial-axial de três grupos OH adjacentes, com as duas hidroxilas axiais sendo cis uma em relação à outra. Para furanoses, um arranjo cis-cis-cis é necessário.

Schöllner et al. (1993) examinaram por experimentos de adsorção em fase líquida as interações de cátions em zeólitas X e Y com diferentes graus de troca iônica, com os monossacarídeos D-frutose, D-glicose e D-(-)-arabinose. Com investigações por raio X, mostraram íons cálcio coordenados com duas moléculas de água posicionadas nas cavidades α e β. Para compensação eletrostática, cada íon Ca^{2+} necessita dois tetraedros de AlO_4^- no anel de seis membros. Portanto o íon cálcio torna-se mais móvel com o incremento da razão Si/Al, devido à interação mais fraca com a estrutura zeolítica, levando

a melhor hidratação dos cátions com moléculas de água. A coordenação de um cátion Ca^{2+} em um anel de seis membros com no mínimo três moléculas de água é necessária para a formação de complexos com monossacarídeos. Uma mudança de posição dos íons cálcio permite uma interação mais forte para as moléculas de frutose devido à troca de três átomos de oxigênio do monossacarídeo por três moléculas de água.

Fortes interações foram observadas para frutose com zeólita KY e 83CaNaY, para D-arabinose com zeólita KX e 83CaNaY e para D-glicose com zeólita KX. Comparando diferentes cátions da zeólita Y com razão Si/Al = 2,55 (64LaNaY, 64SrNaY, 64CaNaY, 77BaNaY e 59KNaY) a seguinte seqüência de aumento da interação com D-frutose foi observada: $Na^{+} < La^{3+} < K^{+} < Ba^{2+} < Sr^{2+} < Ca^{2+}$. Também foi observado para frutose que, quanto maior o grau de troca por íons Ca^{2+} na zeólita Y, maior a adsorção de frutose.

Segundo os autores, o triângulo O(4), O(5) e O (acetal) do isômero β-p-$^{2}C_{5}$ (78 % em solução aquosa) é o responsável pela forte interação observada entre D-frutose e íons Ca^{2+}. Já o triângulo O(2), O(3) e O (acetal) do isômero β-furanosídico da D-frutose (18 %) forma complexo com íons K^{+} na posição SII da zeólita KY.

Enquanto íons Ca^{2+}não apresentam interações fortes com D-glicose, íons K^{+} na posição SII em zeólitas KX formam complexos de adsorção com o triângulo O(1), O(2) e O (acetal) do isômero α-p-$^{1}C_{4}$, e com o triângulo O(2), O(4) e O(acetal) dos isômeros β-p-$^{1}C_{4}$ e α-p-$^{1}C_{4}$.

2.5.3. Separação de Açúcares

Hashimoto et al. (1983) desenvolveram um processo para produção de xaropes de alto teor de frutose (superior a 50 %), combinando adsorção da frutose e reação com glicose-isomerase. A alimentação consistia de uma mistura equimolecular de glicose e frutose em tampão Tris-HCl (pH 8,0) contendo 10 mol/m^{3} de sulfato de magnésio. O sistema utilizado era dividido em três zonas. Na zona I, oito colunas de adsorção e sete de reação foram alternadamente arranjadas. As zonas II e III consistiam somente de colunas de

adsorção. A mistura de glicose e frutose foi introduzida na última coluna de adsorção da zona I, sendo a frutose adsorvida, bem como pequenas quantidades de glicose. A solução resultante passava através da coluna de reação, que continha glicose-isomerase imobilizada, havendo formação de frutose, adsorvida na coluna seguinte, e assim sucessivamente. O líquido que saía da zona I tinha baixa concentração de glicose e frutose, sendo usado como eluente. A frutose adsorvida na zona I era então carregada para as zonas II e III, por movimento das partículas do adsorvente, possível devido à rotação intermitente das colunas de adsorção. Na zona II ocorria dessorção da glicose parcialmente adsorvida e na zona III dessorção da frutose. A resina, regenerada, podia ser reciclada para a zona I.

Ching et al. (1987) citam a resina Duolite (forma cálcica) como adsorvente seletivo para frutose, apresentando, em baixas concentrações, isoterma de equilíbrio linear. Como alternativa, os autores citam a zeólita CaY, utilizada no processo UOP Sorex.

Ghim & Chang (1982) comentam que a frutose tem mais afinidade com resinas catiônicas, e a glicose tem mais afinidade com resinas aniônicas. Com a resina Dowex 50W-X8, forma cálcica, foi obtido um coeficiente de partição de 0,3 para glicose e 0,80 para frutose.

Barker & Ganetsos (1985) estudaram a separação de glicose e frutose proveniente de um xarope de cevada, utilizando um sistema cromatográfico semi-contínuo, investigando o efeito dos parâmetros operacionais sobre a separação. O equipamento consistia de 12 colunas interconectadas, cada uma com 75 cm de comprimento e 5,4 cm de diâmetro interno, dispondo de um conjunto de válvulas cujo acionamento simulava o movimento contra-corrente de líquido e partículas. As colunas eram empacotadas com a resina Korela VO7C (forma cálcica), com diâmetro de partícula de 150–300 μm. Glicose, maltose e oligossacarídeos, fracamente adsorvidos, foram eluídos por água deionizada. A frutose foi preferencialmente adsorvida. Os coeficientes de partição médios para glicose e frutose foram, respectivamente, 0,215 e 0,472. Foi obtido, para 32,1 Kg de açúcar por m^3 de resina por hora, um produto rico em frutose com 95 % de pureza e 11,3 % p/v, enquanto que o produto rico em glicose continha apenas 4,5 % de frutose para uma concentração de 22,56 % .

De acordo com Ho et al. (1987) a separação da glicose e frutose para obtenção de xaropes de alto teor de frutose pode ser conseguida com a adsorção contra-corrente simulada, usando como adsorvente resina troca-cátion na forma cálcica (Mitsubishi and Illinois Water Treatment Processes) ou com zeólita CaY (Processo UOP). Ambos adsorventes são seletivos para frutose. Para comparar as propriedades destes adsorventes, foram realizados uma série de experimentos de adsorção em coluna com duas resinas diferentes (Zerolit 225 SRC 14 e Duolite C-204, forma cálcica) e com as zeólitas CaY (Si/Al = 2,2) e CaX (Si/Al = 1,3). Para reduzir a viscosidade e a queda de pressão a níveis aceitáveis quando operando em altas concentrações, foi necessária a utilização de temperaturas na faixa de 55-60 ^{0}C. Com temperaturas superiores a 65 ^{0}C ocorreu carbonização, que reduziu a qualidade do produto. Para a resina Zerolit, houve seletividade um pouco maior, mas a capacidade foi menor. O adsorvente com melhor separação não foi necessariamente o adsorvente com maior afinidade pela frutose. O adsorvente CaX não mostrou seletividade para frutose, mas todos os outros adsorventes (Zerolit, Dowex, Amberlite, Duolite , CaY) mostraram adsorção preferencial da frutose. A capacidade e seletividade da zeólita CaY foi similar às obtidas com a resina Duolite Ca^{2+}. Foi observado para todos os adsorventes que o coeficiente de partição da glicose foi independente da temperatura, o que significa que a glicose não foi realmente adsorvida, mas apenas ocupava os poros em direta proporção à sua concentração no fluido. Para a zeólita CaY, as relações de equilíbrio permaneceram essencialmente lineares, apresentando pequenos desvios da linearidade para concentrações acima de 25 g/L.

Barker & Abusabah (1985) utilizaram um cromatógrafo contra-corrente semi-contínuo com Zerolit 225 na forma Ca^{2+} com o objetivo de separar glicose e frutose a partir de uma mistura sintética e de um produto da inversão da sacarose. O equipamento era constituído por vinte colunas de 750 mm de comprimento e 25,4 mm de diâmetro. A temperatura foi de 45 ^{0}C, a concentração de 50 %, a alimentação foi de 2 cm^3/min e a vazão de eluente foi de 6 cm^3/min. Observou-se que a pureza dos produtos decresceu de acordo com a sua origem (purezas de 89 % e 73% para, respectivamente, mistura sintética e hidrolisado). Como o pH do hidrolisado era de 2,9 e o da mistura sintética era de 6,8, a hipótese do pH ser responsável pelas diferenças foi sugerida. Testes foram realizados com

o hidrolisado com pH ajustado em 6,8 e mistura sintética com pH ajustado em 3, mas não houve qualquer efeito na separação obtida.

Ching & Ruthven (1988) estudaram a adsorção e difusão de glicose e frutose em zeólitas NaX e KX. Um pequeno pulso contendo a solução de monossacarídeo foi injetado em uma coluna de 1,6 cm de diâmetro e 14,2 cm de comprimento contendo a zeólita (50 μm). O perfil de eluição na saída da coluna foi obtido com um detector de índice de refração, determinando-se o primeiro e segundo momentos das curvas para diferentes velocidades superficiais. Para a zeólita NaX, a adsorção foi favorecida em temperaturas mais elevadas, mas com a zeólita KX o equilíbrio foi independente da temperatura. Com este método foi possível obter os valores de K para a glicose e frutose. Para a zeólita KX foram obtidos, respectivamente, os valores de 0,51 e 0,046 a 58 ^{0}C. Nestas condições, as difusividades intracristalinas foram de 1,8 x10^{-9} cm^2/s e 1,3 x10^{-9} cm^2/s.

Zafar & Barker (1988) descrevem um reator cromatográfico para síntese de dextrana e separação de frutose. O equipamento consistia de uma coluna encamisada para manutenção da temperatura em 25 ^{0}C. Como fase estacionária utilizou-se Lewalit TSW, forma cálcica. O eluente utilizado foi uma solução contendo dextrana-sacarase a pH 5,2, alimentado por uma bomba peristáltica. A solução de sacarose foi injetada como um pulso, e os produtos detectados por um refratômetro diferencial, sendo a análise quantitativa das amostras realizadas por HPLC.

Hashimoto et al. (1988) utilizaram um leito móvel simulado de doze colunas contendo Amberlite HFS-471X (forma sódica) a 25 ^{0}C para separar α-ciclodextrina e glicose. O fluxo do adsorvente foi simulado mudando-se periodicamente os pontos de alimentação e retirada do líquido ao longo do escoamento dessa corrente. A α-ciclodextrina foi fracamente adsorvida comparando-se à glicose, e acima de oito colunas não foi observado diferenças significantes na recuperação e concentração de α-ciclodextrina na corrente de refinado.

Lukac & Perina (1991), ao proporem um modelo dinâmico para a separação cromatográfica de glicose e frutose, estudaram o equilíbrio da adsorção de glicose e frutose

em Zerolit SRC-14, forma cálcica, observando que o processo dependia da temperatura, não havendo uma relação linear.

Saska et al. (1991) fizeram testes em um leito móvel simulado piloto de oito colunas (210 cm x 6 cm). Os testes de pulso foram feitos com as colunas contendo a resina Dowex Monosphere 99 CA (0,32 mm de diâmetro, 6% reticulada) a 70 ^{0}C. A alimentação consistiu de 300 gramas de soluções de frutose e glicose de várias composições, tendo como eluente água deionizada (120-160 mL/min). Foi obtida uma relação K_{fru}/K_{gli} de 1,92, superior às resinas Duolite.

Barker & Joshi (1991) estudaram a recuperação da frutose a partir de açúcar invertido obtido de melaço de beterraba açucareira utilizando um cromatógrafo semi-contínuo. O equipamento consistia de dez colunas de aço inoxidável (75 cm de comprimento e 10,8 cm de diâmetro) empacotadas com resina Zerolit SRC 14 (forma cálcica), de 150 – 300 μm de diâmetro. A temperatura foi de 60 ^{0}C. O movimento contra-corrente das fases sólida e líquida foi simulado pelo acionamento seqüencial de um conjunto de válvulas. Foi observado que os produtos obtidos, ricos em glicose e em frutose, atingiam um máximo e após decresciam rapidamente, devido ao fato do melaço conter 5,8 % de potássio e 1,7 % de sódio, expresso como % p/p em base seca. Os íons deslocavam o cálcio da resina, reduzindo sua capacidade. O problema foi resolvido por duas técnicas: regeneração contínua da resina, por adição de sulfato de cálcio no eluente e na alimentação, com a inconveniência de contaminar os produtos com cálcio, a ser removido em etapas posteriores; e regeneração semi-contínua da resina pela adição de cálcio à coluna de purga, após a remoção dos produtos.

Barker et al. (1992) estudaram a simultânea reação enzimática de formação da dextrana e separação de frutose no mesmo sistema cromatográfico contínuo. A enzima dextrana-sacarase foi adicionada ao eluente (solução de sacarose). As condições operacionais foram 25 ^{0}C e pH 5,2. As colunas (75 cm x 5,4 cm) foram empacotadas com resina Purolite PCR 563 (forma cálcica) com diâmetro de partícula médio de 450 μm. Foi obtido, com 50 DSU/cm^3, 100 % de conversão da sacarose, 100 % de pureza para dextrana

e 97 % de pureza para frutose no ciclo 7 de operação. Verificou-se que a impureza presente no produto rico em frutose era dextrana associada à solução enzimática injetada no sistema. Cerca de 60 % da dextrana produzida apresentou peso molecular superior a 200000 Da, o que representa 80 % a mais que o obtido em processos convencionais, para uma concentração de sacarose de 20 % p/v. Com o decorrer da operação foi observada perda de íons Ca^{2+} pela resina devido à presença de íons na solução enzimática (Na^{+}, K^{+}), adsorvidos preferencialmente. Também foi observado, após 50 horas de operação, a formação de levana e glicose, devido ao acúmulo de impurezas da enzima na resina.

Cheng & Lee (1992) estudaram os fatores que influenciavam a separação de glicose e frutose, utilizando uma coluna de leito fixo contendo zeólita Y. O critério de quantificação da efetividade da separação foi a eficiência de separação, que considera a distância média dos picos de eluição das espécies, como também a distribuição de cada pico. Quanto maior o fator ES, menor a sobreposição dos picos e melhor a separação em geral. Foi observado que o tamanho de partícula mais adequado foi 20-40 mesh (média de $5{,}92 \times 10^{-4}$ m) ou menor, tendo como eluente água deionizada, observando que o efeito combinado de menor atração e tamanho compacto da molécula de glicose facilitou sua eluição na coluna. Quanto menor a vazão (0,5 ou 1 cm^3/min), melhor a separação, pois teve-se maior tempo para a frutose penetrar na estrutura porosa do adsorvente.

Quanto à temperatura, os melhores resultados foram obtidos a 40 °C. A 60 °C foi observado escurecimento, implicando em menor eficiência de separação devido a mudanças na estrutura da glicose e frutose. Quanto à eluição, também foi testado como eluente etanol a 95 %, mas os resultados não foram satisfatórios.

Em relação ao cátion utilizado, a melhor separação foi obtida com zeólita BaY, sendo que, em ordem de eficiência de separação, teve-se: $Ba^{2+} > Ca^{2+} > K^{+} > Na^{+}$.

Kishihara et al. (1992) estudaram a separação contínua de sacarose, glicose e frutose em um leito móvel simulado. A alimentação foi uma solução contendo 15 % de sacarose, 15 % de glicose e 15 % de frutose, o adsorvente foi a resina Diaion UBK 530 forma sódica (100 mesh), a temperatura foi de 50 °C e como eluente foi utilizada água

deionizada. Foram obtidos, como produtos, sacarose com 76 % de pureza, glicose com 67 % de pureza e frutose com 71 % de pureza. Os coeficientes de partição, obtidos em curvas de eluição preliminares, foram 0,1 para sacarose, para glicose 0,17 e para frutose foi 0,32.

Saska et al. (1992) apresentam resultados referentes às propriedades adsorventes da resina Dowex Monosphere 99 CA (forma cálcica) para glicose e frutose em altas concentrações. Observaram a não-linearidade das isotermas, explicada pelo acesso limitado das moléculas dos açúcares à superfície interna da resina, já que uma grande fração dos poros da resina apresentava um diâmetro igual ao das moléculas de açúcares hidratadas. A penetração nos microporos envolve difusão das moléculas do açúcar, sendo que o grau de hidratação e o diâmetro da molécula de açúcar hidratado são menores em altas concentrações. A relação entre os coeficientes de partição de frutose e glicose a 70 ^{0}C foi de 1,92, superior ao obtidos para a resina Duolite na mesma temperatura.

Viard & Lameloise (1992) obtiveram isotermas de equilíbrio para glicose e frutose pela técnica de análise frontal para resinas Duolite e Dowex. Foi observado um comportamento linear para a adsorção. Os dados de equilíbrio foram independentes do tamanho de partícula. A adsorção de glicose não foi influenciada pela temperatura, provavelmente por esta não ser de fato adsorvida e sim somente penetrar nos poros. A retenção de frutose na coluna foi menor para temperaturas mais elevadas (60 ^{0}C). Os melhores resultados foram obtidos com a resina Dowex C326 na temperatura de 30 ^{0}C, com coeficientes de partição para glicose e frutose de, respectivamente, 0,42 e 0,72. Curvas cinéticas de adsorção também foram obtidas em reator de mistura nas temperaturas de 30 e 60 ^{0}C, e concentrações iniciais de 100 e 250 g/L, verificando-se pequena diferença entre as concentrações inicial e final, o que dificultou a determinação experimental das difusividades efetivas. Quanto à difusividade efetiva, a concentração dos açúcares não teve influência sobre este parâmetro. A influência da temperatura foi menos marcante para a glicose, especialmente com a resina Duolite C204/2115. Para as outras resinas, maiores difusividades foram obtidas a 60 ^{0}C. Os dois solutos apresentaram difusividades da mesma ordem de grandeza, sendo que a glicose difundiu-se um pouco mais rápida que a frutose. Com a resina Dowex C326 a 30 ^{0}C os valores de difusividade efetiva para glicose e frutose

foram de, respectivamente, 0,55 x10^{-10} m^2/s e 0,43 x10^{-10} m^2/s.

Ajongwen et al. (1993) observaram que a remoção de frutose por resinas e reação enzimática simultâneos, para 20 % p/v de sacarose na alimentação, 77 % da dextrana produzida teve um peso molecular superior a 160000 Da, enquanto que num processo convencional 43,7 % ficou em torno de 157000 Da.

Buttersack et al. (1993) estudaram a adsorção de sacarídeos em zeólita Y dealuminada (Si/Al > 100), cujo princípio envolve o aumento da hidrofobicidade causado pela redução dos sítios iônicos e o caráter hidrofóbico parcial das moléculas de açúcares. Os experimentos foram realizados em reator de mistura, contendo 1 g de zeólita e 3 mL de solução do açúcar em estudo (5-200 g/L), mantendo-se sob agitação por 20 horas a 25 ^{0}C. Foi observado que com a zeólita dealuminada o coeficiente de partição para frutose aumentou, comparado com a zeólita CaY de razão Si/Al = 2,5, mas não observou-se seletividade para frutose, sendo sacarose, leucrose e outros dissacarídeos adsorvidos preferencialmente.

Na inversão da sacarose usando a enzima invertase, para produção de glicose e frutose, Sarmidi & Barker (1993) utilizaram um cromatógrafo rotatório anular contínuo para a reação bioquímica e separação simultâneas. Este equipamento consistia de dois cilindros concêntricos com 29,7 cm de diâmetro externo, 1,2 cm de largura, com volume anular de 14,5 dm^3. A resina utilizada foi Dowex 50 W-X4, com diâmetro de partícula de 150 μm. O substrato, solução aquosa de sacarose, foi introduzido continuamente num ponto fixo acima do leito da resina, sendo eluído através da coluna com água deionizada e deaerada, contendo a enzima. Os resultados obtidos foram expressos em termos de percentual de conversão de sacarose e resolução entre os componentes (R_{G-F}). A sacarose não convertida foi eluída primeiro, seguida pela glicose e frutose, esta última mais fortemente retida. A melhor separação foi obtida com vazões de eluente mais elevadas (10 dm^3/h), com 100 % de conversão de sacarose e R_{G-F} = 0,76. Para este resultado foi utilizada concentração de sacarose na alimentação de 25 % p/v, vazão de 230 cm^3/h, atividade enzimática de 75 U/cm^3 e rotação da coluna de 240 ^{0}/h.

Takahashi & Goto (1994) utilizaram um cromatógrafo rotatório anular contínuo para separar frutooligossacarídeos, removendo monossacarídeos e dissacarídeos para obter um adoçante com baixo valor calórico. A resina utilizada foi Dowex 50W-X4 na forma sódica, com diâmetro de partícula médio de 0,061 mm , na temperatura de 333 K. Foram obtidas curvas de eluição em colunas convencionais (9 mm de diâmetro interno, 450 mm de comprimento e porosidade do leito de 0,381). O oligossacarídeo GF4 foi eluído primeiramente, seguido de nistose, 1-kestose, sacarose, glicose e frutose. Os parâmetros coeficiente de tranferência de massa, difusividade efetiva e número de Peclet foram determinados, sendo que seus valores aumentaram com o aumento do peso molecular dos açúcares. No cromatógrafo anular foram obtidos oligossacarídeos com pureza de 94 %, mas dissacarídeos não foram separados.

Wolfgang et al. (1997) estudaram a separação de uma mistura sintética contendo frutose, manitol e sorbitol usando a resina Dowex 50W-X8 (38-45 μm). Experimentos em coluna (40 X 1,6 cm) permitiram calcular o coeficiente de partição e o coeficiente de transferência de massa. Os coeficientes de partição foram 0,6 para frutose, 0,93 para manitol e 1,5 para sorbitol.

Matijasevic et al. (1997) estudaram a separação de glicose e frutose pela análise dos perfis de eluição de uma coluna contendo a resina Lewatit MDS 1368 após um pulso. Foram utilizadas colunas de 2,5 cm de diâmetro e com comprimento de 25 e 50 cm, sendo alimentadas com diferentes vazões do eluente (água deionizada). A temperatura foi mantida em 40 ^{0}C. Foi observado que a eficiência da coluna de 25 cm decresceu para concentrações mais altas (de 10 até 40 %), mantendo-se aproximadamente a mesma para a coluna de 50 cm.

Navarro et al. (1997) utilizaram oito colunas de vidro encamisadas (150 cm x 6,1 cm), empacotadas com resina Duolite na forma Ca^{2+} e a 50 ^{0}C. Em medidas por cromatografia de eluição, obtiveram valores de coeficiente de partição de 0,85 e 0,52 para, respectivamente, frutose e glicose, em uma faixa de vazão de 13,4 a 73,3 mL/min. No sistema contínuo, para uma alimentação com 390 g/L de cada componente, foram obtidas purezas de 76 % e 94 %.

Lin & Lee (1998) estudaram a separação de frutooligossacarídeos, obtidos pela ação de β-frutofuranosidase, tendo como adsorvente sílica não-porosa ativada com grupos amino. Os experimentos foram realizados em coluna cromatográfica de 10 cm, observando-se baixa capacidade devido à pequena área superficial da fase estacionária, mas bom desempenho quanto à separação.

Silva et al. (1998) estudaram a adsorção da frutose utilizando zeólitas, verificando o efeito da troca iônica (Ca^{2+}, Ba^{2+}), razão Si/Al de zeólitas Y (1,77 e 2,59) e tempo de troca (5 minutos e 24 horas). Observaram que a zeólita Y_2, com maior razão Si/Al, trocada com Ca^{2+} durante 24 horas, apresentou maior capacidade de adsorção. A adsorção de frutose no meio contendo dextrana foi cerca de 60 % do valor da capacidade de adsorção de frutose pura em mesma concentração. As isotermas de equilíbrio obedeceram ao modelo de Langmuir.

Cavenaghi & Maugeri Filho (1998) estudaram a recuperação de frutose produzida na síntese enzimática "in vitro" de dextrana, utilizando resinas de troca iônica na forma cálcica. O desempenho da coluna foi avaliado pela eficiência de separação, obtida após um pulso cromatográfico, e calculada conforme proposto por LU & LEE (1986). Observou-se aumento da eficiência com o aumento da temperatura e diminuição da vazão. O melhor resultado foi obtido com a resina Dowex XUS-40285 na temperatura de 60 ^{0}C, vazão de 0,1 mL/min, tendo água deionizada como eluente, em uma coluna com 1 cm de diâmetro e 32 cm de leito.

Matijasevic & Vasic-Racki (2000) estudaram a separação de glicose e frutose a 40 ^{0}C em um sistema de adsorção em contra-corrente, formado por quatro colunas com 1,5 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento, contendo a resina Lewatit MDS 1368. Dados de equilíbrio experimentais foram obtidos pela adsorção em banho finito e pelo método de respostas a pulsos cromatográficos. Foi observado um comportamento linear para as isotermas de adsorção, para uma concentração de até 350 g/L dos açúcares. Os valores obtidos para o coeficiente de partição K da glicose e frutose foram, respectivamente, 0,236 e 0,316 para a determinação em banho finito, e 0,186 e 0,323 para o método de respostas a pulsos cromatográficos.

Martinelli et al. (2000) estudaram a separação de glicose e frutose utilizando zeólitas. Diferentes formas catiônicas (Na^+, Ca^{2+}, Ba^{2+} e K^+) de zeólitas do tipo A e X foram testadas quanto à adsorção de frutose, obtendo-se isotermas a 30 ^{0}C que se ajustaram ao modelo de Langmuir. O melhor resultado foi obtido com a zeólita CaX, com q_m de 790,73 mg/g e K_d de 464,35 g/L. Zeólitas A e X na forma Ca^{2+} e Ba^{2+} foram utilizadas na adsorção de glicose, sendo que a zeólita CaX apresentou a menor capacidade de adsorção de glicose (q_m igual a 191,97mg/g), implicando na melhor seletividade. Ensaio em uma coluna de 53,5 cm de leito e 1,2 cm de diâmetro, contendo a zeólita CaX com tamanho de partícula de 0,25 a 1,00 mm, também foi realizado, utilizando-se na alimentação frutose e glicose na concentração de 20 g/L, vazão de 1 mL/min e temperatura ambiente. A coluna foi alimentada até a saturação e após eluída com água deionizada. Foram obtidos coeficientes de partição para frutose e glicose de, respectivamente, 0,369 e 0,242. Foi definido como seletividade a relação entre os coeficientes de partição de frutose e glicose, correspondente a 1,525.

Boon et al. (2000) estudaram a remoção de oligossacarídeos por adsorção em carvão ativado durante a reação catalisada pela enzima β-galactosidase de *Bacillus circulans*. Os experimentos foram conduzidos misturando-se 1,6 g de carvão ativado com 8 mL de tampão citrato-fosfato 0,02 M (pH 5,0) contendo um ou vários açúcares em diferentes concentrações (6 a 108 g/L). A adsorção pôde ser descrita por uma isoterma de Langmuir multicomponente com diferentes constantes de saturação (q_m) para mono, di e trissacarídeos. A afinidade por trissacarídeos foi maior do que para mono e dissacarídeos. Curvas de ruptura foram obtidas para mistura contendo lactose (5,9 g/L), galactose (5,8 g/L) e maltotriose (2,9 g/L), utilizando colunas de leito fixo pré-tratadas com tampão citrato-fosfato 0,02 M (pH 5,0) e lactose (5,9 g/L). Experimentos também foram realizados removendo continuamente os produtos durante a síntese com a enzima imobilizada, obtendo-se um rendimento superior de oligossacarídeos (0,43 mol/mol) quando comparado ao sistema de referência (0,33 mol/mol).

Beste et al. (2000), no estudo da otimização de um leito móvel simulado com a resina Lewatit MIDS 1368 forma cálcica, obtiveram isotermas pela análise frontal, para

temperaturas de 25 a 80 ^{0}C, com concentrações de até 500 Kg/m^3 para frutose e 300 Kg/m^3 para glicose. Foram propostas isotermas competitivas que mostraram que a adsorção de frutose não é influenciada pela presença de glicose, sendo linear. A relação entre os coeficientes de partição diminuiu com o aumento da temperatura.

2.6. Comentários

Foi observado que a dextrana-sacarase, bem como a síntese de dextranas e oligossacarídeos, são assuntos intensivamente estudados. No que se refere à separação de açúcares, diversos trabalhos abordam a separação cromatográfica de glicose e frutose, mas principalmente utilizando resinas de troca iônica (em geral na forma Ca^{2+}), sendo que apenas quatro trabalhos utilizando zeólitas são citados. A separação de dextranas, oligossacarídeos e frutose, tanto com resinas quanto com zeólitas, é pouco citada, à exceção do trabalho inicial de Silva et al. (1998), com zeólitas, e Cavenaghi & Maugeri Filho (1998) e Barker et al. (1992), com resinas de troca iônica. Notou-se em geral uma carência na disponibilidade de dados de equilíbrio e, principalmente, parâmetros cinéticos e de transporte. Portanto, trabalhos que envolvam estes temas podem vir a contribuir bastante no conhecimento dos processos de separação envolvendo estes açúcares.

Capítulo 3:

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos os materiais e métodos utilizados neste trabalho. A fim de facilitar a compreensão da seqüência de atividades realizadas neste trabalho, apresenta-se a seguir um fluxograma com as etapas desenvolvidas (figura 3.1). Nos itens seguintes, tais etapas serão descritas detalhadamente.

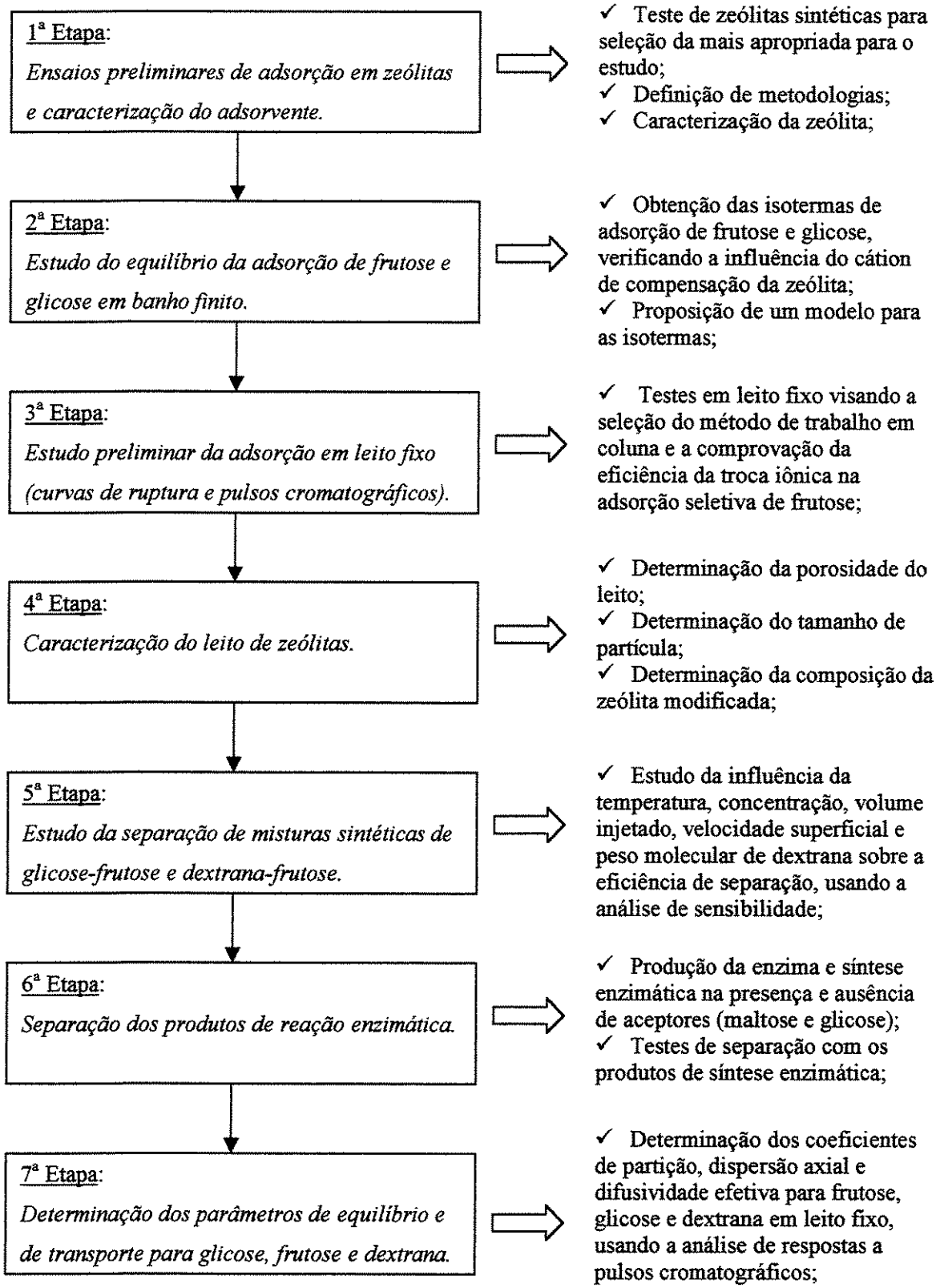


Figura 3.1: Etapas desenvolvidas na realização do trabalho.

3.1. Material

3.1.1. Microrganismo

O microrganismo usado para a produção da enzima dextrana-sacarase foi o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, fornecido pelo National Center for Agricultural Utilization Research (Peoria, Illinois, USA).

3.1.2. Zeólita

Para separação da frutose foram testadas inicialmente as zeólitas $Na_{86}X$ e $Na_{56}Y$, fornecidas pela Aldrich, zeólita Y, fornecida pela Petrobrás S.A. e zeólita Baylith WE 894, fornecida pela Bayer do Brasil S.A., visando a seleção da mais adequada para o estudo proposto.

3.1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados no trabalho foram de grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Troca Iônica da Zeólita

As zeólitas, fornecidas na forma sódica, devem ser utilizadas em outras formas catiônicas, obtidas pela troca iônica com soluções dos respectivos sais.

A metodologia utilizada foi a mesma adotada por Silva (1998). As trocas foram realizadas em reator em batelada contendo água, onde foi adicionada a zeólita, mantendo-se o reator sob agitação por uma hora. A temperatura foi ajustada em 75 ^{0}C por meio de banho termostatizado, e o pH entre 5 e 6, pela adição de solução de HCl 6 % p/p. Adicionou-se então a solução salina, mantendo a agitação por 24 horas. A quantidade de íons para troca foi calculada pelo número de equivalentes-grama de Na_2O presente na zeólita, e as

quantidades de zeólita, água e solução salina foram calculadas para resultar em 15 % de sólidos no reator (massa de zeólita em relação à massa total). A suspensão foi então filtrada em funil de Büchner. A torta foi lavada na mesma temperatura de troca, primeiramente com a mesma quantidade de sal utilizada na troca em um volume de água deionizada igual ao do reator, e após somente com água deionizada, em um volume duas vezes maior. Após, foi feita a secagem em estufa a 120 ^{0}C por 24 horas.

Todas as zeólitas modificadas por troca iônica citadas ao longo do trabalho foram obtidas por este método, variando apenas a natureza do sal e, conseqüentemente, a quantidade utilizada para a troca iônica.

Após cada troca iônica, a umidade da zeólita modificada foi determinada por aquecimento gradual em mufla até 800 ^{0}C por 1 hora.

3.2.2. Testes Preliminares para Seleção de Uma Zeólita Adequada à Adsorção de Frutose

Testes iniciais foram feitos com as zeólitas sintéticas disponibilizadas a fim de selecionar aquela que se mostrasse mais promissora quanto à adsorção de frutose. Para tal, zeólita era adicionada a uma solução contendo frutose (100g/L). As concentrações inicial e final das suspensões foram então medidas. Também foram realizados ensaios visando estabelecer uma relação sólido-suspensão adequada para o experimento, bem como o próprio procedimento do experimento de adsorção em reator de mistura.

Nesta fase inicial também foram testados métodos analíticos para determinação de açúcares inicial e final: 3,5 DNS, Somogyi-Nelson (espectrofotométricos) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3. Caracterização da Zeólita Selecionada

A zeólita selecionada como a mais promissora para o trabalho proposto foi caracterizada com relação à área superficial, densidade, composição e ao tamanho e

distribuição dos poros.

A isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K foi determinada em um equipamento ASAP 2000 Micrometrics. Os dados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de nitrogênio foram tratados por diferentes métodos matemáticos para determinar as propriedades estruturais: área superficial, volume de poro e distribuição de tamanho de poro. Para a faixa de pressão relativa de 0,05 a 0,1, os dados foram ajustados à equação BET linear, que considera o recobrimento da superfície do adsorvente com uma camada unimolecular de nitrogênio, permitindo o cálculo do volume requerido para uma camada monomolecular, o que possibilita o cálculo da área superficial. A construção do gráfico de Horváth-Kawazoe permitiu estabelecer o tamanho e distribuição de poros (Hovárth & Kawakoe, 1983).

Para determinação da composição, pesou-se cerca de 0,1 g de amostra com precisão, em cadinho de platina, adicionou-se 1 g de fundente (metaborato de lítio) e levou-se ao forno de mufla por 1 hora. Dissolveu-se o bolo fundente em 20 mL de HCl (1+4) com agitação e aquecimento (70 ^{0}C) até a dissolução do mesmo. Em seguida procedeu-se à diluição a 100 mL em balão volumétrico. Para a leitura no equipamento (Espectrômetro Perkin Elmer Optma 3000 DV), curvas-padrão de sódio e alumínio foram preparadas, sendo a concentração de SiO_2 encontrada por diferença.

A densidade foi determinada utilizando um picnômetro multivolume 1305 Micrometrics.

3.2.4. Determinação das Isotermas de Adsorção de Frutose e Glicose em Banho Finito

Esta etapa do processo visou verificar a influência do cátion de compensação na adsorção de glicose e frutose, procurando selecionar o cátion de compensação mais adequado ao estudo proposto (que adsorva seletiva e fortemente a frutose), bem como descrever o equilíbrio com isotermas de adsorção, úteis à compreensão do mecanismo de adsorção.

No estudo do equilíbrio de adsorção de glicose e frutose, a faixa de concentração

escolhida foi de 15 a 150 g/L, para abranger a faixa de interesse para a reação enzimática utilizando a dextrana-sacarase.

Primeiramente, a zeólita foi hidratada, pela adição de 5 mL de água deionizada a 1 g de zeólita trocada (com determinação prévia da umidade), sendo os frascos mantidos sob agitação a 30 ^{0}C por 1 h em banho recíproco. Adicionou-se então a cada frasco 15 mL da solução de monossacarídeo (frutose ou glicose), em uma concentração tal que a concentração resultante ficasse na faixa de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 e 150 g/L. Amostras de 2-3 mL, inicial e final (48 horas), foram retiradas com seringa, filtradas em filtros Millex (Millipore) de 0,45 mm de diâmetro de poro, diluídas convenientemente (1:10) e congeladas. Posteriormente, a concentração do açúcar foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (item 3.2.13.4).

As isotermas foram construídas plotando-se q* (quantidade adsorvida do adsorbato no equilíbrio) com o respectivo c* (concentração do adsorbato em solução no equilíbrio). O valor de q* foi calculado pela diferença entre as concentrações inicial e de equilíbrio do monossacarídeo, relacionando com a massa de zeólita (base seca) presente.

3.2.5. Aspectos Cinéticos da Adsorção em Banho Finito

O estudo cinético da adsorção em banho finito foi proposto por ser útil como metodologia para a determinação de parâmetros cinéticos e de equilíbrio, que auxiliam a compreensão do processo de adsorção, sendo fundamentais para trabalhos que venham envolver modelagem matemática e simulação.

Em um reator de vidro encamisado, conectado a um banho termostatizado a 30 ^{0}C, foram adicionados 6 g de zeólita trocada e 30 mL de água deionizada, deixando-se agitar por 1 hora para hidratação. Adicionou-se 90 mL de solução do açúcar na concentração de 140 g/L e acionou-se o cronômetro. Em intervalos de 30 segundos, amostras foram retiradas com seringas e imediatamente filtradas através de filtros Millex com 0,45 μm de diâmetro de poro (Millipore) e as concentrações determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (item 3.2.13.4).

3.2.6. Ensaios Preliminares em Coluna de Leito Fixo

3.2.6.1. Montagem Experimental para Estudos de Adsorção em Leito Fixo

A figura 3.2 mostra a montagem experimental para os estudos de adsorção em leito fixo.

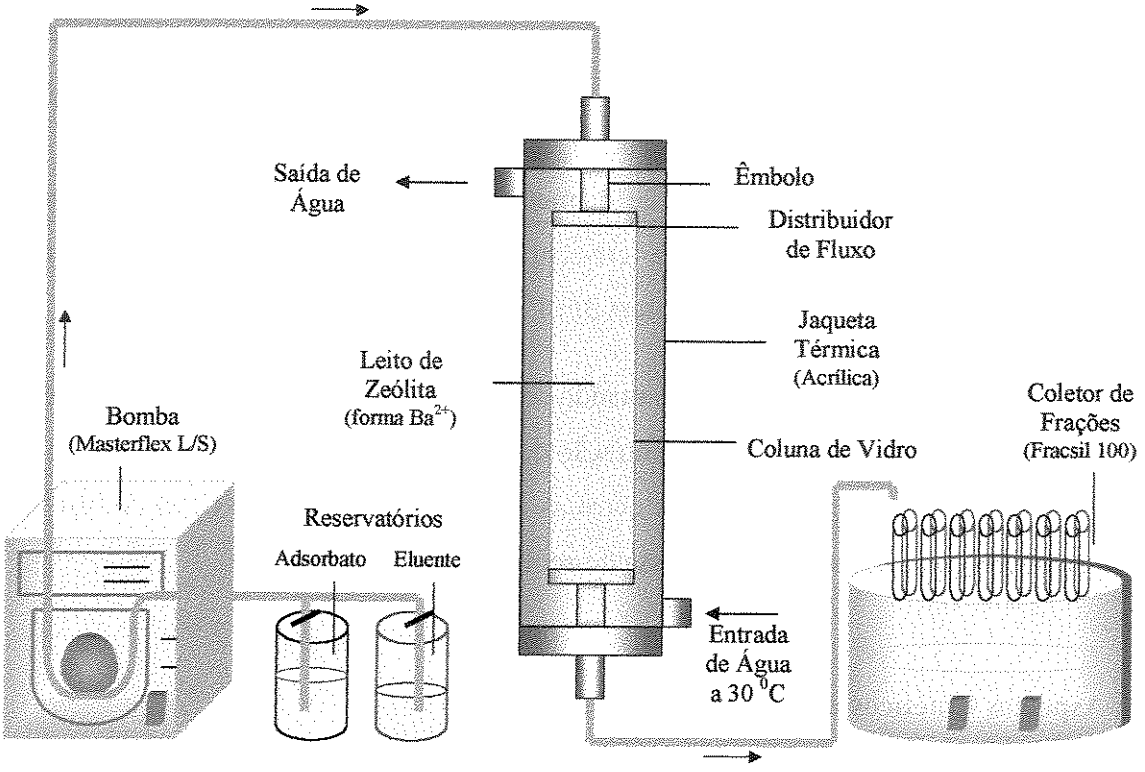


Figura 3.2: Sistema para experimentos de separação cromatográfica em coluna de leito fixo.

Para os experimentos em leito fixo, foi utilizada uma coluna Pharmacia C10/40 encamisada, com 1 cm de diâmetro e altura de leito igual a 25 cm, contendo a zeólita com tamanho de partícula entre 0,053 e 0,125 mm. Para a manutenção da temperatura dos experimentos, a coluna foi acoplada a um banho termostatizado (Tecnal TE-184), permitindo a circulação de água na camisa da coluna. Para alimentação descendente utilizou-se uma bomba peristáltica Marterfex L/S. Foram realizados ensaios utilizando os métodos de análise frontal (curvas de ruptura) e pulso cromatográfico. Na análise frontal a alimentação foi feita continuamente, a partir do reservatório de adsorbato. Nos ensaios por

pulsos cromatográficos, o pulso (volume fixo de solução de adsorbato) foi alimentado, seguido pela passagem do eluente (água deionizada). Amostras foram coletadas utilizando um coletor de frações Fracsil 100 (Incibrás).

3.2.6.2. Determinação das Curvas de Ruptura

Na determinação das curvas de ruptura de glicose e frutose, uma solução contendo 20 g/L de glicose ou 20 g/L de frutose, bem como mistura sintética destes dois componentes (20 g/L de cada componente) foi alimentada continuamente (0,1 mL/min) até a saturação da coluna. Amostras foram retiradas a cada 7 minutos, determinando-se as concentrações dos açúcares por CLAE (item 3.2.13.4). O tempo de ruptura foi determinado para cada componente, correspondendo a 10% da concentração de entrada, verificando-se o comportamento do sistema para as zeólitas de partida (forma Na^{+}) e modificada na forma Ba^{2+}, a fim de observar se realmente a troca iônica da zeólita resultava em uma melhoria do processo de adsorção.

3.2.6.3. Análise de Respostas a Pulsos Cromatográficos

No método de análise de respostas a pulsos cromatográficos, um pulso de 2 mL, contendo glicose e frutose na mesma concentração (20g/L de cada componente), foi injetado na coluna. O eluente utilizado foi água deionizada, com a vazão (0,1 mL/min) controlada por uma bomba Masterflex 7550-20.

Foram determinados nestes ensaios os tempos de retenção dos componentes e eficiências de separação. Em todos os experimentos, frações foram coletadas na saída da coluna utilizando um coletor Fracsil 100 (Incibrás), sendo as concentrações de ambos componentes determinadas por CLAE (item 3.2.13.4).

3.2.7. Caracterização do Leito de Partículas

3.2.7.1. Determinação da Porosidade do Leito

Foi utilizado o método do primeiro momento descrito por Arnold et al. (1985) e utilizado por Kamimura (2000). Este método consiste na análise da resposta obtida após um pulso de traçador na coluna, na presença e ausência de material adsorvente. Blue Dextran (Sigma Co.) de peso molecular de 2.000.000 Da, na concentração de 0,2 % p/v, foi utilizada como traçador.

Uma coluna Pharmacia C 10/20, com leito de 1cm de altura e 1 cm de diâmetro, foi montada e acoplada ao equipamento FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography – Pharmacia LKB). Um "loop" de 1mL foi utilizado para a injeção da amostra (200 μL), tomando-se o cuidado de preenche-lo lentamente, evitando a formação de bolhas.

O método utilizado, programado utilizando o software FPLC Director, consistiu das seguintes etapas:

- lavagem da coluna com água deionizada, na velocidade superficial desejada, até zerar a leitura de absorbância
- injeção da amostra (200 μL)
- eluição com água deionizada até retornar à linha de base

Este procedimento foi adotado para diferentes vazões de alimentação (0,25 a 2 mL/min) e para os sistemas com e sem leito de zeólitas.

Com um detector de ultravioleta (280 ηm) na saída da coluna, determinou-se os perfis de eluição da Blue Dextran, armazenados no FPLC Director. O primeiro momento para o leito, correspondente ao tempo médio de retenção do pico de traçador na coluna, pôde então ser calculado pela diferença dos primeiros momentos com e sem resina para cada velocidade superficial (ou vazão de alimentação).

Arnold et al. (1985) propuseram que o primeiro momento para o leito é dado pela seguinte expressão:

$$\mu^{L} = \mu^{CZ} - \mu^{SZ} = \frac{L}{v_0}\left(\varepsilon_b + (1-\varepsilon_b)\varepsilon_p\right) + \frac{t_0}{2} \qquad (3.1)$$

Onde:

μ é o primeiro momento (min)

L é a altura do leito (L = 1cm)

v_0 é a velocidade superficial (cm/min)

t_0 é o tempo de injeção da amostra (min)

ε_b é a porosidade do leito

ε_p é a porosidade da partícula

Os índices **L**, **CZ** e **SZ** correspondem ao leito, com zeólita e sem zeólita.

Para uma substância não-adsorvida no interior dos poros a equação reduz-se a:

$$\mu^L = \mu^{CZ} - \mu^{SZ} = \frac{L}{v_0}\varepsilon_b + \frac{t_0}{2} \qquad (3.2)$$

Pela equação 3.2, plotando-se L/v_o x primeiro momento do leito para a respectiva velocidade superficial, têm-se uma reta cuja inclinação corresponde à porosidade do leito.

3.2.7.2. Determinação do Tamanho Médio das Partículas

O tamanho médio das partículas de zeólita trocada com Ba^{2+} suspendidas em água deionizada foi determinado utilizando um analisador de tamanho de partículas a laser (LA-900, Horiba Instruments, Inc.).

3.2.7.3. Composição da Zeólita Trocada

A composição da zeólita trocada (forma Ba^{2+}) foi obtida com a mesma metodologia descrita no item 3.2.3, permitindo o cálculo do percentual de troca de íons sódio, indicativo da eficiência da troca iônica.

3.2.8 Análise de Sensibilidade de Parâmetros na Separação de Glicose-Frutose e Dextrana- Frutose

Para estudar as variáveis que podem influenciar o processo de separação de glicose-frutose e dextrana-frutose foi utilizado o método de análise de respostas a pulsos cromatográficos descrito anteriormente (item 3.2.6.3).

A fim de verificar a influência de variáveis do processo na separação dos componentes das misturas glicose-frutose e dextrana-frutose, utilizou-se o fator de sensibilidade.

As variáveis estudadas no processo cromatográfico foram:

Para separação de glicose e frutose: temperatura, concentração dos componentes, volume de pulso e velocidade superficial

Para a separação de dextrana e frutose: temperatura, concentração dos componentes, volume de pulso, velocidade superficial e peso molecular da dextrana

O fator de sensibilidade é dado por:

$$S = \frac{\dfrac{\text{Valor Obtido da Variável de Saída} - \text{Valor da Variável de Saída nas Condições de Referência}}{\text{Valor da Variável de Saída nas Condições de Referência}}}{\dfrac{\text{Valor Alterado da Variável de Entrada} - \text{Valor da Variável de Entrada nas Condições de Referência}}{\text{Valor da Variável de Entrada nas Condições de Referência}}} \qquad (3.3)$$

Os dados do fator de sensibilidade podem ser interpretados como a percentagem de variação na variável de saída para 1% de variação de entrada. Este fator representa ganho (S positivo) ou perda (S negativo).

A resposta, ou variável de saída, foi dada pela eficiência de separação (ES), conforme metodologia de Lu & Lee (1987) utilizada por Cavenaghi (1999).

3.2.9. Produção da Enzima Dextrana-Sacarase

3.2.9.1. Manutenção do Microrganismo

O microrganismo foi mantido em estoque a -20 ^{0}C em solução de glicerol a 10 %.

3.2.9.2. Produção da Enzima

A composição do meio de cultivo utilizado na produção da enzima dextrana-sacarase é apresentada na tabela 3.1, conforme descrito nos trabalhos de Bazán (1993) e Pereira (1996).

Sacarose, extrato de levedura, fosfato e sais foram esterilizados separadamente, a 121 ^{0}C por 15 minutos.

Tabela 3.1: Composição do meio de cultura para produção da enzima dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	40
Extrato de Levedura	20
K_2HPO_4	20
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
$MnSO_4.H_2O$	0,01
$CaCl_2$	0,02
NaCl	0,01
$FeSO_4.H_2O$	0,01
Antiespumante	0,01

O meio foi inoculado com uma cultura previamente preparada a partir da transferência do microrganismo para um meio de cultura de mesma composição, e incubação a 27 ^{0}C por 5 horas em "shaker" com 150 rpm de agitação. O volume de inóculo correspondeu a 2% do volume final de fermentação.

O sistema de fermentação utilizado foi o descrito por Bazán (1993). Este sistema consiste em alimentar o fermentador com uma solução combinada de sacarose e hidróxido de sódio. Foram preparadas duas soluções, sacarose a 200 g/L e hidróxido de sódio 5 N, esterilizando-se separadamente a 121 ^{0}C por 15 minutos. Em seguida as soluções foram misturadas, na proporção de 4:1, para obter uma concentração de sacarose de 160 g/L e hidróxido de sódio 1 N.

A fermentação foi conduzida em um fermentador de 2 litros (Bioflo III, da New Brunswick Scientific), com volume de trabalho de 1,5 L. A temperatura foi de 27 ^{0}C, agitação de 160 rpm, aeração de 0,5 L/min e o pH controlado em 6,7 pela adição de solução combinada de sacarose e hidróxido de sódio. Esta adição foi feita por um período de aproximadamente 8 horas, utilizando uma bomba peristáltica conectada ao controlador automático de pH.

A fermentação foi acompanhada pela determinação da atividade enzimática (item 3.2.13.1).

No final da fermentação, o pH do caldo fermentado foi ajustado para 5,2 com HCl 1N.

O caldo proveniente da fermentação foi centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 2 ^{0}C para separação das células bacterianas, e o sobrenadante contendo a enzima foi concentrado por ultrafiltração.

A precipitação da enzima foi feita com PEG 1500 50 % p/v em um volume igual ao do filtrado. A mistura foi então centrifugada nas mesmas condições anteriores e o precipitado foi dissolvido em solução tampão acetato de sódio 200 mM, pH 5,2, estocando-se a -15^{0}C.

3.2.10. Reações Enzimáticas com a Enzima Dextrana-Sacarase

As reações foram conduzidas em reator de mistura de vidro encamisado, acoplado em um banho termostatizado (Tecnal TE-184) para controle da temperatura em 20 ^{0}C. A agitação foi promovida por meio de um agitador magnético.

Para a reação sem aceptor, o volume final de reação foi de 50 mL. Para tal adicionou-se solução estoque de sacarose 600 g/L em tampão acetato (pH 5,2), tampão acetato (pH 5,2) e suspensão de enzima em tampão acetato (pH 5,2). As quantidades adicionadas foram tais que resultaram nas seguintes concentrações: 50 g/L de sacarose e 40 UDS/mL de enzima. Esta condição corresponde à citada por Mibielli (2001).

Para a reação com aceptor glicose, o volume final de reação foi de 120 mL. Para tal adicionou-se solução estoque de sacarose 600 g/L em tampão acetato (pH 5,2), solução de glicose 250 g/L em tampão acetato (pH 5,2), tampão acetato (pH 5,2) e suspensão de enzima em tampão acetato (pH 5,2). As quantidades adicionadas foram tais que resultaram nas seguintes concentrações: 150 g/L de sacarose, 30 g/L de glicose e 40 UDS/mL de enzima. Esta condição corresponde à citada por Pereira et al. (1998).

Para a reação com aceptor maltose o volume foi de 100 mL. Para tal adicionou-se solução estoque de sacarose 600 g/L em tampão acetato (pH 5,2), solução de maltose 250 g/L em tampão acetato (pH 5,2), tampão acetato (pH 5,2) e suspensão de enzima em tampão acetato (pH 5,2). As quantidades adicionadas foram tais que resultaram nas seguintes concentrações: 120 g/L de sacarose, 29 g/L de maltose e 40 UDS/mL de enzima. Esta condição corresponde à citada por Paul et al. (1986).

Em todos os casos, o tempo zero correspondeu à adição da enzima e amostras de 3 mL foram retiradas a cada 30 minutos. Cada amostra foi inativada por aquecimento a 100 ^{0}C por 5 minutos, determinando-se os açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 DNS. As reações foram consideradas finalizadas após três valores constantes de açúcares redutores. O meio reacional foi aquecido a 100 ^{0}C por 5 minutos e armazenado sob refrigeração para posteriores testes de separação e para caracterização dos produtos obtidos por GPC (item 3.2.13.5). Posteriormente, as amostras foram analisadas por CLAE (item

3.2.13.4), para determinação das concentrações de substratos e produtos ao longo do tempo.

3.2.11. Separação dos Produtos de Reação Enzimática

Os produtos obtidos nas sínteses enzimáticas descritas anteriormente foram utilizados em testes para verificar sua separação em coluna de leito fixo contendo zeólita na forma Ba^{2+}, utilizando condições com base nos resultados observados para o item 3.2.8.

3.2.12. Determinação dos Coeficientes de Partição e Parâmetros de Transporte em Coluna de Leito Fixo

Estes parâmetros podem ser determinados pelo método de análise de respostas a pulsos cromatográficos, já comentado no item 3.2.6.3. As condições utilizadas para os experimentos em coluna foram baseados nos resultados anteriormente obtidos, tendo-se fixado a temperatura em 40 ^{0}C, a concentração do adsorbato em 20 g/L, o volume de pulso em 2 mL (aproximadamente 10 % do volume do leito, para uma coluna com 25 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro para o leito de zeólitas). Os pulsos foram alimentados e eluídos com vazões de 0,1 a 0,5 mL/min.

Para a descrição da curvas cromatográficas dos adsorbatos as seguintes hipóteses foram consideradas:

- o sistema líquido contém somente uma espécie a ser adsorvida;
- o soluto está diluído na fase móvel;
- a adsorção é descrita somente pela etapa linear da sua isoterma de adsorção;
- o mecanismo difusivo do líquido no interior dos poros da resina é governado somente pelo movimento browniano das moléculas do soluto;
- admite-se resistência externa à difusão interna do soluto.

Com estas considerações, foram propostas equações de balanço de massa na fase

móvel e fase porosa, conforme proposto por Cremasco et al. (2000), que permitiram o cálculo dos coeficientes de partição K para os adsorbatos glicose, frutose e dextrana (peso molecular 9300) puros, bem como a difusividade efetiva e o coeficiente de dispersão axial.

Os balanços de massa propostos, bem como os cálculos envolvidos na determinação dos parâmetros citados, são apresentados no Capítulo 4.

3.2.13. Métodos Analíticos

3.2.13.1. Determinação da Atividade de Dextrana-Sacarase

Em um reator encamisado a 30 ^{0}C adiciona-se 2 mL de solução de sacarose (600 g/L), 1 mL de solução tampão de acetato de sódio (acetato de sódio 20 mM e 1,2 g/L de $CaCl_2$) e 8 mL de água deionizada. Após a adição de 1 mL da amostra contendo dextrana-sacarase, retira-se amostras de 1 mL a cada 3 minutos durante 12 minutos. Nestas amostras são determinados os açúcares redutores liberados, utilizando o método do ácido 3,5 DNS (item 3.2.13.2). A absorbância lida em espectrofotômetro é plotada em função do tempo, e com o valor da inclinação da reta e com a curva-padrão de glicose determina-se a atividade enzimática, expressa em UDS (unidade de dextrana-sacarase), pela equação 4.2.

$$\text{Ativ (UDS / mL)} = \frac{\alpha.\beta.\text{d}.60}{0{,}52} \tag{3.4}$$

Onde:

α é o coeficiente angular da curva absorbância em função do tempo

β é o coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d é a diluição final do reator

Uma unidade de atividade de dextrana-sacarase (UDS) representa a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em uma hora, liberando 0,52 mg de frutose a 30 ^{0}C em pH 5,4 (tampão acetato 20 mM).

Uma unidade internacional (UI) corresponde a 20,27 UDS.

3.2.13.2. Determinação de Açúcares Redutores pelo Método 3,5 - DNS (Miller, 1959)

Primeiramente, é preparado o reagente 3,5 DNS, pela dissolução de 3,74 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 6,99 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água com um leve aquecimento. Após esfriar, adiciona-se 5,36 g de fenol (fundido a quente a 50 ^{0}C) e 2,93 g de metabissulfito de sódio, elevando o volume a 500 mL.

O método consiste da reação de 1 mL da amostra convenientemente diluída com 0,5 mL do reagente descrito, em banho-maria a 100 ^{0}C por 5 minutos. Após esfriar, adiciona-se 8,5 mL de água deionizada, fazendo-se a leitura da absorbância (540 ηm) em espectrofotômetro (Micronal, modelo B 342 II). O teste em branco é feito utilizando-se água deionizada como amostra.

A correlação entre a absorbância e a concentração de açúcares redutores (frutose ou glicose) é possível pela construção de uma curva-padrão, utilizando-se soluções padrões deste açúcar na faixa de 0 a 1 g/L.

3.2.13.3. Determinação de Açúcares Redutores pelo Método de Somogyi-Nelson (Reguly, 1983)

São preparados os seguintes reagentes:

Reagente A: dissolve-se 100 g de sulfato de sódio anidro em 150 mL de água destilada; 12 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de água destilada; 12 g de carbonato de sódio anidro em 100 mL de água destilada; e 10 g de bicarbonato de sódio anidro em 50 mL de água destilada. Junta-se, a seguir, as quatro soluções.

Reagente B: em 100 mL de água destilada, dissolve-se 6 g de sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$), adicionando duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Reagente C: dissolve-se 5 g de molibdato de amônio em 90 mL de água destilada,

juntando-se após 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Adiciona-se então 0,6 g de arseniato de sódio ($NaHAsO_4.7H_2O$), dissolvidos em 5 mL de água destilada. Deixa-se em estufa a 37 ^{0}C, filtra-se e guarda-se em frasco escuro.

O método consiste da reação de 1 mL da amostra convenientemente diluída com 1 mL de reagente (16 mL de A e 2mL de B), levando em banho-maria a 100 ^{0}C por 20 minutos. Após esfriar, adiciona-se 2 mL do reagente C, completando o volume a 25 mL, fazendo-se a leitura da absorbância (570 ηm) em espectrofotômetro (Micronal, modelo B 342 II). O teste em branco é feito utilizando-se água deionizada como amostra.

3.2.13.4. Análise de Frutose e Glicose por CLAE

O equipamento consiste de um injetor automático Varian 9095, bomba ternária Varian 9010, forno Spark Holland 99, e detector de índice de refração R14. Para as análises de frutose e glicose realizadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) utiliza-se uma coluna SHODEX KS801 e uma pré-coluna de mesmo nome. As condições de injeção das amostras são apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições para injeção de amostras de frutose e glicose no cromatógrafo.

Condição	Valor
Temperatura Ambiente	25 ^{0}C
Temperatura do Forno	60 ^{0}C
Temperatura do Detector do Índice de Refração	40 ^{0}C
Volume de Injeção	98 μL
Vazão do Eluente	0,60 mL/min
Tempo de Corrida	20 min

A fase móvel utilizada é água ultrapura, obtida em um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus, sendo a água desgaseificada a vácuo durante uma hora em um banho ultra-som Eurosonics modelo SX-20.

A curva de calibração é obtida utilizando-se soluções padrões de frutose e glicose de concentrações 4, 8, 12, 16 e 20 g/L.

As amostras contendo frutose são diluídas em água Milli-Q de tal forma que as concentrações resultantes encontrem-se entre os limites da curva de calibração.

Para quantificação das amostras, integrando os cromatogramas, é utilizado o "software" Millenium (Waters Co.).

3.2.13.5. Análise do Peso Molecular por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Nesta análise utiliza-se um conjunto de três colunas e uma pré-coluna Varian série Micropack. A faixa de exclusão de cada coluna e suas dimensões são mostradas na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Características das colunas utilizadas na GPC.

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

A fase móvel é água ultrapura, obtida em um sistema de purificação compacto Milli-Q Plus, sendo a água desgaseificada a vácuo durante uma hora em um banho ultra-som Eurosonics modelo SX-20.

As amostras são diluídas em água Milli-Q numa concentração de 0,02 % p/v, filtradas em membrana Millipore (0,45 μm de abertura de poro) e colocadas em repouso por 16 a 20 horas.

As condições para injeção das amostras nas colunas são mostradas na tabela 3.4.

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

Condição	Valor
Temperatura Ambiente	23 ^{0}C
Temperatura do Forno	40 ^{0}C
Temperatura do Detector do Índice de Refração	40 ^{0}C
Volume de Injeção	98 μL
Vazão do Eluente	1,0 mL/min
Tempo de Corrida	35 min

Para a curva de calibração são utilizados padrões de dextrana (American Polymer Standards Corporation) e frutose, mostrados na tabela 3.5. A curva de calibração é obtida utilizando os parâmetros M_w, M_n e M_p como parâmetros básicos.

Para quantificação das amostras, integrando os cromatogramas, também é utilizado o "software" Millenium.

Tabela 3.5: Pesos moleculares dos padrões utilizados.

Padrão	M_w	M_p	M_n
DXT 11K	11700	9900	8000
DXT 43K	42750	35000	28700
DXT 79K	78800	68000	49400
DXT 165K	165500	150000	110800
DXT 685K	685000	500000	380600
DXT 1750K	1750000	1450000	1250000
DXT 5000K	4900000	4500000	1500000
Frutose	-	180	-

3.2.13.6. Quantificação de Oligossacarídeos e Dextranas por CLAE

A fim de quantificar as amostras obtidas em ensaios por pulsos cromatográficos contendo dextrana ou oligossacarídeos, permitindo a obtenção de um perfil de eluição, procurou-se um método alternativo para estas determinações, já que a GPC permite avaliar somente a distribuição de peso molecular.

Desta forma as amostras foram quantificadas utilizando uma coluna Shodex KS801, nas mesmas condições utilizadas para monossacarídeos (item 3.2.13.4), utilizando padrões de dextranas de concentração conhecida e correlacionando as áreas dos picos obtidos para as amostras e áreas dos picos dos padrões.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos experimentos realizados.

4.1. Testes Preliminares para Seleção de Uma Zeólita Adequada à Adsorção de Frutose

4.1.1. Teste dos Métodos Analíticos

Nesta etapa inicial, três diferentes métodos de determinação da concentração de açúcares foram testados, a fim de selecionar aquele mais adequado para os ensaios propostos. Os métodos testados foram:

- 3,5 DNS (Miller, 1959) e Somogyi-Nelson, dois métodos espectrofotométricos, ambos baseados na capacidade redutora de açúcares, mas com distintas faixas de detecção.

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Shodex KS801 em cromatógrafo.

Primeiramente tentou-se trabalhar com o método 3,5 DNS, amplamente utilizado, com vantagem de permitir uma rápida avaliação do desempenho da adsorção. No entanto foi observado, já no princípio do trabalho, que algumas condições para a condução da adsorção poderiam resultar numa diferença pequena entre a concentração final e inicial de açúcares em solução, menor que 5 %, o que inviabilizaria a utilização do método, pela faixa de erro do mesmo, o que pôde ser constatado experimentalmente (observou-se concentrações inicial e final aproximadamente iguais, o que indicaria não adsorção, mas uma diferença foi detectada por outros métodos analíticos). Alternativamente, testou-se o método de Somogyi-Nelson, observando-se o mesmo problema.

A cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se uma técnica adequada para os estudos propostos, mostrando boa sensibilidade e reprodutibilidade, sendo esta a técnica adotada em todo o trabalho. Devido às peculiaridades do processo em estudo, sobretudo no que diz respeito à pequena variação de concentração que deve ser medida, tomou-se, como cuidados rotineiros, para todos as análises, a calibração das pipetas automáticas utilizadas para diluição, a realização de duplicatas de diluição e de injeção no cromatógrafo e a utilização de material rigorosamente seco.

Este aspecto é ilustrado pelos cromatogramas mostrados na figura 4.1, que evidenciam a pouca diferença que pode ser observada entre uma amostra inicial e final em um ensaio de adsorção.

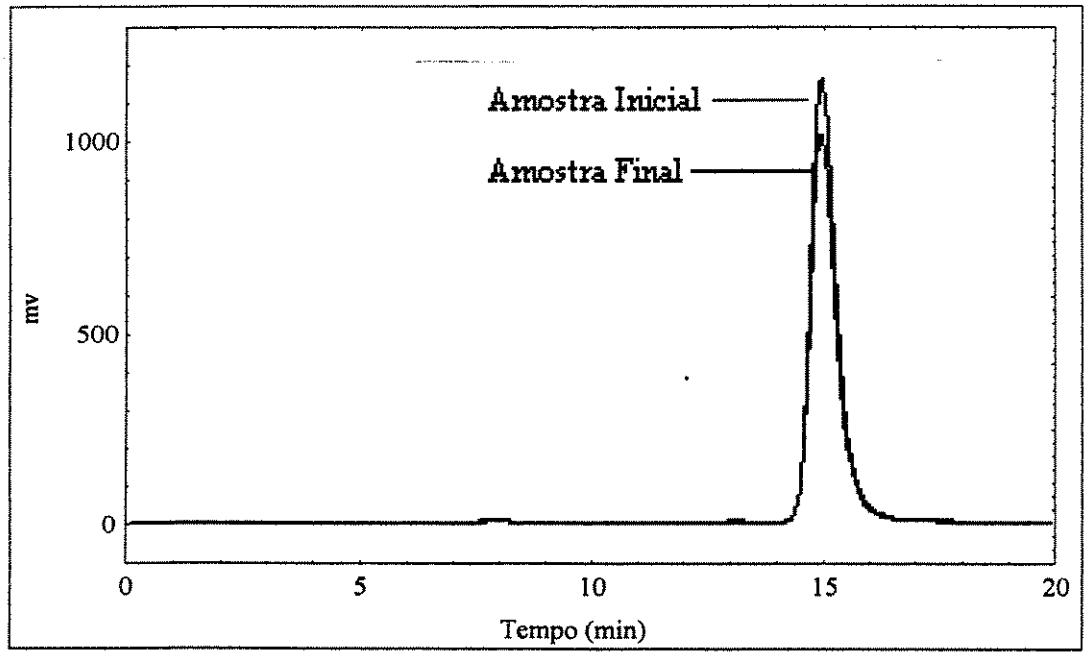


Figura 4.1: Cromatogramas típicos obtidos na adsorção da frutose a 30 ^{0}C em zeólita na forma Ba^{2+}.

4.1.2. Testes Iniciais para Escolha da Zeólita e Metodologia para os Experimentos em Banho Finito

Testes preliminares foram realizados com quatro zeólitas distintas, a fim de verificar a mais promissora para utilização na adsorção de frutose. Todas as zeólitas foram submetidas à troca iônica com íons Ca^{2+}, conforme metodologia descrita no item 3.2.1.1, pois o Ca^{2+} é o cátion mais freqüentemente associado à adsorção de açúcares. No entanto, apenas a zeólita Baylith WE 894 mostrou capacidade de adsorção nestes experimentos iniciais.

Nesta etapa, também foram definidos, a partir da revisão bibliográfica e das dificuldades encontradas na condução dos experimentos, procedimentos que serviram como

referência aos ensaios subseqüentes, estabelecendo-se a melhor relação sólido-solução, a hidratação da zeólita e a forma de coleta e filtração da amostra.

As amostras foram coletadas utilizando seringas. Elementos filtrantes, como algodão, lã de vidro e papel de filtro, não foram eficientes, obtendo-se amostras turvas pela passagem de partículas finas. A solução foi a utilização de filtros Millex (Millipore) com 0,45 μm de diâmetro de poro.

Quanto à relação sólido-solução, três relações distintas foram propostas (1:20, 1:10 e 1:5). O esperado era que uma maior quantidade de zeólita aumentasse a quantidade adsorvida, levando a uma maior diferença entre concentração inicial e final, facilitando no aspecto analítico. No entanto, dificuldades de homogeneização da suspensão para quantidades maiores de sólido, bem como problemas de entupimento de filtros, comprometendo a adsorção e dificultando a obtenção do material filtrado, foram observadas, optando-se definitivamente pela relação 1:20.

4.2. Caracterização da Zeólita Baylith WE 894

A figura 4.1 mostra a isoterma de adsorção de nitrogênio. Convencionalmente, a isoterma de adsorção de nitrogênio representa o método mais usado para determinar a área superficial total e para caracterizar a estrutura porosa do sólido.

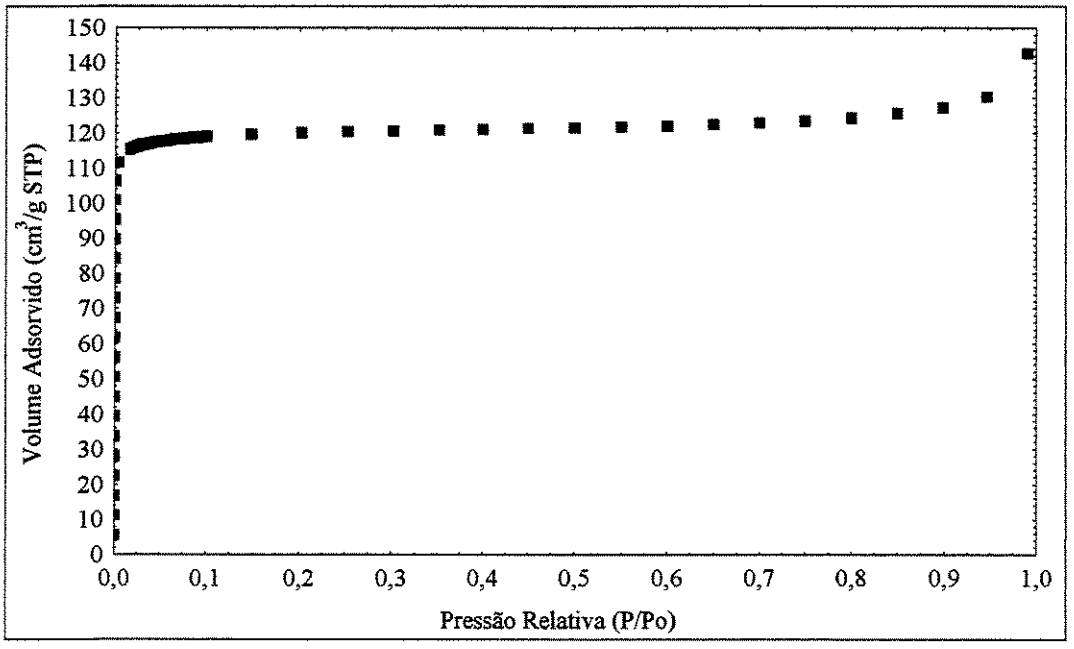


Figura 4.2: Isoterma de adsorção de nitrogênio para a zeólita em estudo.

Para determinação da área superficial utilizou-se o método de Brunauer, Emmet e Teller, conhecido como equação BET (equação 4.1).

$$\frac{1}{v(p_0/p-1)} = \frac{1}{V_m.C_{bet}} + \frac{C_{bet}-1}{V_m.C_{bet}}\frac{p}{p_0} \qquad (4.1)$$

Com esta curva (figura 4.3) foi possível o cálculo do volume requerido para uma camada monomolecular de nitrogênio (v_m), a partir do qual a área superficial pôde ser calculada. A tabela 4.1 mostra estes valores. O valor negativo de *c* é indicativo do caráter microporoso da zeólita.

Tabela 4.1: Resultados do modelo BET obtidos com os dados da isoterma de adsorção de nitrogênio.

Parâmetro	Valor
v_m	103,0157cm^3/g STP
c_{bet}	-221,2328
Área Superficial	448,4478 m^2/g
Volume de Poro	0,2208 cm^3/g

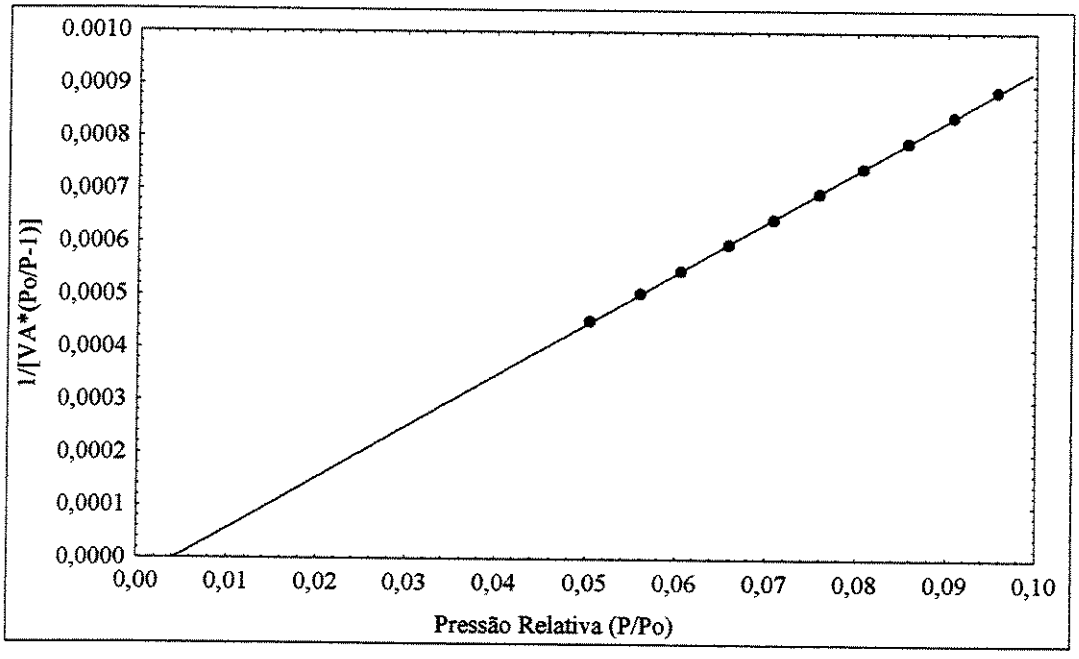


Figura 4.3: Curva BET para o cálculo da área superficial.

A tabela 4.2 mostra a composição da zeólita de partida (forma sódica). A relação Si/Al de 3,07 é característica de zeólitas do tipo Y. No entanto, convém ressaltar que parte do silício poderia não estar presente na estrutura cristalina. Neste caso, a relação Si/Al na estrutura seria menor que o valor obtido.

A densidade calculada foi de 1,9653 g/mL.

Tabela 4.2: Composição da zeólita de partida.

Componente	Teor (%)
Na_2O	10,57
Al_2O_3	16,96
SiO_2	58,93
Si/Al	3,07
Umidade	13,56

A figura 4.4 mostra a distribuição de tamanho de poros. A zeólita apresentou uma distribuição uniforme de tamanho de poro, com diâmetro médio de 0,5621 ηm. Esta dimensão permite a difusão de moléculas como glicose e frutose no interior dos poros, permitindo a interação destas com os sítios da zeólita ocupados pelos cátions de compensação, enquanto moléculas maiores, como sacarose (diâmetro de aproximadamente 0,88 ηm), maltose, oligossacarídeos e dextranas não penetram nos poros, dando-se um efeito de peneira molecular que pode ser útil na separação de açúcares aplicada a reações enzimáticas. Por exemplo na síntese enzimática de dextrana, ou oligossacarídeos na presença de aceptores, por dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides*, em que a frutose é um subproduto da reação, pode-se ter uma separação satisfatória destes compostos.

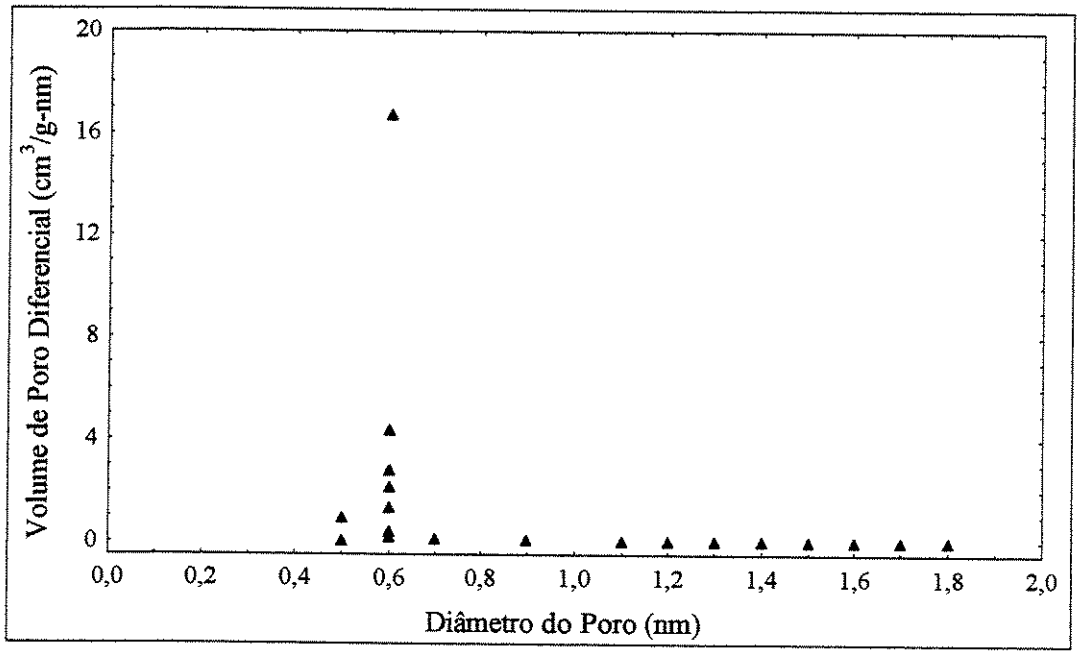


Figura 4.4: Distribuição de tamanho de poros pelo método de Hovárth-Kawazoe.

4.3. Isotermas de Adsorção em Banho Finito

Seis diferentes isotermas de adsorção foram obtidas. Na adsorção de frutose, o cátion de compensação da zeólita foi avaliado. As zeólitas foram modificadas por troca iônica, conforme proposto no item 3.2.1. Os cátions propostos para o estudo foram: Ba^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} e K^{+}, mencionados no trabalho de Schöllner et al. (1993). Os resultados obtidos nestes experimentos determinaram o estudo da adsorção de glicose somente para os cátions Ba^{2+} e K^{+}.

4.3.1. Modelos de Adsorção

Em primeiro lugar, os dados de equilíbrio obtidos para as diferentes isotermas foram tratados matematicamente a fim de selecionar um modelo adequado para a isoterma. Os modelos propostos são citados por Finette et al. (1997).

Os modelos testados foram os seguintes:

Linear: $q^* = Kc^*$

Freundlich: $q^* = K_f c^{*nf}$

Langmuir: $q^* = \frac{q_m.c^*}{K_d + c^*}$

Langmuir-Freundlich: $q^* = \frac{q_m.c^{*n}}{K_d + c^{*n}}$

Os parâmetros dos modelos Langmuir e Langmuir-Freundlich foram obtidos por ajuste não linear realizado com a ferramenta "solver" do software Excel 2000.

As tabelas 4.3 a 4.6 mostram os valores obtidos para os parâmetros de cada modelo. Pode-se verificar que o comportamento observado para a adsorção de frutose e glicose foi similar para os diferentes modelos, com adsorção mais efetiva de frutose na zeólita Ba^{2+}, adsorvendo pouco a glicose. Os coeficientes de correlação, entre os dados experimentais e preditos, em geral foram satisfatórios. Exceção foi a isoterma de adsorção de frutose em zeólita na forma K^+, utilizando os modelos de Langmuir e Freundlich.

Com relação aos desvios médios, correspondentes a média das diferenças percentuais entre os valores experimentais e preditos por um dado modelo, pode-se afirmar que foram aceitáveis e na mesma ordem de grandeza para todos os casos, sendo que o modelo de Freundlich resultou nos menores desvios para as isotermas de adsorção de frutose em zeólita Ca^{2+} e glicose em zeólita Ba^{2+}. Convém ressaltar que os maiores desvios observados com o modelo linear nas citadas isotermas foram devidos a um único ponto de baixa concentração. Para as demais isotermas, os modelos lineares foram os que apresentaram os menores desvios.

A adoção de um modelo simples, com apenas um parâmetro, poderá ser útil em trabalhos posteriores, que envolvam modelagem matemática e simulação da adsorção. Convém ressaltar que os trabalhos citados na literatura apontam a adsorção de glicose e frutose como tendo um comportamento linear para baixas concentrações. Além disso, o uso

de um mesmo tipo de modelo permite uma comparação direta do desempenho de zeólitas distintas. Desta forma, o modelo linear foi adotado para representar as diferentes isotermas de adsorção de frutose e glicose em zeólitas.

Tabela 4.3: Parâmetros do modelo linear.

Isoterma	Coeficiente de Partição K	Coeficiente de Correlação (r)	Desvio Médio (%)
30 ^{0}C/Ca^{2+}/Frutose	0,40	0,96	31,77
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Frutose	0,82	0,98	15,13
30 ^{0}C/Sr^{2+}/Frutose	0,31	0,97	18,29
30 ^{0}C/K^+/Frutose	0,44	0,94	17,62
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Glicose	0,12	0,95	26,99
30 ^{0}C/K^+/Glicose	0,33	0,97	10,57

Tabela 4.4: Parâmetros ajustados para o modelo de Freundlich.

Isoterma	K_f	n_f	Coeficiente de Correlação (r)	Desvio Médio (%)
30 ^{0}C/Ca^{2+}/Frutose	0,10	1,27	0,98	16,00
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Frutose	1,44	0,86	0,97	15,72
30 ^{0}C/Sr^{2+}/Frutose	1,76	0,60	0,96	6,23
30 ^{0}C/K^+/Frutose	1,08	0,80	0,87	19,44
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Glicose	0,0035	1,74	0,98	9,64
30 ^{0}C/K^+/Glicose	0,36	0,99	0,95	13,16

Tabela 4.5: Parâmetros ajustados para o modelo de Langmuir.

Isoterma	q_m (mg/g)	K_d (mg/g)	Coeficiente de Correlação (r)	Desvio Médio (%)
30 ^{0}C/Ca^{2+}/Frutose	90,91	252,52	0,92	27,35
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Frutose	125,00	104,98	0,92	17,90
30 ^{0}C/Sr^{2+}/Frutose	32,00	34,66	0,95	7,77
30 ^{0}C/K^+/Frutose	75,00	101,24	0,81	15,58
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Glicose	28,27	385,80	0,96	34,75
30 ^{0}C/K^+/Glicose	66,57	100,00	0,99	19,46

Tabela 4.6: Parâmetros ajustados para o modelo de Langmuir-Freundlich.

Isoterma	q_m (mg/g)	K_d (mg/g)	n	Coeficiente de Correlação (r)	Desvio Médio (%)
30 ^{0}C/Ca^{2+}/Frutose	75,00	137,03	0,92	0,90	33,31
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Frutose	125,00	69,72	0,87	0,92	16,31
30 ^{0}C/Sr^{2+}/Frutose	37,24	29,97	0,85	0,94	6,77
30 ^{0}C/K^+/Frutose	99,61	44,99	0,72	0,82	13,91
30 ^{0}C/Ba^{2+}/Glicose	81,63	357,31	0,68	0,96	38,01
30 ^{0}C/K^+/Glicose	350,74	281,26	0,73	0,98	21,46

4.3.2. Considerando o Modelo Linear

As figuras 4.5 a 4.10 mostram as isotermas de adsorção de frutose e glicose para diferentes cátions de compensação da zeólita, ajustadas ao modelo linear. Os valores experimentais apresentados são resultado da média de quatro valores lidos de concentração

inicial e final, tendo sido feito duplicata da diluição e injeção no cromatógrafo, conforme comentado no item 4.1.1.

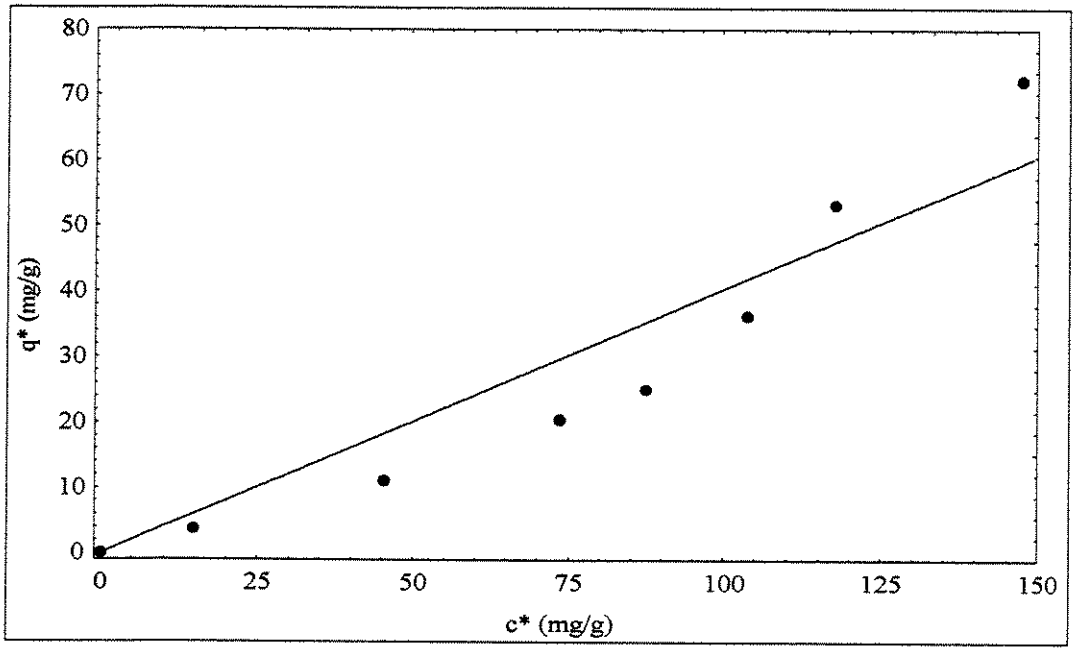


Figura 4.5: Isoterma de adsorção de frutose em zeólita na forma Ca^{2+} a 30 ^{0}C. q*=0,40c*. r = 0,96

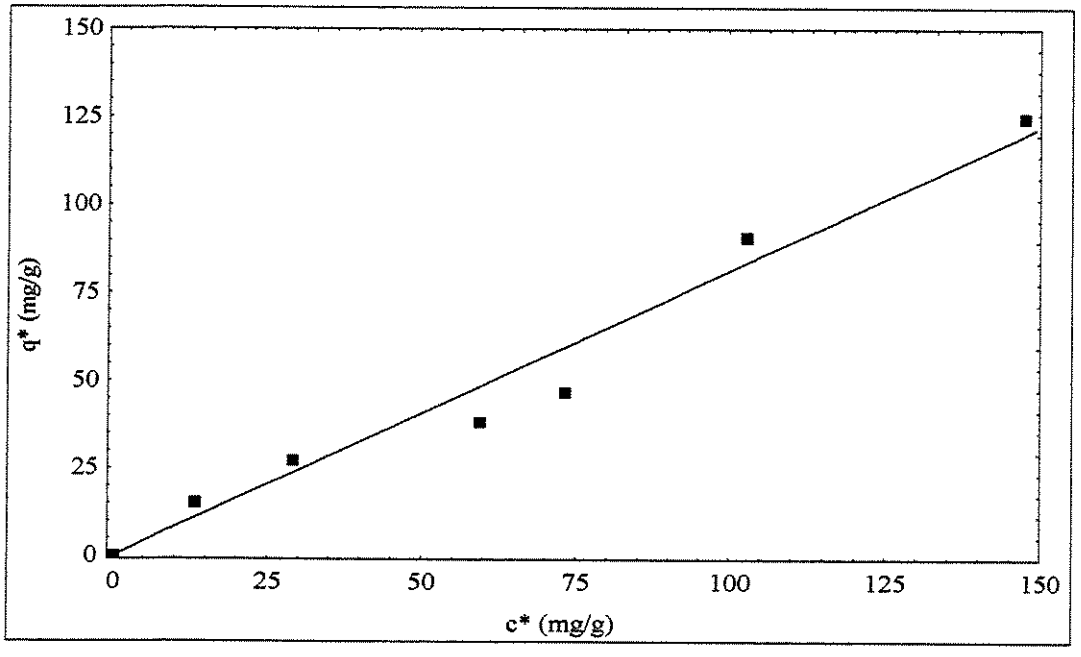


Figura 4.6: Isotermas de adsorção de frutose em zeólita na forma Ba^{2+} a 30 ^{0}C. q*=0,82c*. r = 0,98.

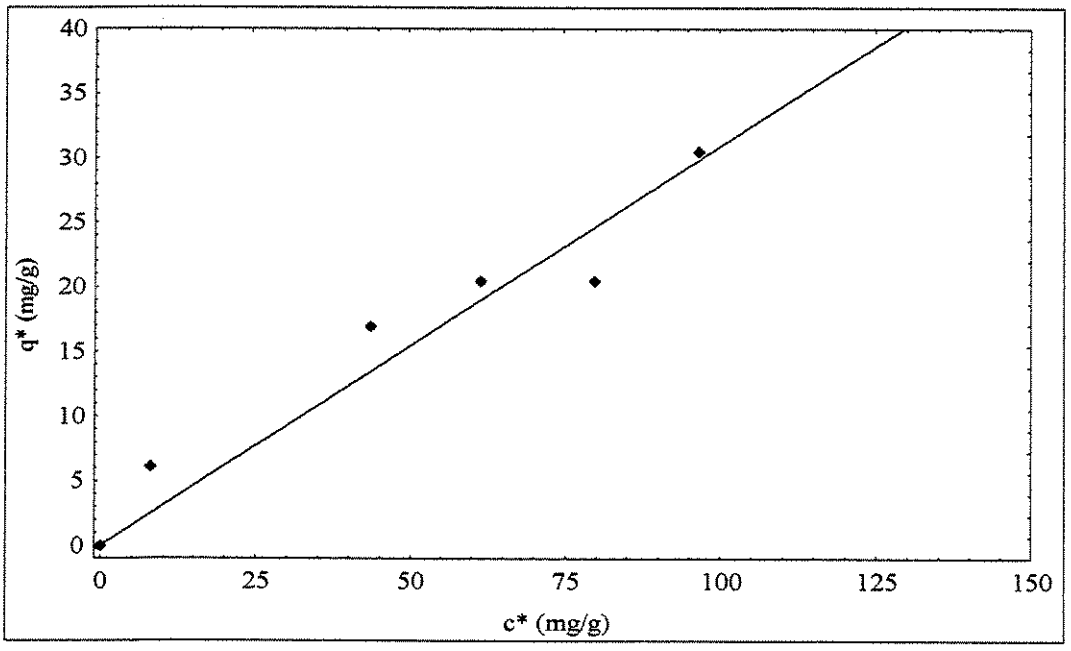


Figura 4.7: Isoterma de adsorção de frutose em zeólita na forma Sr^{2+} a 30 ^{0}C. q*=0,31c*. r = 0,97.

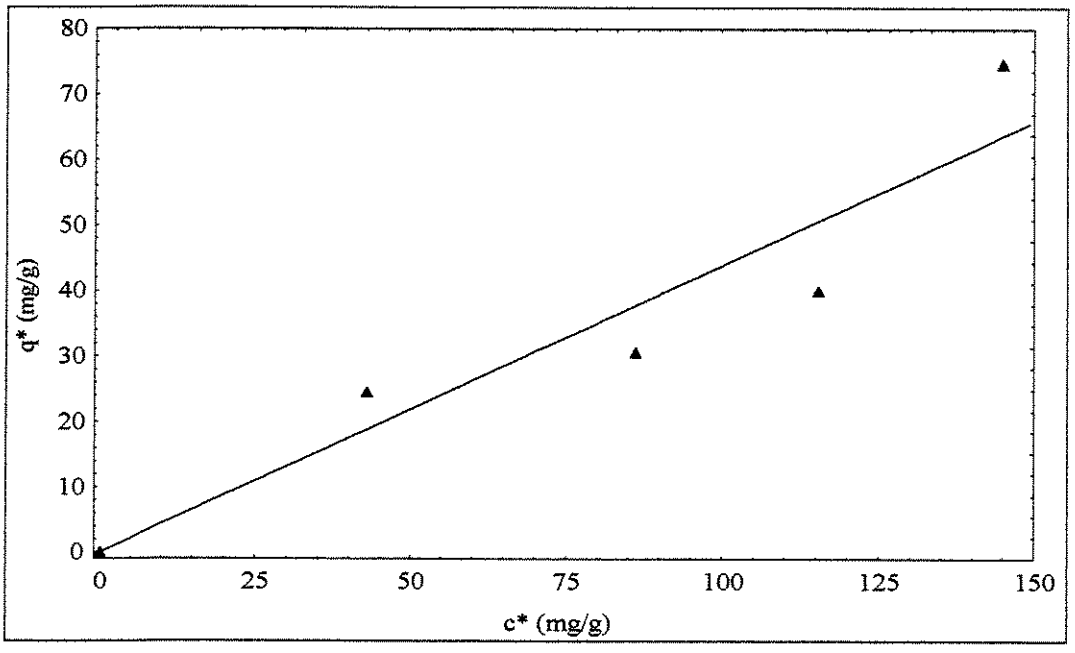


Figura 4.8: Isotermas de adsorção de frutose em zeólita na forma K^+ a 30 ^{0}C. q*=0,44c*. r = 0,94.

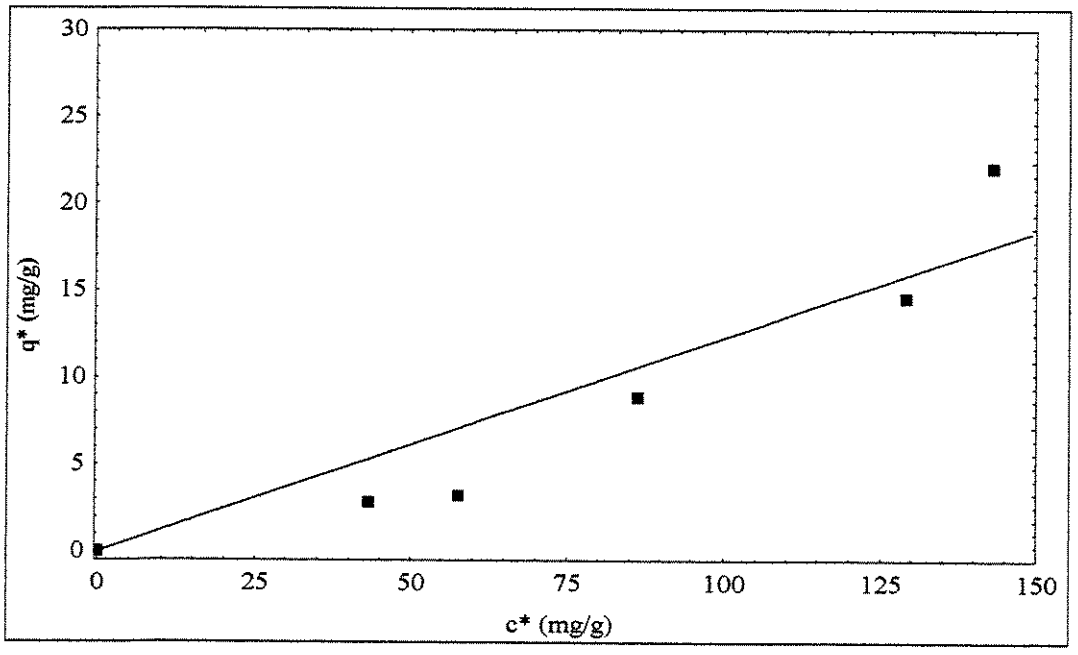


Figura 4.9: Isotermas de adsorção de glicose em zeólita na forma Ba^{2+} a 30 ^{0}C. q*=0,12c*. r = 0,95.

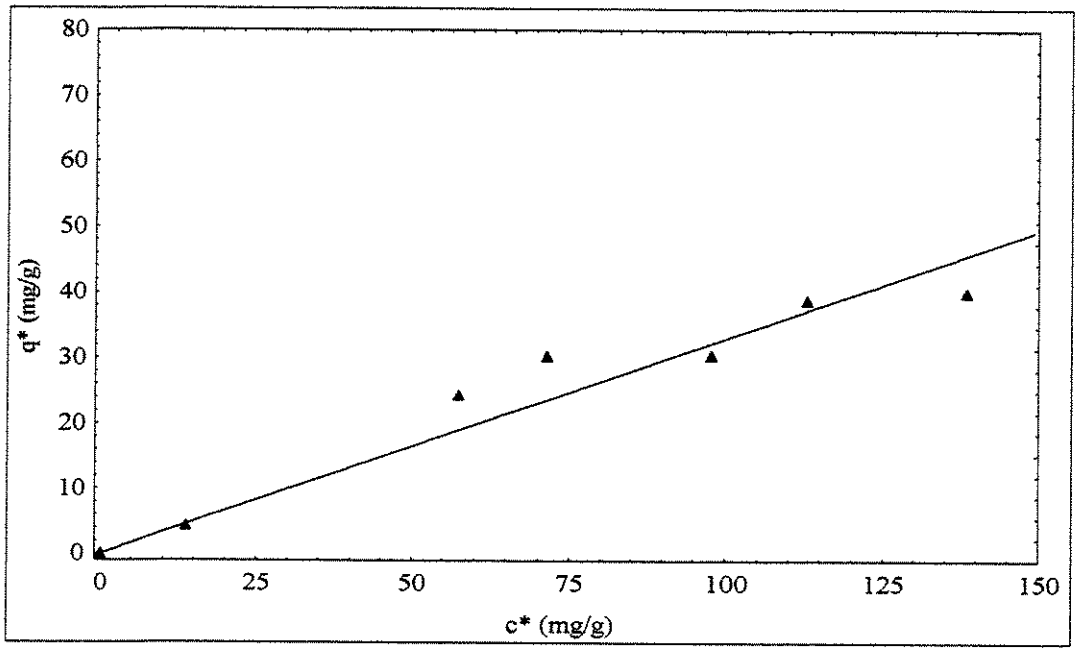


Figura 4.10: Isotermas de adsorção de glicose em zeólita na forma K^+ a 30 ^{0}C. q*=0,33c*. r = 0,97.

A isoterma linear é descrita pela seguinte equação:

$$q^* = Kc^* \qquad (4.2)$$

Na equação 4.2, **K** é o parâmetro que caracterizada esta isoterma, denominado coeficiente de partição (ou parâmetro de equilíbrio), correspondendo ao coeficiente angular da equação, **q*** é a quantidade adsorvida no equilíbrio e **c*** é a concentração em solução no equilíbrio. Portanto, quanto maior o coeficiente de partição, maior a capacidade de adsorção, melhor o desempenho da adsorção.

A tabela 4.7 mostra os modelos lineares para as isotermas de adsorção de frutose e glicose, bem como os respectivos coeficientes de correlação para os ajustes lineares.

Tabela 4.7: Modelos lineares propostos para as isotermas de adsorção de frutose e glicose.

Condições	Modelo Linear para a Frutose	r	Modelo Linear para a Glicose	r
30 ^{0}C/Ca^{2+}	q*=0,40c*	0,96	-	
30 ^{0}C/Ba^{2+}	q*=0,82c*	0,98	q*=0,12c*	0,95
30 ^{0}C/K^+	q*=0,44c*	0,94	q*=0,33c*	0,97
30 ^{0}C/Sr^{2+}	q*=0,31c*	0,97	-	

Os coeficientes de correlação (r) obtidos no ajuste linear foram considerados satisfatórios, similares aos encontrados para isotermas de frutose utilizando resinas de troca iônica (Matijasevic & Vasic-Racki, 2000).

A figura 4.11 mostra, comparativamente, as isotermas de adsorção de frutose e glicose para a zeólita Ba^{2+}, que apresentou o melhor resultado em termos de capacidade de adsorção e seletividade para a frutose. O valor de K obtido para a zeólita na forma Ba^{2+} na adsorção de frutose foi superior aos encontrados para resinas de troca iônica mencionados na literatura, como pode ser observado na tabela 4.8.

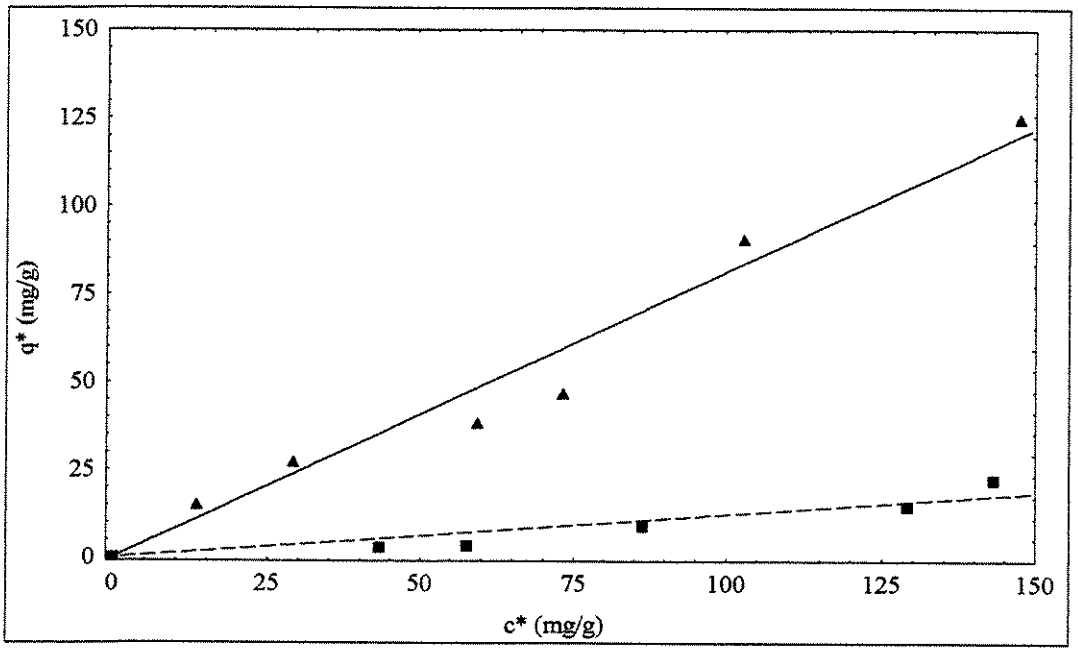


Figura 4.11: Isotermas de adsorção de frutose (▲) e glicose (■) em zeólita na forma Ba^{2+} a 30 ^{0}C.

Tabela 4.8: Comparação entre a adsorção de frutose por zeólitas e por resinas de troca iônica.

Adsorvente	Condições	K	Referência
Lewatit MDS1368	$Ca^{2+}/40^0C$	0,316	Matijasevic & Vasic-Racki (2000)
Duolite C204/2115	$Ca^{2+}/60^0C$	0,46	Viard & Lameloise (1992)
Duolite C204/2078	$Ca^{2+}/30^0C$ $Ca^{2+}/60^0C$	0,59 0,47	Viard & Lameloise (1992)
Dowex C326	$Ca^{2+}/30^0C$ $Ca^{2+}/60^0C$	0,72 0,64	Viard & Lameloise (1992)
Zeólita Bayer	$Ba^{2+}/30^0C$	0,82	Este trabalho

4.3.3. Considerações sobre os Mecanismos de Adsorção

Foi observada adsorção pouco efetiva de frutose usando zeólita na forma cálcica, sendo que resinas em geral são utilizadas na forma cálcica. O fato pode ser explicado devido à relação Si/Al da zeólita em uso. Para relações Si/Al superiores a 2, menos de duas cargas negativas estão posicionadas para interação com um íon cálcio, conferindo a este maior mobilidade e resultando em interações eletrostáticas mais fracas. A isoterma da zeólita modificada por troca iônica com íons bário bivalente foi a que resultou em maior adsorção de frutose. Este fato pode estar relacionado ao maior raio dos íons bário, que implica na predominância destes na posição SII da supercavidade α da zeólita, adsorvendo frutose nessa região independente do grau de troca e da relação Si/Al da zeólita (Schöllner et al., 1993). Além disso, apresentou baixa adsorção de glicose, o que implica em boa seletividade na adsorção de misturas contendo glicose e frutose. No caso da zeólita na forma K^+, não foi observada diferença apreciável na adsorção de glicose e frutose, não demonstrando seletividade. No entanto, o uso de zeólita K^+ favoreceu a adsorção de

glicose, quando comparado à forma Ba^{2+}, pois sabe-se que há uma favorável interação entre íons K^+ e o tautômero de glicose predominante em solução (isômero β-p-C_4).

4.4. Aspectos da Cinética de Adsorção

As curvas cinéticas obtidas na adsorção de glicose e frutose são mostradas nas figuras 4.12 e 4.13.

Observou-se a dificuldade em acompanhar o decréscimo da concentração ao longo do tempo, pois a diferença entre concentração final e inicial foi bastante pequena. Desta forma, os dados obtidos não foram adequados para o cálculo de parâmetros cinéticos e de transporte, como constantes cinéticas e difusividade efetiva. Como já comentado por Viard & Lameloise (1992) pode resultar em valores de parâmetros pouco representativos. Portanto, pode-se afirmar que, para separações como a estudada, o estudo da cinética de adsorção em banho finito não é um método adequado para o levantamento dos parâmetros desejados, devendo-se propor métodos alternativos para estas determinações.

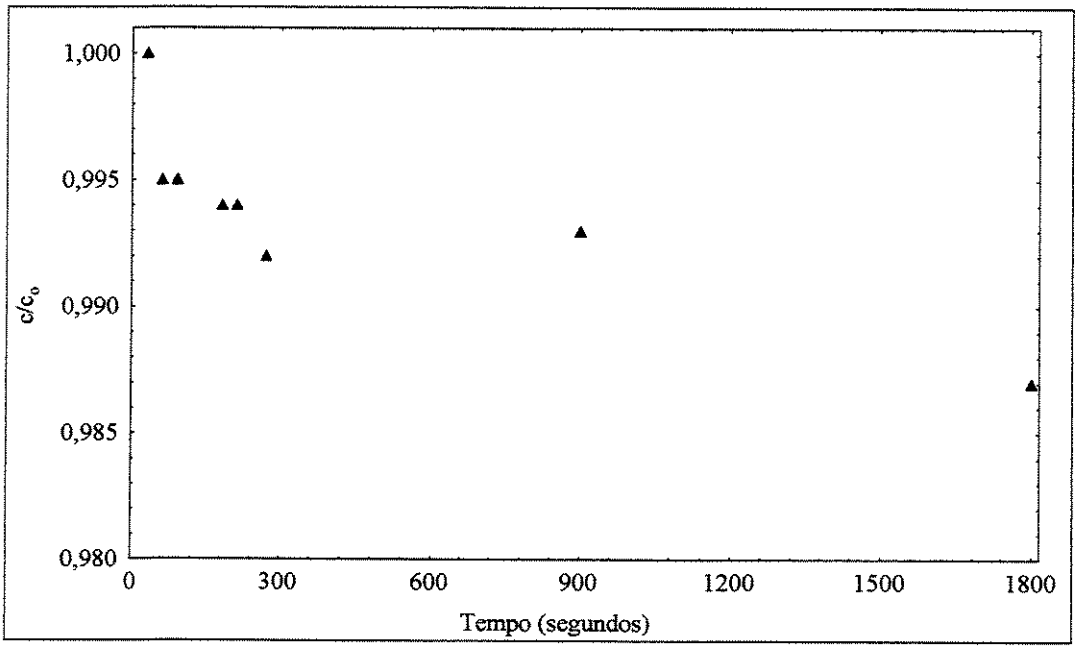


Figura 4.12: Curva cinética de adsorção da frutose em zeólita na forma Ba^{2+}. $c_0 = 91{,}32$ mg/g; T = 30 °C.

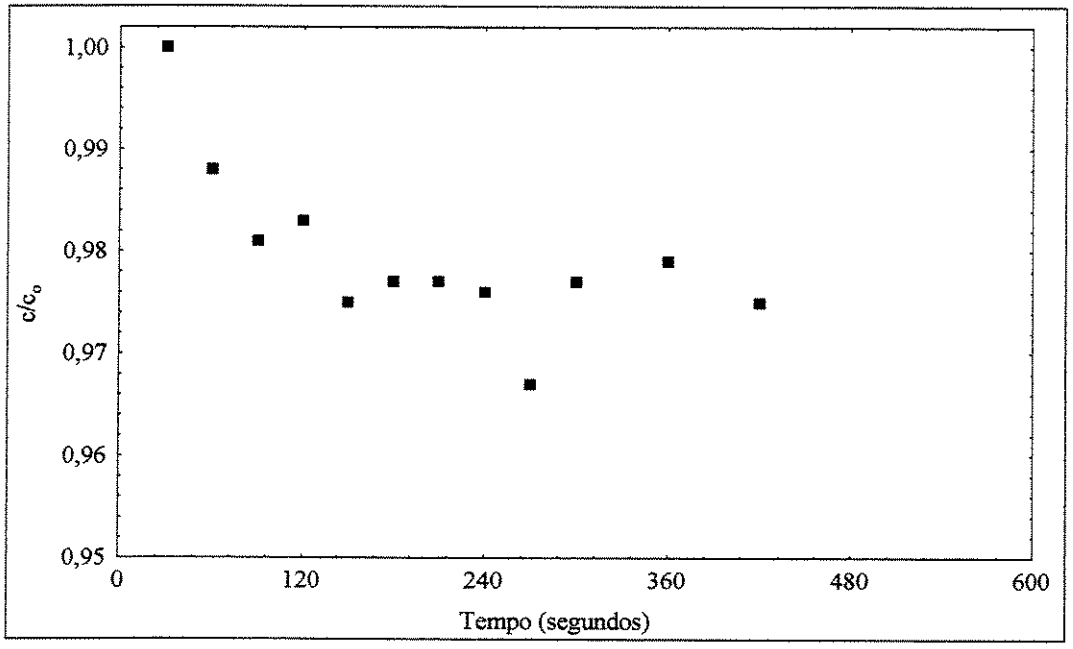


Figura 4.13: Curva cinética de adsorção da glicose em zeólita na forma K^+. c_o = 102,69 mg/g; T = 30 ^{0}C.

4.5. Ensaios Preliminares em Coluna de Leito Fixo

4.5.1. Curvas de Ruptura

As figuras 4.14 e 4.15 mostram as curvas de ruptura utilizando-se na alimentação misturas equimoleculares de glicose e frutose (concentração de 20 g/L de cada componente) obtidas em coluna contendo, respectivamente, zeólita nas formas Na^+ e Ba^{2+}. Para a zeólita sódica foram obtidos tempos de ruptura da glicose e frutose muito próximos (respectivamente 110,69 min e 117,07 min) e perfis bastante similares, evidenciando sua pouca seletividade. Já com a zeólita na forma Ba^{2+} verificou-se uma diferença mais pronunciada entre os tempos de ruptura para glicose e frutose (respectivamente 112,88 min e 129,77 min), demonstrando uma maior retenção e seletividade para a frutose. A glicose foi fracamente retida em ambos os casos, sendo que a troca iônica pareceu não influenciar sua adsorção.

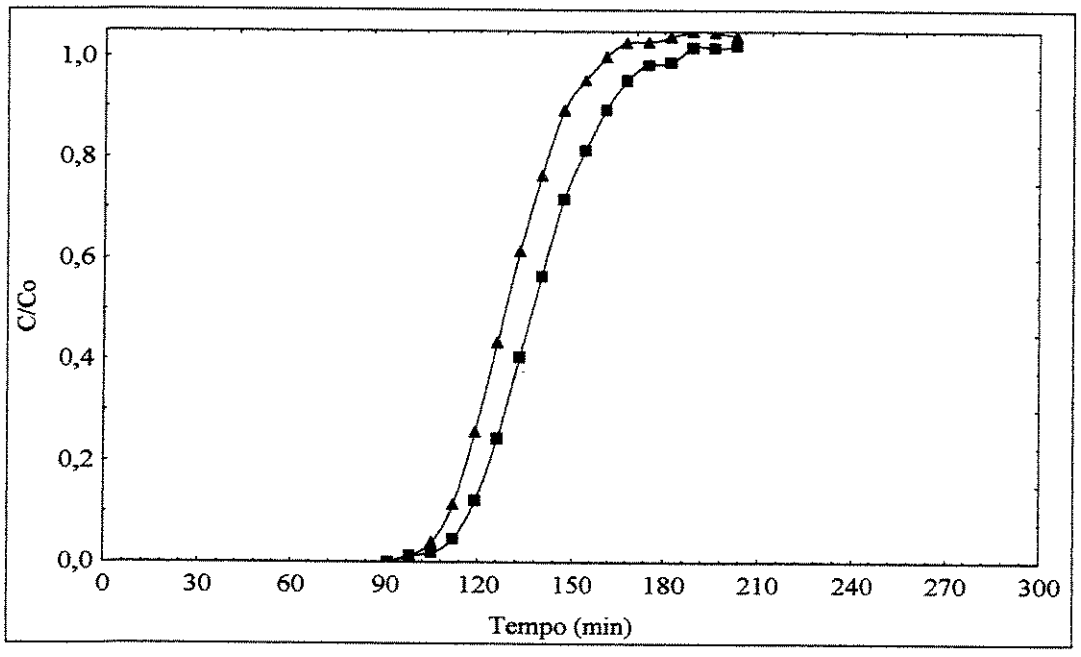


Figura 4.14: Curvas de ruptura em coluna com zeólita de partida (forma Na^{+}).

■ (frutose); ▲ (glicose).

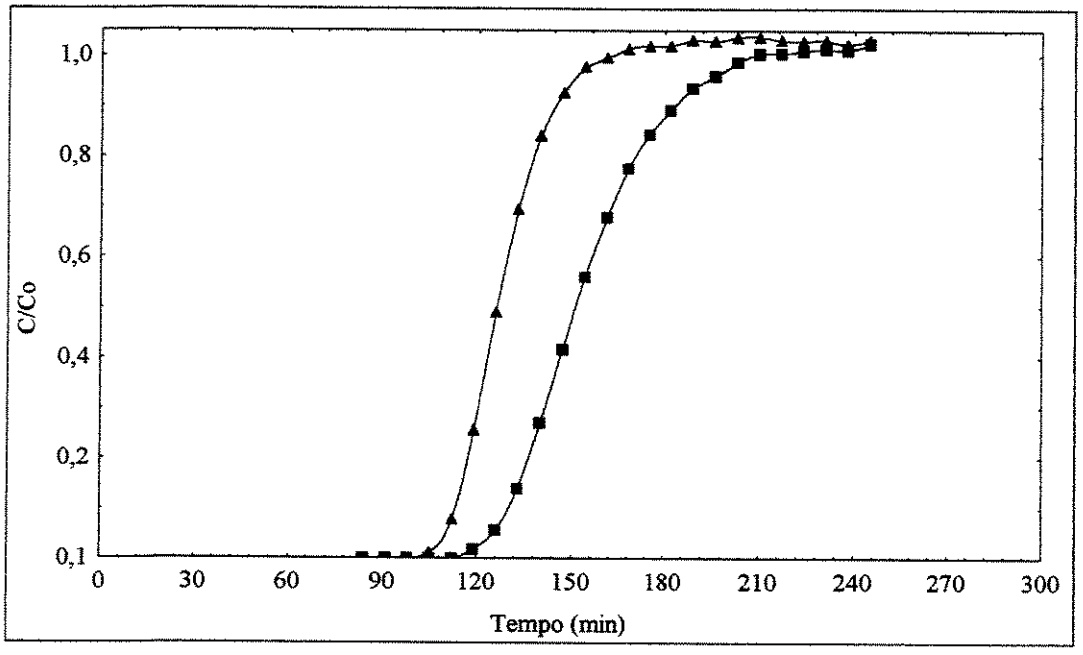


Figura 4.15: Curvas de ruptura em coluna com zeólita na forma Ba^{2+}.

■ (frutose); ▲ (glicose).

4.5.2. Análise de Respostas a Pulsos Cromatográficos

As figuras de 4.16 e 4.17 mostram os resultados obtidos pelo método do pulso cromatográfico na separação de glicose e frutose. A eficiência de separação (ES) foi calculada conforme as equações 4.3, 4.4 e 4.5 descritas abaixo, de acordo com o procedimento utilizado por Cavenaghi (1999) e proposto por Lu & Lee (1987):

$$ES_{12} = \frac{\Delta t_{12}}{\sigma_{12}} \tag{4.3}$$

Sendo:

$$\Delta t_{12} = |\mu_1 - \mu_2| \tag{4.4}$$

$$\sigma_{12} = (\sigma_1.\sigma_2)^{1/2} \tag{4.5}$$

Definindo o primeiro (μ) e segundo (σ^2) momentos para cada componente como:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i.t_i.\Delta t_i}{\sum_{i=1}^{n} C_i.\Delta t_i} \tag{4.6}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i.(t_i - \mu)^2.\Delta t_i}{\sum_{i=1}^{n} C_i.\Delta t_i} \tag{4.7}$$

Onde $\mathbf{C_i}$ é a concentração do componente na fração i, $\mathbf{t_i}$ o respectivo tempo, e $\mathbf{\Delta t_i}$ o intervalo de amostragem.

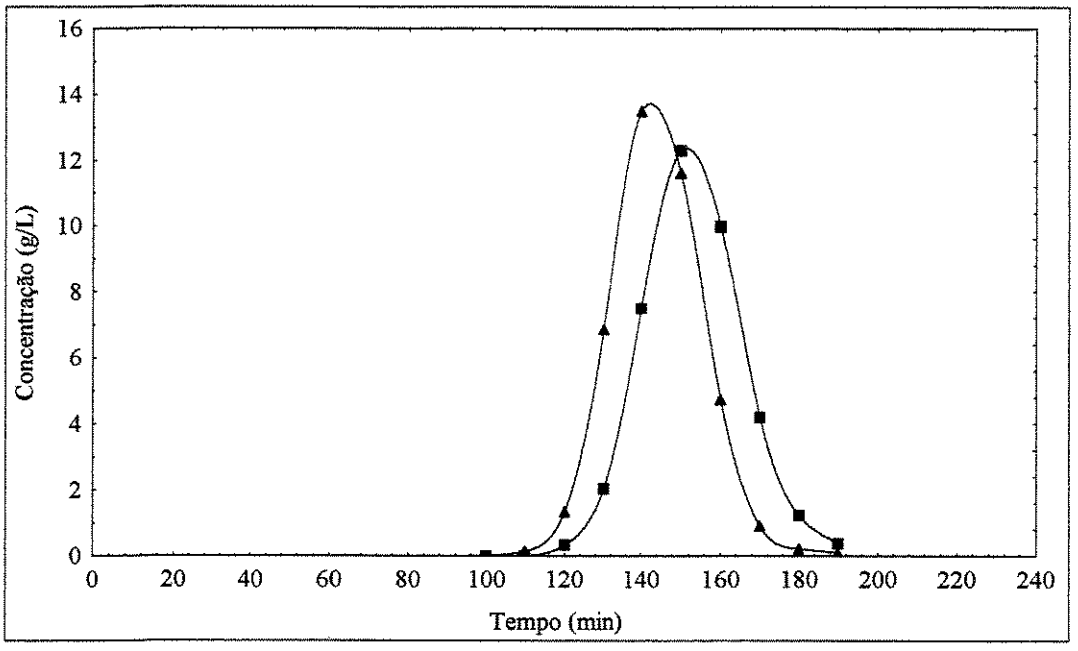


Figura 4.16: Perfil de eluição de glicose (▲) e frutose (■) em coluna com zeólita na forma Na^{+}. T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L.

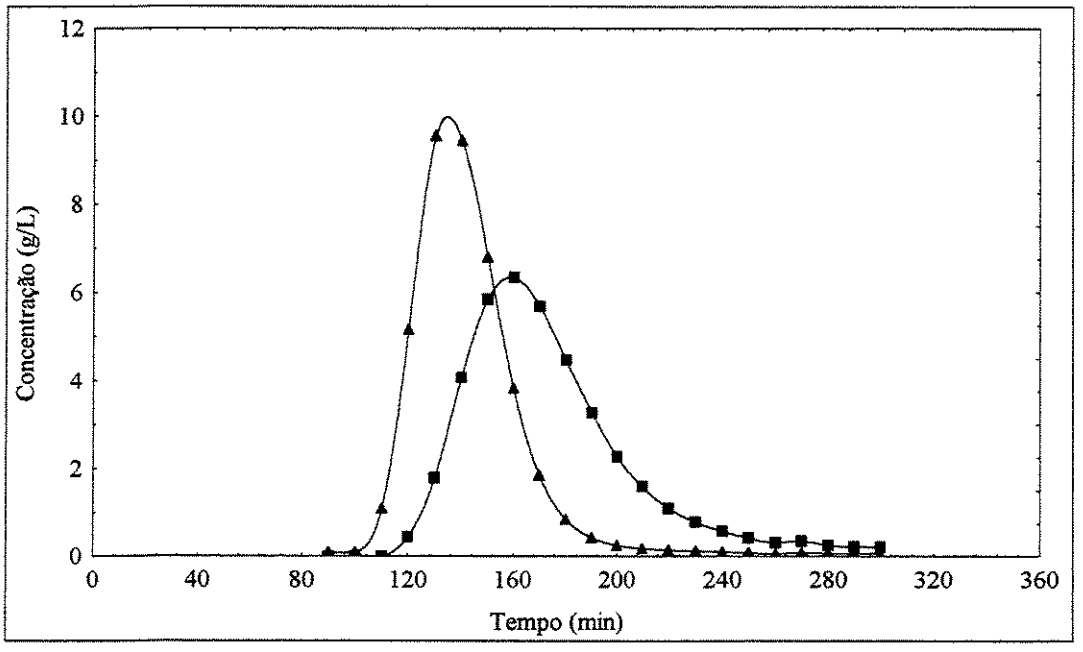


Figura 4.17: Perfil de eluição de glicose (▲) e frutose (■) em coluna com zeólita na forma Ba^{2+}. T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L.

Os valores de ES calculados são mostrados na tabela 4.9. Comparando-se os perfis de eluição das figuras 4.12 e 4.13 e respectivos valores de ES novamente foi possível observar o aumento da seletividade com a troca iônica com íons Ba^{2+}, havendo aumento significativo da ES e aumento da capacidade de adsorção (maior tempo de retenção).

Tabela 4.9: Tempos de retenção e eficiências de separação obtidas em coluna de leito fixo.

Condição do Ensaio	$\bar{t}_{gli}$ (min)	$\bar{t}_{fru}$ (min)	ES_{gf}
Na^+/30 ^{0}C/20 g/L	143,99	153,18	0,74
Ba^{2+}/30 ^{0}C /20 g/L	138,66	168,84	1,28

gli: glicose; fru: frutose;

Com isto pode-se afirmar que realmente a troca iônica torna o processo de separação mais eficiente, tanto no que diz respeito à capacidade de adsorção quanto à seletividade. Pela sua praticidade, o método do pulso cromatográfico foi utilizado nos outros ensaios realizados.

4.6. Caracterização do Leito

4.6.1. Determinação da Porosidade do Leito

O primeiro momento do sistema é dado pela equação:

$$\mu^{SZ} = \mu^{CZ} = \frac{\int_0^\infty t.C(t).dt}{\int_0^\infty C(t).dt} \qquad (4.8)$$

Onde:

SZ: sem zeólita

CZ: com zeólita

O primeiro momento para o leito é dado pela diferença entre os primeiros momentos do sistema com e sem zeólita. Arnold et al. (1985) propuseram que o primeiro momento para o leito é dado pela seguinte expressão:

$$\mu^L = \mu^{CZ} - \mu^{SZ} = \frac{L}{v_0}\left(\varepsilon_b + (1-\varepsilon_b)\varepsilon_p\right) + \frac{t_0}{2} \qquad (4.9)$$

Onde:

L é a altura do leito (L = 1cm)

$\mathbf{v_0}$ é a velocidade superficial (cm/min)

$\mathbf{t_0}$ é o tempo de injeção da amostra (min)

$\boldsymbol{\varepsilon_b}$ é a porosidade do leito

$\boldsymbol{\varepsilon_p}$ é a porosidade da partícula

Para uma substância não-adsorvida no interior dos poros a equação reduz-se a:

$$\mu^L = \mu^{CZ} - \mu^{SZ} = \frac{L}{v_0}\varepsilon_b + \frac{t_0}{2} \qquad (4.10)$$

Pela equação 4.10, plotando-se L/v_o x primeiro momento do leito para a respectiva velocidade superficial, têm-se uma reta cuja inclinação corresponde à porosidade do leito.

As figuras 4.18 a 4.22 mostram os experimentos realizados.

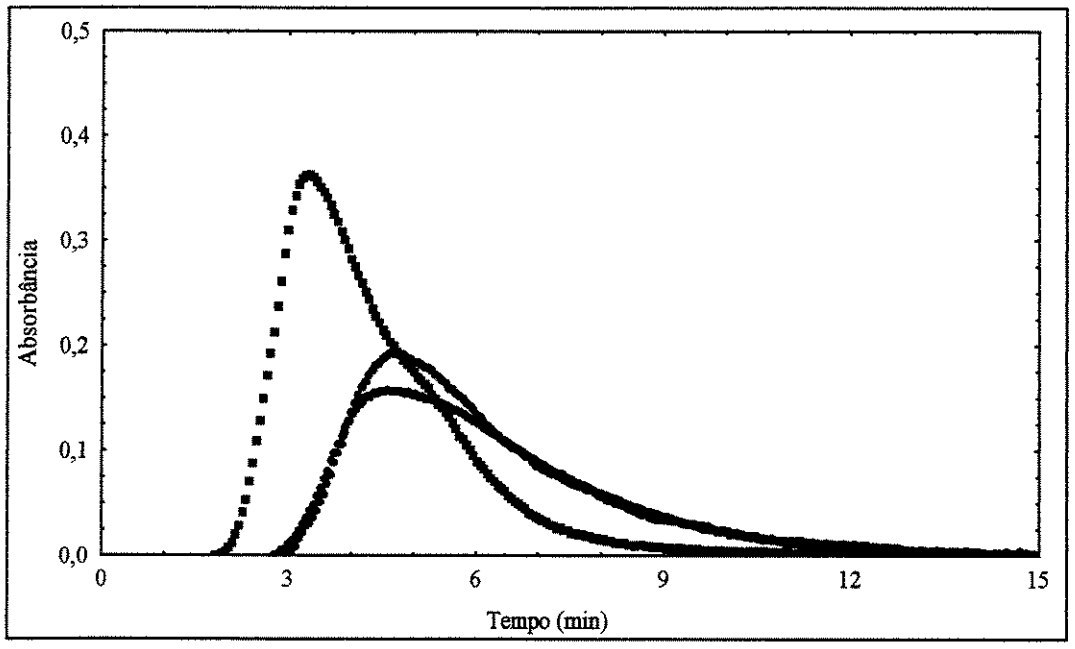


Figura 4.18: Perfil de eluição de blue dextran (traçador) para vazão de 0,25 mL/min. (■) sem leito; (●) com leito (duplicatas).

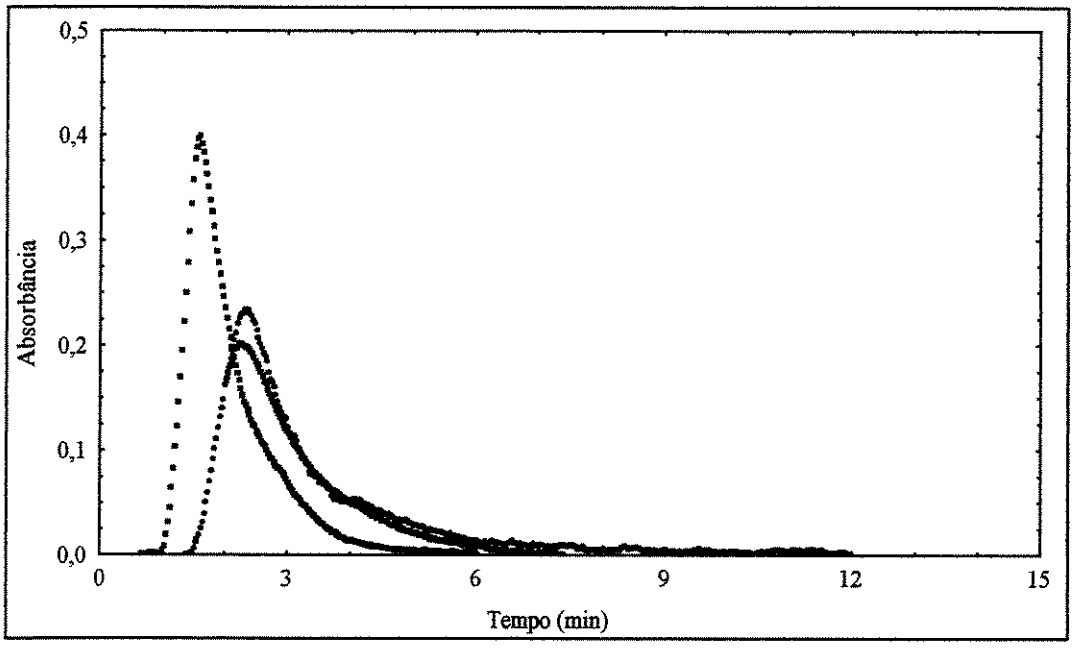


Figura 4.19: Perfil de eluição de blue dextran (traçador) para vazão de 0,50 mL/min. (■) sem leito; (●) com leito (duplicatas).

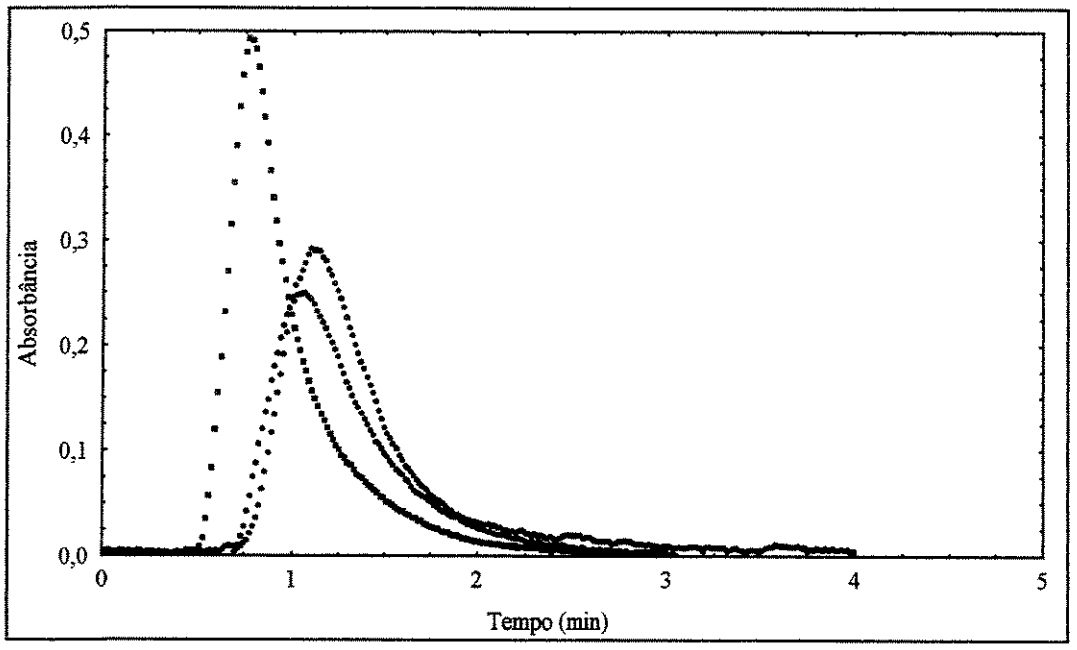


Figura 4.20: Perfil de eluição de blue dextran (traçador) para vazão de 1,0 mL/min. (■) sem leito; (●) com leito (duplicatas).

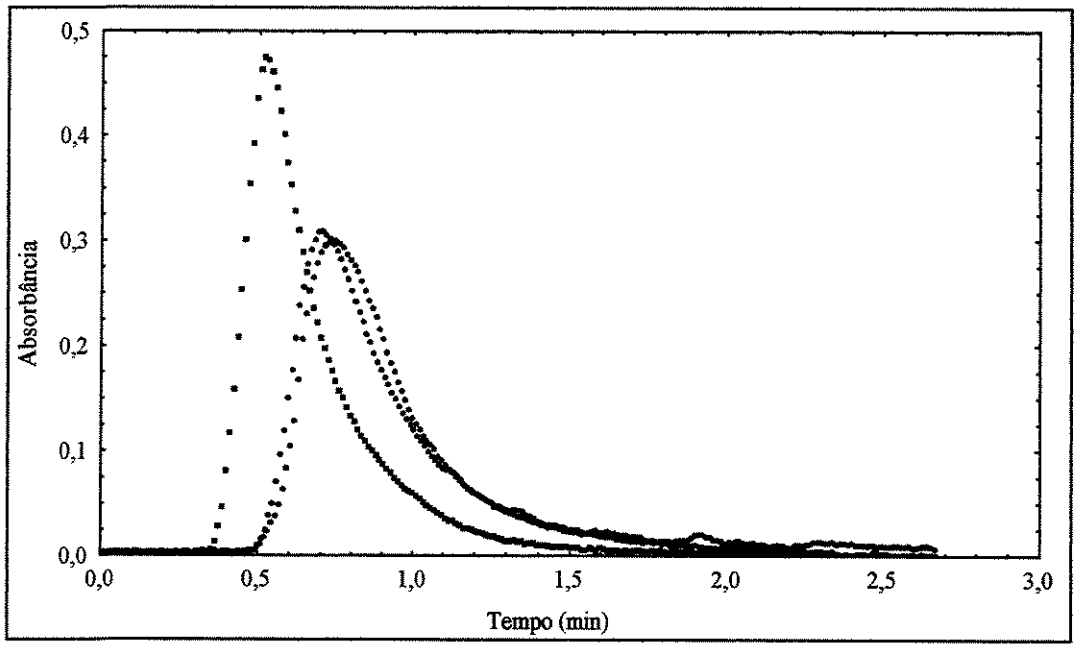


Figura 4.21: Perfil de eluição de blue dextran (traçador) para vazão de 1,5 mL/min. (■) sem leito; (●) com leito (duplicatas).

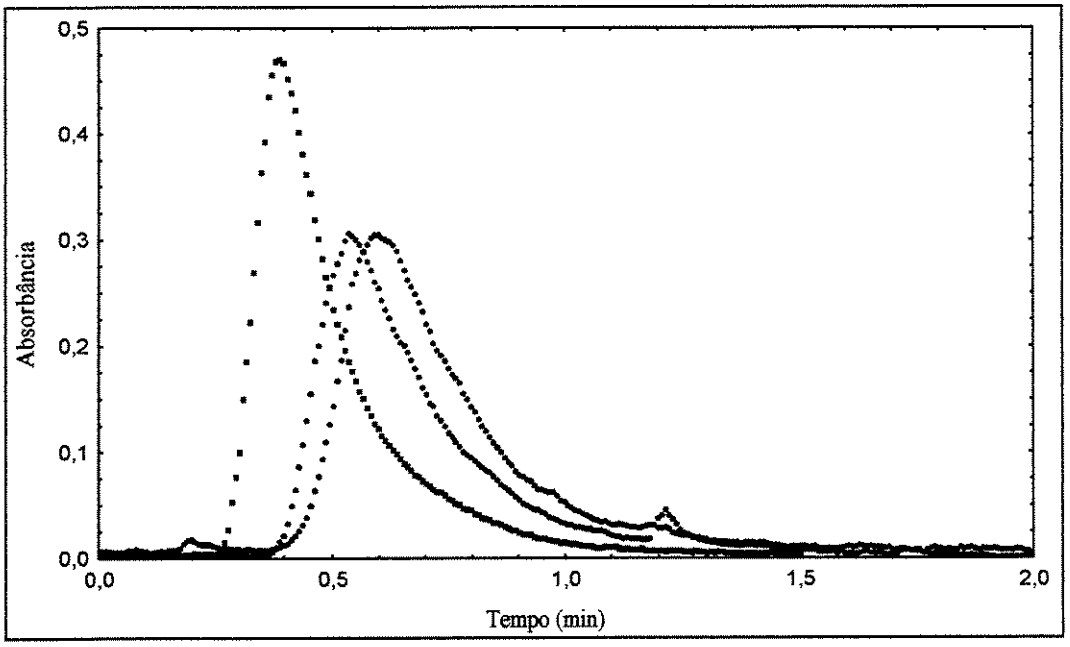


Figura 4.22: Perfil de eluição de blue dextran (traçador) para vazão de 2,0 mL/min. (■) sem leito; (●) com leito (duplicatas).

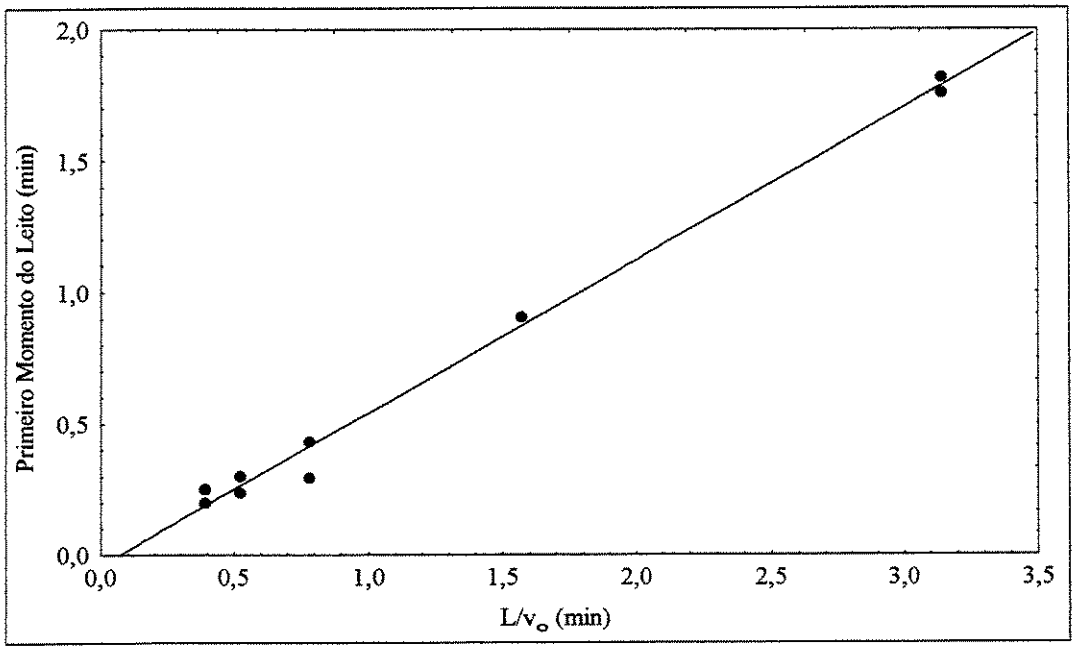


Figura 4.23: Primeiro momento do leito para diferentes velocidades superficiais.

Plotando-se os valores do primeiro momento para diferentes valores de H/v tem-se a porosidade do leito, correspondendo a inclinação da reta mostrada na figura 4.23. O valor calculado foi de 0,58.

4.6.2. Determinação do Tamanho Médio das Partículas

A figura 4.24 mostra a distribuição de diâmetro de partícula obtida para a zeólita Baylith WE 894 na forma Ba^{2+}. Observa-se que predominam partículas com tamanho entre 53 e 125 μm (conforme o esperado, pelo peneiramento) e uma pequena parcela de finos. O diâmetro médio calculado foi de 78,724 μm.

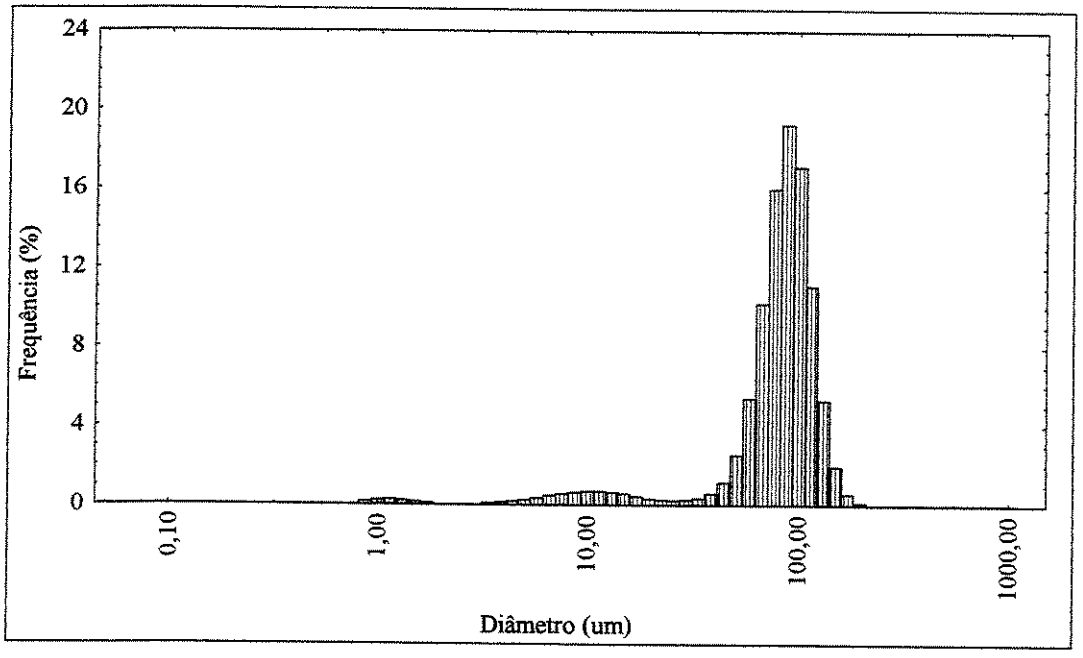


Figura 4.24: Distribuição de tamanho de partícula.

4.6.3. Composição da Zeólita Trocada

A tabela 4.10 mostra a composição da zeólita submetida à troca iônica com íons Ba^{2+}. Comparando-se com a zeólita de partida (tabela 4.2), observou-se que o percentual de troca íons de íons Na^{+} ficou em cerca de 69,35 %. Este percentual é dado pela seguinte expressão:

$$PST = \frac{\%\ \text{inicial de Na} - \%\ \text{final de Na}}{\%\ \text{inicial de Na}} \tag{4.11}$$

No trabalho de Silva et al. (1998), para condições idênticas de troca iônica, este percentual foi de 69,58 % para uma zeólita de relação Si/Al de 2,59 e 78,38 % para uma zeólita de relação Si/Al de 1,77. Pode-se dizer, portanto, que a troca foi bem sucedida.

Tabela 4.10: Composição da zeólita trocada (forma Ba^{2+}).

Componente	Teor (%)
Na_2O	3,24
Al_2O_3	24,14
SiO_2	25,88

4.7. Análise de Sensibilidade

A sensibilidade de um sistema, como um conceito geral, refere-se a uma alteração na variável de saída que pode ser atribuída a uma mudança em um dos parâmetros do sistema. Como uma medida, a sensibilidade tem um valor muito significativo para a engenharia, pois permite avaliar possíveis alterações na saída do sistema.

4.7.1. Fatores de Sensibilidade dos Parâmetros da Coluna na Separação Glicose-Frutose

Neste estudo, foram realizados 5 experimentos. As variáveis estudadas foram: temperatura, concentração, relação volume de pulso/volume da coluna (Vp/Vc) e velocidade superficial. A tabela 4.11 mostra os ensaios realizados, descrevendo as condições do ensaio de referência e dos ensaios com parâmetro alterado.

Tabela 4.11: Valores de referência e alterados para os parâmetros da coluna na separação glicose-frutose.

Parâmetro	Valor de Referência	Valor Alterado	Fator de Alteração
Temperatura	30 ^{0}C	40 ^{0}C	1,33
Concentração	20 g/L	50 g/L	2,50
Vp/Vc	0,1	0,2	2,00
Velocidade Superficial	0,127 cm/min	0,509 cm/min	4,00

As figuras 4.25 a 4.29 mostram os perfis de concentração obtidos na saída da coluna cromatográfica como resposta aos pulsos injetados.

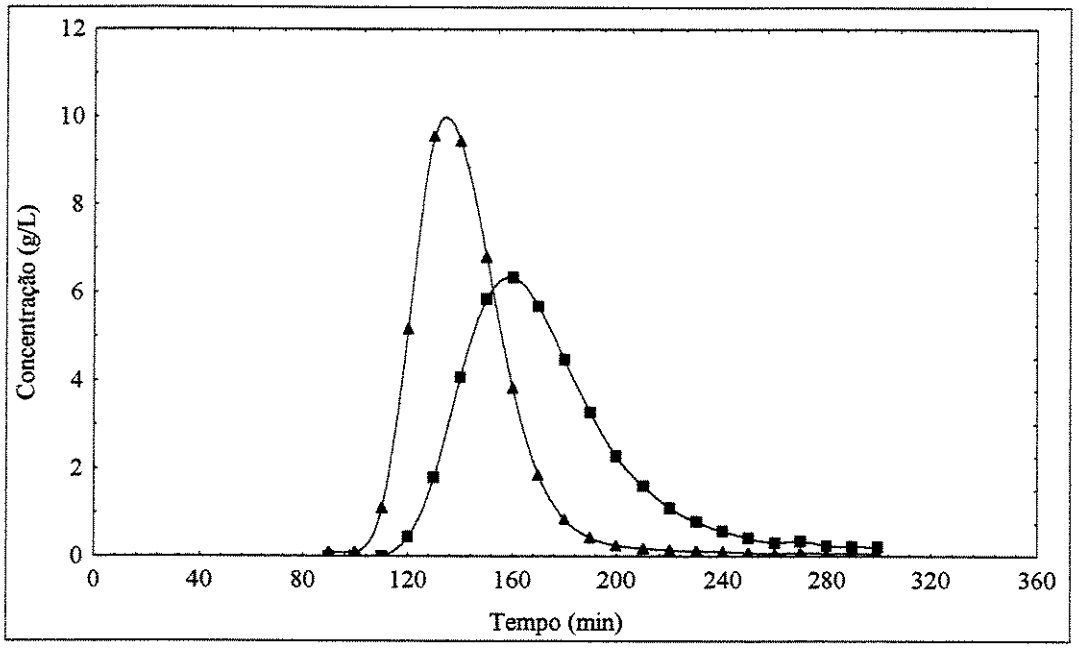


Figura 4.25: Ensaio 1. Separação de glicose (▲) e frutose (■) nas condições de referência (T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1, v_0 = 0,127 cm/min).

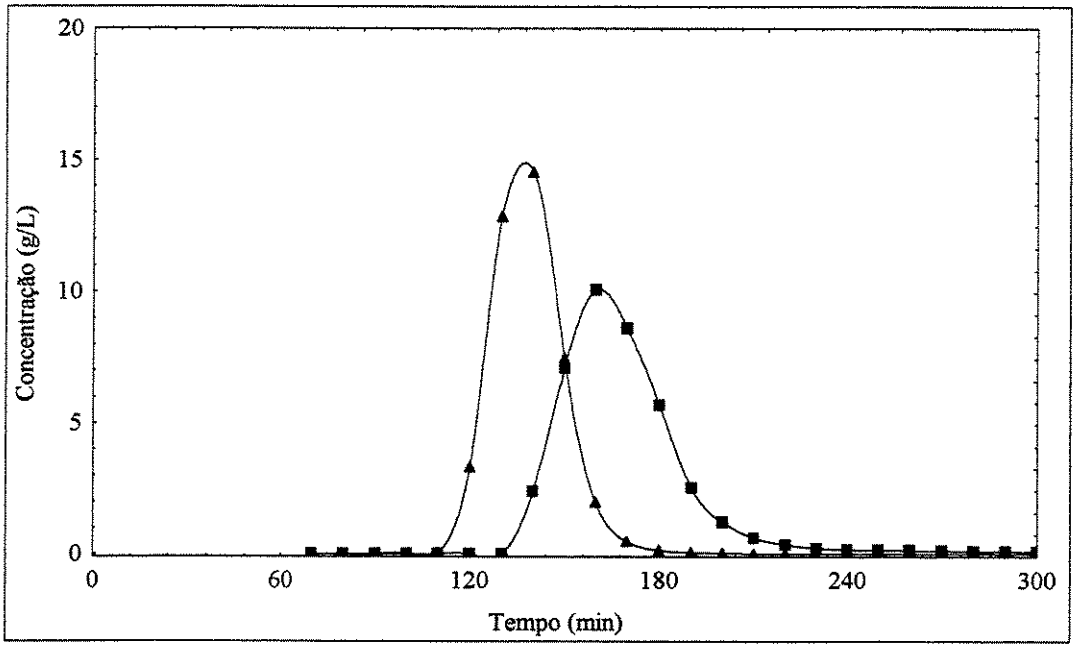


Figura 4.26: Ensaio 2. Separação de glicose (▲) e frutose (■) com alteração da temperatura. Condições: T = 40 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1 e v_0 = 0,127 cm/min.

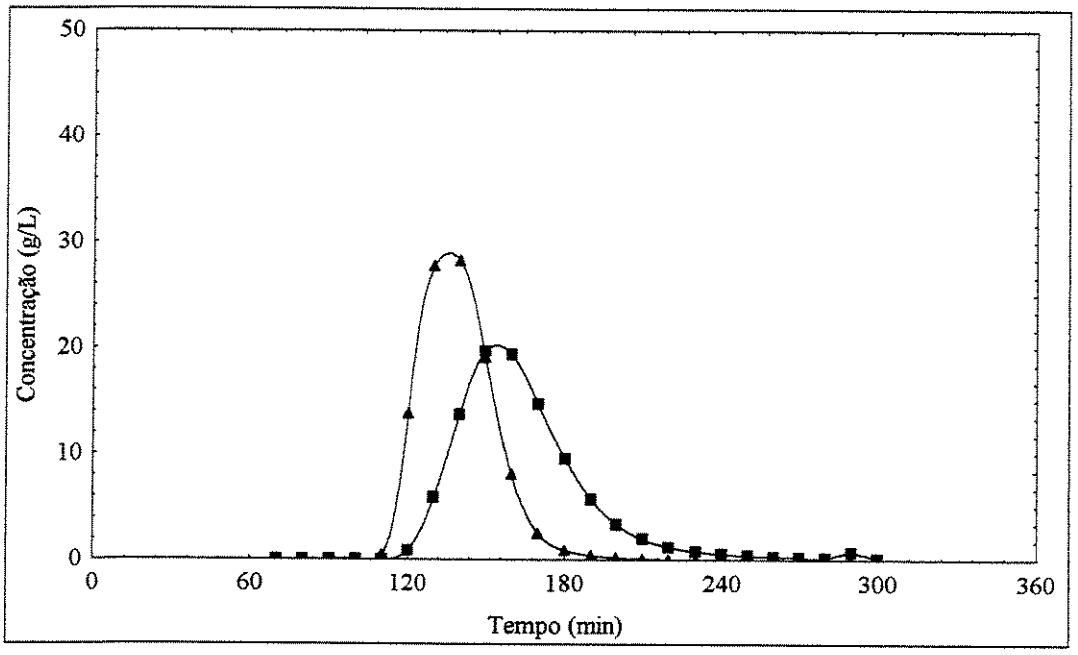


Figura 4.27: Ensaio 3. Separação de glicose (▲) e frutose (■) com alteração da concentração. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 50 g/L, Vp/Vc = 0,1 e v_0 = 0,127 cm/min.

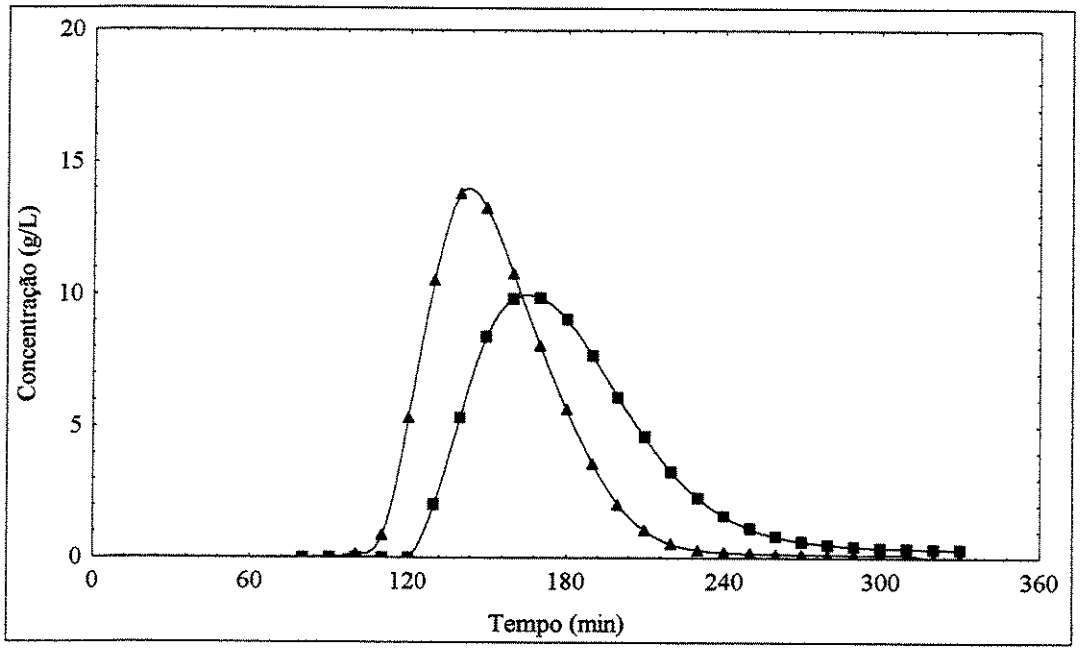


Figura 4.28: Ensaio 4. Separação de glicose (▲) e frutose (■) com alteração da relação Vp/Vc. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,2 e v_0 = 0,127 cm/min.

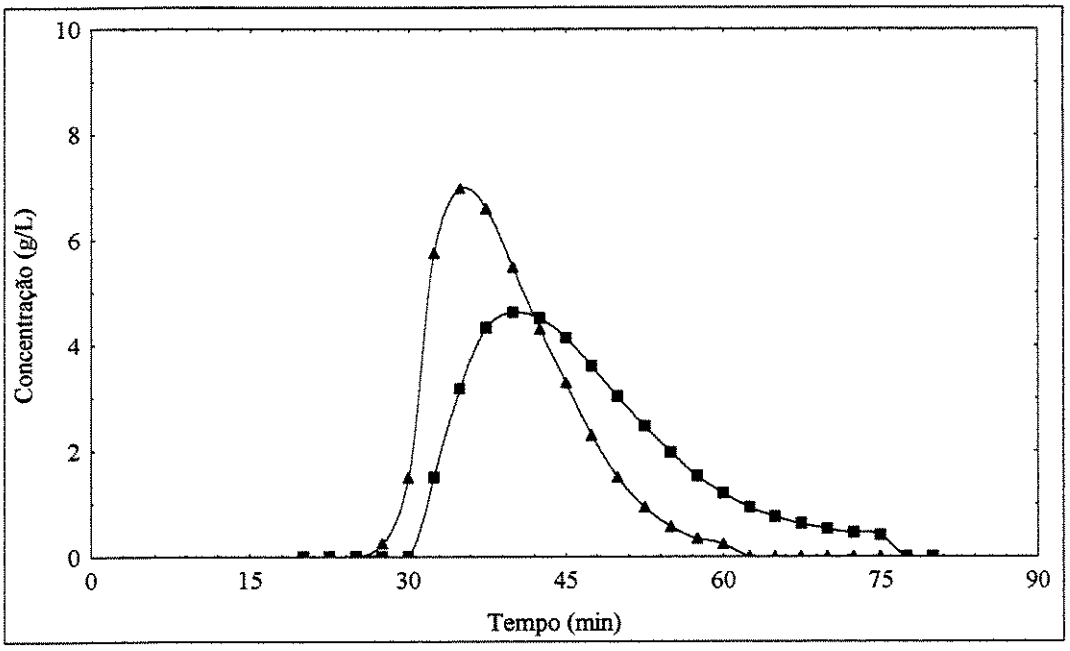


Figura 4.29: Ensaio 5. Separação de glicose (▲) e frutose (■) com alteração da velocidade superficial. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1 e v_0 = 0,509 cm/min.

A tabela 4.12 mostra as respostas obtidas para os ensaios anteriores, em termos de eficiência de separação (ES) e respectivos fatores de sensibilidade das variáveis em estudo.

Tabela 4.12: Sensibilidade dos parâmetros sobre a eficiência de separação de glicose e frutose. ES de referência foi de 1,28.

Ensaio	Parâmetro Alterado	ES	Sensibilidade (S)
2	Temperatura	1,94	1,55
3	Concentração	1,31	0,02
4	Vp/Vc	0,92	-0,08
5	Velocidade Superficial	0,92	-0,09

A figura 4.30 ilustra a influência das variáveis sobre a eficiência de separação. As eficiências de separação foram calculadas de acordo com o proposto por Lu & Lee (1987), conforme já descrito no item 4.5.2.

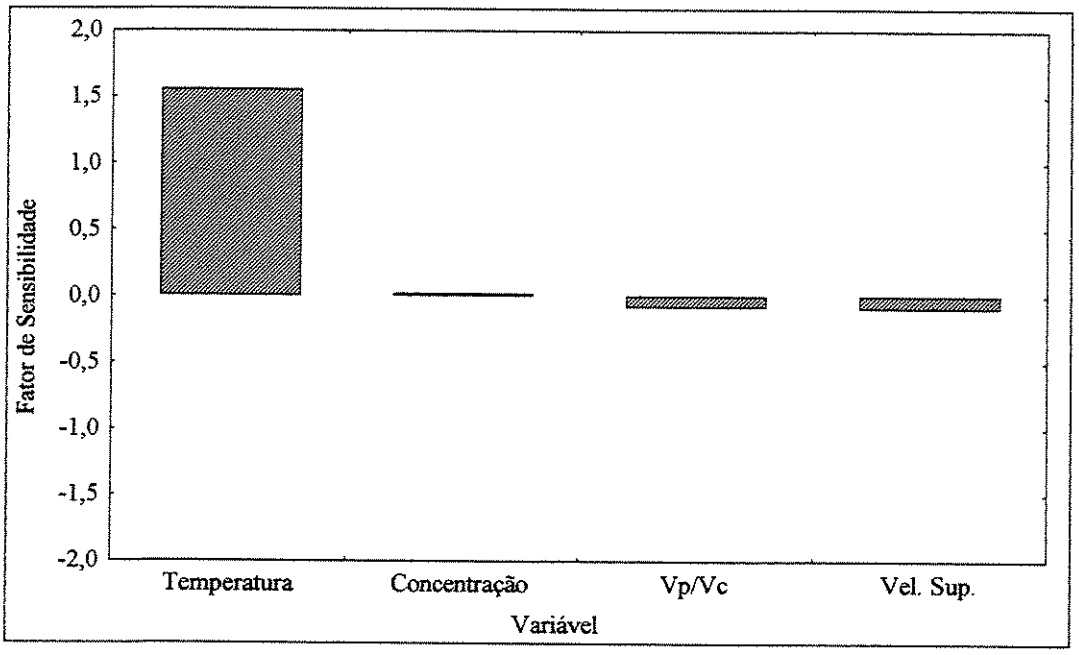


Figura 4.30: Influência das variáveis do processo cromatográfico sobre a eficiência de separação de glicose e frutose em termos de fator de sensibilidade.

A temperatura mostrou forte influência sobre o processo de separação (um aumento desta melhora a eficiência do processo), enquanto que a concentração praticamente não influenciou a separação, e a relação volume de pulso/volume de coluna e velocidade superficial mostraram uma influência pouco pronunciada.

Portanto, na condição de 40^{0}C, concentração de 20 g/L de cada componente, relação Vp/Vc de 0,1 e velocidade superficial de 0,127 cm/min foi obtido o melhor desempenho da coluna, entre os experimentos realizados. A separação de glicose e frutose pode ser comparada com os resultados obtidos por Cheng & Lee (1992). Utilizando uma zeólita BaY na temperatura de 40^{0}C, os autores conseguiram uma eficiência de separação de 2,21, um pouco superior a este trabalho, no entanto utilizando uma coluna de 90 cm e 0,5 mL/min.

A figura 4.31 mostra características das frações recuperadas no Ensaio 2 (figura 4.26), correspondente às condições para o melhor desempenho da coluna entre os ensaios propostos. Pode-se observar, no caso da glicose, o soluto menos retido (primeiro pico na saída da coluna), que nas frações 6 a 8 tem-se glicose pura (frutose não detectada pela CLAE), correspondendo a cerca de 40,55 % da glicose aplicada na coluna. De outra forma, a partir da fração 12, tem-se frações com 95 % ou mais de frutose, correspondendo a cerca de 51,09 % do total aplicado de frutose. Nas frações intermediárias têm-se concentrações variáveis e significativas de ambos os solutos. Estes resultados mostram que a separação de glicose e frutose em coluna de zeólitas nas condições propostas é bastante promissora.

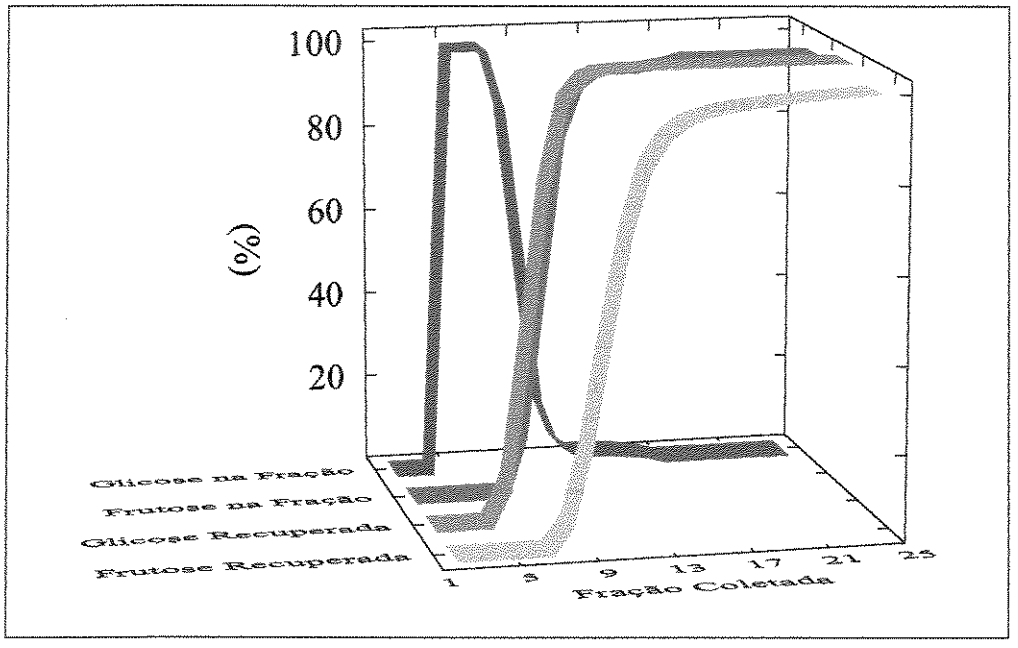


Figura 4.31: Características das frações recuperadas na saída da coluna resultantes de um pulso cromatográfico de glicose e frutose. Condições: T = 40 ^{0}C, C = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1 e v = 0,127 cm/min (Ensaio 2).

4.7.2. Fatores de Sensibilidade dos Parâmetros da Coluna na Separação Dextrana-Frutose

No estudo da separação de dextrana e frutose, utilizando a análise de sensibilidade, foram realizados 6 experimentos. As variáveis estudadas foram: temperatura, concentração, relação volume de pulso/volume da coluna (Vp/Vc), velocidade superficial e peso molecular da dextrana. A tabela 4.13 mostra os ensaios realizados, descrevendo as condições do ensaio de referência e dos ensaios com parâmetros alterados.

Tabela 4.13: Valores de referência e alterados para os parâmetros da coluna na separação dextrana-frutose.

Parâmetro	Valor de Referência	Valor Alterado	Fator de Alteração
Temperatura	30 ^{0}C	40 ^{0}C	1,33
Concentração	20 g/L	50 g/L	2,50
Vp/Vc	0,1	0,2	2,00
Velocidade Superficial	0,127 cm/min	0,509 cm/min	4,00
Peso Molecular	9300	73000	7,85

As figuras 4.32 a 4.37 mostram os perfis de concentração obtidos na saída da coluna cromatográfica como resposta aos pulsos injetados.

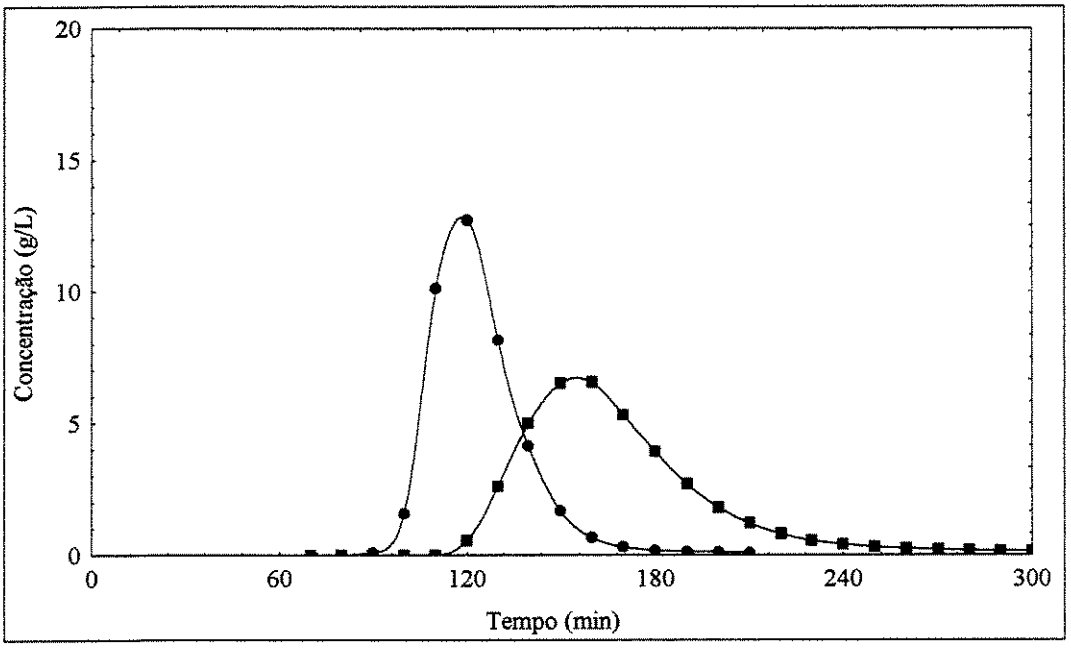


Figura 4.32: Ensaio 6. Separação de dextrana (●) e frutose (■) nas condições de referência (T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1, v_0 = 0,127 cm/min, PM = 9300).

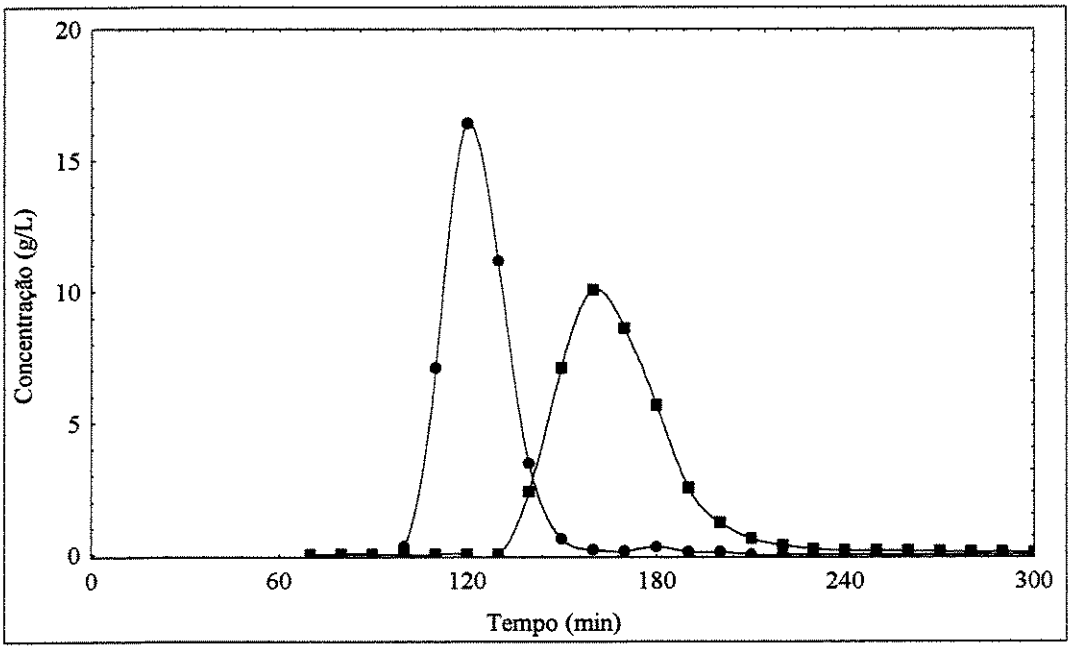


Figura 4.33: Ensaio 7. Separação de dextrana (●) e frutose (■) com alteração da temperatura. Condições: T = 40 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1, v_0 = 0,127 cm/min e PM = 9300.

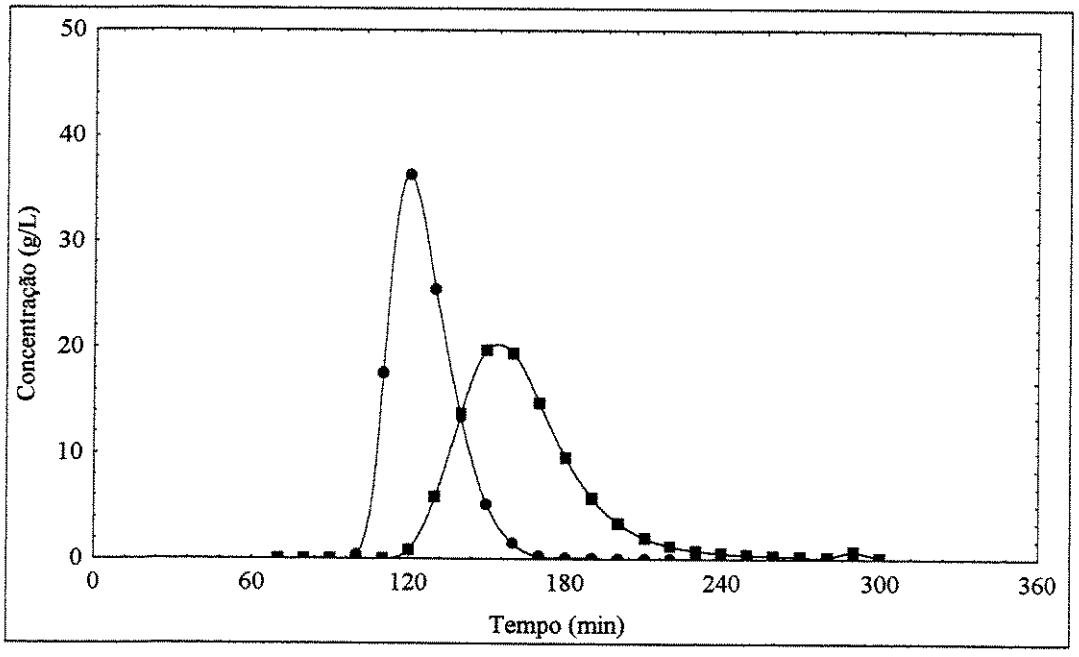


Figura 4.34: Ensaio 8. Separação de dextrana (●) e frutose (■) com alteração da concentração. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 50 g/L, Vp/Vc = 0,1, v_0 = 0,127 cm/min e PM = 9300.

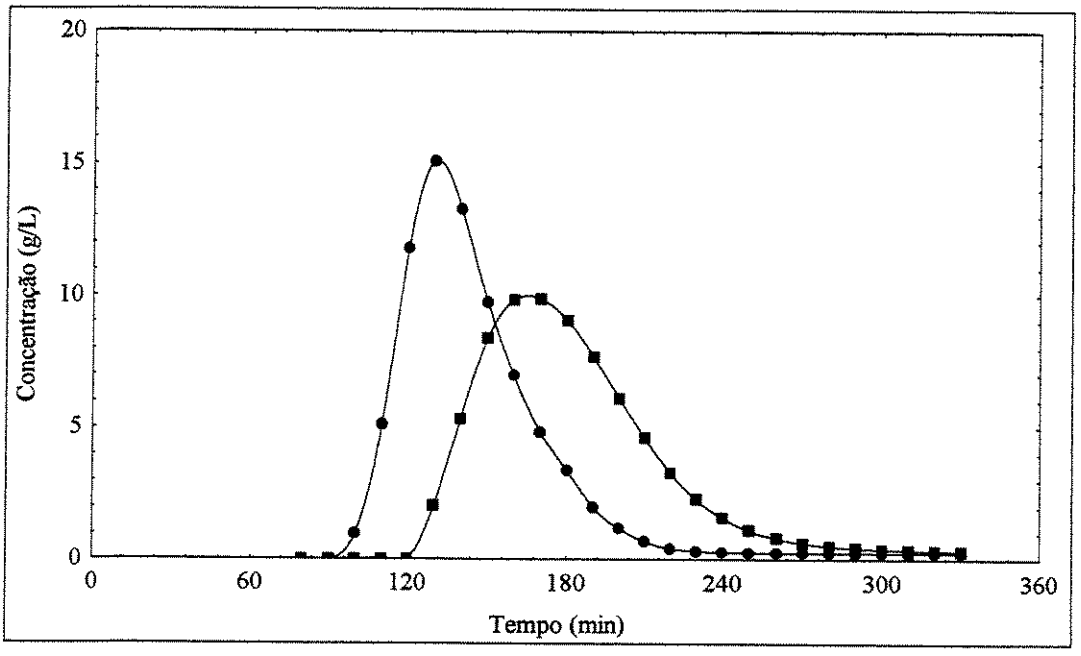


Figura 4.35: Ensaio 9. Separação de dextrana (●) e frutose (■) com alteração da relação Vp/Vc. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,2, v_0 = 0,127 cm/min e PM = 9300.

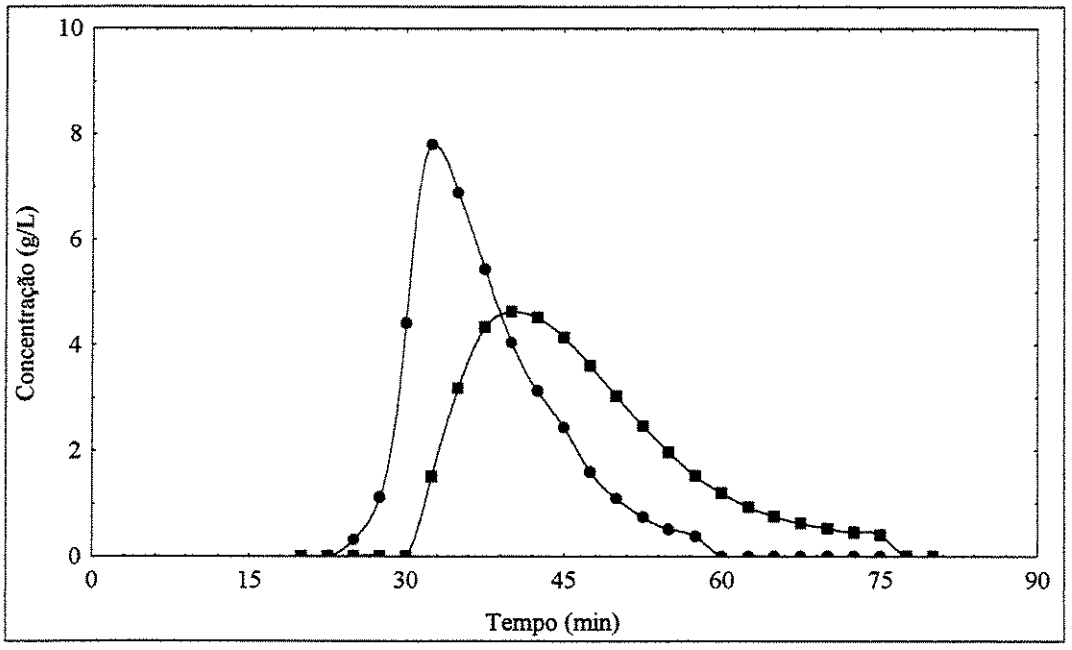


Figura 4.36: Ensaio 10. Separação de dextrana (●) e frutose (■) com alteração da velocidade superficial. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1, v_0 = 0,509 cm/min e PM = 9300.

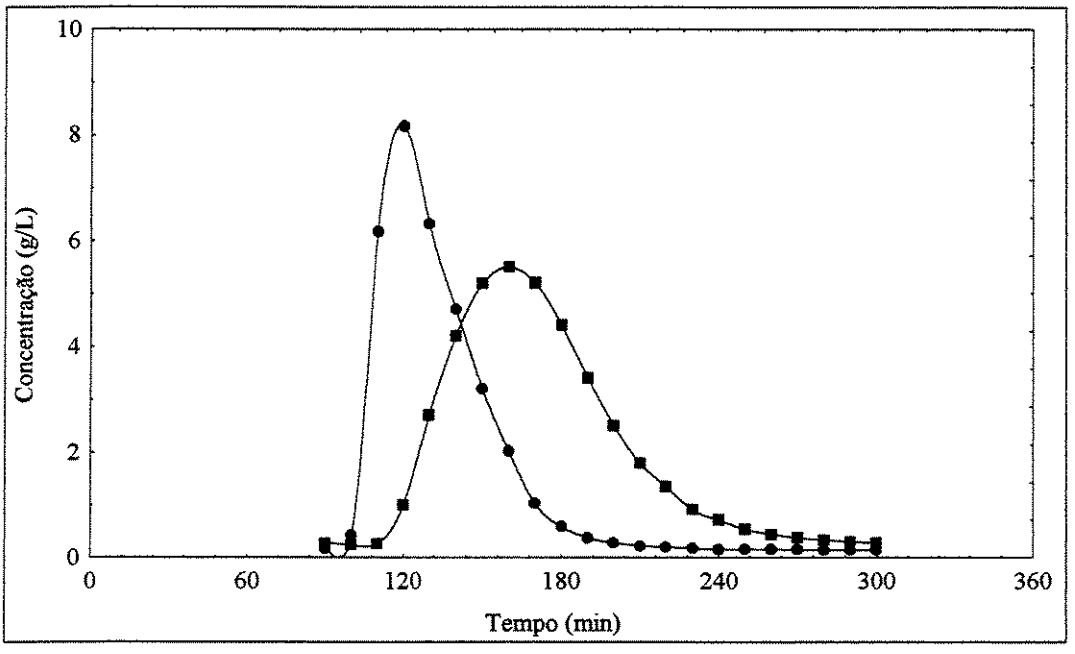


Figura 4.37: Ensaio 11. Separação de dextrana (●) e frutose (■) com alteração do peso molecular. Condições: T = 30 ^{0}C, C_0 = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1, v_0 = 0,127 cm/min e PM = 73000.

A tabela 4.14 mostra as respostas obtidas para os ensaios anteriores, em termos de eficiência de separação (ES) e respectivos fatores de sensibilidade das variáveis em estudo. A figura 4.38 ilustra a influência da variáveis sobre a eficiência de separação.

Tabela 4.14: Sensibilidade dos parâmetros sobre a eficiência de separação de dextrana e frutose. ES do ensaio de referência foi de 2,01.

Ensaio	Parâmetro Alterado	ES	Sensibilidade (S)
7	Temperatura	2,72	1,06
8	Concentração	2,16	0,05
9	Vp/Vc	1,02	-0,49
10	Velocidade Superficial	1,16	-0,14
11	Massa Molecular	1,06	-0,07

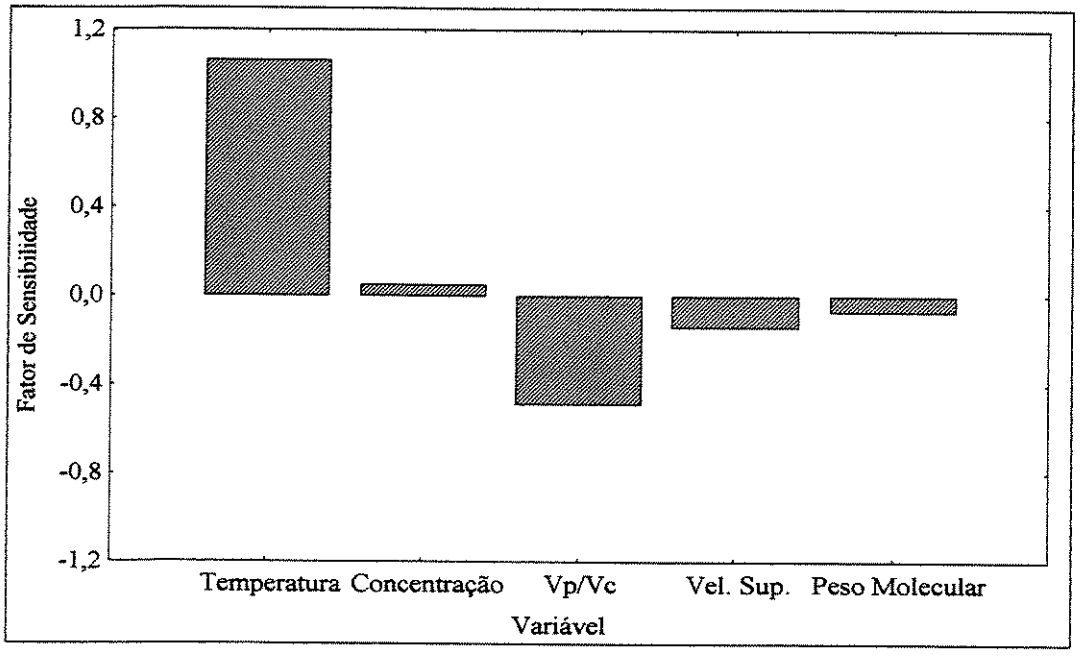


Figura 4.38: Influência das variáveis do processo cromatográfico sobre a eficiência de separação de dextrana e frutose em termos de fator de sensibilidade.

Observou-se influência mais pronunciada da temperatura (aumentando a eficiência da separação com a elevação da temperatura) e da relação Vp/Vc (diminuindo a eficiência com o aumento do volume de pulso injetado). A concentração e a velocidade superficial tiveram influência bem menos pronunciada. A variável peso molecular, embora tenha mostrado uma influência pouco pronunciada, deve ser considerada importante, pois um aumento do peso molecular a faixas facilmente encontradas após a reação enzimática leva a reduções apreciáveis da eficiência de separação da coluna.

Portanto, na condição de 40^{0}C, concentração de 20 g/L de cada componente, relação Vp/Vc de 0,1, velocidade superficial de 0,127 cm/min e peso molecular de 9300 foi obtido o melhor desempenho da coluna, com uma eficiência de separação de 2,72, bem superior à obtida por Cavenaghi (1999). Neste trabalho foi possível obter uma eficiência de separação de 1,08 utilizando resina de troca iônica Dowex XUS-40285 com vazão de 0,1 mL/min, leito de 32 cm e temperatura de 60 ^{0}C. Também foi observado um aumento da eficiência com o aumento da temperatura e redução da vazão de alimentação (ou velocidade superficial). Convém ressaltar que Cavenaghi (1999) obteve eficiência de separação de 3,48 na separação de dextrana e frutose por permeação em gel, utilizando uma coluna Hiload 16/60 da Pharmacia Fine Chemicals, contendo Gel Superdex 30, com vazão de 1 mL/min, leito de 60 cm e temperatura de 45 ^{0}C. No entanto, esta coluna é de alto custo, especificamente recomendada para tais separações.

A figura 4.39 mostra algumas características das frações recuperadas no Ensaio 7 (figura 4.33), correspondente às condições para o melhor desempenho da coluna entre os ensaios propostos para separação de dextrana e frutose. Analisando este gráfico com relação à dextrana, o soluto menos retido, observa-se que nas frações de 5 a 8 tem-se dextrana 9300 pura, sem a presença de frutose, o que corresponde a aproximadamente 87,54 % da dextrana aplicada na coluna. A partir da fração 10, tem-se frações com mais de 90 % de frutose, correspondendo a cerca de 93,97 % do total aplicado de frutose. Apenas a fração 9 possui quantidades apreciáveis de ambos os solutos. Estes resultados mostram que a separação de dextrana 9300 e frutose em coluna de zeólitas nas condições propostas é excelente, indicando um processo altamente eficiente.

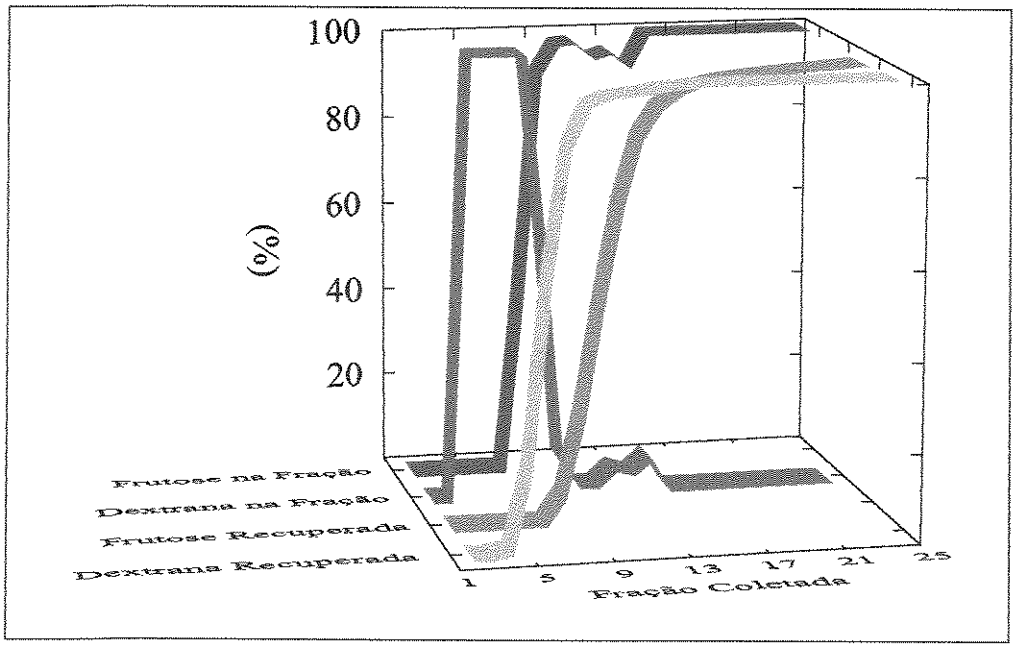


Figura 4.39: Características das frações recuperadas na saída da coluna resultantes de um pulso cromatográfico de dextrana 9300 e frutose. Condições: T = 40 ^{0}C, C = 20 g/L, Vp/Vc = 0,1, v = 0,127 cm/min e PM = 9300 (Ensaio 7).

4.8. Síntese Enzimática

4.8.1. Síntese Sem a Presença de Aceptor

A síntese de dextrana sem a presença de aceptores foi realizada conforme descrito no item 3.2.10, em que a sacarose (50 g/L), sob a ação da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (40 UDS/mL), foi convertida em dextranas e frutose. A figura 4.40 mostra o acompanhamento deste ensaio. Para estas curvas, a quantificação das amostras foi feita por cromatografia líquida utilizando a coluna Shodex KS801 (3.2.13.6).

Com uma concentração inicial de sacarose de 46,28 g/L, foi obtido como produto final uma mistura contendo 22,61 g/L de frutose e 21,90 g/L de dextrana (sacarose e glicose não estavam presentes em quantidades detectáveis), correspondendo a um rendimento de 99,64 %, sendo este dado pela seguinte expressão:

$$R = \frac{\text{massa de dextrana produzida}}{0{,}475 \text{ x massa de sacarose inicial}} \qquad (4.12)$$

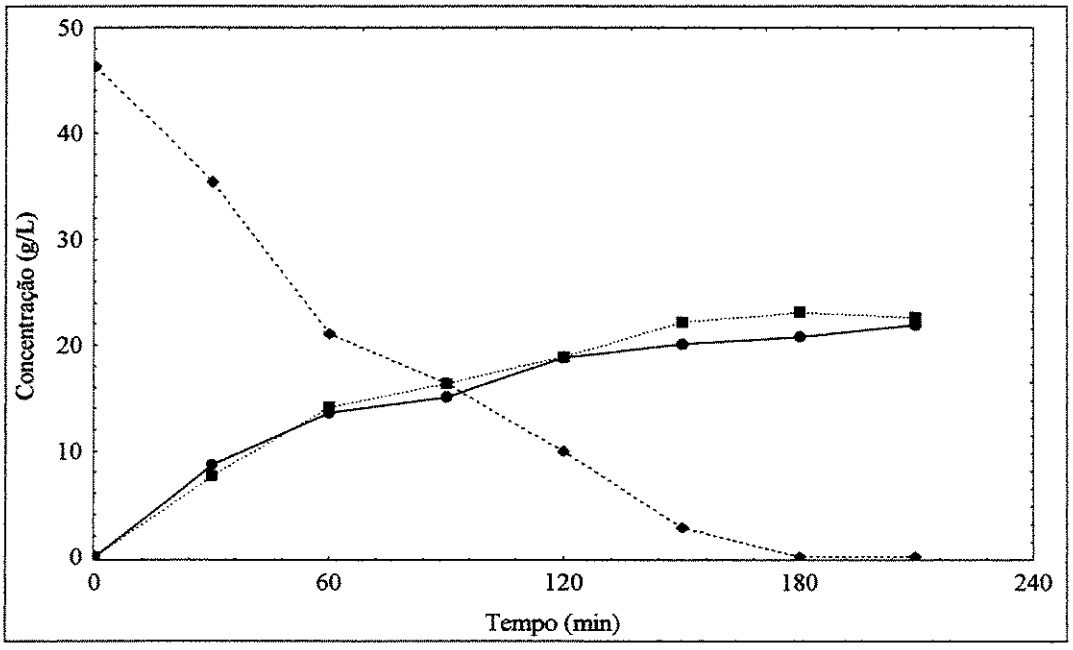


Figura 4.40: Acompanhamento da síntese de dextrana pela enzima dextrana-sacarase de *L. mesenteroides* NRRL B-512F sem a presença de aceptor.
(●) dextrana; (◆) sacarose; (■) frutose.

A caracterização do produto obtido foi feita pela análise da distribuição de peso molecular por cromatografia de permeação em gel (GPC), sendo os resultados obtidos mostrados na tabela 4.15.

Pela tabela 4.15, o produto caracterizou-se pelo elevado peso molecular de dextrana, conforme esperado para a reação sem a presença de aceptores. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Cavenaghi (1999), que obteve 12,082 % de dextrana com peso molecular acima de 100.000 Da, 0,162 % de dextrana clínica e 87,702 % com peso molecular abaixo de 10.000 Da.

Tabela 4.15: Caracterização do produto de síntese obtido na ausência de aceptor.

Propriedade	Valor
Mw	1.057.773
Fração com PM > 100.000 Da	14,68 %
Fração com PM entre 30.000 e 100.000 Da	1,69 %
Fração com PM < 30.000 Da	83,63 %
Fração com PM < 10.000 Da (incluindo oligossacarídeos e monossacarídeos)	82,55 %
Polidispersidade	2.157,8

4.8.2. Síntese na Presença do Aceptor Maltose

O acompanhamento desta reação pode ser observado na figura 4.41.

A condição utilizada correspondeu a uma concentração inicial de 111,20 g/L de sacarose, relação sacarose-maltose em torno de 4,1 e demais condições conforme o ensaio anterior.

Houve formação predominante de oligossacarídeos (maltooligossacarídeos), com peso molecular médio de 1.243 (determinado por GPC), não sendo observada a presença de dextranas de alto peso molecular e dextrana clínica. O produto final apresentou, na quantificação por CLAE, 77,74 g/L de oligossacarídeos (usando como padrão dextrana 9300) e 53,51 g/L de frutose.

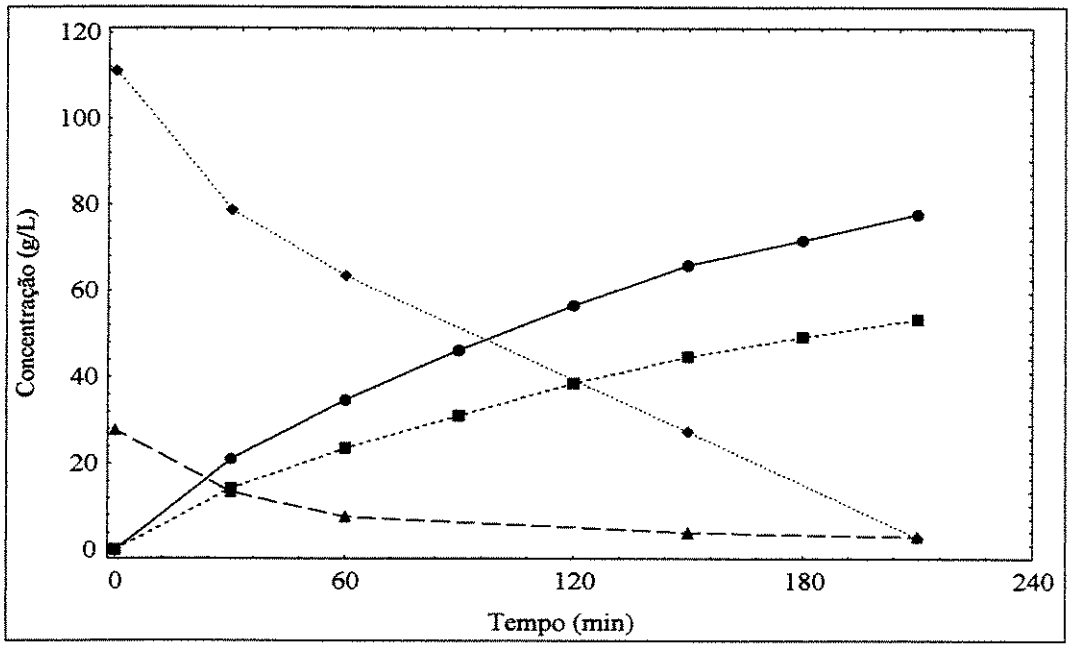


Figura 4.41: Acompanhamento da síntese de oligossacarídeos pela enzima dextrana-sacarase de *L. mesenteroides* NRRL B-512F na presença do aceptor maltose. (●) oligossacarídeos; (◆) sacarose; (▲) maltose; (■) frutose.

O rendimento pode ser definido conforme a equação 4.13, sendo que o valor calculado foi de 96,43 %.

$$R = \frac{\text{massa de oligossacarídeos produzida}}{\text{massa de aceptor inicial} + 0{,}475 \text{ x massa de sacarose inicial}} \qquad (4.13)$$

No trabalho de Paul et al. (1986) foi obtido um rendimento de 93 %. Neste trabalho é ainda apresentada uma correlação que permite estimar o peso molecular em função da relação mássica sacarose-maltose do meio reacional. Esta correlação é descrita pela equação 4.14.

$$Mw = 340 \text{ x } (1 + 0{,}48 \text{ S/M}) \qquad (4.14)$$

Por esta correlação o peso molecular é de 1.059,62, muito similar ao obtido experimentalmente por GPC.

4.8.3. Síntese na Presença do Aceptor Glicose

A figura 4.42 mostra o acompanhamento da síntese enzimática na presença do aceptor glicose, onde foi utilizado cerca de 150 g/L de sacarose e 30 g/L de glicose.

No produto final observou-se a presença de 22,90 g/L de glicose, 67,29 g/L de frutose e 75,10 g/L de dextranas e oligossacarídeos. Houve, portanto, pouco consumo de glicose, não tendo está atuado efetivamente como aceptor.

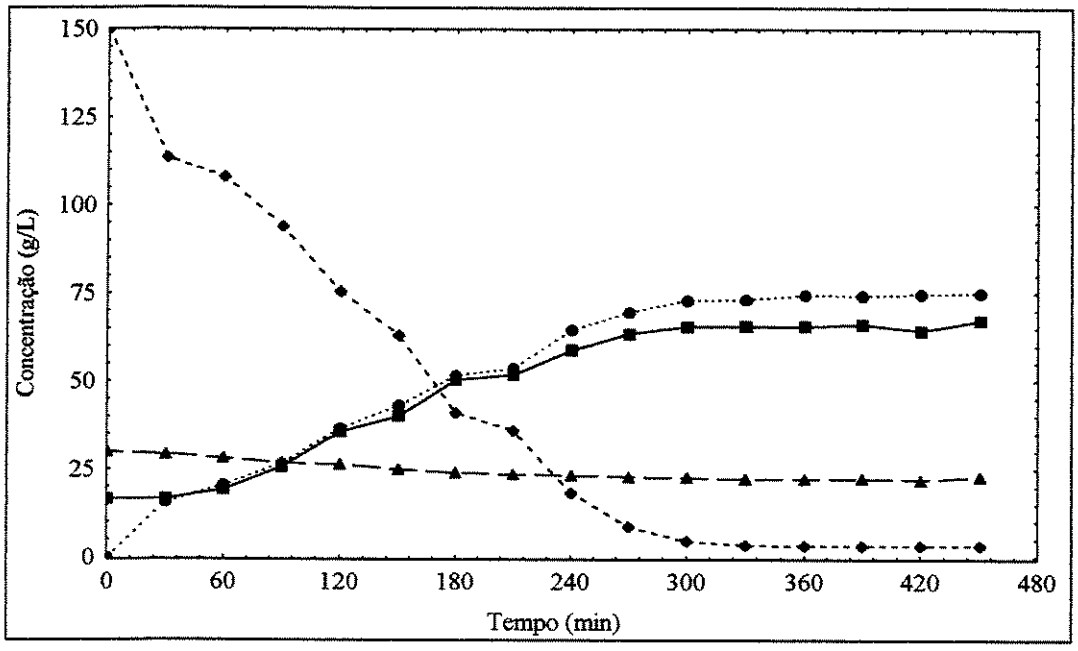


Figura 4.42: Acompanhamento da síntese de oligossacarídeos e dextrana pela enzima dextrana-sacarase de *L. mesenteroides* NRRL B-512F na presença do aceptor glicose. (●) produtos de síntese (oligossacarídeos e dextranas); (◆) sacarose; (▲) glicose; (■) frutose.

Este fato justificaria a presença de dextranas de alto peso molecular e peso molecular médio bem acima do esperado, conforme mostrado na tabela 4.16, bem como baixo rendimento (74,89 %, conforme equação 4.13).

Houve formação de oligossacarídeos em maior proporção, quando comparado à reação sem aceptor, com formação de dextranas de alto peso molecular em menor proporção, associado a atuação da glicose, mesmo em baixa proporção, como aceptor.

Tabela 4.16: Caracterização do produto de síntese obtido com a presença do aceptor glicose.

Propriedade	Valor
Mw	242.382
Fração com PM > 100.000 Da	5,19 %
Fração com PM entre 30.000 e 100.000 Da	0,80 %
Fração com PM < 30.000 Da	94,01 %
Fração com PM < 10.000 Da (incluindo oligossacarídeos e monossacarídeos)	93,64 %
Polidispersidade	438,76

4.9. Separação dos Produtos de Síntese

4.9.1. Separação dos Produtos da Reação sem Aceptor

A figura 4.43 mostra o perfil de eluição obtido para os produtos de síntese da reação enzimática sem a presença de aceptor. As condições do ensaio foram as estabelecidas no item 4.7.2, com temperatura de 40 ^{0}C, velocidade superficial de 0,127 cm/min e Vp/Vc de 0,1, correspondendo a um pulso de 2 mL do produto de síntese para uma coluna de 25 cm de comprimento de leito e 1 cm de diâmetro. O produto de síntese foi diluído na proporção de 1:3, devido à alta viscosidade, tendo no pulso concentrações de frutose e dextrana de, respectivamente, 7,46 g/L e 7,30 g/L.

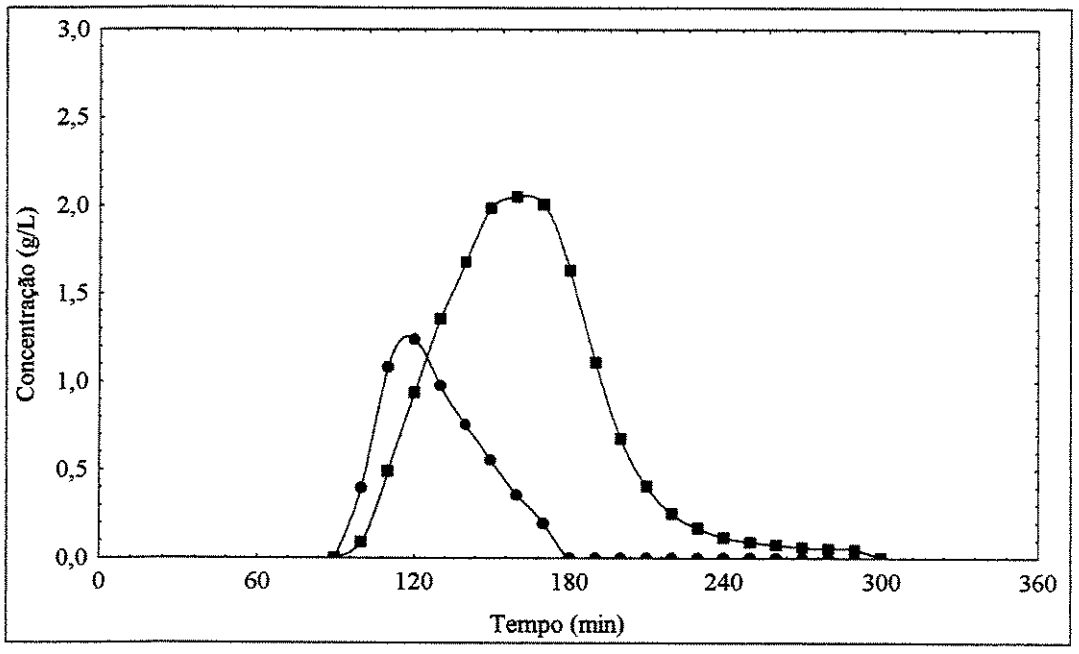


Figura 4.43: Perfil de eluição obtido para os produtos de síntese da reação sem aceptor com diluição 1:3. (●) dextranas; (■) frutose.

A tabela 4.17 mostra os parâmetros da separação em coluna dos produtos de síntese da reação sem aceptor, comparando com os resultados obtidos com a mistura sintética em condições similares (figura 4.33).

Houve redução significativa na eficiência de separação quando comparado ao ensaio com mistura sintética, adotado como referência, observando um maior tempo de retenção para as dextranas sintetizadas e menor tempo de retenção de frutose. A hipótese que pode ser formulada seria que a dextrana de alto peso molecular, bem mais viscosa que o padrão de peso molecular 9300, se deslocaria mais lentamente ao longo da coluna, levando a uma banda mais larga no perfil de saída, acarretando uma separação menos efetiva, com frações coletadas contendo misturas de dextrana e frutose. Por outro lado, o peso molecular elevado poderia levar a uma obstrução parcial dos poros da zeólita, dificultando a difusão interna da frutose e conseqüente acesso da frutose aos sítios de adsorção. Isto levaria a frutose ser eluída um pouco mais rápido, provocando a redução no tempo de retenção (diretamente associado ao coeficiente de partição).

Tabela 4.17: Parâmetros da separação dos produtos de síntese e mistura sintética.

Parâmetro	Separação com Mistura Sintética	Separação dos Produtos de Síntese
μ_{dext}*	124,27 min	128,45 min
μ_{fru}*	169,19 min	162,84 min
$\lvert \mu_{dext} - \mu_{fru} \rvert$	44,91	34,39 min
σ^2_{dext}**	157,17 min^2	330,60 min^2
σ^2_{fru}**	491,46 min^2	1000,13 min^2
ES	2,69	1,43

* primeiro momento, correspondente ao tempo médio de retenção

** segundo momento

Além disso houve discordância entre dextrana injetada e dextrana recuperada nas frações eluídas, indicando provável retenção desta na coluna, o que dificultaria ainda mais o transporte na coluna. A recuperação foi de apenas 37,58 % para dextrana, enquanto que a frutose foi totalmente recuperada. Observou-se, ao desmontar a coluna, que realmente houve retenção de dextrana no seu interior.

Para amenizar o problema, aumentou-se a diluição da amostra de síntese (de 1:3 para 1:5). Neste caso, portanto, a alimentação continha 4,41 g/L de frutose e 4,28 g/L de dextranas.

Os resultados podem ser observados na figura 4.44 e tabela 4.18.

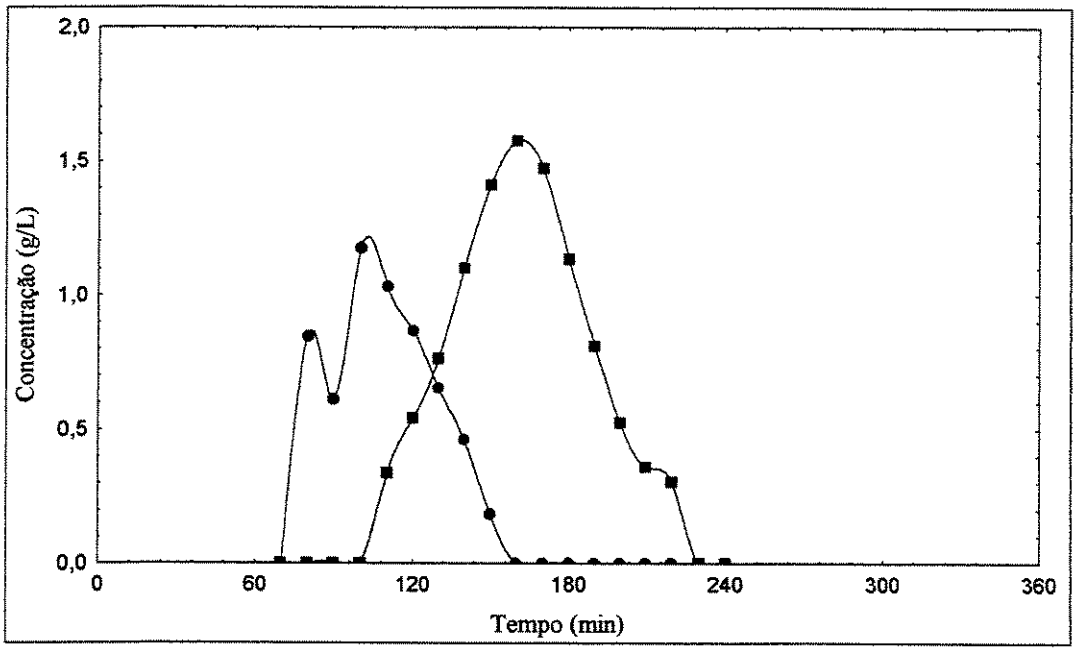


Figura 4.44: Perfil de eluição obtido para os produtos de síntese da reação sem aceptor com diluição 1:5. (●) dextranas; (■) frutose.

Tabela 4.18: Parâmetros da separação do produto de síntese e mistura sintética.

Parâmetro	Separação com Mistura Sintética	Separação dos Produtos de Síntese
μ_{dext}*	124,27 min	108,90 min
μ_{fru}*	169,19 min	162,07 min
$\lvert \mu_{dext} - \mu_{fru} \rvert$	44,91	53,17 min
σ^2_{dext}**	157,17 min^2	372,81 min^2
σ^2_{fru}**	491,46 min^2	687,06 min^2
ES	2,69	2,36

* primeiro momento, correspondente ao tempo médio de retenção
** segundo momento

Com a diluição, a eficiência de separação subiu significativamente, ficando apenas um pouco abaixo do ensaio com a mistura sintética. Houve redução significante do tempo de retenção médio da dextrana, comparado ao ensaio anterior, possivelmente ocasionado pela melhoria no fluxo da coluna. Para frutose observou-se o mesmo tempo de retenção, levando a um aumento da diferença entre os tempos de retenção médios dos picos. Perdas de dextranas, em relação à amostra injetada, não foram observadas.

Quanto aos segundos momentos, comparando com o ensaio com alimentação mais concentrada, houve redução significativa de σ^2_{fru}, indicando menos espalhamento do pico de frutose, mesmo assim em níveis superiores ao da mistura sintética.

4.9.2. Separação dos Produtos da Reação com Aceptor Maltose

Nesta separação, os perfis de eluição dos produtos de síntese com aceptor maltose e a comparação do processo com a mistura sintética são mostrados, respectivamente, na figura 4.45 e tabela 4.19.

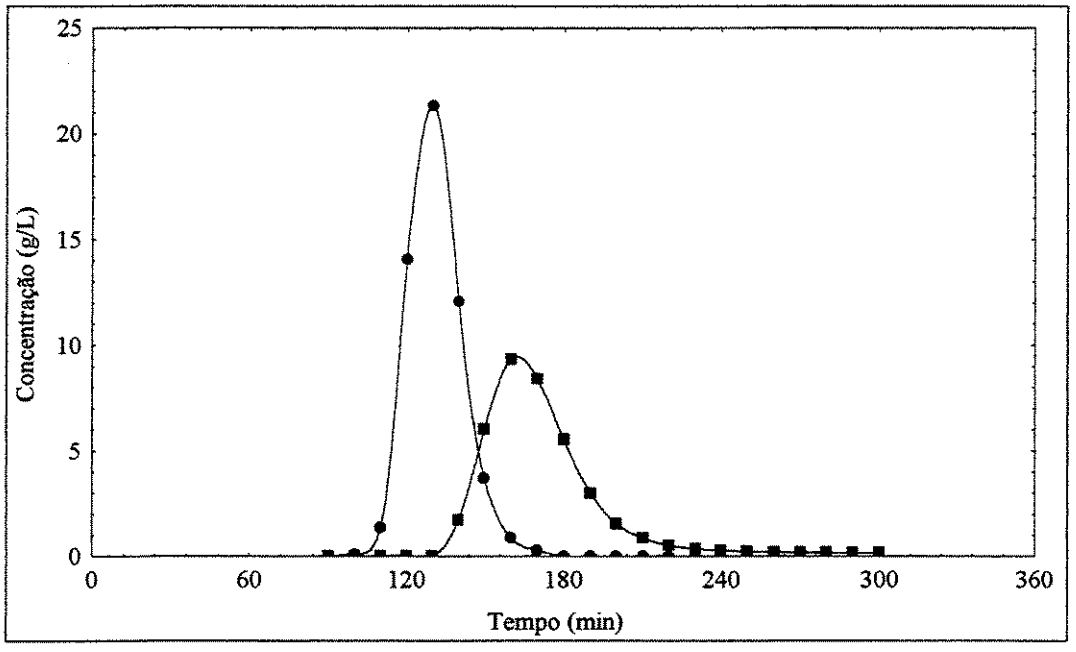


Figura 4.45 Perfil de eluição obtido para os produtos de síntese da reação com aceptor maltose. (●) oligossacarídeos; (■) frutose.

Para alimentação da coluna utilizou-se o produto de síntese descrito no item 4.8.2. Apesar da menor viscosidade, quando comparado aos produtos que contém dextrana de alto peso molecular, foi feita a diluição para posterior injeção da amostra, na proporção de 1:3, com concentrações resultantes de 28,44 g/L de oligossacarídeos e 19,15 g/L de frutose, a fim de haver similaridade com a mistura sintética adotada como comparação (concentração de cada componente igual a 20 g/L).

Observou-se neste ensaio uma boa concordância com os dados obtidos com a mistura sintética. Pode-se afirmar que os produtos de síntese da reação enzimática com aceptor maltose são os mais similares à mistura sintética, pois caracterizam-se pelo baixo peso molecular, levando a soluções bem menos viscosas, mesmo em concentrações relativamente altas. Os tempos de retenção dos produtos de ambos ensaios foram diferentes, mas dentro de uma variação aceitável para experimentos distintos, mas as diferenças entre os tempos de retenção foram muito próximas. A recuperação foi de 96,16 % para os oligossacarídeos e total para a frutose.

Quanto ao segundo momento, para os oligossacarídeos foi menor em relação à mistura sintética, indicando pico bem estreito, e um pouco maior para frutose.

Tabela 4.19: Parâmetros da separação do produto de síntese e mistura sintética.

Parâmetro	Separação com Mistura Sintética	Separação dos Produtos de Síntese
μ_{dext}*	124,27 min	131,16 min
μ_{fru}*	169,19 min	172,89 min
$\lvert \mu_{dext} - \mu_{fru} \rvert$	44,91	41,73 min
σ^2_{dext}**	157,17 min^2	110,31 min^2
σ^2_{fru}**	491,46 min^2	655,47 min^2
ES	2,69	2,54

* primeiro momento, correspondente ao tempo médio de retenção
** segundo momento

4.9.3. Separação dos Produtos da Reação com Aceptor Glicose

Os resultados obtidos neste experimento são mostrados na figura 4.46 e tabela 4.20.

A alimentação foi obtida pela diluição de amostra de produtos de síntese na proporção de 1:5, com concentrações resultantes de 4,269 g/L de glicose, 13,145 g/L de frutose e 15,268 g/L de dextranas.

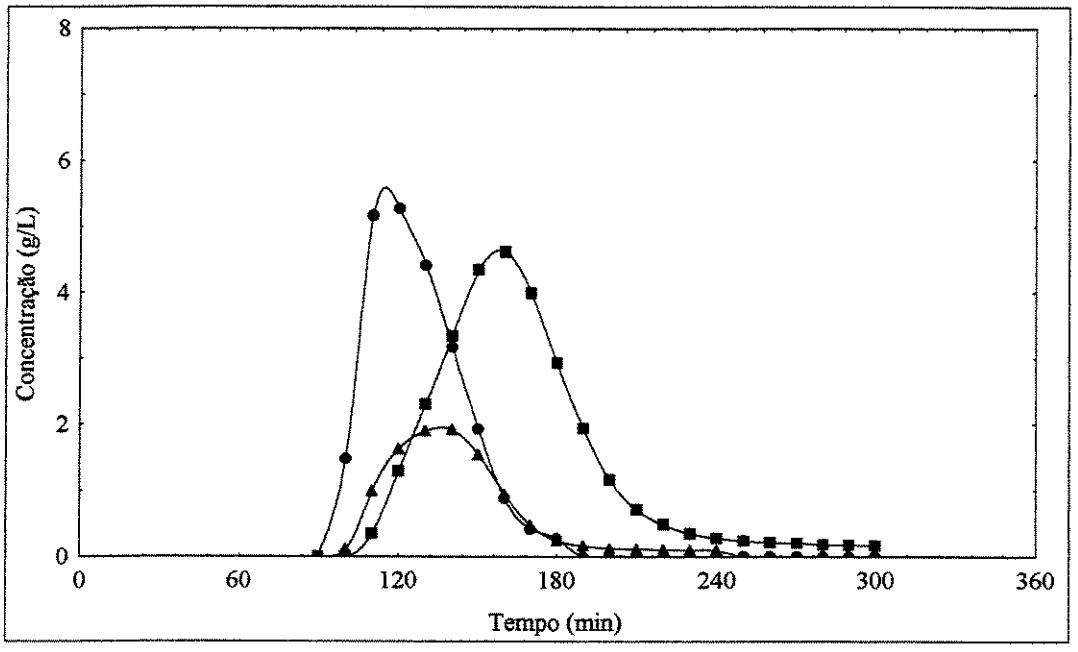


Figura 4.46: Perfil de eluição obtido para os produtos de síntese da reação com aceptor glicose. (●) oligossacarídeos e dextranas; (▲) glicose; (■) frutose.

Tabela 4.20: Parâmetros da separação do produto de síntese e mistura modelo.

Parâmetro	Separação com Mistura Sintética	Separação dos Produtos de Síntese
μ_{dext}*	124,27 min	126,86 min
μ_{fru}*	169,19 min	166,83 min
μ_{gli}*	138,63 min	142,21 min
$\lvert \mu_{dext} - \mu_{fru} \rvert$	44,91 min	39,97 min
$\lvert \mu_{gli} - \mu_{fru} \rvert$	30,55 min	24,62 min
σ^2_{dext}**	157,17 min^2	302,82 min^2
σ^2_{fru}**	491,46 min^2	1129,12 min^2
σ^2_{gli}**	124,54 min^2	671,62 min^2
$ES_{dext-fru}$	2,69	1,65
$ES_{gli-fru}$	1,94	0,83

Observou-se novamente uma redução na eficiência de separação. As dextranas de alto peso molecular estavam presentes, mas em menor proporção, no entanto as concentrações utilizadas nesta síntese foram maiores, resultando num produto com concentração mais elevada. A combinação de dextranas de alto peso molecular e em concentração mais elevada levaria a dificuldades na difusão interna dos monossacarídeos. Uma evidência deste fato foi não ter havido separação entre glicose e frutose, antes ocorrendo de maneira eficiente, indicando uma dificuldade na adsorção de frutose.

4.9.4. Comentário Sobre a Separação dos Produtos de Síntese

Comparando-se os resultados obtidos nos itens 4.9.1, 4.9.2 e 4.9.3, pode-se dizer que o ensaio em que utilizou-se o produto de síntese obtido pela reação enzimática com dextrana-sacarase atuando sobre sacarose, na presença do aceptor maltose, foi o que

apresentou melhor eficiência de separação, bem como o que mais assemelhou-se ao correspondente ensaio com mistura sintética. Este produto de síntese, com predominância de oligossacarídeos de baixo peso molecular e, com a diluição, com concentrações na faixa de 20 g/L para cada componente, é muito similar à mistura sintética utilizada, também de baixo peso molecular e com concentrações de 20 g/L. Conseguiu-se, neste ensaio, alta eficiência de separação e recuperação dos produtos. Já nos demais casos (dextranas de maior peso molecular) as eficiências foram menores, bem como a recuperação, o que concorda com a tendência observada na análise de sensibilidade em relação ao parâmetro peso molecular (item 4.7.2). Em relação a estes experimentos observou-se, no entanto, uma melhoria do processo com a diluição da amostra, mostrando que para produtos de síntese com dextranas de alto peso molecular este pode ser um procedimento necessário. Um outro aspecto que pode ser considerado em novos experimentos seria a utilização de partículas com maior diâmetro, facilitando o escoamento destes produtos altamente viscosos ao longo da coluna. No entanto, sabe-se que o aumento do tamanho de partícula tende a diminuir a eficiência dos processos de separação, pela menor área superficial disponível para interações, exigindo que esta alteração leve em conta a adoção de outros parâmetros operacionais que compensem esta provável diminuição de eficiência.

4.10. Parâmetros de Equilíbrio e Transporte na Coluna

4.10.1. Modelagem Matemática de Uma Coluna Submetida a um Pulso Cromatográfico

Para a adsorção em coluna cromatográfica, pode-se descrever as seguintes equações de balanço (Cremasco et al., 2000), adotando as considerações citadas no item 3.2.12:

- balanço de massa do soluto na fase móvel:

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = E_b \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2} - v\frac{\partial C_m}{\partial z} - \left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right)\frac{3k_f}{R_p}\left(C_m - q|_{r=Rp}\right) = 0 \qquad (4.15)$$

Onde:

$\mathbf{C_m}$ é a concentração do soluto na fase móvel;

$\mathbf{E_b}$ é o coeficiente de dispersão axial;

$\mathbf{k_f}$ é o coeficiente convectivo de transferência de massa;

q é a concentração do soluto na fase porosa;

$\mathbf{R_p}$ é o raio da partícula;

t é o tempo;

v é a velocidade intersticial;

z é a distância axial;

ε_b é a porosidade do leito;

- balanço de massa do soluto na fase porosa, considerando o equilíbrio linear:

$$K\frac{\partial q}{\partial t} = \varepsilon_p D_p \frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r}\right) \tag{4.16}$$

Onde:

$\mathbf{D_p}$ é a difusividade efetiva;

K é o coeficiente de partição;

r é o raio;

ε_p é a porosidade da partícula;

As condições iniciais que descrevem a injeção do pulso do soluto na coluna cromatográfica são:

$$z = 0,\ 0 \le t \le t_0 \tag{4.17}$$

$$z = 0,\ t > t_0 \tag{4.18}$$

$$z > 0,\ t = 0,\ c = 0 \tag{4.19}$$

$$r \ge 0,\ t = 0,\ q = 0 \tag{4.20}$$

As condições de contorno são dadas por:

$$\frac{\partial q}{\partial r}\Big|_{r=0} = 0 \tag{4.21}$$

$$\varepsilon_p D_p \frac{\partial q}{\partial r}|_{r=Rp} = \frac{3k_f}{R_p}(C_m - q|_{r=Rp}) \tag{4.22}$$

Os primeiro e segundo momentos da curva cromatográfica estão relacionados à altura do pico e à largura dessa curva, sendo definidos como:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i.t_i.\Delta t_i}{\sum_{i=1}^{n} C_i.\Delta t_i} \tag{4.23}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i.(t_i - \mu)^2.\Delta t_i}{\sum_{i=1}^{n} C_i.\Delta t_i} \tag{4.24}$$

Alguns autores utilizaram-se da transformada de Laplace-Carson aplicada nas equações de balanço que descrevem a função do pulso cromatográfico, obtendo analiticamente o primeiro e segundo momentos da curva cromatográfica. Estes parâmetros correspondem a:

$$\mu = \frac{L}{v}\left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right).K\right] \tag{4.25}$$

Onde **L** é o comprimento do leito.

$$\sigma^2 = \left(\frac{2L}{v}\right)\left(\frac{E_b}{v^2}\right)\left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right).K\right]^2 + \left(\frac{2L}{v}\right)\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right).K^2\left(\frac{R_p}{3k_f} + \frac{R_p^2}{15\varepsilon_p D_p}\right) \tag{4.26}$$

A eficiência de uma coluna cromatográfica é avaliada por intermédio da altura equivalente a um prato teórico (HETP), definida segundo a equação de van Deemter como:

$$HETP = L\left(\frac{\sigma^2}{\mu^2}\right) \tag{4.27}$$

Substituindo as definições de μ e σ^2 nesta equação tem-se:

$$HETP = 2\left(\frac{E_b}{v}\right) + 2\chi^2\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right)\left(\frac{R_p}{3k_f} + \frac{R_p^2}{15\varepsilon_p D_p}\right) \tag{4.28}$$

Onde:

$$\chi^2 = \left\{K\left[1+\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right).K\right]^{-1}\right\}^2 \tag{4.29}$$

Rearranjando a equação 4.28 tem-se a seguinte expressão:

$$\overset{0}{L} = \beta + \alpha.v \tag{4.30}$$

Sendo:

$$\overset{0}{L} = HETP - 2\chi^2\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right)\left(\frac{R_p}{3k_f}\right)v \tag{4.31}$$

$$\beta = 2\left(\frac{E_b}{v}\right) \tag{4.32}$$

$$\alpha = 2\chi^2\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right)\left(\frac{R_p^2}{15\varepsilon_p D_p}\right) \tag{4.33}$$

Ao construir-se uma reta L x v é possível obter o coeficiente efetivo de difusão por intermédio da inclinação e o coeficiente de dispersão axial via interceptação.

4.10.2. Determinação dos Coeficientes de Partição

4.10.2.1. Coeficiente de Partição da Frutose

A figura 4.47 mostra os perfis de concentração de frutose na saída da coluna para diferentes vazões de alimentação, a partir dos quais obtém-se os respectivos tempos de

retenção médios do soluto (primeiro momento), utilizando a equação 4.23. As condições dos experimentos foram: temperatura de 40 ^{0}C, concentração de frutose de 20 g/L e relação Vp/Vc de 0,1 para uma coluna com 1 cm de diâmetro e 25 cm de leito formado por partículas de zeólita na forma Ba^{2+}. Estas condições correspondem às melhores entre as testadas no item 4.7, tanto na separação glicose-frutose quanto na separação dextrana-frutose.

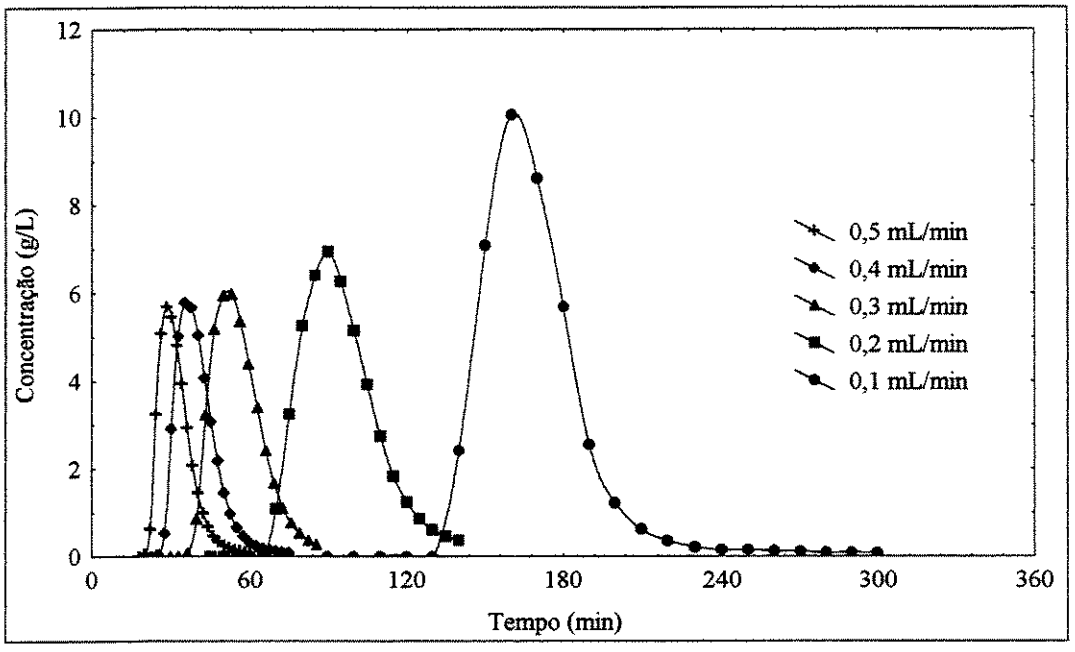


Figura 4.47: Perfil de concentração de frutose na saída da coluna para diferentes vazões de alimentação.

O tempo de retenção médio de um pulso em um sistema linear está relacionado ao coeficiente de partição K pela seguinte expressão proposta por Matijasevic & Vasic-Racki (2000), onde **L** é o comprimento do leito, **v** é a velocidade intersticial e ε_b é a porosidade do leito.:

$$\bar{t} = \frac{L}{v}\left[1+\left(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b}\right)K\right] \qquad (4.34)$$

Esta equação corresponde à equação 4.25. A porosidade do leito (ε_b = 0,58) foi determinada anteriormente (item 4.6.1), pela técnica de pulsos cromatográficos utilizando um soluto não retido (blue dextran, 2000 KDa), conforme Arnold et al. (1985). Plotando-se tempo de retenção e L/v (figura 4.48) tem-se uma reta com coeficiente angular igual a $1+(\frac{1-\varepsilon_b}{\varepsilon_b})K$, possibilitando o cálculo de K.

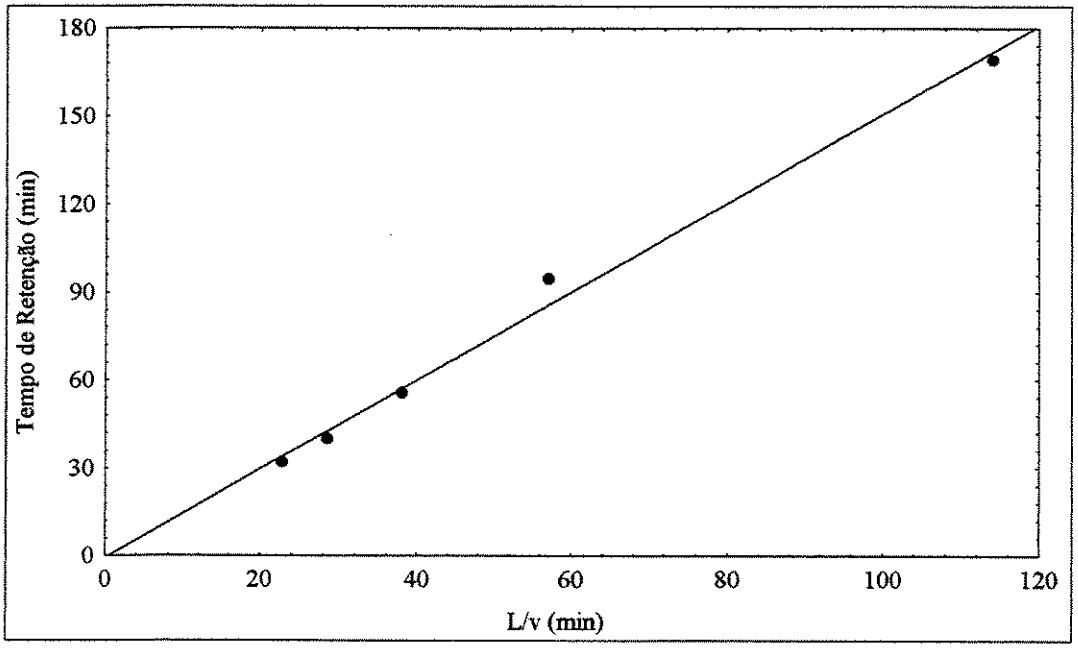


Figura 4.48: Gráfico tempo de retenção x L/v para a frutose.

O valor de K obtido para frutose foi de 0,71. Apesar de não ter-se disponível dados de K para o banho finito nas mesmas condições, pois estes foram determinados a 30 ^{0}C (item 4.3.1), é possível afirmar que há razoável concordância entre os dados, ao menos na mesma ordem de grandeza (o valor de K na adsorção de frutose em banho finito foi de 0,82 a 30 ^{0}C). O coeficiente de correlação (r) foi igual a 0,996, valor superior ao encontrados em banho finito (0,98), demonstrando uma boa resposta para o método utilizado. Além disso o método mostrou-se de mais fácil execução, sendo uma alternativa às comumente utilizadas técnicas em banho finito.

4.10.2.2. Coeficiente de Partição da Glicose

A figura 4.49 mostra os perfis de eluição obtidos para a glicose para diferentes vazões de alimentação da fase móvel. As condições utilizadas nos ensaios correspondem também às condições de melhor desempenho na separação entre as testadas: temperatura de 40 ^{0}C, concentração de 20 g/L, Vp/Vc = 0,1 e mesma geometria da coluna (1 cm de diâmetro e leito de 25 cm de comprimento).

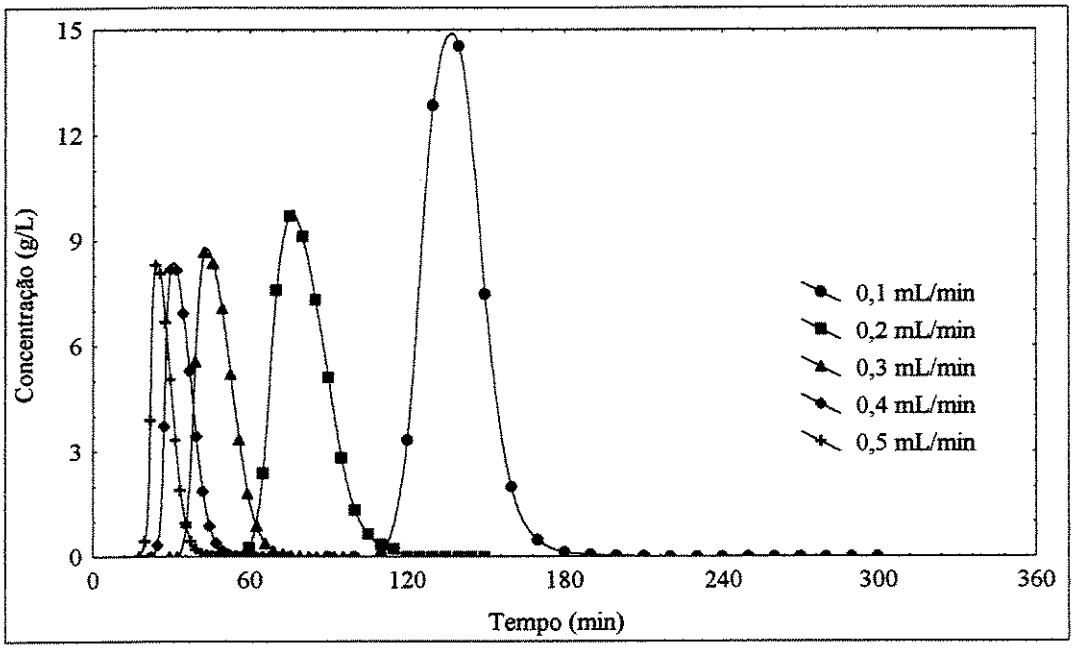


Figura 4.49: Perfil de concentração de glicose na saída da coluna para diferentes vazões de alimentação.

Com os dados dos tempos de retenção para cada vazão utilizada (equação 4.23), e usando a metodologia proposta no item anterior, foi possível o cálculo do coeficiente de partição K na coluna, plotando-se L/v e tempo de retenção (figura 4.50).

O valor de K obtido para glicose foi de 0,31, novamente não podendo ser comparado diretamente aos ensaios realizados em banho finito, onde K foi igual a 0,12 na temperatura de 30 ^{0}C (item 4.3.1). No entanto, o coeficiente de correlação (r) foi igual a

0,994, valor superior ao encontrados em banho finito (0,96), demonstrando uma boa resposta para o método utilizado.

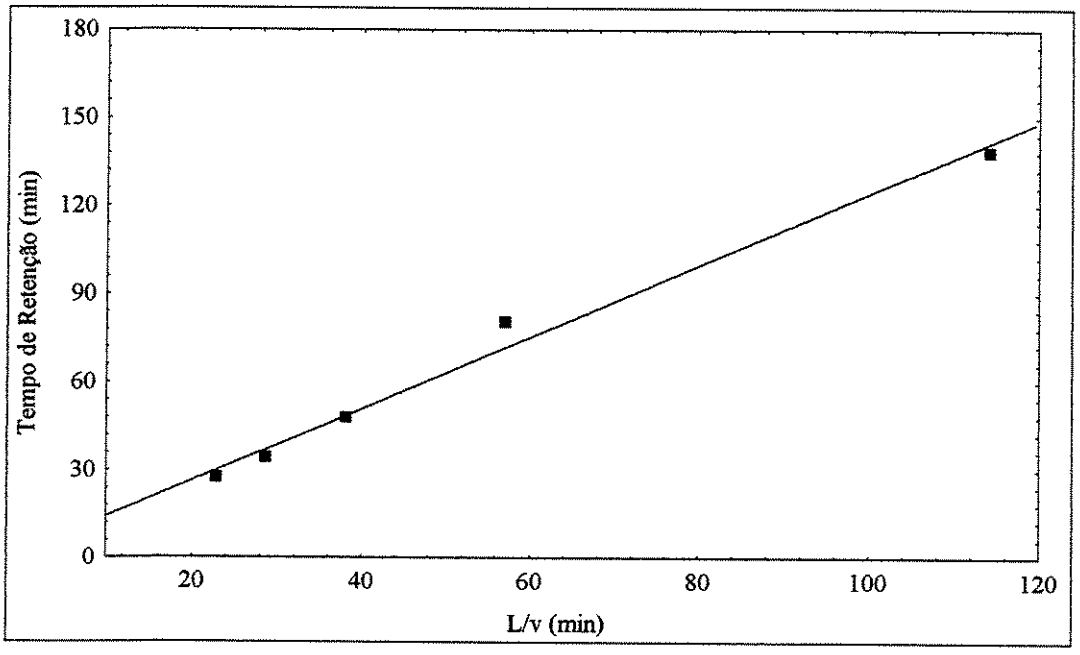


Figura 4.50: Gráfico tempo de retenção x L/v para a glicose.

O fator de seletividade para a separação glicose-frutose na coluna foi então calculado, correspondendo à relação entre os coeficientes de partição ($\alpha = K_{fru}/K_{gli}$). O valor obtido foi igual a 2,33, valor superior ao encontrado para resinas de troca iônica, como mostra a tabela 4.21, demonstrando boa capacidade de adsorção e seletividade para frutose.

Tabela 4.21: Comparação entre experimentos de separação em coluna cromatográfica.

Adsorvente	K_{fru}	K_g	α	Referência
Zeólita CaY 55 ^{0}C	0,64	0,36	1,78	Ching et al. (1987)
Duolite (Ca^{2+}) 50 ^{0}C	0,52	0,36	1,44	Ching et al. (1987)
Zeólita CaY 29 ^{0}C	0,78	0,38	2,02	Ho et al. (1987)
Duolite (Ca^{2+}) 28 ^{0}C	0,66	0,36	1,83	Ho et al. (1987)
Zeólita Bayer (Ba^{2+}) 40^{0}C	0,71	0,31	2,33	Este trabalho

4.10.2.3. Coeficiente de Partição da Dextrana 9300

A figura 4.51 mostra os perfis de eluição de dextrana 9300 na coluna cromatográfica para diferentes vazões de alimentação, nas condições já citadas anteriormente.

A partir destes perfis, com o cálculo dos tempos de retenção (equação 4.23), tem-se o gráfico representado na figura 4.52 e que permite o cálculo do valor do coeficiente de partição para a dextrana 9300.

O valor de K obtido para dextrana 9300 foi de 0,13. O coeficiente de correlação (r) foi igual a 0,994. Estes dados mostram a baixa capacidade de adsorção da dextrana na coluna, devida provavelmente a interações com apenas a superfície externa do adsorvente, confirmando hipóteses anteriores, bem como a validade deste método na determinação dos parâmetros de equilíbrio em coluna. Não há dados disponíveis para adsorção de dextrana em banho finito, para fins comparativos.

Quanto à separação dextrana-frutose, os valores de K obtidos permitem estimar a seletividade (definida como $\alpha = K_{fru}/K_{dext}$) em 5,46. Este valor elevado mostra novamente a adsorção altamente preferencial de frutose neste processo de separação.

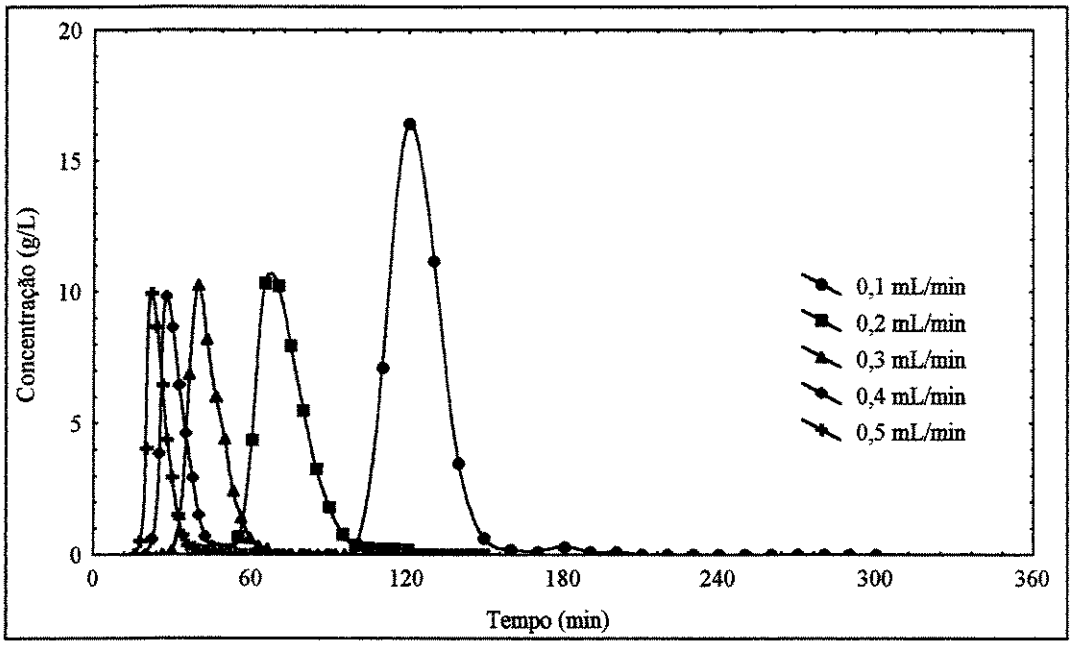


Figura 4.51: Perfil de concentração de dextrana na saída da coluna para diferentes vazões de alimentação.

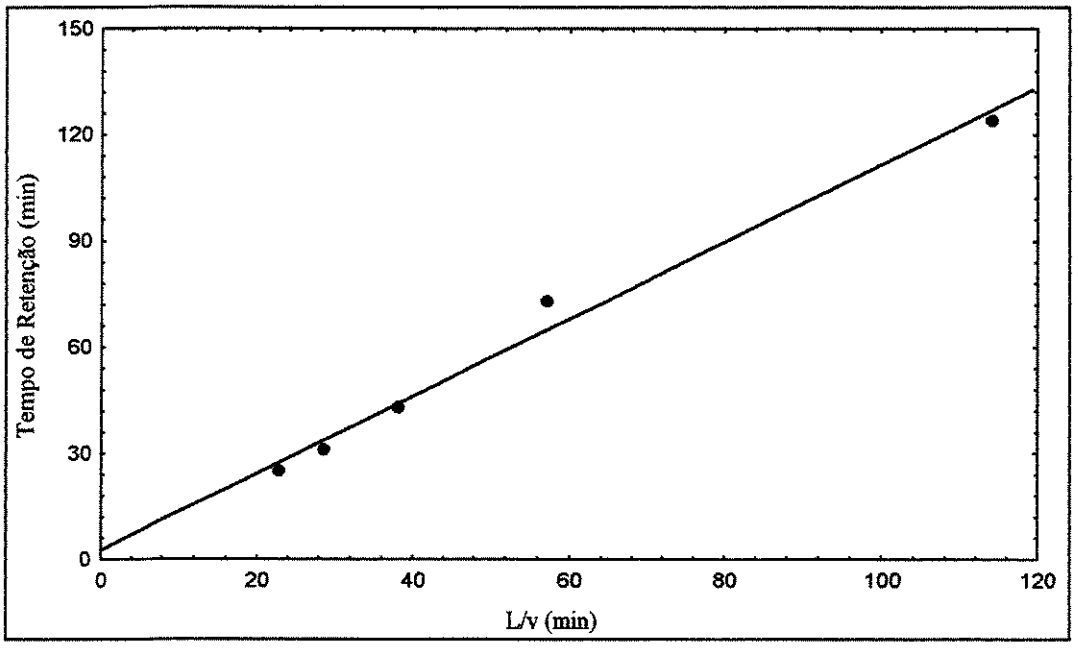


Figura 4.52: Gráfico tempo de retenção x L/v para a dextrana 9300.

4.10.3. Parâmetros de Transporte

4.10.3.1. Cálculo da Difusividade Efetiva e Dispersão Axial para Frutose

A figura 4.53 mostra os dados obtidos plotando-se HETP modificada x v, a partir do modelo proposto.

No cálculo da HETP modificada utilizou-se os seguintes parâmetros:

Raio da partícula: 39,362 μm (item 4.6.2)

Difusividade molecular da frutose a 40 ^{0}C: 2,05.10^{-4} cm^2/min (Rampp et al., 2000)

Porosidade da partícula: 0,43 (a partir da análise estrutural da zeólita, item 4.2)

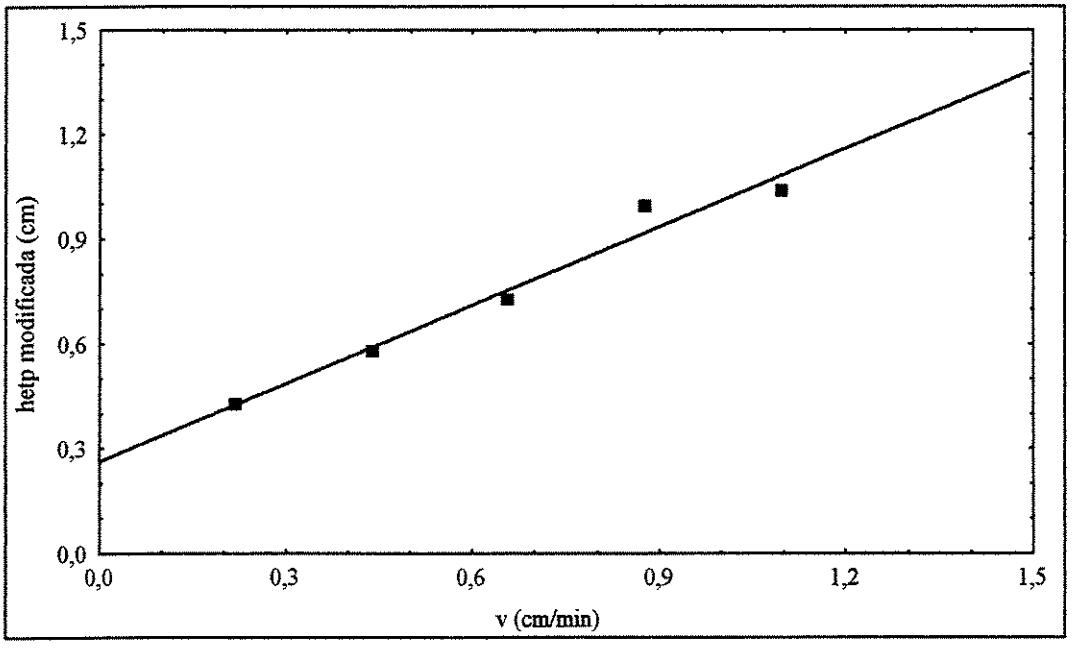


Figura 4.53: Gráfico HETP modificada x v para frutose.

Para a frutose, o valor calculado para difusividade efetiva foi de 1,02.10^{-6} cm^2/min e a dispersão axial foi dada pela expressão $E_b = 0{,}131v$. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,985, demonstrando a validade do método utilizado.

No trabalho de Viard & Lameloise (1992), com a resina de troca iônica Duolite C204/2115, forma Ca^{2+}, foi obtido difusividade efetiva de 27.10^{-6} cm^2/min a 30 ^{0}C e 59.10^{-6}

cm^2/min a 60 ^0C. Já no trabalho de Cheng & Ruthven (1988), o valor de difusividade efetiva para frutose em zeólita KX foi de 78.10^{-9} cm^2/min. Portanto, o valor calculado neste trabalho está na mesma ordem de grandeza do obtido por Viard & Lameloise (1992).

4.10.3.2. Cálculo da Difusividade Efetiva e Dispersão Axial para Glicose

A figura 4.54 mostra os dados relativos à velocidade superficial x HETP modificada para a glicose, que permite o cálculo da difusividade efetiva e coeficiente de dispersão.

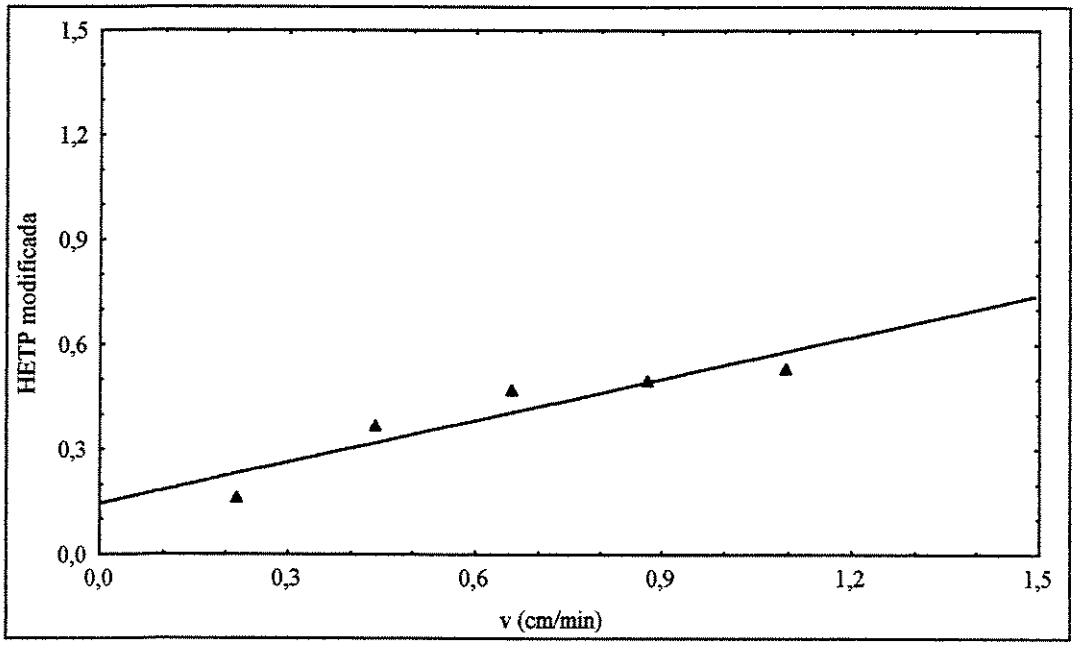


Figura 4.54: Gráfico HETP modificada x v para glicose.

Os valores utilizados para raio da partícula, difusividade molecular da glicose a 40 ^0C e porosidade da partícula foram os mesmos utilizados no item anterior.

O valor calculado para difusividade efetiva da glicose foi de $5{,}59.10^{-7}$ cm^2/min, e a dispersão axial foi governada pela expressão $E_b = 0{,}073v$. O coeficiente de correlação foi mais baixo ($r = 0{,}919$), mas considerado satisfatório, podendo ser melhorado com um número maior de experimentos. O valor de difusividade, comparado ao da frutose, é bem

menor, o que pode explicar, ao menos em parte, a mais fraca adsorção da glicose, pela maior dificuldade de difusão interna.

No trabalho de Viard & Lameloise (1992), com a resina de troca iônica Duolite C204/2115, forma Ca^{2+}, foi obtido para glicose difusividade efetiva de 72.10^{-6} cm^2/min a 30 ^0C e 78.10^{-6} cm^2/min a 60 ^0C, enquanto que no trabalho de Cheng & Ruthven (1988) o valor de difusividade efetiva em zeólita KX foi de 66.10^{-9} cm^2/min.

4.10.3.3. Cálculo da Difusividade Efetiva e Dispersão Axial para Dextrana 9300

A figura 4.55 mostra os dados obtidos de velocidade superficial x HETP modificada para a dextrana 9300.

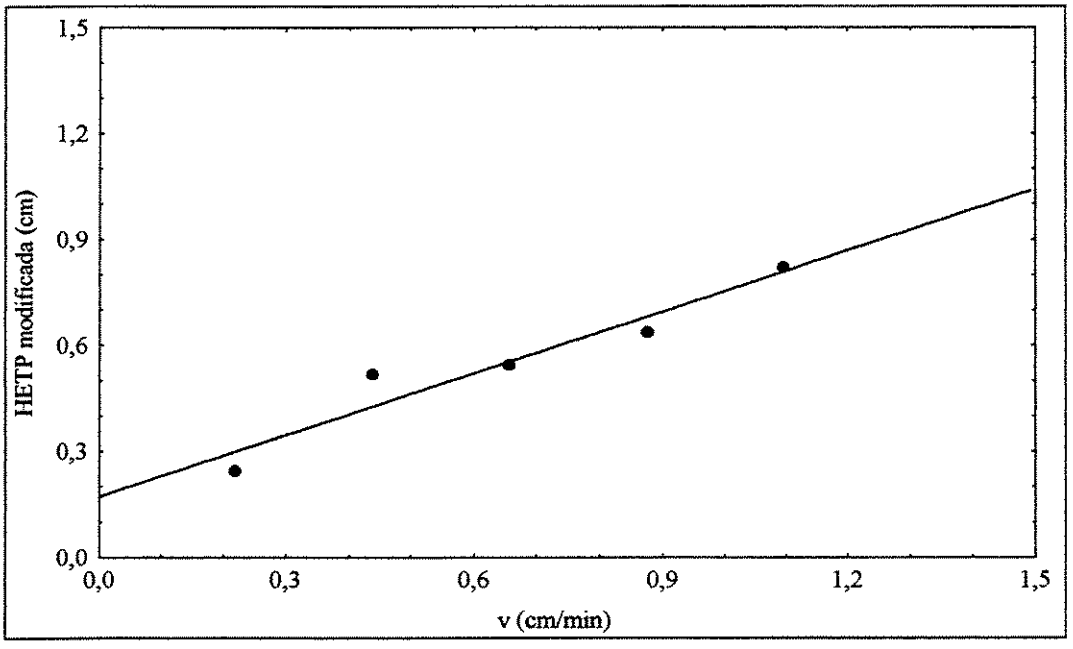


Figura 4.55: Gráfico HETP modificada x v para dextrana 9300.

A difusividade molecular da dextrana foi estimada de acordo com a correlação proposta por Shao (2000), que relaciona a difusividade molecular (D_m) e peso molecular da dextrana (Mw), descrita pela equação 4.35.

$$D_m\ (cm^2/s) = 7{,}58.10^{-5} Mw^{-0{,}485} \qquad (4.35)$$

O valor calculado para difusividade efetiva da dextrana foi de $7{,}79.10^{-8}$ cm^2/min, valor bastante baixo, em concordância com a esperada exclusão molecular para este processo. A dispersão axial foi governada pela expressão $E_b = 0{,}086v$. O coeficiente de correlação foi considerado adequado ($r = 0{,}961$).

4.10.4. Comentário Sobre a Determinação dos Parâmetros de Equilíbrio e Transporte da Coluna

É imprescindível o conhecimento dos parâmetros associados aos mecanismos de adsorção, como os parâmetros de equilíbrio (coeficiente de partição) e de transferência de massa (difusividade efetiva, dispersão axial), independente do processo de separação utilizado: cromatografia em batelada ou sistemas contínuos como o leito móvel simulado.

Para as separações abordadas neste trabalho, glicose-frutose e dextrana-frutose, o leito móvel simulado parece ser uma técnica adequada para conciliar alta eficiência de separação e alto rendimento. Neste caso, a disponibilidade de valores representativos para os parâmetros citados pode permitir, a partir de modelos matemáticos adequados, a simulação e otimização do mesmo, levando à predição do comportamento do sistema quanto ao rendimento e pureza dos extratos, delineando os procedimentos experimentais.

O método de respostas a pulsos cromatográficos, utilizado neste trabalho, mostrou-se útil na determinação de tais parâmetros, preenchendo uma lacuna quanto à disponibilidade de dados para frutose, glicose e, em particular, para dextrana.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões obtidas com este trabalho.

- O estudo do equilíbrio da adsorção de frutose e glicose puras mostrou que a zeólita Baylith WE-894 trocada com íons Ba^{2+} apresentou os melhores resultados, com alta capacidade de adsorção de frutose e baixa capacidade de adsorção para glicose. Para todos os cátions testados, o modelo linear foi adotado, sendo que o parâmetro que caracteriza a adsorção é o coeficiente de partição K. Para o caso da zeólita trocada com íons Ba^{2+} as isotermas foram definidas como: para a frutose, $q^*=0,82c^*$; e para glicose, $q^*=0,12c^*$. Em termos de adsorção da frutose, os resultados foram superiores aos encontrados para resinas de troca iônica.

- Nos ensaios preliminares realizados em coluna de leito fixo, tanto por análise frontal como por respostas a pulsos cromatográficos, utilizando misturas de glicose e frutose, observou-se melhoria do processo pela troca iônica, ao comparar-se com a zeólita de partida (forma sódica), tanto em termos de tempo de ruptura na análise frontal como em eficiência de separação nos perfis de eluição obtidos pela injeção de um pulso.

- O leito de zeólitas foi caracterizado, determinando sua porosidade ($\varepsilon = 0,58$) e as propriedades da zeólita modificada, incluindo percentual de troca de íons sódio, mostrando que a troca iônica foi eficiente, e distribuição de tamanho de partícula (diâmetro médio de 78,724 μm).

- No estudo da separação de glicose e frutose, com a técnica de análise de respostas a pulsos cromatográficos, utilizando a metodologia da análise de sensibilidade, verificou-se que a temperatura mostrou efeito pronunciado sobre a eficiência de separação, sendo que o aumento da temperatura de 30 ^{0}C para 40 ^{0}C resultou num aumento da eficiência de 1,28 para 1,94 (S = 1,55).

- Já na separação de dextrana e frutose, temperatura e volume injetado mostraram um efeito pronunciado na separação. O aumento de temperatura de 30 ^{0}C para 40 ^{0}C aumentou a eficiência de 2,01 para 2,72 (S = 1,06) e o aumento da relação Vp/Vc

(volume do pulso injetado de 10% para 20 % do volume total da coluna) reduziu a eficiência de separação de 2,01 para 1,02 (S = -0,49).

- Como esperado, o peso molecular da dextrana também é um importante fator a ser considerado no processo. Dextranas de alto peso molecular levam a redução da eficiência de separação da coluna.

- O melhor resultado na separação de glicose e frutose foi obtido a 40 ^{0}C, concentração de 20 g/L de cada componente, velocidade superficial de 0,127 cm/min (vazão de 0,1 mL/min) e Vp/Vc igual a 0,1 (volume injetado correspondente a 10 % do volume total da coluna), com uma eficiência de separação de 1,94.

- O melhor resultado obtido na separação dextrana-frutose foi a 40 ^{0}C, concentração de 20 g/L de cada componente, velocidade superficial de 0,127 cm/min (vazão de 0,1 mL/min) e Vp/Vc igual a 0,1 (volume injetado correspondente a 10 % do volume total da coluna) e um peso molecular de 9300, com eficiência de separação de 2,72.

- Em ambos os casos de separação, as eficiências de separação obtidas puderam ser consideradas elevadas, sobretudo no caso da separação dextrana-frutose, com valores muito superiores aos encontrados para resinas de troca iônica. Isto mostrou que o uso de zeólitas como adsorvente é promissor para as separações estudadas.

- Também estudou-se a separação dos produtos de reação obtidos pela ação da enzima dextrana-sacarase sobre sacarose na ausência e presença de aceptores (glicose e maltose) em coluna de leito fixo, utilizando o método de respostas a pulsos cromatográficos na temperatura de 40 ^{0}C e vazão de 0,1 mL/min, tendo-se obtido resultados promissores, em concordância aos obtidos com as misturas sintéticas, sendo que o peso molecular dos produtos de síntese e sua concentração mostraram-se fatores importantes a serem considerados.

- Os parâmetros de equilíbrio, cinéticos e de transporte de frutose, glicose e dextrana 9300 em coluna de leito fixo a 40 ^{0}C foram determinados, calculando-se o coeficiente de partição, difusividade efetiva e dispersão axial, usando o método de respostas a pulsos cromatográficos, que mostrou-se satisfatório. Os valores obtidos para os coeficientes de partição foram 0,71 para frutose, 0,31 para glicose, com seletividade de 2,33; e 0,13 para dextrana 9300, com seletividade de 5,46. Com relação à dispersão axial, esta mostrou-se dependente da velocidade interticial. Os valores para difusividade efetiva foram $1{,}02.10^{-6}$ cm^2/min para frutose, $5{,}59.10^{-7}$ cm^2/min para glicose e $7{,}79.10^{-8}$ cm^2/min para dextrana 9300.

- A metodologia de análise de respostas a pulsos cromatográficos mostrou-se eficaz, tanto na avaliação da influência de variáveis sobre a eficiência de separação como na determinação de parâmetros de equilíbrio, cinéticos e de transporte.

Capítulo 6

SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

Neste capítulo são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros.

- O leito móvel simulado é um método com potencial econômico para separação e purificação de produtos naturais, pois consiste de um processo contínuo, com maior produtividade, maior recuperação do produto e maior pureza, quando comparado com os processos cromatográficos em batelada. Portanto, o estudo deste processo aplicado à separação de glicose e frutose, bem como dextrana e frutose, é um campo que pode ser explorado, tanto na modelagem matemática e otimização, utilizando os parâmetros de equilíbrio, cinéticos e de transporte obtidos neste trabalho, quanto na realização de um estudo experimental.

- Estudos complementares de separação em coluna, utilizando produtos resultantes da ação da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, particularmente aqueles de alto peso molecular, poderão ser realizados, a fim de minimizar os problemas observados. Testes com partículas de maior diâmetro, e conseqüente maior porosidade do leito, podem ser interessantes, considerando também as demais variáveis operacionais.

- O estudo de reação e separação simultâneos, em uma coluna cromatográfica, em que a alimentação consiste de um pulso contendo a enzima dextrana-sacarase e o substrato sacarose, é um campo de estudo promissor, podendo ser verificado o efeito da remoção simultânea da frutose sobre rendimento e peso molecular dos produtos de síntese.

- Ensaios de adsorção com zeólitas modificadas com outros cátions de compensação, visando uma adsorção preferencial de glicose, em misturas de glicose-frutose, é interessante, podendo a técnica ser aplicada a processos enzimáticos como a síntese de frutooligossacarídeos, linha de pesquisa também desenvolvida no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP. Nesta reação enzimática a glicose é inibidora da reação, sendo desejada a sua remoção durante a síntese. Além disto, aumentaria o valor agregado do produto (frutooligossacarídeos), pela remoção de monossacarídeos presentes.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJONGWEN, J. N.; AKINTOYE, A.; BARKER, P. E.; GANETSOS, G.; SHIEH, M. T. Large-scale purification of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase for use in the biosynthesis of dextran by batch and continuous chromatography. **The Chemical Engineering Journal**, New York, v. 51, n. 3, p. B43-B50, june, 1993.

2. ALSOP, R. M. Industrial production of dextrans. **Progress in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 18, p. 1-45, 1983.

3. ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Liquid chromatography plate height equations. **Journal of Chromatography**, v. 330, p. 159-166, 1985.

4. ATKINS, P. W. **Physical chemistry**. 3. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1986. 857 p.

5. BARKER, P. E.; ABUSABAH, E. K. E. The separation of synthetic mixtures of glucose and fructose and also inverted sucrose feedstocks using countercurrent chromatographic techniques. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 20, n. 1, p. 9-12, jan., 1985.

6. BARKER, P. E.; GANETSOS, G. Production of high purity fructose from barley syrups using semi-continuous chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 35B, n.4, p. 217-228, dec., 1985.

7. BARKER, P. E.; JOSHI, K. The recovery of fructose from inverted sugar beet molasses using continuous chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 52, n.1, p. 93-108, 1991.

8. BARKER, P. E.; GANETSOS, G.; AJONGWEN, J.; AKINTOYE, A. Bioreaction-separation on continuous chromatographic systems. **The Chemical Engineering Journal**, New York, v. 50, n. 2, p. B23-B28, nov., 1992.

9. BAZÁN, J. H. V. **Estudo da produção enzimática da dextrana clínica**. Campinas, 1993. 123 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

10. BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1988. 813 p.

11. BESTE, Y. A.; LISSO, M.; WOZNY, G.; WOLFGANG, A. Optimization of simulated moving bed plants with low efficient stationary phases: separation of fructose and glucose. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 868, p. 169-188, 2000.

12. BÖKER, M.; JÖRDENING, H. J.; BUCHHOLZ, F. Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextransucrase. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 43, n. 9, p. 856-864, apr. 15, 1994.

13. BOON, M. A.; VAN'T RIET, K.; JANSSEN, A. E. M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. Biotechnology and Bioengineering, v. 70, n. 4, p. 411-420, nov., 2000.

14. BRECK, D. W. **Zeolite molecular sieves - structure, chemistry and use**. New York: John Wiley & Sons, 1974. 771 p.

15. BROCKLEBANK, M. P. Downstream processing plant and equipment. In: ASENJO, J. A. **Separation processes in biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1990. p. 617–740.

16. BUTTERSACK, C.; WACH, W.; BUCHHOLZ, K. Specific adsorption of saccharides by dealuminated Y-zeolites. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 97, n. 46, p. 11861-11864, nov. 18, 1993.

17. CARTA, G.; MAHAJAN, A. J.; COHEN, L. M. Chromatography of reversibly reacting mixtures: mutarotation effects in sugar separations. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 1645-1657, may, 1992.

18. CASTILLO, E.; ITURBE, F.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; PELENC, V.; PAUL,F.; MONSAN, P. Dextran and oligosaccharide production with glucosyltransferases from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, p. 425-430, 1993.

19. CAVENAGHI, M. E. **Estudo da recuperação de frutose produzida na síntese enzimática "in vitro" de dextrana**. Campinas, 1999. 100 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

20. CAVENAGHI, M. E.; MAUGERI FILHO, F. Estudo da recuperação de frutose produzida na síntese enzimática "in vitro" de dextrana. XII Simpósio Nacional de Fermentações.

21. CHENG, Y.L.; LEE, T. Y. Separation of fructose and glucose mixture by zeolite Y. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 40, n. 4, p. 498-504, aug. 5, 1992.

22. CHING, C. B.; HIDAJAT, K.; RUTHVEN, D. M. Experimental study of a simulated counter-current adsorption system - V. Comparison of resin and zeolite absorbents for fructose-glucose separation at high concentration. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 42, n. 11, p. 2547-2555, 1987.

23. CHING, C. B.; RUTHVEN, D. M. A liquid phase chromatographic study of sorption and diffusion of glucose and fructose in NaX and KX zeolite crystals. **Zeolites**, Stoneham, v. 8, n. 1, p. 68-73, jan., 1988.

24. CREMASCO, M. A.; HRITZKO, B. J.; WANG, L. Determinação da porosidade do leito, coeficientes de partição e parâmetros de transferência de massa de aminoácidos utilizando a técnica de análise das respostas de pulsos cromatográficos. XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering. Águas de São Pedro – SP. 2000.

25. CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food- grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 11, p. 353-361, nov., 1996.

26. CURRALERO, I. C. B. **Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática, para obtenção de ferro-dextrana**. Campinas, 1993. 172 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

27. CURRALERO, I. C. B. **Estudo de sistema bifásico duplo estágio para produção de dextrana**. Campinas, 2000. 148 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

28. DILLS, W. L. J. Protein fructosylation: fructose and the maillard reaction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 779S-787S, 1993.

29. FINETTE, G. M. S.; BAHARIN, B. S.; MAO, Q. M.; HEARN, M. T. W. Adsorption behavior of multicomponent protein mixtures containing a1-proteinase inhibitor with the anion exchanger, 2 - (diethylamino) ethyl - spherodex. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 3, p. 265-275, may/june, 1997.

30. FLANINGEN, E. M. Zeolites and molecular sieves: an historical perspective. In: BEKKUM, H.; FLANINGEN, E. M.; JANSEN, J. C. **Introduction to zeolite science and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 13-34.

31. GHIM, Y. S.; CHANG, H. N. Adsorption characteristics of glucose and fructose in ion-exchange resin columns. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, Washington, v. 21, n. 4, p. 369-374, nov., 1982.

32. GOULDING, R. W. Liquid chromatography of sugars and related polyhydric alcohols on cation exchangers: the effect of cation variation. **Journal of Chromatography**, v. 103, p. 229-239, 1975.

33. GOSLING, I. S.; COOK, D.; FRY, M. D. M. The role of adsorption isotherms in the design of chromatographic separations for downstream processing. **Chemical Engineering Research & Design**, London, v. 67, n. 3, p. 232 - 242, may, 1989.

34. HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufactoring, composition and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 724S-732S, 1993.

35. HASHIMOTO, K.; ADACHI, S.; NOUJIMA, H.; MARUYAMA, H. Models for the separation of glucose/fructose mixture using a simulated moving-bed adsorber. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 16, n. 5, oct., 1983.

36. HASHIMOTO, K.; ADACHI, S.; SHIRAI, Y.; HORIE, M. Continuous separation of a-cyclodextrin and glucose using a simulated moving-bed adsorber. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 8, n. 3, p. 187-200, 1988.

37. HERNALSTEENS, S. **Obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por via enzimática**. Campinas, 2002. 83 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

38 HO, C.; CHING, C. B.; RUTHVEN, D. M. A comparative study of zeolite and resin adsorbents for the separation of fructose-glucose mixtures. **Industrial Engineering Chemistry Research**, Columbus, v. 26, n. 7, p. 1407-1412, 1987.

39. HORVÁTH, G.; KAWAZOE, K. Method for the calculation of effective pore size distribution in molecular sieve carbon. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 16, n. 6, p. 470-475, 1983.

40. KALIL, S. J. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido**. Campinas, 2000. 141 p. Tese (doutor em engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

41. KAMIMURA, E. S. **Modelagem e simulação de purificação de lipase por cromatografia de afinidade**. Campinas, 2000. 221 p. Tese (doutor em engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

42. KIM, D.; ROBYT, J. F. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC constitutive dextransucrase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 12, p. 1010-1015, dec., 1994.

43. KISHIHARA, S.; FUJII, S.; TAMAKI, H.; KIM, K. B.; WAKIUCHI, N.; YAMAMOTO, T. Continuous chromatographic separation of sucrose, glucose and fructose using a simulated moving-bed adsorber. **International Sugar Journal**, v. 94, n. 1128, p. 305-308, dec., 1992.

44. LIN, S. C.; LEE, W. C. Separation of a fructo-oligosaccharide mixture by hydrophilic interaction chromatography using silica-based micropellicular sorbents. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 803, n. 1-2, p. 302-306, 1998.

45. LONG, J. E. High fructose corn syrup. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 247-258.

46. LU, T. S.; LEE, T. Y. Separation of diethylbenzene isomers by column adsorption and desorption. **Industrial Engineering Chemistry Research**, Columbus, v. 26, n. 10, p. 2024-2028, 1987.

47. LUKÁC, M.; PERINA, Z. A dynamic model of physical process in chromatographic glucose-fructose separation. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 959-965, 1991.

48. MARTINELLI, A. L. S.; MACHADO, N. R. C. F.; ZANIN, G. M. Separation of glucose and fructose mixture by adsorption on zeolites. XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering. Águas de São Pedro – SP. 2000.

49. MATIJASEVIC, Lj.; VASIC-RACKI, D. Separation of glucose/fructose mixtures: counter-current adsorption system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 101-106, 2000.

50. MATIJASEVIC, Lj.; VASIC-RACKI, D.; PAVLOVIC, N. Separation of glucose/fructose mixtures. Analysis of elution of profiles. Chemical Engineering Journal, v. 65, p. 209-212, 1997.

51. MIBIELLI, G. M. **Síntese do processo de obtenção de dextrana clínica e frutose a partir de sacarose**. Campinas, 2001. 88 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

52. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

53. MIZOTA, T. Functional and nutritional foods containing bifidogenic factors. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 313, p. 31-35, 1996.

54. MONCHOIS, V.; REMAUD-SIMEON, M.; RUSSEL, R. R. B.; MONSAN, P.; WILLEMOT, R. M. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 465-472, oct., 1997.

55. MONCHOIS, V.; REVERTE, A.; REMAUD-SIMEON, M.; MONSAN, P.; WILLEMOT, R. M. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 1644-1649, may, 1998.

56. MONSAN, P.; LOPEZ, A. On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 23, n. 9, p. 2027-2037, sept., 1981.

57. NAVARRO, A.; CARUEL, H.; RIGAL, L.; PHEMIUS, P. Continuous chromatographic separation process: simulated moving bed allowing simultaneous

withdrawal of three fractions. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 770, p. 39-50, 1997.

58. NEELY, W. B. J. Dextran structure and synthesis. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 15, p. 34-369, 1960.

59. ORIOL, E.; PAUL, F.; MONSAN, P. Transfer reaction of glucosyl residues to maltose and purified oligosaccharides using highly active *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, v. 501, p. 210-215, 1987.

60. OSBERGER, T. F. Crystalline fructose. In: NABORS, L. O.; GELARDI, R. C. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 219-246.

61. O'SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora – an overview. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 313, p. 23-30, 1996.

62. PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Aplication to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 149, n. 2, p. 433-441, jul. 1st, 1986.

63. PEPPER, T. Alternative bulk sweeteners. In: JACKON, E. B. **Sugar confectionery manufacture**. Glasgow: Blackie and Son Ltd., 1990. p. 13-33.

64. PEREIRA, A. M. **Estudo da influência da glicose na síntese "in vitro"de dextrana**. Campinas, 1996. 127 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

65. PEREIRA, A. M.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 4, p. 397-401, apr., 1998.

66. PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. Commercially available oligosaccharides. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 313, p. 10-22, 1996.

67. QUEIRÓZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. Campinas, 1987. 118 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

68. QUEIROZ, J. H.; MAUGERI, F. Otimização da produção de dextrana-sacarse de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melaço como fonte de carbono. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 150-156, abr./jun., 1989.

69. RAMPP, M.; BUTTERSACK, C.; LÜDEMANN, H. D. c, T – Dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions.. Carbohydrate Research, v. 328, p. 561-572, 2000.

70. REGULY, J. C. **Introdução à analítica e à tecnologia de carboidratos, lipídios, proteínas e enzimas**. Rio Grande: Editora da FURG, 1983.

71. REMAUD-SIMEON, M.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; PELENC, V.; PAUL, F.; MONSAN, P. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α-(1→2) linkages. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, p. 101-117, 1994.

72. ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of dextransucrase action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 165, n. 2, p. 634-640, dec., 1974.

73. ROBYT, J. F.; EKLUND, L. H. Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F Dextransucrase. **Carbohydrate Research**, v. 121, p. 279-286, 1983.

74. ROBYT, J.; TANIGUCHI, H. The mechanism of dextransucrase action: biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. **Archives of Biochemistry**

and Biophysics, v. 174, p. 129-135.

75. ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. The mecanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 61, p. 433-445, mar., 1978.

76. RODRIGUES, M. I. **Contribuição ao estudo da utilização da enzima dextrana-sacarase na modificação de polissacarídeos**. Campinas, 1989. 93 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

77. SANTOS, V. M. **Estudo das condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica**. Campinas, 1996. 107 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

78. SARMIDI, M. R.; BARKER, P. E. Simultaneous biochemical reaction and separation in a rotating annular chromatograph. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 48, n. 14, p. 2615-2623, 1993.

79. SASKA, M.; CLARKE, S. J.; WU, M. D.; IQBAL, K. Applications of continuous chromatographic separation in the sugar industry. **International Sugar Journal**, v. 93, n. 1115, p. 223-228, 1991.

80. SASKA, M.; CLARKE, S. J.; WU, M. D.; IQBAL, K. Glucose-fructose equilibria on Dowex Monosphere 99 CA resin under overloaded conditions. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 590, n. 1, p. 147-151, 1992.

81. SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W. D.; GLÄSER, B. Liquid-phase adsorption of monosaccharide-water mixtures on X and Y zeolites. **Journal of Chemical Society - Faraday Transactions**, Cambridge, v. 89, n. 11, p. 1871-1876, june 7, 1993.

82. SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Editora Manole, 1985. 489 p.

83. SHAO (2000). The effect of solute concentration on the hindered diffusion of dextran and polyethylene glycol in porous membranes. 2000. PhD Thesis - Clarkson University. Apud: Peterson, N.; Baltus, R. **Verification of modeling techniques for sieving coefficients of ultrafiltration membranes**. Disponível em: <http://www.clarkson.edu/~peterson/FinalReport.doc> Acesso em: out. 2002.

84. SILVA, C. F. **Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose**. Campinas, 1998. 96 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

85. SILVA, C. F.; MACHADO, N. R. C. F.; MAUGERI FILHO, F. Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose. **Ciência & Engenharia**, ano 7, n. 2, p. 12-15, jul.-dez., 1998.

86. SOUZA, E. A. **Modelagem e simulação de um reator contínuo com reciclo de enzima para produção in vitro de dextrana**. Campinas, 1993. 149 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

87. SU, D.; ROBYT, J. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextransucrase. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 248, p. 339-348, oct., 1993.

88. SYMONS, M. C. R.; BENBOW, J. A.; PELMORE, H. Interactions between calcium ions and a range of monosaccharides studied by hidroxy-proton resonance spectroscopy. **Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions I**, London, v. 80, part 7, p. 1999-2016, jul., 1984.

89. TAKAHASHI, Y.; GOTO, S. Continuous separation of fructooligosaccharides using an annular chromatograph. **Separation Science and Technology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1311-1318, 1994.

90. VIARD, V.; LAMELOISE, M. L. Modelling glucose-fructose separation by adsorption chromatography on ion exchange resins. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 17, n. 1, p. 29-48, 1992.

91. VUILLEMIER, S. Prospects for HFS and high intensity sweeteners. International Sugar Journal, v. 99, n. 1186, p. 512-514, 1997.

92. WHITAKER, J. R. **Principles of enzimology for the food sciences**. New York: Marcel Dekker Inc., 1972. 636 p.

93. WOLFGANG, J.; PRIOR, A.; BART, H. J.; MESSENBÖCK, R. C.; BYERS, C. H. Continuous separation of carbohydrates by ion-exchange chromatography. **Separation Science and Technology**, New York, v. 32, n. 1-4, p. 71-82, 1997.

94. ZAFAR, I.; BARKER, P. E. An experimental and computacional study of a biochemical polymerization reaction in a chromatographic reactor separator. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 43, n. 9, p. 2369-2375, 1988.