

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

**ESTUDO DE SISTEMA BIFÁSICO DUPLO ESTÁGIO PARA
PRODUÇÃO DE DEXTRANA**

Isabel Cristina Baddini Currelero

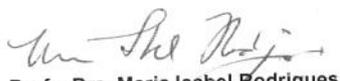
Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1993

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Rodrigues

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Isabel Cristina Baddini Currelero, aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de dezembro de 2000.

Campinas, 07 de dezembro de 2000


Prof. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Presidente da Banca

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

CAMPINAS

2000

200101048

UNIDADE	BE
N.º CHAMADA:	1/Unicamp
	C936e
V.	Ex.
TOMBO BC	43692
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	09/02/01
N.º CPD	



CM-00153441-4

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

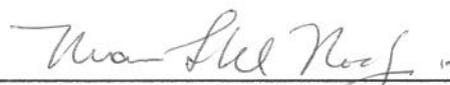
C936e Currelero, Isabel Cristina Baddini
Estudo de sistema bifásico duplo estágio para produção de dextrana / Isabel Cristina Baddini Currelero. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Dextrana. 2.Cromatografia de troca iônica.
3.Planejamento experimental. I.Rodrigues, Maria Isabel.
II.Universidade EStadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título

BANCA EXAMINADORA

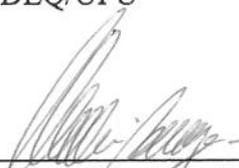
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE



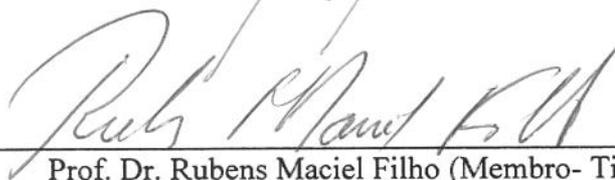
Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues (Orientadora)
DEA/FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro (Membro- Titular)
DEQ/UFU



Dr. Marlei Barboza (Membro- Titular)
DEQ/UFSCAR



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



Dr. Silvio Roberto Andrietta (Membro- Titular)
CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (Membro- Suplente)
DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Liliane Batista (Membro- Suplente)
FEQ/UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

A meu filho Gabriel pelo amor incondicional

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Isabel Rodrigues pela preciosa amizade, orientação e atenção no decorrer deste trabalho.

Ao professor Francisco Maugeri pelas sugestões e valiosos conselhos no desenvolvimento desta tese.

Ao meu querido Pedro, pelo amor, companheirismo e compreensão.

À Dona Maura, pela ajuda preciosa com as crianças.

À minha mãe, meu pai e minha irmã pela ajuda nos momentos de necessidade.

À “Dra Olinda”, Pedro e Meca pela constante solicitude e ajuda.

À Simara, pela ajuda inestimável no desenvolvimento do trabalho experimental e pelos bons papos.

Às amigas Eliana, Fifa e Lia pela ajuda, e principalmente pelo carinho constante.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos: Susana, Yemiko, Oscar, Luciano, Janaína, André e Daniel.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE GERAL

Nomenclatura	xv
Resumo	xvii
Summary	xix
1 – Introdução	1
2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1 – Introdução	5
2.2 - Dextrana-sacarase	6
2.2.1 – Propriedades	6
2.2.2 – Produção	10
2.2.3.- Imobilização	11
2.2.4 - Mecanismo de ação catalítica	12
2.3 - Propriedades e usos da dextrana	13
2.3.1. Propriedades	13
2.3.2. – Usos	15
2.4 - Processos de produção da dextrana	16
2.4.1 – Processo convencional	17
2.4.2 – Processo “in vitro “	17
2.4.3 – Processos alternativos para síntese de dextrana	18
2.5.- Aplicação de sistemas adsorptivos em processos enzimáticos	19
2.6 - Otimização do processo	23
2.6.1 - Seleção de variáveis	25
2.6.2 – Otimização	27
2.7 – Conclusões	28

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÇÃO CIRCULANTE

3 – Processo Contínuo com Reciclo de Enzima para Síntese de Dextrana	31
3.1 – Introdução	31
3.2 – Descrição do processo	31
3.3 – Procedimento Experimental	33
3.3.1 – Síntese de dextrana-sacarase	33
3.3.1.1 – Microrganismo	33
3.3.1.2 – Meio de cultura	34
3.3.1.3 – Inóculo	34
3.3.1.4 – Fermentação	35
3.3.1.5 – Purificação e estocagem da enzima	35
3.3.2 – Metodologia Analítica	36
3.3.2.1.- Determinação de açúcares	36
3.3.2.2 – Determinação de atividade enzimática	36
3.3.2.3.-Curva padrão de albumina bovina	37
3.3.2.4 – Curva padrão de atividade de dextrana-sacarase	38
3.3.3 – Obtenção dos parâmetros de adsorção	39
3.3.3.1. – Preparação da resina	40
3.3.3.2 – Obtenção das curvas de equilíbrio	40
3.3.3.3 – Estudo da adsorção em regime transiente	41
3.3.3.4 – Determinação dos parâmetros k_d e q_m	43
3.3.3.5 – Determinação das constantes cinéticas	47
3.4. Conclusões	52
4 - Modelagem Matemática	55
4.1 – Introdução	55
4.2 –Desenvolvimento do modelo matemático e simulações	55
4.3 –Estudo dinâmico do processo	67
4.4 – Conclusões	71

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

5 – Otimização do Processo	73
5.1 – Introdução	73
5.2 – Seleção das variáveis – “Screening design”	74
5.3 – Planejamento Experimental e Análise de superfícies de resposta	78
5.4 – Conclusões	109
6 – Operação do Sistema	111
6.1 – Introdução	111
6.2 – Descrição do sistema	111
6.3 – Metodologia experimental	114
6.3.1 – Metodologia analítica	114
6.3.1.1 – Determinação de sacarose e frutose por cromatografia líquida	115
6.3.1.2 – Detecção de dextrana por cromatografia de permeação em gel	116
6.3.1.3 – Curva padrão de albumina bovina	117
6.3.1.4 – Determinação de atividade enzimática	119
6.3.1.5. Determinação da concentração de NaCl	119
6.3.2 – Operação	119
6.4 – Obtenção dos perfis de concentração	122
6.4.1 – Ensaio na ausência de sacarose	122
6.4.2 – Ensaio com sacarose	124
6.5 – Conclusões	129
7 – Conclusões	131
8 - Perspectivas para Trabalhos Futuros	133
9.– Referências Bibliográficas	135
Apêndice A	147

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

NOMENCLATURA

τ_s	Tempo de residência de sólidos	h
τ_h	Tempo de residência hidráulico	h
V_l	Volume de líquido	L
V_t	Volume total (líquido+sólidos)	L
ε	Fração líquida	
F_1	Vazão de alimentação-reator 1	L.h ⁻¹
F_2	Vazão de alimentação-reator 2	L.h ⁻¹
F_r	Vazão de reciclo	L.h ⁻¹
q^*	Concentração de enzima adsorvida no equilíbrio	g.Lres ⁻¹
C^*	Concentração de enzima livre no equilíbrio	g.L ⁻¹
q_m	Capacidade máxima da resina	g.Lres ⁻¹
k_d	Constante de dissociação	g.L ⁻¹
k_1	Constante cinética	L.g ⁻¹ .h ⁻¹
k_2	Constante cinética	h ⁻¹
E	Concentração de NaCl	mol.L ⁻¹
E_0	Concentração de NaCl na alimentação do 1º reator	mol.L ⁻¹
C	Concentração de enzima livre	g.L ⁻¹
C_0	Concentração de enzima livre na alimentação do 1º reator	g.L ⁻¹
C_e	Concentração de enzima livre no estado estacionário	g.L ⁻¹
q	Concentração de enzima adsorvida	g.Lres ⁻¹
S	Concentração de sacarose	g.L ⁻¹
S_0	Concentração de sacarose na alimentação do 1º reator	g.L ⁻¹
m_{res}	Massa de resina	g
p_{res}	Densidade da resina	g.L ⁻¹
k	constante da taxa de reação	h ⁻¹
k_m	Constante de Michaelis-Menten	g.L ⁻¹
h	Passo de integração	

UNICAMP
 BIBLIOTECA CENTRAL
 SEÇÃO CIRCULANTE

RESUMO

A dextrana, um homopolissacarídeo de origem bacteriana, possui grande número de aplicações na indústria química, alimentícia e farmacêutica. Neste trabalho foi estudado um processo contínuo, de produção de dextrana, que permite o reciclo da enzima dextran-sacarase.

Neste sistema a enzima é adsorvida em resina de troca iônica (DEAE CELULOSE) e mantida em recirculação entre dois estágios. No primeiro, se dá a dessorção da dextran-sacarase, pela alimentação de solução de NaCl, e a reação enzimática de formação de dextrana, a partir da sacarose alimentada. No segundo estágio a enzima é adsorvida para mantê-la no sistema, sendo assim retida pelo filtro colocado na saída desse estágio.

O estudo deste sistema se iniciou com a obtenção experimental das isotermas de adsorção e constantes cinéticas dos processos de adsorção e dessorção, assim como a influência da concentração de eletrólito (NaCl) nesses parâmetros. A partir das equações cinéticas de adsorção e dessorção da dextran-sacarase a 25°C, foi desenvolvido um modelo determinístico do processo e através de simulações foram obtidos perfis de concentrações de enzima livre e adsorvida, sacarose e NaCl.

Técnicas de planejamento fatorial e superfícies de resposta foram usadas em combinação com a simulação do processo no estudo da otimização, visando um estudo prévio de otimização do rendimento, da produtividade e da retenção da enzima no sistema. Inicialmente, foi usada uma metodologia de "screening design" para avaliar quais das sete variáveis estudadas eram relevantes nas respostas. Cinco variáveis estatisticamente significativas foram selecionadas e utilizadas no planejamento fatorial para otimizar o processo. Com os modelos obtidos do planejamento fatorial, foram geradas superfícies de resposta que indicaram fração de líquidos (ϵ) igual a 0,8, concentração de sacarose na alimentação (S_0) de 125 g/L, NaCl (E_0) de 0,5 mol/L, tempo de residência de sólidos de 50 h, tempo de residência de líquidos no 1º reator (τ_{h1}) de 3 h e o do 2º de (τ_{h2}) 0,2 h, para atingir rendimento de 91-95% e produtividade de 220 g/L.h. O valor de τ_{h2} deve ser de 0,8 h para otimizar a retenção enzimática. Foi analisada ainda a função resposta otimizada

(RO), com a finalidade de verificar as condições operacionais necessárias para atingir os melhores valores possíveis das três respostas ao mesmo tempo.

Como etapa final do trabalho, o sistema foi colocado em operação , mostrando que é um processo viável, verificando-se a formação de dextrana. Apesar da dificuldade em manter vazões estáveis em pequena escala, os perfis de concentrações foram qualitativamente semelhantes aos obtidos pelo modelo matemático.

SUMMARY

Dextran, a bacterial homopolysaccharide, has many applications in chemical, food and pharmaceutical industries. In this work it was studied a continuous process, with dextranase recycle, for dextran production.

The enzyme is adsorbed in an ion exchange resin (DEAE CELLULOSE) and recirculated from one stage to other. In the first one, the dextranase desorption takes place by the feeding of NaCl solution feeding, as well as the enzymatic reaction of dextran formation. In the 2nd stage the enzyme is adsorbed and maintained in the system. In the exit stream it was located a tangential filter to retain the resin.

The experimental determination of adsorption isotherms, kinetic constants and the influence of electrolytic strength in these parameters was the first step in this study. A deterministic model with the kinetic equations and mass balances was developed. Concentration profiles of free and adsorbed enzyme, sucrose and NaCl were obtained by simulation.

Factorial design and response surface techniques were used in combination with modeling and simulation to optimize the process in order to maximize yield, productivity and enzymatic retention in the system. Initially, screening design methodology was used to evaluate which of the seven studied variables were relevant in the responses. Five statistically significant parameters were selected and utilized in factorial design in order to optimize the process.

With the obtained models from the factorial design, response surfaces were generated indicating a liquid fraction value of 0,8, sucrose and NaCl concentrations of 125 g/L e 0,5 mol/L respectively, solids residence time of 50h, hydraulic residence time in the first reactor of 3h and 0,2 h in the second, to reach a productivity of 220 g/L.h and yield of 91-95%. The hydraulic residence time in the second stage must be 0,8h to maximize the enzymatic retention. A function defined as optimized response was also analyzed in order to verify the operational conditions to reach better results for the three responses at the same time.

As a final step the system was maintained in operation in a laboratorial scale, showing its viability and dextran formation.

1.Introdução

Dextrana é o termo dado a um grupo de polissacarídeos de origem bacteriana, cuja cadeia principal consiste de unidades de D-glucose unidas por ligações α -1,6. O grau de ramificações, peso molecular e outras propriedades da dextrana são muito específicas, variando conforme o microrganismo usado para a obtenção da enzima responsável pela produção do biopolímero. A maioria dos trabalhos recentes têm sido conduzida com várias linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, em particular o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F.

As aplicações da dextrana estão diretamente relacionadas com seu peso molecular. Seus principais usos estão na indústria química, de alimentos e farmacêutica, merecendo relevância sua utilização como expensor de plasma sanguíneo ou na prevenção da obstrução dos capilares por melhorar a fluidez do sangue. Existem ainda alguns derivados da dextrana com importantes aplicações, como a dextrana-sulfato com propriedades anticoagulantes e a dextrana-ferro, usada no tratamento de anemias em animais e humanos. Devido ao grande potencial de utilização apresentado, os processos de produção e aplicações das dextranas foram objeto de um grande número de patentes (citado por Queiroz, 1987).

Os processos tradicionais para síntese de dextrana são compostos de duas etapas: a produção da enzima dextrana-sacarase, por linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e a obtenção da dextrana a partir da sacarose, catalisada pela dextrana-sacarase. Nos processos mais antigos, quando começaram os estudos deste polissacarídeo, sua síntese era feita juntamente com a fermentação, numa única etapa. Com o domínio das características do microrganismo, da enzima, e da própria reação enzimática, esta passou a ser feita numa etapa separada, podendo haver ou não uma purificação anterior da dextrana-sacarase.

Devido ao alto custo associado à produção da enzima, torna-se economicamente interessante a sua reutilização, visto que possui ótima estabilidade em condições normais de operação. Técnicas tradicionais de imobilização não apresentaram bons resultados para a

dextrana-sacarase, no entanto outras alternativas têm sido estudadas. Neste sentido a adaptação do sistema CARE (Continuous Affinity-Recycle Extraction), proposto inicialmente para purificação de enzimas (Pungor *et al.*, 1987) parece oferecer uma alternativa interessante para a síntese de dextrana, já que o processo permite o reciclo contínuo da dextrana-sacarase.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a modificação do processo CARE para produção de dextrana, proposto por Sousa (1993), visando a reutilização da enzima e conseqüentemente, uma possível diminuição nos custos de produção. Uma outra expectativa em relação a este trabalho foi a possibilidade de manter concentrações constantes e num nível adequado para a formação de um polímero de peso molecular homogêneo, tendo visto que as concentrações de sacarose e frutose são determinantes na definição do peso molecular e homogeneidade do produto. A descrição detalhada do processo, assim como a obtenção experimental das constantes cinéticas de adsorção e dessorção da enzima dextrana-sacarase em DEAE-celulose em diferentes concentrações salinas é apresentada no capítulo 3.

A obtenção das constantes cinéticas e a proposição de modelos para seu comportamento frente a diferentes concentrações de sais, permitiu uma modelagem matemática mais criteriosa do sistema como um todo, mostrada no capítulo 4. A modelagem matemática permitiu maior agilidade no estudo dinâmico do processo, além de facilitar sua otimização, imprimindo maior rapidez e confiança nos resultados obtidos a partir de um grande número de ensaios.

Assim, no capítulo 5, foram selecionadas as variáveis com efeito significativo sobre o processo, através das metodologias de Plackett-Burman e planejamento fatorial fracionário, permitindo um estudo comparativo das duas metodologias de 'screening design' para este caso. Através do planejamento fatorial completo e análise de superfícies de resposta, foram obtidos modelos do comportamento das respostas de interesse em função das variáveis selecionadas, sendo estabelecidas assim faixas ótimas de operação.

Para investigar a validade do modelo proposto para o processo e sua exequibilidade prática, o sistema foi colocado em operação, numa escala laboratorial de 200 mL. Foram obtidos perfis de concentração de sacarose, dextrana-sacarase, NaCl, açúcares redutores e dextrana, que puderam ser comparados com aqueles previstos pelo modelo. Estes dados e discussões, assim como a descrição dos equipamentos utilizados são apresentados no capítulo 6.

A seguir será apresentado, na Figura 1.1, um fluxograma indicando as etapas seguidas no desenvolvimento deste trabalho

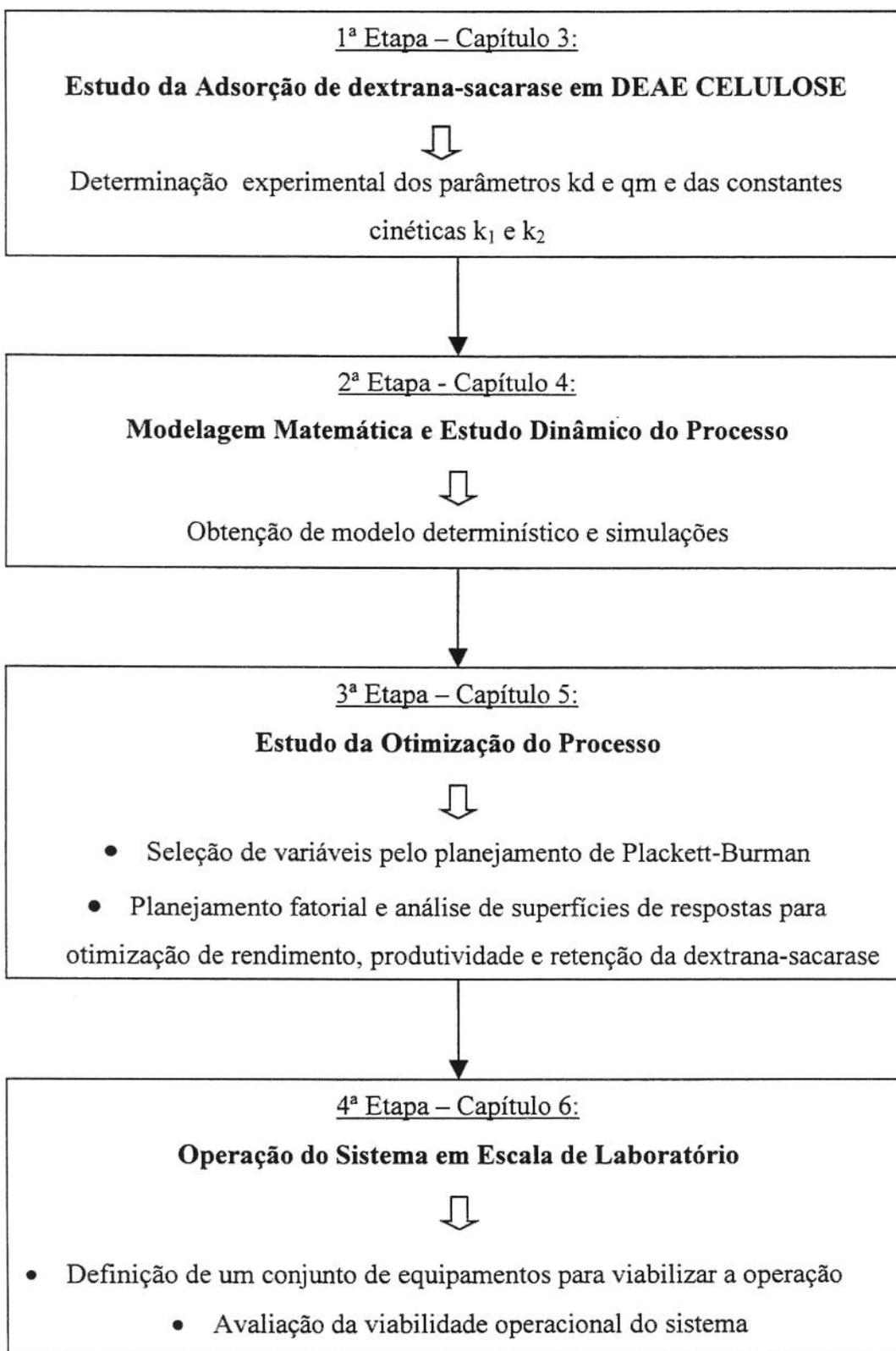


Figura 1.1. Fluxograma das etapas desenvolvidas neste trabalho.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Introdução

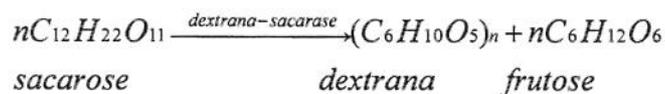
As dextranas começaram a ser estudadas há mais de um século, com a observação da formação de películas e aumento da viscosidade durante processos de fabricação de vinhos e açúcar de cana e de beterraba (Alsop, 1983).

Em 1861, Pasteur já havia demonstrado que a formação dessas películas em caldos ricos em sacarose tinha como causa uma ação microbiana, sem no entanto ter identificado esse agente. Foi em 1878 que Van Tieghem isolou e descreveu a bactéria causadora de tais películas, dando-lhe o nome de *Leuconostoc mesenteroides* (De Belder, 1987).

Em 1874, Scheibler havia descoberto que o espessamento apresentado pelos caldos de açúcar de cana e de beterraba era devido à presença de um carboidrato com fórmula empírica ($C_6H_{10}O_5$)_n, com rotação óptica positiva, ao qual denominou dextrana (Alsop, 1983). Atualmente o termo dextrana é usado para designar toda uma classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares, compostos quase que exclusivamente de resíduos glicosídicos, unidos predominantemente por ligações α -1,6.

Muitas bactérias sintetizam dextrana extracelularmente em meio contendo sacarose. Estas bactérias pertencem à família Lactobacillaceae, gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. As principais bactérias produtoras de dextrana pertencem ao gênero *Leuconostoc*, espécies *mesenteroides* e *dextranicum*, sendo a linhagem NRRL B 512-F de *Leuconostoc mesenteroides* a única com interesse comercial, devido às características da dextrana por ela produzida, quais sejam solubilidade em água e pequena quantidade de ramificações.

A dextrana não é um produto formado diretamente pela ação microbiana, mas provém da ação da enzima dextrana-sacarase, esta sim produzida pelo microrganismo, sobre a sacarose existente no meio, segundo a seguinte equação geral :



No mecanismo de reação, a energia requerida para a condensação das unidades glicosídicas é fornecida pela hidrólise da sacarose, o que constitui uma diferença essencial, comparado aos mecanismos comuns de síntese de polissacarídeos. Uma característica importante é que a dextrana-sacarase não necessita de cofatores ou de intermediários fosforilados de alta energia (Monsan & Lopez, 1981), sendo ainda a enzima e a dextrana extracelulares, facilmente recuperáveis.

2.2. Dextrana-Sacarase

A enzima dextrana-sacarase (E.C.2.4.1.5, α -(1,6)-D-glucana:D-frutose Z-glucosiltransferase) é classificada como uma glucosiltransferase que catalisa a transferência de um grupo α -D-glucopiranosil da sacarose para formar a dextrana (Monsan *et al.*, 1986). Esta enzima não é produzida comercialmente, estando sua produção vinculada à da dextrana.

2.2.1 – Propriedades

A dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512-F é uma enzima indutiva, sendo a sacarose o único substrato indutor conhecido (Paul *et al.*, 1984). Kim & Robyt (1996) desenvolveram mutantes de *Leuconostoc mesenteroides* constitutivos para dextrana-sacarase, havendo produção de enzima em meio contendo somente glicose. O trabalho anterior de Mizutani *et al.* (1994), também cita a obtenção de mutantes constitutivos de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512-F para dextrana-sacarase. Neste caso há produção de enzima em meios contendo exclusivamente glicose,

maltose ou frutose como fonte de carbono, sendo obtidas atividades 2 a 3 vezes maiores que aquelas obtidas pela geração parental.

A dextrana-sacarase não necessita de cofatores e é bastante específica, sendo o único substrato alternativo à sacarose a α -1-fluoroglucose, segundo relato de Jung & Mayer (1981).

O peso molecular da dextrana-sacarase purificada, com menos de 1% de carboidratos, obtido por Miller *et al.* (1986) está na faixa de 180000 daltons. Em trabalhos anteriores, Kobayashi & Matsudo (1977) avaliaram o peso em 65000 daltons, contendo 17% de carboidratos.

Robynt & Walseth (1978), em seus experimentos com a enzima purificada concluíram que ela era uma glicoproteína contendo D-manose como o principal componente dos carboidratos. Miller *et al.* (1986) colocaram em dúvida esta estrutura de glicoproteína, pelos baixos teores de carboidratos obtidos em suas preparações.

A inibição causada por íons de metais pesados e outros reagentes foram testados por Miller & Robyt (1984), sendo verificado que a enzima é inibida por Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , EDTA e p-cloroaminobenzoato. O íon cálcio, segundo Miller & Robyt (1986), apresenta efeito estabilizador e ativador. Em concentrações inferiores a 1 mM, a velocidade da reação é aumentada e acima deste valor ocorre o inverso. O efeito restaurador deste íon é também citado em Robyt & Walseth (1979).

A dextrana não inibe a ação da dextrana-sacarase aumentando sua estabilidade e também a atividade da enzima (Robynt & Walseth, 1978). Miller & Robyt (1984), mostram que além da dextrana, outros biopolímeros neutros como o polietilenoglicol, metil-celulose e detergentes neutros aumentam significativamente a estabilidade da enzima.

A enzima dextrana-sacarase não purificada é muito mais estável que a enzima na formapurificada, podendo ser estocada por vários meses sob refrigeração e pH 5, sem perda significativa da atividade (Alsop, 1983). Robyt & Walseth (1978), relatam em seus estudos

que a enzima purificada estocada à 4°C perde a atividade rapidamente e à -15°C, durante um período de 20 dias, a perda é de aproximadamente 60%. Outros pesquisadores relatam que a enzima apresenta maior estabilidade em temperaturas abaixo de 4°C (LOPES, 1979). Estudos mais recentes mostram que a purificação da enzima através de centrifugação e ultrafiltração diminuem sua estabilidade, sendo necessárias pequenas quantidades de dextrana para manter a estabilidade na faixa de pH de 5 a 7, inclusive durante o congelamento (Ajongwen & Barker., 1993). A enzima bruta e liofilizada retém a atividade por vários anos, quando estocada a temperaturas abaixo de 5°C (Queiroz, 1989). Guimarães (1999) usou dextrana-sacarase precipitada com polietileno glicol 1500 e estocada em solução tampão acetato de sódio 20 mmol/L (pH=5,2) a -15°C, observando boa estabilidade, mesmo depois de dois meses de estocagem.

Vários fatores influenciam a estabilidade da enzima em solução, sendo a temperatura e o pH dois parâmetros fundamentais (Queiroz, 1989). O pH ótimo situa-se em torno de 5,2, apresentando uma maior estabilidade entre 5,0 e 6,0 segundo Ebert & Schenk (1968). Kaboli & Reilly (1980), também situam o pH ótimo em 5,2 tanto para a enzima livre como imobilizada. Alguns autores apresentaram valores diferentes para o pH ótimo da enzima livre e imobilizada. Kobayashi & Matsuda (1980) obtiveram o valor 5,5 para a enzima livre, enquanto Miller *et al.* (1986) determinaram um pH ótimo de 6,0 para a enzima imobilizada, para ambos a faixa de pH onde se verifica maior estabilidade está entre 6,0 e 8,0.

Sousa (1993), através de análises de eletroforese, determinou o ponto isoelétrico da enzima em 4,5. Este valor é de fundamental importância na escolha da resina a ser utilizada em ensaios de adsorção.

A cinética da enzima dextrana-sacarase é normalmente descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, aplicável para níveis de sacarose entre 10 e 15%, quando a saturação da enzima é alcançada (Alsop, 1983).

O efeito da variação da concentração da sacarose na velocidade inicial da reação enzimática foi examinado nos trabalhos de Hehre (1946). Ele relata que a velocidade

máxima é atingida em baixas concentrações de substrato, próximas a 200 mmol/L, ocorrendo a inibição pela sacarose acima deste valor (Ebert & Schenk, 1968). Estes dados também foram obtidos por Martinez- Espindola & Lopes-Munguia (1985). Eles mediram a velocidade inicial em ampla faixa de concentração de sacarose e verificaram que o modelo de inibição pelo substrato se adequava aos dados cinéticos obtidos. O valor de K_m determinado foi 5,12 g/L .

Vários pesquisadores estudaram a influência de diversos açúcares na velocidade da reação, assim como no peso molecular do produto formado. Estes açúcares que podem ser mono, di, oligo ou polissacarídeos são chamados aceptores.

Stringer & Tsuchiya (1958), estudaram a cinética de formação da dextrana utilizando o α -metil glucosídeo como o acceptor e verificaram um aumento na velocidade de reação. Tsuchiya (1960) confirma os resultados obtidos anteriormente estudando este mesmo sistema. Ele notou ainda que a inibição pelo substrato diminuía à medida que a concentração do acceptor aumentava.

Monsan *et al.* (1986), estudaram a cinética da dextrana-sacarase na presença de maltose como acceptor. As velocidades iniciais da reação foram medidas para várias concentrações de sacarose e maltose. Com o aumento da concentração de maltose de 0 para 200 g/L , eles observaram um aumento linear de 12 para 163 mM na constante aparente de Michaelis e uma variação na velocidade máxima de 5,8 para um valor máximo de 19,1 U/mL.

A unidade de dextrana-sacarase (UDS) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana em uma hora, a pH 5,2 com tampão acetato e temperatura de 30°C, liberando 0,52 mg de frutose (Hehre,1955). Na maioria dos trabalhos é utilizada a definição de UDS, e em alguns mais recentes tem sido adotada a unidade internacional (UI). Segundo Kaboli & Reilly (1980), a UI é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de frutose por minuto a 30°C e pH 5,2. A definição de unidades alternativas é citada em Alsop (1983).

2.2.2. Produção

Desde os estudos iniciais da produção de dextrana-sacarase realizados por Koepsell & Tsuchiya (1952) e Tsuchiya et al. (1953) até o final da década de 70, apenas os processos descontínuos de produção de dextrana-sacarase tiveram destaque, ficando a produção máxima em torno de 50-70 UDS/mL.

A formulação dos meios de cultura para produção da enzima foi amplamente estudada, ficando evidenciada a necessidade de adição de sacarose numa faixa de 50 g/L, nitrogênio orgânico na forma de extrato de levedura ou água de maceração de milho, fosfato como KH_2PO_4 e sais (Lopes, 1979).

Utilizando o meio de cultura proposto por Lopes (1979) e meio alternativo com melaço e água de maceração de milho, Queiroz & Maugeri (1989) estudaram a produção em batelada alimentada, utilizando diversos perfis de adição de sacarose. Foram obtidas atividades da ordem de 50 - 70 UDS/mL, mostrando a possibilidade de utilização de matérias-primas mais baratas e abundantes.

No início da década de 80, segundo Alsop(1993), Lopez & Monsan conseguiram aumentar consideravelmente os rendimentos até então obtidos, através da adição contínua de sacarose, principalmente durante a fase logarítmica de crescimento, quando ocorre a indução na formação da enzima. Com este tipo de processo em batelada alimentada foram obtidas atividades da ordem de até 180 UDS/mL. BROWN & Mcavoy (1990) fizeram a adição de solução alcalina de sacarose associada ao sistema de controle de pH obtendo até 300 UDS/mL, como descrito anteriormente por Monsan & Lopes (1981). Currello (1993) usando o mesmo método de adição de sacarose, obteve 150 UDS/mL.

A produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua tem sido pouco estudada, Paul et al. (1985) conseguiram uma produtividade três vezes maior que a obtida por batelada alimentada, com taxa de diluição de $0,4 \text{ h}^{-1}$.

2.2.3 – Imobilização

A imobilização da dextrana tem sido estudada por vários pesquisadores sem que um processo de produção de dextrana utilizando enzima imobilizada tenha sido desenvolvido com resultados satisfatórios. Isto se deve provavelmente ao fato de que a formação do polissacarídeo dificulta muito a difusão do substrato para os sítios ativos da enzima, estando esta imobilizada.

Chen & Kaboli (1976), estudaram a imobilização em papéis de filtro e sílica porosa. Os melhores resultados foram obtidos com sílica, atingindo uma atividade de 13 UDS/g de sílica. Os autores relatam uma perda de atividade enorme quando a enzima entra em contato com o suporte. Kaboli & Reilly (1980), também utilizando sílica, obtiveram valores ainda mais baixos, da ordem de 8 UDS/g de sílica. Monsan & Lopes (1981), no entanto, imobilizando dextrana-sacarase em sílica porosa, atingiram índices bem mais elevados, com atividade de 800 UDS/g de sílica. Verificou-se que a eficiência da imobilização variava com a área específica da sílica utilizada, sendo atingido o máximo de retenção com sílica de 6 m²/g. Queiroz & Maugeri. (1989) relataram um aumento na retenção de dextrana-sacarase com a utilização de maltose durante a ligação enzima-suporte.

O uso de adsorção hidrofóbica em fenoxiacetil celulose, citado por Chang *et al.* (1981), apesar de fornecer boa atividade (400 UDS/g suporte), resultou em baixa estabilidade com perda de 40% da atividade em quatro horas de incubação. Altas atividades foram obtidas por Kobs (1991), com adsorção em Sephadex G-200, mas a estabilidade não foi testada.

Reichwitz *et al.* (1995) obtiveram rendimento da ordem de 80% (190 UDS/g) na imobilização de dextrana-sacarase em alginato de sódio. A enzima imobilizada apresentou boa estabilidade a 25°C, com tempo de meia vida de 60 horas. Este método foi utilizado por Reh *et al.* (1996) em um estudo de produção de leucrose em reatores contínuos e em batelada.

2.2.4 - Mecanismo de Ação Catalítica

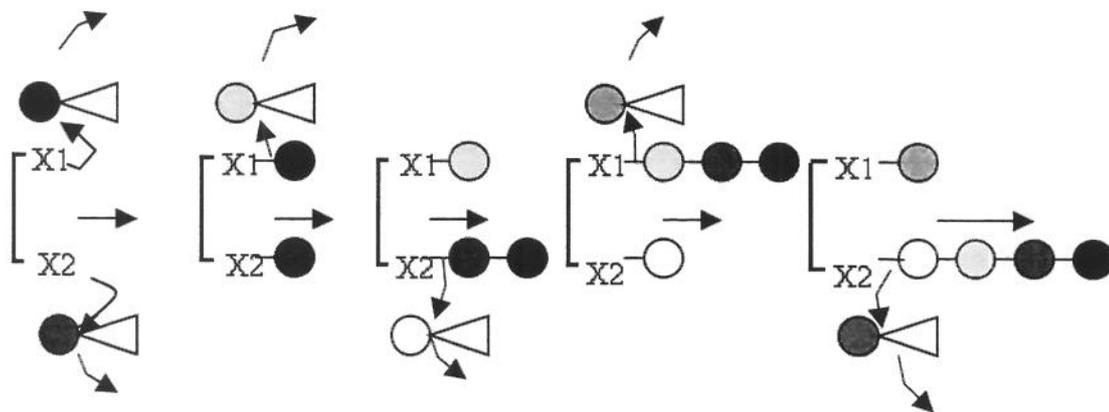
Depois de muitos estudos sobre o mecanismo de reação para a formação da dextrana, agora parece claro que a reação ocorre por um mecanismo de inserção, como tem sido mostrado por Robyt e colaboradores (1974 a 1980).

De acordo com esses estudos, a enzima possui dois sítios ativos equivalentes X1 e X2, como mostra a Figura 2.1. Numa primeira etapa os sítios ativos fazem um ataque nucleofílico a moléculas de sacarose, formando dois grupos glicosil que permanecem ligados ao carbono 1 através de ligações covalentes.

No passo seguinte, a hidroxila do carbono 6, de uma das unidades glicosílicas, faz um ataque nucleofílico ao glicosil ligado ao outro sítio catalítico, formando uma ligação α -(1,6) e liberando um sítio que ataca outra molécula de sacarose, formando um novo grupo glicosil. Em seguida, a hidroxila do carbono 6 do novo glicosil formado faz um ataque ao carbono 1 do isomaltosil formado na etapa anterior. Na presença de sacarose o mecanismo se repete continuamente com os dois grupos catalíticos dos sítios X1 e X2, formando alternadamente complexos covalentes com a glucose e a cadeia de dextrana em crescimento.

A finalização da cadeia ocorre pelo deslocamento da dextrana, através da ação de aceptores como glicose ou frutose, quando estes atingem uma concentração suficiente para atuar no sítio ativo, de tal forma que uma de suas hidroxilas faz um ataque nucleofílico ao carbono 1 da dextrana.

Este mecanismo explica ainda a formação de oligossacarídeos e dextrana de baixo peso molecular, quando a síntese se dá na presença de aceptores fortes como maltose e isomaltose, que mesmo em concentrações baixas são capazes de deslocar a molécula de dextrana em formação.



X1 e X2 : Grupos nucleofílicos do centro ativo

- : Glicose
- △ : Frutose
- △ : Sacarose
- : Glicoses unidas por ligação α - 1,6

Figura 2.1: Mecanismo de formação de dextrana

2.3 - Propriedades e Usos da Dextrana

2.3.1. Propriedades

A dextrana é um homopolissacarídeo neutro de origem bacteriana produzido extracelularmente. Dependendo da espécie microbiana empregada e das condições de fermentação, uma grande variedade de dextranas podem ser produzidas (Blanch *et al.*, 1986). Diferem entre si por determinadas características físicas e químicas, como

viscosidade aparente, solubilidade em água, rotação específica, estrutura e peso molecular (Garcia *et al.*, 1962).

A linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F produz dextrana com uma cadeia principal formada por resíduos glicosídicos com 95 % de ligações α -(1,6) e ramificações formadas somente por 5% de resíduos na posição α -(1,3) (Alsop, 1983). A estrutura é mostrada na Figura 2.2.

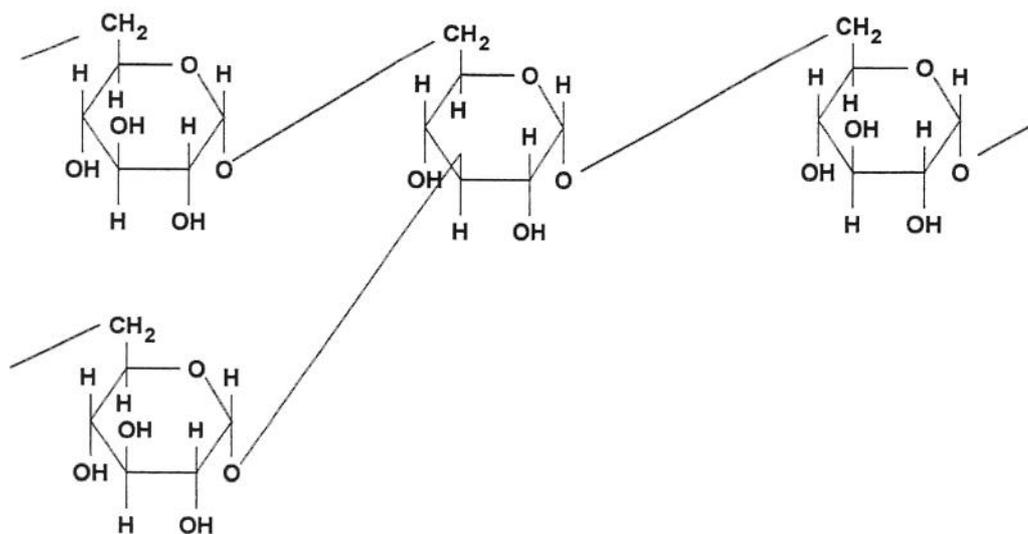


Figura-2.2: Estrutura básica da dextrana

A dextrana B-512F é completamente solúvel em água, metil sulfóxido, formamida, etilenoglicol e glicerol. Sua rotação ótica é de aproximadamente $+200^\circ$ em solução aquosa (3 a 10 % p/v). Apresenta estabilidade quando esterilizada sob calor e aos processos de congelamento e descongelamento. O peso molecular pode variar de acordo com as condições de síntese. No processo convencional, a dextrana nativa pode atingir de 9 a 50 milhões de daltons (De Belder, 1987).

Segundo alguns dados reológicos de soluções aquosas de dextrana e xantana obtidos por Margaritis & Te Bokkel (1983), verifica-se que as soluções de dextrana de alto peso molecular apresentam um grau de pseudoplasticidade maior que as de baixo peso, sendo que estas quase se comportam como um fluido Newtoniano. Comparada à xantana, um heteropolissacarídeo aniônico altamente ramificado, o grau de pseudoplasticidade é menor (Blanch *et al.*, 1986).

A capacidade de complexar íons é outra importante propriedade da dextrana, e aparentemente está relacionada com os grupos 3-hidroxil das ramificações (Sandford & Baird, 1983).

2.3.2. Usos

As dextranas apresentam um enorme potencial de uso, mas somente algumas alcançaram sucesso comercial, já que outros polissacarídeos conhecidos apresentam propriedades semelhantes, podendo ser substituídos, muitas vezes, uns pelos outros. Nestes casos, o custo de produção pode determinar o uso de um determinado produto em detrimento de outro. Por outro lado, algumas características específicas e únicas da dextrana dificultam sua substituição, garantindo seu espaço nas aplicações industriais.

- **Indústria farmacêutica**

As dextranas de baixo peso molecular, ao contrário das de alto peso, podem ser utilizadas para fins clínicos, porque são completamente metabolizadas no organismo e não apresentam efeitos tóxicos e possuem baixa alergenicidade (Alsop, 1983).

A dextrana com peso molecular médio de 75000 daltons é utilizada como expansor do plasma sanguíneo, mantendo o volume e a pressão arterial normais, em casos de choque por queimaduras ou hemorragias. Em solução salina isotônica a 6% (p/v) apresenta

viscosidade e pressão osmótica equivalente às proteínas do plasma. A dextrana 40 (solução 10% p/v), segundo Currello (1993), possui um poder limitado de expansão do volume sanguíneo, mas promove uma melhora no fluxo, auxiliando a circulação nos vasos capilares, podendo ser administrada em indivíduos de qualquer tipo sanguíneo, evitando riscos de choque associados a hemoderivados, assim como a possibilidade de contaminação por agentes patogênicos.

A dextrana-sulfato é usada como agente anticoagulante (Alsop, 1983) e segundo os estudos feitos por Busso & Resnick (1990), apresenta atividade anti-viral, inclusive contra o vírus HIV.

A ferro-dextrana é utilizada no tratamento de anemia ferro-priva em seres humanos e principalmente em animais (Goodman & Gilman, 1985)

As dextranas de peso molecular acima de 200 000 daltons podem ser usadas como vetor de medicamentos (Queiroz, 1987).

- **Indústria química**

Um dos grandes sucessos de aplicação da dextrana é na produção de redes moleculares. Os produtos mais conhecidos são o SEPHADEX e o DEAE- DEXTRANA, usados para enchimento de colunas de cromatografia.

2.4.Processos de Produção da Dextrana

As condições ótimas de pH, temperatura e concentração de substrato são bastante distintas na obtenção da enzima dextrana-sacarase e do biopolímero dextrana. Assim a dextrana produzida durante o processo fermentativo apresenta rendimento muito baixo e seu peso molecular não pode ser controlado. A alternativa mais adequada é a obtenção da enzima numa primeira etapa, sua recuperação e purificação com posterior síntese da

dextrana nas condições ótimas para a atuação da enzima. Uma descrição e revisão das condições de operação deste processo “in vitro” serão apresentados a seguir, assim como para o processo convencional, onde enzima e polissacarídeo são produzidos numa única etapa.

2.4.1. Processo convencional

Neste caso, a dextrana é produzida durante o crescimento do microrganismo, num processo bastante simples, onde apenas a temperatura é controlada. Algumas formulações do meio de cultura são apresentadas por Jeanes *et al.* (1954) e Veljkovic *et al.* (1988). Neste processo, ocorrem simultaneamente as etapas de crescimento do microrganismo, produção da enzima e produção da dextrana. O pH varia de valores próximos da neutralidade até 4,5, devido à formação de sub-produtos ácidos. O término do processo se dá entre 18 e 24 horas, tempo no qual se obtém um máximo de viscosidade coincidindo com um pH entre 4,5 e 4,8 (Alsop, 1983). A dextrana é recuperada do meio fermentado inicialmente por centrifugação para a separação das células e em seguida pela precipitação com solventes orgânicos, como etanol ou metanol. O produto é comumente chamado de dextrana nativa e possui um peso molecular da ordem de vários milhões de daltons. O rendimento final é de aproximadamente 25% em relação à sacarose alimentada.

2.4.2. Processo “in vitro”

Neste processo, a dextrana-sacarase e a dextrana são produzidas em condições controladas em duas etapas distintas, ou seja, a enzima obtida na primeira é utilizada na segunda para a síntese da dextrana.

Como os valores ótimos de pH, temperatura e de outros parâmetros do processo são diferentes para cada etapa, o desenvolvimento do processo em duas etapas facilita o controle e a otimização das condições de fermentação e da síntese enzimática (Alsop,

1983). Este controle mais efetivo das duas etapas resulta numa forma mais rentável e racional de obtenção do polissacarídeo, levando ainda à simplificação nos processos de purificação e maiores rendimentos, tanto na fermentação, quanto na síntese propriamente dita. A produção de dextrana por esta via torna possível a purificação da enzima, permitindo o emprego de técnicas que tornem viável sua reutilização. Além disso, existe a possibilidade da recuperação da frutose produzida, já que este açúcar tem grande valor comercial (Silva, 1998)

Alsop (1983) estudou o efeito de vários parâmetros da síntese 'in vitro' em condições industriais, através de técnicas de cromatografia de permeação em gel, concluindo que o parâmetro mais importante é a concentração de sacarose, controlando tanto o rendimento quanto a distribuição de peso molecular. Os maiores rendimentos são obtidos em concentrações de sacarose entre 2 e 10%, havendo a partir desta um aumento considerável na formação de dextransas de peso molecular mais baixo.

A temperatura de síntese, assim como a concentração enzimática parecem não ter grande influência sobre o rendimento e peso molecular, apenas sobre a produtividade (Paul et al., 1986). A temperatura é geralmente fixada em torno de 25° C, na qual a enzima apresenta boa estabilidade e a velocidade de reação é razoável. O pH utilizado é 5,2, correspondente ao ótimo de estabilidade.

Estudos de otimização das condições de síntese de dextrana realizadas por Guimarães et al. (1999), apontaram para uma concentração de sacarose de 60 g/L e 23°C sendo esperado um rendimento de 32%

2.4.3. Processos Alternativos para Síntese de Dextrana:

Processos alternativos para produção de dextrana foram estudados por Barker et al. (1993), propondo a utilização de um biorreator-separador cromatográfico, onde a frutose é retirada do meio, na região da coluna onde se dá a reação através de sua ligação à resina,

aumentando o rendimento. O mesmo princípio de eliminação da frutose para aumento do rendimento motivou Setford & Barker (1994) a utilizar um reator giratório, onde a separação das espécies se dá pela diferença no tempo de sedimentação no campo centrífugo. Estes sistemas, no entanto necessitam de equipamentos sofisticados e de difícil operação numa possível ampliação de escala.

Visando o reaproveitamento da enzima dextrana-sacarase e o barateamento do processo de produção de dextrana, começou a ser estudado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP) um processo alternativo de produção, no qual a enzima é imobilizada pela adsorção em resina de troca iônica. Este processo foi inspirado no processo CARE de purificação de enzimas, descrito a seguir. Estudos preliminares deste sistema foram publicados por Sousa (1993) e uma descrição detalhada do sistema é feita no capítulo 3.

2.5. Aplicação de sistemas adsortivos em processos enzimáticos

As técnicas envolvendo a adsorção seletiva de moléculas de uma fase líquida para outra sólida, são métodos muito usados no processamento de biomoléculas. Neste contexto, a utilização de processos adsortivos na purificação de enzimas e proteínas de maneira geral, principalmente aqueles com bom potencial de utilização em larga escala, vêm sendo estudados intensamente nas últimas décadas. A Tabela 2.1 apresenta diferentes alternativas de técnicas de cromatografia em larga escala

Tabela 2.1: Métodos cromatográficos para a purificação de produtos biológicos (adaptado de Blanch & Clark, 1997)

Mecanismo de separação	Tipo de cromatografia	Características	Aplicação
Carga	Troca iônica	A resolução pode ser alta Capacidade é elevada Velocidade pode ser alta dependendo da matriz	É o método mais utilizado. É mais efetivo nos estágios iniciais quando grandes volumes são manuseados. Pode ser utilizado em modo batelada.
Interações de Van der Waals	Interação hidrofóbica	Resolução é boa Capacidade é boa Velocidade é alta	Pode ser aplicado em qualquer estágio, mas é mais aplicado quando a força iônica é alta (após troca iônica ou precipitação salina). Possibilidade de alguma desnaturação. Pode envolver solventes orgânicos durante a eluição.
Tamanho e forma	Filtração em gel	Resolução moderada para fracionamento. Bom para troca de tampão e dessalinização. Capacidade relativamente baixa, mas é possível altas vazões com alguns tipos de empacotamento.	Fracionamento é melhor para os últimos estágios de purificação quando a alimentação é menor. Tampão pode ser trocado em qualquer momento.
Afinidade biológica	Afinidade	Seletividade pode ser alta. Capacidade pode ser alta dependendo do ligante. Velocidade é alta	Pode ser utilizado em qualquer estágio, mas os materiais são caros; melhor é utilizar quando as proteínas alimentadas e as substâncias que entopem tenham sido previamente reduzidas por métodos mais econômicos.

Para projetar e otimizar processos adsorptivos em larga escala, é importante que se estabeleça o modelo de adsorção envolvido. Segundo Chase (1988), o ponto de partida mais simples é assumir que os sítios do adsorvente tem atividade específica por uma única proteína. Neste caso é possível representar as interações entre adsorvente e adsorbato como um equilíbrio simples, representado matematicamente pela Equação 2.1.

$$q^* = \frac{q_m \times C^*}{(k_d + C)} \quad (2.1)$$

Esta equação relaciona as concentrações da proteína em equilíbrio na fase sólida (q^*) e na fase líquida (C^*). A isoterma de adsorção é neste caso chamada de isoterma de Langmuir e contém parâmetros que indicam a capacidade máxima do adsorvente (q_m) e a relação entre as reações de dessorção e adsorção envolvidas no equilíbrio (k_d). Ainda segundo Chase (1988), a obtenção das isotermas de adsorção é um primeiro passo na caracterização da interação entre proteína e adsorvente.

Yamamoto et al. (1983), obtiveram as isotermas de adsorção de várias proteínas em sistemas de cromatografia de troca iônica, retirando amostras periódicas de mistura contendo o adsorvente e uma determinada concentração de proteína, sob agitação. Este procedimento pode causar erros de interpretação, pois a cada retirada de amostra, as condições de equilíbrio são alteradas.

A determinação experimental de k_d e q_m a partir das isotermas de adsorção, foi descrito por Chase (1984) para sistemas de cromatografia de afinidade. Neste trabalho as isotermas foram obtidas a partir de amostras agitadas contendo adsorvente e várias concentrações de proteína, mantidas em contato até que o equilíbrio fosse atingido. Os parâmetros cinéticos foram obtidos de ensaios em batelada, nos quais a fase solúvel é continuamente removida do reator através de um filtro e bombeada para um espectrofotômetro, para monitoramento da concentração da proteína, retornando ao reator.

Esta mesma metodologia de obtenção das isotermas em tanque agitado, foi utilizada, tanto para adsorção por afinidade (Horstmann et al., 1986), Kamimura et al. (1999) como por troca iônica (Skidmore & Chase, 1990) e outros (Boyer & Hsu, 1990).

A obtenção experimental de isotermas de adsorção e determinação de parâmetros cinéticos em batelada, utilizada por Chase (1984), tornou-se uma ferramenta segura para estudos de processos adsorptivos. Esta metodologia pode ser usada em leitos fixos, ou técnicas mais modernas como reatores de fibra oca descritas por Schisla et al. (1995) para cromatografia por afinidade Kubota et al. (1997), usando ligantes hidrofóbicos (Mandieta, 1999), ou leito expandido (Chase & Draeger, 1992, Kalil, 2000a).

Com o objetivo de superar algumas limitações operacionais das técnicas de cromatografia em larga escala, foi proposto um sistema novo, baseado na cromatografia de afinidade, para purificação de proteínas, denominado 'Continuous Affinity Recycle Extraction'(CARE). Este processo foi desenvolvido por Pungor *et al.* (1987), para a recuperação e isolamento da enzima β -galactosidase produzida por *E. coli*, usando PABTG-agarose como suporte.

O processo CARE esquematizado na Figura 2.3, estudado por vários pesquisadores (Pungor *et al.* 1987, Afeyan *et al.* 1989, Gordon *et al.* 1990) consiste num sistema composto de dois reatores de mistura perfeita, conectados por um reciclo, operando em regime permanente.

No primeiro reator se dá a alimentação do material a ser purificado, que entra em contato com o adsorvente adequado e é nele adsorvido. Neste estágio de adsorção são mantidas condições que permitem a captura da proteína alvo e lavagem das impurezas.

No segundo reator são alimentados o tampão de eluição e a enzima adsorvida proveniente do primeiro estágio, ocorrendo assim a dessorção, o que permite a recuperação da enzima purificada. A resina recircula continuamente entre os estágios sendo retida no sistema através de filtros existentes na saída dos reatores.

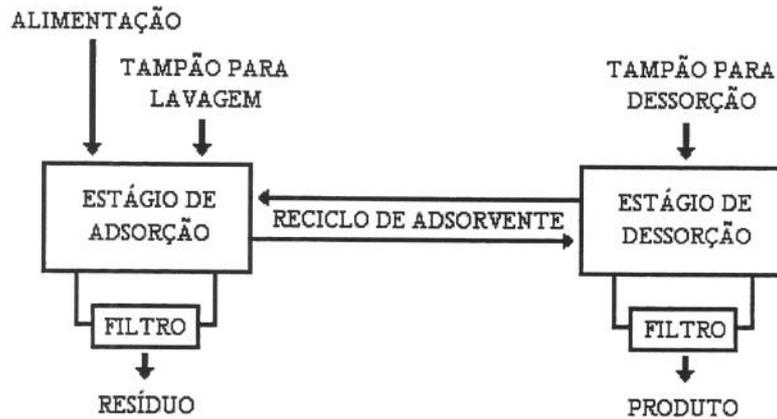


Figura 2.3 – Esquema do sistema CARE

O princípio de funcionamento do processo CARE, e os resultados preconizados por simulações, inspiraram outros processos de purificação. A purificação de cefalosporina C foi estudada por Barboza (1998), com obtenção experimental de parâmetros cinéticos e otimização do processo por planejamento experimental, através de simulação. A utilização de cromatografia em adsorventes hidrofóbicos, para purificação de lipase foi estudada por Mandieta (1999), também através de modelagem e simulação. Neste contexto também se insere o trabalho de Sousa (1993), que propõe um processo de produção de dextrana baseado no sistema CARE, no qual este estudo encontrou suas bases.

2.6. Otimização do Processo

Atualmente a necessidade crescente de minimizar custos através de altos rendimentos, sem perda apreciável na produtividade, para manter a competitividade dos produtos num mercado globalizado, tem levado à busca de ferramentas que possibilitem a otimização dos processos de maneira mais racional e que permitam um maior conhecimento das variáveis do processo.

Estes fatos aliados à evolução da tecnologia de informática, tanto em microcomputadores, como de aplicativos na área da estatística, vem trazendo um grande aumento na utilização de otimização de processos através de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta, embora esta metodologia tenha sido desenvolvida por BOX, na década de 50. Uma pesquisa na base de dados do “Food Science and Technology Abstracts” e Biotechnology Abstracts” mostrou um aumento muito grande no número de trabalhos que utilizavam estas metodologias. A Figura 2.4 mostra esta evolução nas últimas décadas, relacionando o número de artigos publicados usando esta metodologia a cada cinco anos.

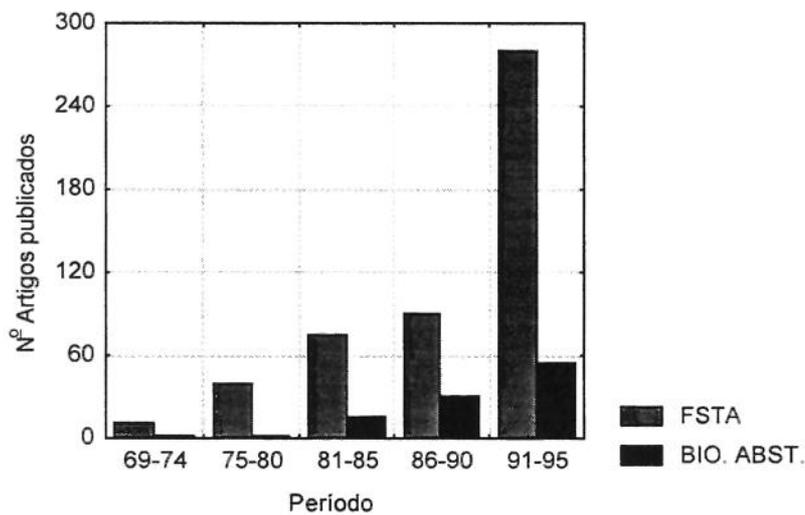


Figura 2.4 : Evolução do uso da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta nos últimos 25 anos

Num processo bioquímico um grande número de variáveis pode influenciar o rendimento, a produtividade ou outra resposta de interesse. Normalmente não é evidente quais dessas variáveis são as mais importantes e devem ser estudadas. Esta informação pode ser obtida através de uma técnica científica como a do planejamento fatorial. No

entanto o número de variáveis pode tornar o número de ensaios muito grande e muitas vezes inviável, mesmo que as respostas dos ensaios sejam obtidas através de simulações. No caso de sete variáveis em duas condições, por exemplo, seriam necessários 128 ensaios (2^7). Torna-se interessante neste caso a utilização de técnicas que permitam a pré seleção das variáveis, com um número mínimo de ensaios. Esta seqüência de técnicas de “screening desing” e otimização por planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta, foi utilizada por Kalil (2000), para fermentação alcoólica contínua, considerando inicialmente 10 variáveis independentes no processo.

2.6.1. Seleção de variáveis

Quando o pesquisador não conhece todas as variáveis que afetam significativamente as respostas de interesse num determinado sistema, ao invés de eliminar arbitrariamente fatores potencialmente importantes, é possível estudá-los todos sem aumentar o número de ensaios, utilizando planejamentos fracionários ao invés de fatoriais completos, ou outra metodologia para selecionar as variáveis de interesse.

A aplicação da metodologia de Plackett-Burman (1946) (PB), mostra-se como um recurso apropriado tendo em vista sua relativa simplicidade e confiabilidade (Stowe & Mayer, 1966). Os planejamentos mais usuais propostos neste método, envolvem a execução de 12, 20, 24 e 28 e 36 ensaios, podendo ser usados para qualquer número de variáveis de entrada, sendo conveniente realizar quatro ensaios a mais que o número de variáveis a serem estudadas, para determinação do desvio padrão. Os planejamentos de Plackett-Burman têm tido uma aplicação bastante limitada, apesar dos resultados obtidos serem bastante confiáveis e permitirem a estimativa dos efeitos principais das variáveis investigadas, com variância mínima (Rodrigues et al., 1998). Desde sua publicação, somente cerca de 20 artigos publicados utilizaram esta técnica de análise multivariável. Isso se deve muito provavelmente a dificuldade de compreensão do texto original.

Um exemplo bastante ilustrativo da maior racionalização na obtenção de resultados, através do método de PB, é o estudo realizado por Silman et al. (1991), onde a produção de esporos de *Colletotrichum truncatum*, usado como herbicida, foi investigada. Foram comparados quatro tipos diferentes de cultivo, sendo testados para cada um dez variáveis. A otimização deste processo por tentativa e erro ou mesmo por planejamento fatorial completo (1024 ensaios, somente estudando cada variável em dois níveis) envolveria um número incontável de ensaios. No entanto, a utilização da metodologia de Plackett – Burman, permitiu a obtenção de boas indicações no sentido da otimização do processo de produção de esporos, com um número bastante reduzido de experimentos.

De maneira geral o planejamento de PB vêm sendo utilizado, em processos biotecnológicos como uma ferramenta para a otimização de meios de cultura em fermentações, ou estudo da influência de aminoácidos e outros nutrientes no crescimento celular e produção de insumos, como evidencia a revisão a seguir.

Milagres & Lacis (1991), estudaram 5 variáveis no processo de produção de xilanase por *Penicillium janthinellum*, selecionando através de um PB de 8 ensaios, apenas duas variáveis como relevantes na resposta desejada, dentro da faixa estudada.

A importância de 23 nutrientes num meio complexo de cultura de tecidos para produção de interferon recombinante, e sua influência no crescimento celular e produção foi avaliado por Castro et al. (1992).

Kisaalita et al. (1993), definiram os aminoácidos presentes no “Bacto Casamino Acids”, com influência significativa no crescimento de *Pseudomonas fluorescens 2-79* e produção de fungicida por esse microrganismo.

O uso da metodologia estatística de PB (McIntire et al., 1996) permitiu a formulação de um meio definido com aminoácidos como fonte de nitrogênio, para a produção de vancomicina por *Amycolatopsis orientalis*.

Tailandier et al. (1996), estudaram a influência de fontes de nitrogênio, concentração de açúcar e ácidos orgânicos, além de temperatura e pH na taxa de crescimento específico, concentração máxima de biomassa e produtividade numa cultura de *Lactobacillus acidophilus*. Com apenas 12 experimentos foi observado que temperatura, pH e concentração de glicose tinham pouca influência nas variáveis estudadas.

2.6.2. Otimização

Os métodos de otimização baseados em planejamento experimental vêm sendo aplicados com grande frequência na área de processos fermentativos e enzimáticos, com certeza devido às inúmeras variáveis que estes processos envolvem. O que se nota entretanto é que a exemplo da metodologia de Plackett-Burman, sua utilização está mais voltada para a elaboração de meios de cultura, não sendo otimizadas variáveis operacionais, como temperatura, pH, tempo de residência, etc.

Karthikeyan et al. (1996) otimizaram o meio de cultura (concentrações de sacarose, extrato de levedura e K_2HPO_4), a temperatura e o pH iniciais para maximização da produção de dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512-F pelo processo convencional. A otimização foi feita pelo método da análise de superfícies de resposta, obtidas a partir de planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} . Os valores obtidos para as variáveis foram bastante semelhantes aos encontrados em trabalhos totalmente experimentais, sendo o rendimento obtido nas condições otimizadas 10% menor que o predito pelo modelo ajustado.

O estudo das condições de hidrólise de dextrana para obtenção de dextrana clínica, foi feito por Santos (1996) e posteriormente complementado por Guimarães et al. (1999). Foram obtidas condições ótimas de pH e temperatura através de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta, para obtenção de Dextrana 40 e Dextrana 70, utilizadas para fins clínicos. Além de prever 100% de conversão da dextrana nativa em dextrana

clínica a 72 ° C e pH 1, foi possível verificar que o pH é o parâmetro mais importante nesse processo, tendo a temperatura um efeito menos significativo.

As condições ótimas de produção *in vitro* de dextrana através de análise de superfícies de resposta foi também estabelecida por Guimarães et al. (1999). Realizando ensaios com temperatura na faixa de 20 a 31°C e concentração de sacarose entre 50 e 98 g/L a partir de planejamento fatorial completo, a análise das superfícies de resposta indicou um rendimento máximo a 23°C e concentração de sacarose de 60 g/L.

Da mesma forma a obtenção de dextrana clínica pela reação com glicose como acceptor foi estudada por Pereira et al. (1998). O rendimento em dextrana e o peso molecular do polissacarídeo formado foram avaliados variando a temperatura na faixa de 10 a 30°C, a concentração de sacarose entre 58 e 150 g/L e a razão entre as concentrações de glicose e sacarose de 0,02 a 0,2. Um rendimento de 45% em oligossacarídeos de peso molecular entre 2700 e 3800 daltons foi obtido com 150 g/L de sacarose e razão entre concentração de glicose e sacarose de 0,2 para qualquer valor de temperatura na faixa estudada.

2.7. Conclusões

Neste capítulo foram apresentados os processos mais usuais de síntese de dextrana e sua importância principalmente nas indústrias química e farmacêutica. A grande dificuldade de imobilização de dextrana-sacarase através de técnicas tradicionais, limita sua reutilização nos processos de produção tornando-os mais caros. Por outro lado o grande potencial de utilização dos processos adsorptivos, evidenciado pelo grande número de artigos encontrados, fez com que os pesquisadores do Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos concebessem um processo contínuo em dois estágios com reciclo de enzima adsorvida em resina de troca iônica, segundo os conceitos do processo CARE, na síntese de dextrana. Assim, por este processo apresentar um potencial de

utilização industrial, foi escolhido como objeto de estudo neste trabalho, verificando-se através de sua operação em laboratório, a viabilidade do mesmo.

Paralelamente foi desenvolvido um modelo matemático determinístico, de maneira a representar tão fielmente quanto possível o processo em questão, para um estudo de otimização a partir de metodologia estatística de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta. Nos últimos sete anos esta metodologia, planejamento fatorial associado à modelagem matemática do processo, vem sendo utilizada como uma ferramenta útil na avaliação multivariável de processos.

O sistema estudado tem um grande potencial de utilização industrial e a operação do sistema em laboratório pode verificar sua viabilidade.

3. Processo Contínuo com Reciclo de Enzima para Síntese de Dextrana

3.1. Introdução

Como já citado em capítulo anterior, a síntese de toda dextrana consumida mundialmente é feita a partir de processos nos quais a enzima não é reutilizada. Tendo em vista o alto custo de produção da enzima, torna-se imperativo que se criem alternativas de produção onde a enzima possa, mesmo que parcialmente, ser recuperada. Os problemas observados, principalmente quanto à estabilidade e ação enzimática nos processos tradicionais de imobilização de dextrana-sacarase, fez com que novos sistemas de produção fossem propostos e estudados. A consideração de novas alternativas é muito importante não só do ponto de vista tecnológico, mas principalmente quanto à viabilidade econômica da obtenção de um produto.

Neste contexto se insere a proposta deste trabalho de estudo de um processo inovador para produção de dextrana, verificando sua eficiência e operacionalidade.

3.2. Descrição do Processo

O processo CARE, descrito anteriormente, foi adaptado por Sousa (1993) visando a produção de dextrana, com reutilização de dextrana-sacarase, como mostra a Figura 3.1

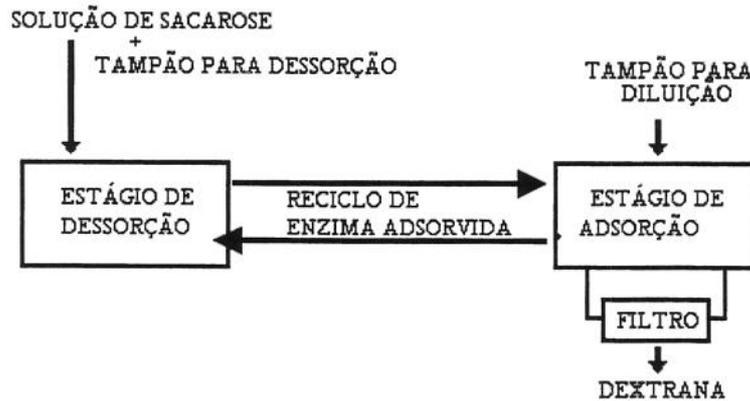


Figura 3.1 - Processo bifásico duplo estágio para produção de dextrana

Neste sistema, o princípio da adsorção da enzima em resina de troca iônica foi utilizado para manter a dextrana-sacarase recirculando no sistema, visando a minimização da sua perda.

No primeiro estágio é feita a alimentação de solução de cloreto de sódio, eluente usado para promover a dessorção da enzima, juntamente com solução de sacarose. Neste estágio, denominado de estágio de dessorção, a enzima deverá estar quase que totalmente livre no meio, possibilitando sua reação com a sacarose alimentada, havendo formação de dextrana.

No segundo estágio, chamado de estágio de adsorção, a enzima livre deve ser adsorvida na resina devido à diluição da solução de NaCl pela alimentação de tampão, e assim ligada, voltar para o primeiro estágio.

A dextrana formada no primeiro estágio é retirada no segundo, passando por um filtro onde a dextrana-sacarase ligada à resina será retida e retornada ao sistema. Simulações da operação deste sistema (Sousa, 1993) mostraram que o regime permanente não é atingido, pois há uma perda contínua de enzima não adsorvida na saída do segundo

estágio. Por este motivo o sistema deve ser operado de maneira a minimizar esta perda, propiciando maior eficiência.

O estudo da viabilidade deste processo depende num primeiro momento, do sistema enzima-adsorvente. Depois de escolhida a resina de troca iônica a ser utilizada, é fundamental para ter um conhecimento global do processo adsorativo, seguir os seguintes passos:

- Estudo da adsorção em regime transiente
- Obtenção das isotermas de adsorção
- Determinação dos parâmetros k_d e q_m
- Determinação dos parâmetros cinéticos

Através desses passos pode-se também estudar o melhor eluente, para promover a dessorção da enzima, assim como sua concentração.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Síntese de Dextrana-Sacarase

3.3.1.1. Micorganismo

A enzima dextrana-sacarase foi obtida a partir de culturas de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512-F, mantidas em estoque a -15° C em solução de glicerol a 10% (p/v).

3.3.1.2. Meio de Cultura

A Tabela 3.1 apresenta a formulação do meio de cultura utilizado nas fermentações. Todos os componentes apresentados na tabela, com exceção do fosfato dibásico de potássio, foram dissolvidos em água para obtenção das concentrações desejadas e o pH da solução acertado para 6,7. A solução de fosfato foi preparada separadamente e o pH também ajustado para 6,7. Ambas soluções foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos. A solução de fosfato deve ser esterilizada separadamente para evitar precipitação observada experimentalmente, quando uma só solução é preparada.

Tabela 3.1- Meio de cultura para fermentação de *Leuconostoc mesenteroides*

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g/L)</i>
sacarose (açúcar cristal)	40
extrato de levedura	20
sulfato de magnésio	0,2
cloreto de sódio	0,01
sulfato ferroso	0,01
sulfato de manganês	0,01
cloreto de cálcio	0,02
fosfato de potássio dibásico	20

3.3.1.3. Inóculo

Foram preparadas e esterilizadas como anteriormente meio de cultivo e solução de fosfato, de maneira que quando misturados atinjam as concentrações descritas na Tabela 3.1. O meio de cultura foi inoculado com um tubo de cultura estoque e incubado a 27°C por 12 horas a 200rpm.

3.3.1.4. Fermentação

Foi utilizado o fermentador BIOFLOW III da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co. com controle automático de pH, temperatura, agitação, nutrientes e aeração, com capacidade de 3 litros, contendo 1,5 L do meio padrão previamente esterilizado. O meio foi inoculado e incubado a 27°C, com aeração de 0,6 L/min e agitação moderada. O pH foi controlado numa faixa de $6,7 \pm 0,1$. O processo foi operado pelo sistema de batelada alimentada. O sistema de alimentação escolhido foi o utilizado por Santos (1996), feito juntamente com o controle de pH. Foram preparados 600ml de solução de sacarose 200 g/L e 150 mL de solução de NaOH 200g/L, esterilizadas separadamente a 121° C por 15 minutos e misturadas depois de frias, para obter uma solução final com concentração de 160 g/L de sacarose e 40 g/L de NaOH. Depois de aproximadamente 6 horas de fermentação, a alimentação foi interrompida e o pH acertado para 5,2 com HCl. O caldo foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C e feitas determinações de açúcares totais, açúcares redutores e atividade enzimática.

3.3.1.5. Purificação e estocagem da enzima

O sobrenadante do caldo fermentado foi submetido a um processo de ultrafiltração a baixa temperatura para concentrar a enzima e eliminar impurezas. Em banho de gelo, adicionou-se lentamente ao concentrado uma solução 50% de polietilenoglicol 1500 (PEG 1500) até que a solução tornou-se turva, com aparecimento de partículas esbranquiçadas. A suspensão foi centrifugada e o precipitado rico em dextrana-sacarase, diluído numa solução tampão de acetato de sódio 0,05 mol/L pH 5,2 contendo 0,05 g/L de cloreto de cálcio. A enzima foi estocada em frascos a -15°C para posterior utilização.

3.3.2. Metodologia Analítica:

3.3.2.1. Determinação de açúcares

Os açúcares redutores e totais foram determinados pelo método de DNS (Miller, 1959), segundo metodologia adaptada por Santos (1996).

3.3.2.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada medindo-se a velocidade inicial de produção de frutose (dosada pelo método DNS), quando a enzima é colocada em contato com sacarose sob condições controladas (reator de vidro de 25 mL encamisado, termostatizado a 30 °C e com agitação magnética). Na cela de vidro coloca-se 0,5 mL de tampão atividade (pH 5,2), 8,5 mL de água destilada, 2 mL de solução de sacarose 600 g/L e 1 mL de solução enzimática. A partir do momento de adição da amostra retira-se 1 mL da solução a cada intervalo de tempo (por exemplo : 1, 4, 7, 10, 13 minutos) para dosagem de frutose pelo método DNS. Foi construída uma curva padrão de absorbância em função do tempo, sendo a atividade determinada pela Equação 3.1:

$$\text{ATIVIDADE} = \alpha \cdot \beta \cdot d \cdot 114 \quad (3.1)$$

onde :

Atividade = (UDS/ml)

α : coeficiente angular da curva de absorbância x tempo

β : coeficiente angular da curva padrão de açúcares redutores

d : diluição da amostra no reator

114 : fator de conversão de unidades

3.3.2.3. Curva padrão para proteína utilizando albumina bovina

Estas curvas foram construídas para correlacionar resultados de atividade enzimática (UDS/mL) obtidos, com valores correspondentes para a concentração de albumina bovina que foi usada como proteína de referência e serviu de base para cálculos deste trabalho. As curva de variação da absorbância a 280 nm, com a concentração de albumina bovina em soluções contendo CaCl_2 e várias concentrações de NaCl são apresentadas na Figura 3.2.

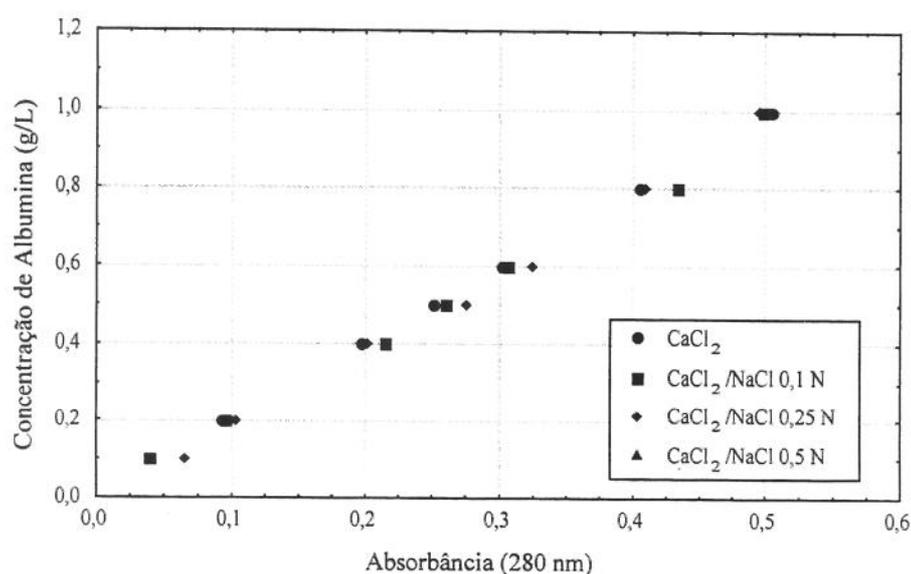


Figura 3.2: Curva padrão de albumina bovina

Como pode ser observado pela Figura 3.2, as curvas para as diferentes concentrações de NaCl são bastante próximas, sendo usada então a curva obtida experimentalmente sem o NaCl cujo ajuste linear é apresentado na Equação 3.2.

$$[\text{Albumina}] = 1,909 \times \text{Abs} + 0,011 \quad (3.2)$$

$$R^2 = 0,997$$

3.3.2.4. Curva padrão da atividade dextrana-sacarase

A Figura 3.3 mostra uma curva típica da relação entre a quantidade de dextrana-sacarase, representada por sua atividade em UDS/mL e a leitura de absorbância obtida em espectrofotômetro a 280 nm. Através das Figuras 3.2 e 3.3 foi possível correlacionar absorbância com concentração de proteína. Foi observado durante o início do desenvolvimento dos trabalhos que a relação entre a absorbância e a atividade variava dependendo do lote de enzima utilizado. Para evitar problemas na análise dos resultados foi usado um único lote de enzima para a obtenção dos parâmetros de adsorção.

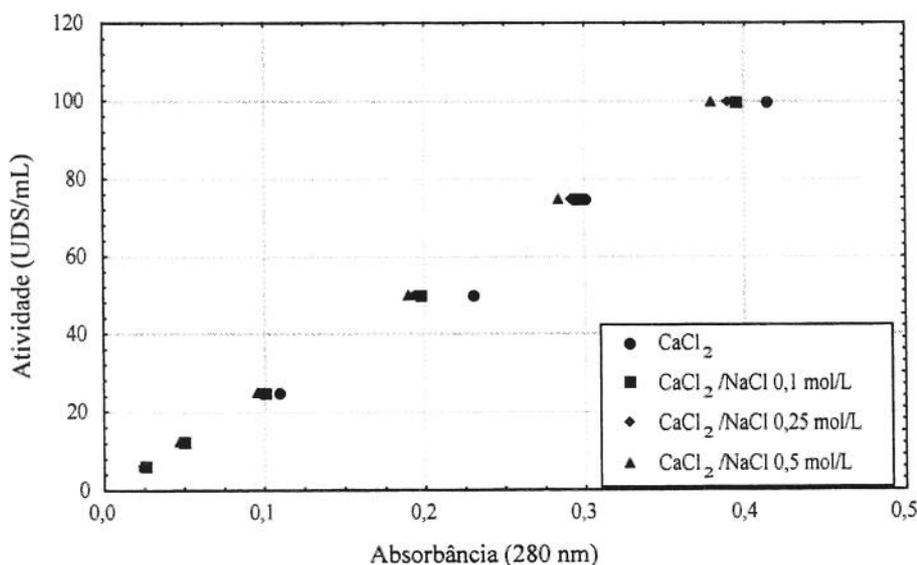


Figura 3.3: Curva padrão de atividade enzimática

Como no caso anterior foi usada a curva obtida na ausência de sacarose, cujo ajuste e coeficiente de correlação estão na Equação 3.3

$$\begin{aligned} \text{Atividade} &= 253,58 \times \text{Abs} + 0,124 & (3.3) \\ R^2 &= 0,989 \end{aligned}$$

3.3.3. Obtenção dos Parâmetros de Adsorção

A resina de aniônica utilizada para adsorver a enzima dextrana-sacarase foi a DEAE CELULOSE. Trabalhos preliminares realizados por SOUSA (1993), mostraram que adsorventes a base de dextrana, como DEAE SEPHADEX, não ofereciam bons resultados, principalmente na fase de dessorção. Isto talvez se deva ao fato da grande afinidade existente entre a enzima dextrana-sacarase e a dextrana.

No início deste trabalho foram realizados testes preliminares com a resina DEAE SEPHACEL, que apresentou um tempo de equilíbrio bastante longo (2 horas e 40 minutos) durante a adsorção, o que exigiria tempos de residência bastante longos no estágio de dessorção. Não foi possível observar dessorção da enzima, mesmo depois da adição de grandes quantidades de NaCl. Por estes motivos optamos pela utilização de DEAE CELULOSE.

A Figura 3.4 apresenta de modo esquemático o sistema utilizado para experimentos de adsorção em batelada em tanque encamisado com controle de temperatura e agitação magnética, no qual pode-se determinar o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio e obter os perfis de concentração de dextrana-sacarase livre ao longo do tempo. A variação da concentração de enzima no tanque agitado (1) foi continuamente monitorada através de um registrador (4), acoplado a um espectrofotômetro (3), com comprimento de onda ajustado em 280 nm. A fase líquida foi continuamente bombeada com uma vazão de aproximadamente 2 mL/min através de um tubo munido de um filtro, que impedia a passagem do sólido, através do espectrofotômetro, retornando a seguir para o reator.

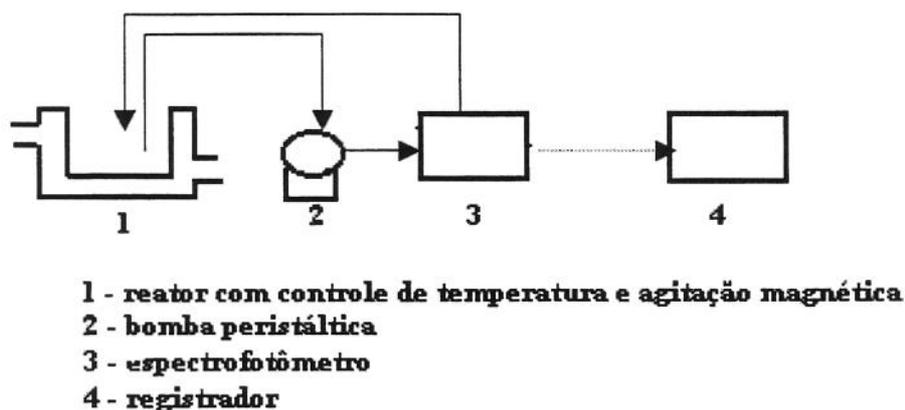


Figura 3.4: Sistema utilizado para a determinação dos parâmetros de adsorção

3.3.3.1.Preparação da resina (Sousa,1993)

Antes de ser utilizada nos ensaios de adsorção e dessorção a resina DEAE CELULOSE passou por um tratamento com base e ácido fortes e foi posteriormente estocada em solução de CaCl_2 0,05 g/L pH 5,2.

Primeiramente, a resina foi mantida sob agitação magnética por 2 horas em solução de NaOH 0,5mol/L, sendo em seguida filtrada e lavada sucessivamente com água até a neutralidade. Em seguida o mesmo procedimento foi feito com solução de HCl 0,5 mol/L, filtrando-se e lavando-se até a neutralidade novamente. O sólido filtrado foi ressuspensionado em solução de CaCl_2 e estocado em geladeira para posterior utilização.

Para que se pudesse saber a concentração de resina na suspensão estocada, foram feitos testes de secagem em estufa.

3.3.3.2. Obtenção das curvas de equilíbrio

Para a determinação das constantes k_d e q_m , foram construídas as curvas de adsorção no equilíbrio em várias concentrações de NaCl (0;0,1;0,25;0,5 mo/L).

Em frascos contendo volumes fixos da suspensão de resina (0,8 mL), foram adicionadas concentrações variáveis de dextrana-sacarase (C_o) sendo o volume completado para 10 mL (V_t), com a solução salina a ser estudada. Os recipientes foram mantidos sob agitação à 25°C por 2 horas. As suspensões foram então filtradas e o filtrado submetido à leitura de absorbância (280nm), que por sua vez foi correlacionada à concentração enzimática (C^*), através de curva padrão de concentração de albumina contra absorbância no mesmo comprimento de onda. O tempo de equilíbrio foi determinado anteriormente através de ensaios utilizando a montagem apresentada na Figura 3.4. Foi observado que em 45 minutos o processo atingia o equilíbrio.

Através da Equação 3.4, foi possível calcular a concentração de enzima dextrana-sacarase no equilíbrio.

$$q^* = \frac{(C_o - C^*) \times V_t \times \rho_{res}}{m_{res}} \quad (3.4)$$

Em todos os ensaios realizados foi usada uma suspensão da resina estabilizada, da qual eram retiradas alíquotas com volume determinado. A massa seca de resina por volume unitário de suspensão foi determinada em ensaio de perda por secagem em estufa. A densidade da resina (ρ_{res}) foi obtida através de ensaios com picnômetro, nas condições de operação, sendo obtido o valor de 1,213 g/mL.

3.3.3.3. Estudo da adsorção no regime transiente

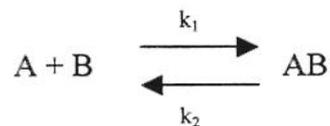
O sistema utilizado para determinação do tempo de equilíbrio (Figura 3.2), foi novamente usado para fazer corridas de adsorção nas diferentes concentrações de sal, visando a obtenção das concentrações de enzima livre ao longo do tempo.

O estudo da adsorção em regime transiente foi feito adicionando-se a um pequeno reator encamisado, contendo solução salina, resina em quantidades determinadas e enzima suficiente para obter atividade total de 150 e 300 UDS, num volume total de 15 mL. A suspensão era continuamente bombeada para um espectrofotômetro, através de um filtro para retenção da resina, seguindo para um registrador e retornando para o reator. Com este procedimento foi obtida a evolução da adsorção até que o equilíbrio fosse atingido.

Os valores registrados foram transformados em concentração, através das curvas de calibração de albumina bovina e atividade enzimática, e comparados com aqueles calculados pela resolução numérica da Equação 3.5 pelo método de Runge-Kuta de 4ª ordem.

$$\frac{dq}{dt} = k_1 c (q_m - q) - k_2 q \quad (3.5)$$

Esta equação representa o balanço de enzima na fase sólida, supondo as reações de adsorção e dessorção seguindo o mecanismo:



Antes de sua resolução numérica, a Equação 3.5 foi modificada, substituindo:

$$q(t) = \frac{(C_o - C(t)) \times V_t \times \rho_{res}}{m_{res}} \quad (3.6)$$

e a relação entre k_1 e k_2 :

$$k_d = \frac{k_2}{k_1} \quad (3.7)$$

A equação adimensionalizada obtida foi:

$$\frac{d(C/C_o)}{dt} = -k_1 \left(\frac{C}{C_o} \right) \times \left[q_m \times \frac{m_{res}}{\rho_{res} \times V_t} - C_o \left(1 - \frac{C}{C_o} \right) \right] + k_1 k_d \left(1 - \frac{C}{C_o} \right) \quad (3.8)$$

Os valores de C/C_o foram obtidos estimando-se um valor de k_1 e então resolvendo a Equação 3.8 pelo método de Runge Kutta. Esses valores de concentração adimensional foram comparados aos valores experimentais e ajustados pelo método de mínimos quadrados, sendo obtidos assim os valores de k_1 para cada concentração salina, e conseqüentemente os valores de k_2 , pela Equação 3.7.

3.3.3.4. Determinação dos parâmetros k_d e q_m

Como citado anteriormente, a partir das isotermas de adsorção de dextrana-sacarase em DEAE CELULOSE a 25° C em diferentes concentrações salinas, foram obtidos os valores de q_m , capacidade máxima da resina e k_d , constante de dissociação.

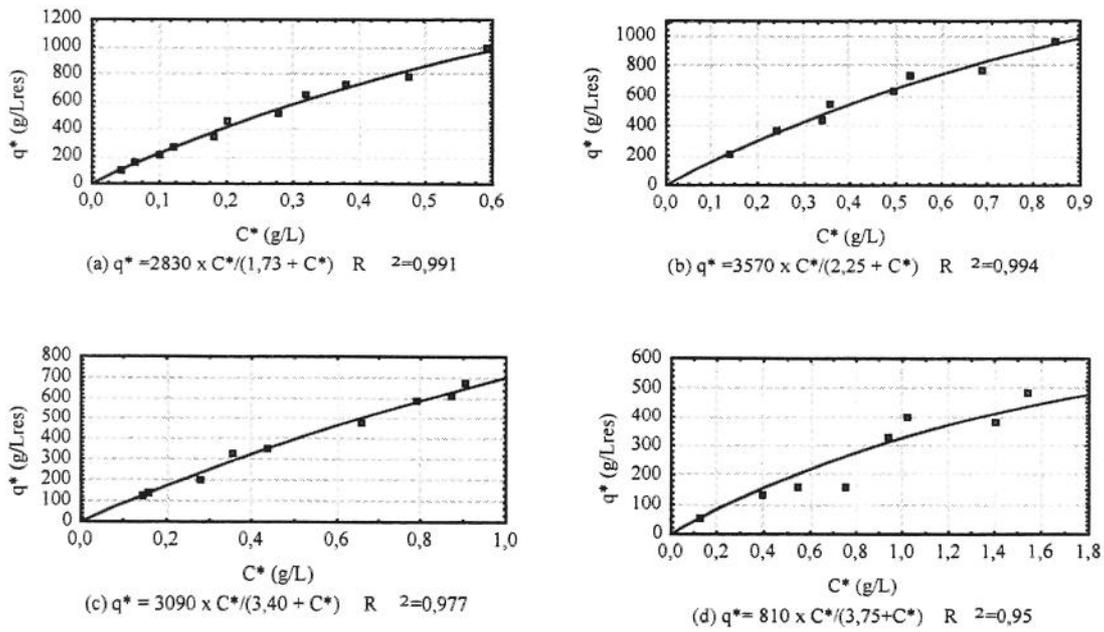


Figura 3.5: Adsorção em batelada de dextrana-sacarase em DEAE CELULOSE a 25° C em solução de CaCl₂ 0,05 g/L e pH 5,2, com diferentes concentrações de NaCl: (a) sem NaCl, (b) [NaCl]=0,10 mol/L, (c) [NaCl]=0,25 mol/L e (d) [NaCl]=0,50 mol/L. Os pontos representam os dados experimentais e as linhas cheias, o ajuste feito segundo a Equação 2.1.

A Figura 3.5 apresenta as concentrações de equilíbrio obtidas, na ausência de NaCl (a), com concentração de 0,1 mol/L (b), 0,25 mol/L (c) e 0,5 mol/L (d) de NaCl. Juntamente com os pontos experimentais (Anexo A) são apresentadas as curvas representativas dos modelos não lineares ajustados.

Os gráficos apresentados, juntamente com os coeficientes de correlação obtidos nas regressões, evidenciam que o modelo proposto (Equação 2.1) para a adsorção da dextrana-sacarase em DEAE CELULOSE é bastante adequado. Isto significa que podemos assumir o modelo de Langmuir para a adsorção, como era esperado para um sistema de adsorção de proteínas em adsorventes de troca iônica (Skidmore & Chase, 1990). Verificou-se ainda que a medida que a concentração de NaCl aumenta, diminui a qualidade do ajuste dos pontos experimentais (R^2 varia de 0,991 para 0,950), provavelmente devido à influência da concentração de eletrólito ser grande na faixa de concentração de enzima estudada.

A Tabela 3.2 apresenta os valores da capacidade máxima da resina e da constante de dissociação do sistema DEAE CELULOSE/dextrana-sacarase, encontradas através do ajuste dos dados experimentais em meio contendo CaCl_2 0,05 g/L e várias concentrações de NaCl.

Tabela 3.2: Valores das constantes k_d e q_m em várias concentrações salinas.

$[\text{NaCl}]$ (mol/l)	$q_m \times 10^{-3}$ (g/lres)	k_d (g/l)
0	2,83	1,73
0,10	3,57	2,25
0,25	3,09	3,40
0,50	0,81	3,75

Analisando os valores de q_m calculados, podemos observar que até a concentração de NaCl correspondente a 0,25 mol/L, o valor de q_m não se altera significativamente, embora aparentemente haja um máximo em 0,1 mol/L. Quando a concentração de sal é aumentada para 0,5 mol/L, o valor de q_m cai drasticamente. Isto pode ser explicado pela grande concentração de íons presente em solução, que desprende grande parte das moléculas de enzima que se ligam ao adsorvente. Desta maneira, a quantidade máxima de enzima que tem a possibilidade de se ligar à resina é bastante diminuída.

A Figura 3.6 mostra a variação da capacidade máxima da resina em adsorver a enzima dextrana-sacarase em função da concentração salina. Um ajuste não linear destes pontos, também apresentada na figura, forneceu a relação apresentada na Equação 3.9, que evidencia uma queda exponencial no valor de q_m , com o aumento da concentração salina.

$$q_m = 18,78 \exp(-1,178[\text{NaCl}]^2 + 3,30[\text{NaCl}] + 5,02) \quad (3.9)$$

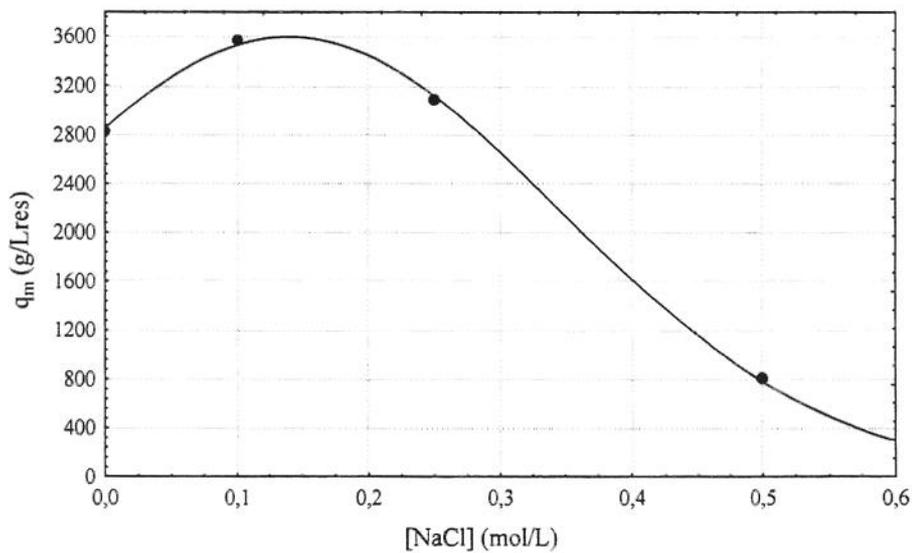


Figura 3.6: Variação de q_m com a concentração de NaCl. Os pontos representam os valores experimentais e a linha o modelo ajustado com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,997$

Ainda na Tabela 3.2, uma análise dos valores de k_d indica grande coerência com o esperado. Uma inspeção na Equação 3.4, leva à conclusão de que o aumento de k_d se deve a um aumento de k_2 , (constante da taxa da reação de dessorção), a uma diminuição de k_1 (constante da taxa da reação de adsorção), ou aos dois efeitos em sobreposição. De qualquer maneira o aumento do valor de k_d observado era esperado e até desejado, já que a

adição de NaCl ao meio é feito justamente para promover a dessorção da enzima, ou seja aumentar o valor de k_2 .

Não foi ajustado um modelo para os valores de k_d em função da concentração de NaCl, como feito para q_m , já que os valores de k_1 e k_2 , calculados a seguir, são mais importantes no estabelecimento do modelo matemático do processo.

3.3.3.5. Determinação das constantes cinéticas k_1 e k_2 :

As concentrações de enzima livre, foram adimensionalizadas e plotadas contra o tempo de adsorção, para atividade de 150 e 300 UDS em cada concentração salina. a Figura 3.7 mostra os valores obtidos.

Através da Equação 3.7 foram calculados valores de k_1 para cada concentração salina e cada concentração inicial de enzima. A Figura 3.7 mostra os dados experimentais (Apêndice A) e aqueles obtidos pelo ajuste, com o valor de k_1 estimado.

Para cada concentração salina testada, foi calculado um valor de k_1 médio entre os valores encontrados para as concentrações iniciais de enzima de 150 e 300 UDS. Este procedimento foi adotado tendo em vista a semelhança no perfil de concentrações para as duas concentrações iniciais de enzima.

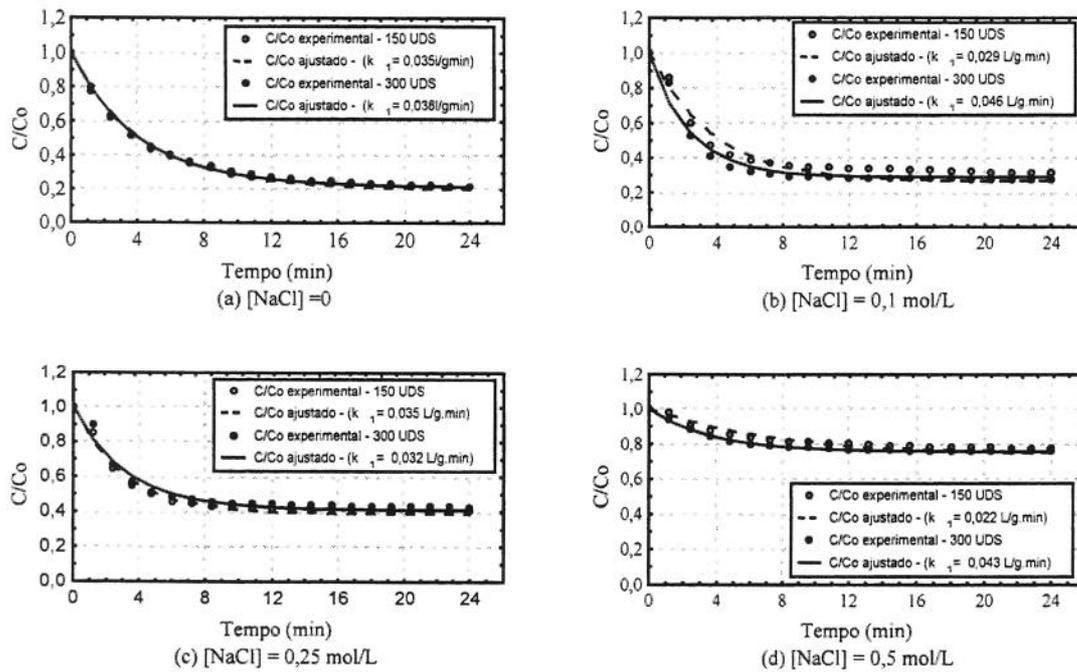


Figura 3.7: Ajuste dos pontos experimentais pelo método de mínimos quadrados, para cálculo do valores de k_1 , nas várias concentrações de NaCl.

A Tabela 3.3 apresenta os valores calculados e as respectivas médias. Pode-se observar que o valor médio do parâmetro k_1 praticamente não varia com o aumento da concentração salina, sofrendo um decréscimo de menos de 10% quando a concentração de NaCl passa de 0 para 0,5 mol/L. Este fato é consistente com os modelos assumidos, onde é de se esperar que a concentração salina não altere significativamente a taxa de adsorção.

Tabela 3.3: Valores de k_1 calculados para atividades iniciais de 150 e 300 UDS, e valores médios calculados para cada concentração de NaCl.

$[NaCl]$ (mol/l)	k_1 (L/g.min)		k_1 médio (L/g.min)
	150 UDS	300 UDS	
0	0,035	0,038	0,036
0,10	0,030	0,047	0,038
0,25	0,035	0,032	0,034
0,50	0,022	0,043	0,033

A Figura 3.8 evidencia o comportamento constante do parâmetro k_1 , ou seja, na faixa de concentrações de NaCl estudada, este não afeta a constante cinética k_1 . O ajuste linear dos pontos experimentais apresentou a forma da Equação 3.10, com uma correlação de 0,995, mostrando que acréscimos de 0,1 mol/L provocam um decréscimo de menos de 2% na constante, cujo valor inicial é de 0,037 L/g.min. Como a concentração máxima de NaCl que deverá ser alcançada nos ensaios do processo não deverá ultrapassar 0,5 mol/L, assumiremos o valor de k_1 constante e igual a 0,037 L/g.min ou 2,22 L/g.h.

$$k_1 = 0,037 - 0,009 [NaCl] \quad (3.10)$$

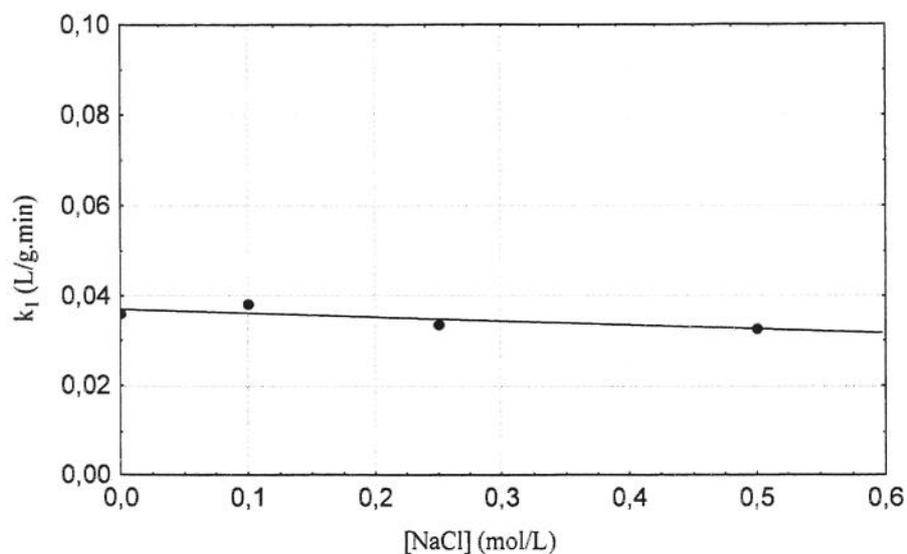


Figura 3.8: Valores de k_1 calculados e modelo ajustado em função da concentração de NaCl.

A partir do valor de k_1 e k_d , foram calculados valores de k_2 , constante da taxa da reação de dessorção, como descrito anteriormente. Os valores encontrados são mostrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Valores de k_2 calculados para as várias concentrações de NaCl.

$[NaCl]$ (mol/L)	k_2 (min) ⁻¹
0	0,042
0,1	0,086
0,25	0,115
0,5	0,123

A Figura 3.9 contém os valores de k_2 calculados, assim como o ajuste não linear da forma da Equação 3.11, em min^{-1} e da equação 3.12 em h^{-1} , com coeficiente de correlação $R^2 = 0,993$.

$$k_2 = 0,042 + \frac{0,103 \times [\text{NaCl}]}{0,122 + [\text{NaCl}]} \quad (3.11)$$

$$k_2 = 2,520 + \frac{6,18 \times [\text{NaCl}]}{0,122 + [\text{NaCl}]} \quad (3.12)$$

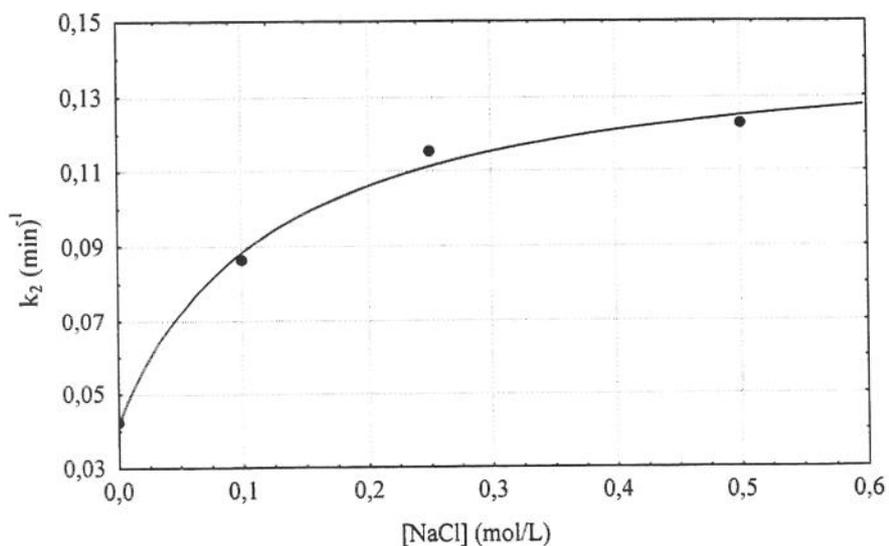


Figura 3.9: Variação de k_2 com a concentração de NaCl. Os pontos representam os valores calculados e a linha cheia, o modelo ajustado.

Conforme esperado, o valor de k_2 aumenta com a concentração de sal, ou seja, a taxa de desorção aumenta com a concentração de NaCl. Este comportamento era justamente o desejado, para que fosse possível aumentar a concentração de enzima livre pela adição de cloreto de sódio.

O aumento de k_2 com o aumento da concentração salina acima de 0,25 mol/L não é muito grande, sendo da ordem de 10% quando a concentração chega a 0,5 mol/L. Este comportamento assintótico, tendendo a um valor constante, é confirmado pelo modelo ajustado.

Sendo o valor de k_1 constante, o aumento observado no valor de k_d se deve exclusivamente ao aumento de k_2 .

3.4. Conclusões

A influência da concentração salina na constante q_m , parece não ser muito importante, a não ser em valores de concentração em torno de 0,5 mol/L, talvez devido principalmente ao aumento da constante cinética de dessorção. Nessas condições, a dextrana-sacarase não se mantém ligada longamente, sendo rapidamente deslocada, pelos íons presentes no meio.

A partir do comportamento observado para as constantes cinéticas k_1 e k_2 , podemos concluir que dentro da faixa de concentração salina estudada, ocorre um aumento de k_2 , sem que o valor de k_1 diminua. Isto indica que com o aumento da concentração de cloreto de sódio, há um deslocamento do equilíbrio entre as reações de adsorção e dessorção no sentido desta última. Não podemos entretanto desprezar a reação de adsorção, mesmo em concentrações relativamente altas, e considerar apenas a dessorção como uma reação irreversível.

Aparentemente a partir de 0,5 mol/L a adição de NaCl não altera as condições de equilíbrio, já que k_2 não se altera significativamente.

Pelos bons ajustes dos modelos no estudo da adsorção tanto no equilíbrio como em regime transiente, pode-se concluir que a adsorção de dextrana-sacarase em DEAE

CELULOSE segue o mecanismo proposto. A metodologia proposta por Chase (1984) e utilizada para obtenção dos parâmetros mostrou-se bastante adequada para este sistema.

4. Modelagem Matemática do Processo

4.1. Introdução

Um modelo matemático que represente bem um processo, é sem dúvida uma ferramenta extremamente útil, sendo possível realizar simulações para uma melhor compreensão do processo, prever futuros problemas de operação, escolher estratégias de controle reduzir o número de experimentos na otimização do processo. É possível uma avaliação das variáveis de entrada que maximizem respostas de interesse, como rendimento e produtividade, minimizando custos, situados numa realidade prática e exequível, diminuindo o número de ensaios em laboratório ou planta piloto, reduzindo custos de desenvolvimento.

Neste trabalho, a obtenção de um modelo matemático determinístico, apoiado em resultados empíricos, possibilitou um vislumbre das condições de operação, principalmente no que diz respeito à sensibilidade do sistema a alterações ou oscilações em variáveis como vazões de entrada e saída e concentrações de eletrólito e sacarose.

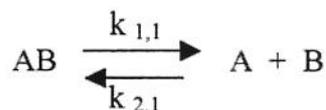
Tendo em vista ainda a complexidade do sistema proposto, a modelagem matemática foi fundamental para os trabalhos de estudo preliminar de otimização, através de simulações do processo onde o grande número de variáveis e consequentemente de ensaios propostos pela metodologia empregada, poderia dificultar sobremaneira, ou até inviabilizar a obtenção de resultados.

4.2. Desenvolvimento do Modelo Matemático e Simulações

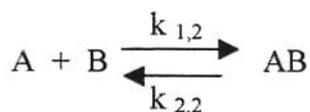
De acordo com o processo descrito anteriormente (Figura 3.1), a modelagem foi feita admitindo-se que os reatores são perfeitamente agitados (Pungor et al., 1987), ocorrendo processos simultâneos de adsorção e dessorção. Tanto no primeiro estágio,

denominado estágio de dessorção, como no segundo, de adsorção, os processos foram considerados reversíveis, de acordo com as observações feitas durante a avaliação das constantes cinéticas, descritas no capítulo 3 e apresentadas a seguir: Esta consideração se aproxima mais da realidade do processo estudado do que aquela feita em trabalhos anteriores, onde no estágio de dessorção, o processo é considerado irreversível.

Dessorção (Estágio 1):



Adsorção (Estágio 2):



onde A, B e AB são a enzima a ser adsorvida, o adsorvente e o complexo enzima-adsorvente, respectivamente.

Os valores das constantes $k_{2,1}$ e $k_{2,2}$ adquirem diferentes valores de acordo com a concentração salina presente nos estágios 1 e 2 respectivamente, de acordo com a Equação (3.12)

$$k_{2,i} = 2,520 + \frac{6,18 \times [\text{NaCl}]}{0,122 + [\text{NaCl}]} \quad (3.12)$$

onde $i = 1$ para o primeiro estágio ou 2 para o segundo.

Os parâmetros $k_{1,1}$ e $k_{1,2}$, são ambos iguais a 2,22 g/L, já que a constante k_1 se mostrou insensível a variações na força iônica do meio.

As constantes $k_{1,i}$ e $k_{2,i}$ representam além da cinética de adsorção e dessorção intrínseca, as resistências à transferência de massa, agregados num único parâmetro, determinado experimentalmente (Chase, 1984). No caso de proteínas de alto peso molecular, como a dextrana-sacarase, estas são adsorvidas em sítios superficiais ou próximos à superfície do adsorvente, bloqueando o caminho para a difusão dentro do mesmo (Harsa et al., 1990). Esta consideração é reforçada neste caso pela estrutura da DEAE CELULOSE.

O valor de q_m utilizado no modelo, foi obtido no capítulo anterior e é expresso pela Equação (3.9):

$$qm = 18,78 \exp(-11,78[NaCl]^2 + 3,30[NaCl] + 5,02) \quad (3.9)$$

A resistência à difusão na fase líquida foi desconsiderada na modelagem do sistema, pois segundo Cowan et al. (1987), esta pode ser significativa em processos de adsorção em colunas, mas não em tanques agitados.

O processo foi considerado isotérmico, com temperatura igual a 25°C, já que os reatores devem ser encamisados, com controle de temperatura.

Como este processo de síntese de dextrana é um processo contínuo e com duas fases, foram definidos tempos de residência para a fase líquida, denominados tempos de residência hidráulicos (τ_h), para os dois reatores, como mostram as Equações 4.1 e 4.2. Para a fase sólida foi definido o tempo de residência de sólidos (Equação 4.3), igual para os dois reatores, já que os volumes nos dois reatores foram considerados iguais e a quantidade de sólidos a mesma nos dois estágios.

$$\tau_{h1} = \frac{V_{l1}}{F1 + Fr \times \varepsilon} \quad (4.1)$$

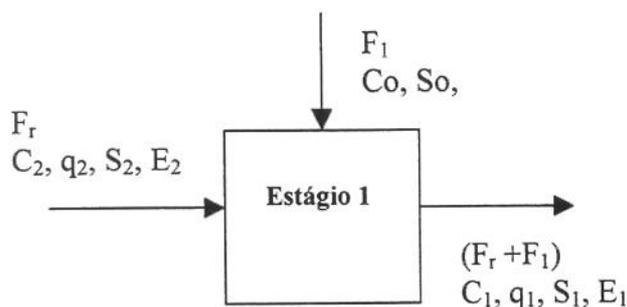
$$\tau_{h2} = \frac{V_{l2}}{F1 + F2 + Fr \times \varepsilon} \quad (4.2)$$

$$\tau_{s1} = \tau_{s2} = \frac{V_l}{Fr \times \varepsilon \times (1 - \varepsilon)} \quad (4.3)$$

Estas definições de tempo de residência hidráulico envolvem a razão entre os volumes de líquido e as vazões de entrada em cada estágio, estando relacionados com os tempos necessários para que se estabeleça o equilíbrio nos processos de adsorção e para que a reação de formação de dextrana possa ocorrer com bom rendimento.

Foram feitos os balanços de massa para enzima livre (C), adsorvida (q), sacarose (S) e NaCl (E) nos dois estágios, como apresentados nas equações abaixo. O modelo de Michaelis - Menten foi utilizado para descrever a cinética da reação de formação de dextrana, sendo o valor da constante $k_m = 5,12$ g/l utilizado na equação 4.7, encontrado por Martinez-Espíndola & Lopez-Munguia (1985) utilizado nas simulações, já que as condições de sua obtenção foram bastante semelhantes àsquelas utilizadas neste trabalho.

Estágio de Dessorção:



$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{F_1}{V_{11}}(E_o - E_1) + \frac{F_r}{V_{11}}(E_2 - E_1)\epsilon \quad (4.4)$$

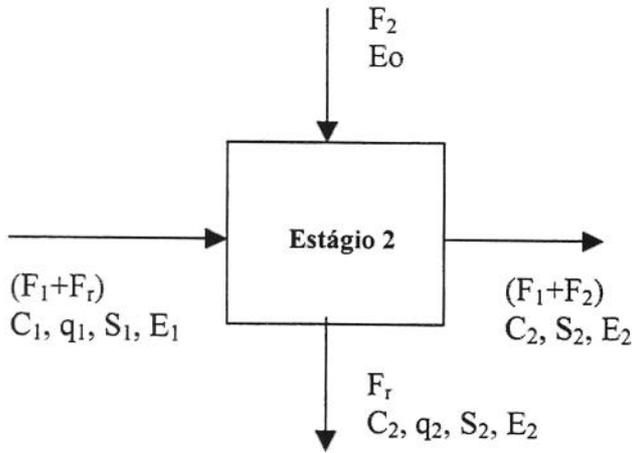
$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_r\epsilon}{V_{11}}(C_1 - C_2) - \frac{F_1C_1}{V_{11}} + [k_2q_1 - k_1C_1(q_m - q_1)]\frac{(1-\epsilon)}{\epsilon} \quad (4.5)$$

$$\frac{dq_1}{dt} = \frac{F_r\epsilon}{V_{11}}(q_2 - q_1) - \frac{F_1q_1}{V_{11}} - k_2q_1 + k_1C_1(q_m - q_1) \quad (4.6)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V_{11}}(S_o - S_1) + \frac{F_r\epsilon}{V_{11}}(S_2 - S_1) - \frac{kC_1S_1}{k_m + S_1} \quad (4.7)$$

O parâmetro k na Equação 4.7 diz respeito à velocidade da reação enzimática de formação de dextrana e seu valor foi calculado através das curvas de concentração de albumina versus absorbância e de atividade enzimática em função da absorbância, para meio contendo NaCl (k') ou não (k). Estes valores são respectivamente $127,02 \text{ h}^{-1}$ e $132,31 \text{ h}^{-1}$. Esta diferença se deve à mudança de velocidade na reação quando o meio contém altas concentrações salinas.

Estágio de Adsorção:



$$\frac{dE_2}{dt} = \frac{F_1}{V_{I2}}(E_1 - E_2) - \frac{F_r \varepsilon}{V_{I2}}(E_1 - E_2) - \frac{F_2 E_2}{V_{I2}} \quad (4.8)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_1}{V_{I2}}(C_1 - C_2) - \frac{F_r \varepsilon}{V_{I2}}(C_1 - C_2) - [k_1 C_2 (q_m - q_2) - k_2 C_2] \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (4.9)$$

$$\frac{dq_2}{dt} = \frac{F_r \varepsilon}{V_{I2}}(q_1 - q_2) - \frac{F_1 q_1}{V_{I2}} - k_2 q_2 + k_1 C_2 (q_m - q_2) \quad (4.10)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_1}{V_{I2}}(S_1 - S_2) - \frac{F_r \varepsilon}{V_{I2}} + \frac{k' C_2 S_2}{k_m + S_2} \quad (4.11)$$

Além da obtenção dos perfis de concentrações ao longo do tempo, poderão ser avaliadas respostas de grande importância na avaliação da eficiência do processo, ou seja

na conversão de sacarose em dextrana. Estas respostas são o rendimento em dextrana (REND) a partir da sacarose alimentada, a produtividade do processo (PROD) e a quantidade de enzima retida no sistema (RET), ou seja, quanto da dextrana-sacarase alimentada permanece no sistema. As Equações 4.12, 4.13 e 4.14 expressam estas respostas matematicamente.

$$REND = \frac{(S_0 - S_2)}{S_0} \times 100 \quad (4.12)$$

$$PROD = (S_0 - S_2) \frac{(F_1 + F_2)}{(V_1 + V_2)} \varepsilon \quad (4.13)$$

$$RET = \frac{(C_1 + C_2)}{C_0} + \frac{(q_1 + q_2)(1 - \varepsilon)}{C_0 \varepsilon} \quad (4.14)$$

O sistema de equações diferenciais apresentado foi resolvido numericamente, usando algoritmo baseado no método de Runge Kutta de 4ª ordem. Estas simulações possibilitaram um estudo dinâmico do processo, permitindo uma avaliação preliminar do comportamento do processo no estado estacionário e transiente, assim como sua reação às perturbações nas variáveis de entrada, mais especificamente das vazões. O efeito destas perturbações foi de grande valia na operação do processo em pequena escala, além de poder indicar variáveis manipuláveis em futuros estudos de controle do processo.

Nestas simulações foram avaliadas as seguintes variáveis de entrada: a fração de líquido nos reatores (ε), a concentração inicial de dextrana-sacarase (C_0), e as concentrações de sacarose (S_0) e NaCl (E_0), nas correntes de alimentação, além das vazões de alimentação nos dois reatores (F_1 e F_2) e a vazão de reciclo (F_r). O uso das vazões como

variáveis de entrada, ao invés dos tempos de residência, muito mais reveladores das condições mais adequadas de processo, se deveu ao fato de se desejar averiguar o comportamento do sistema frente a perturbações nestas variáveis, que são aquelas que podem sofrer alterações durante a operação do sistema.

Os valores de base destas variáveis são apresentados na Tabela 4.1 e foram definidos de acordo com conhecimento prévio dos processos de adsorção e reação enzimática de produção de dextrana. As vazões foram propostas de maneira que a vazão de entrada no segundo reator fosse maior que aquela de entrada no primeiro, para promover uma diminuição na concentração salina, e uma razão de reciclo da ordem de 40%.

Tabela 4.1: Valores de entrada na simulação do processo contínuo, bifásico em duplo estágio para síntese de dextrana.

$C_0 = 0,6 \text{ g/L}$
$\varepsilon = 0,8$
$S_0 = 100 \text{ g/L}$
$E_0 = 0,5 \text{ mol/L}$
$F_1 = 0,05 \text{ L/h}$
$F_2 = 0,2 \text{ L/h}$
$F_r = 0,02$
$V_{r1} = V_{r2} = 1 \text{ L}$
$\tau_{h1} = 15,2 \text{ h}$
$\tau_{h2} = 3,8 \text{ h}$
$\tau_{s1} = \tau_{s2} = 312,5 \text{ h}$
$h = 10^{-4}$

O volume de líquido foi considerado igual nos dois estágios, sendo o volume total calculado através da Equação 4.15.

$$V_t = \frac{V_l}{\varepsilon} \quad (4.15)$$

Os valores de τ_{h1} e τ_{h2} foram calculados pelas Equações 4.1 e 4.2.

As condições iniciais para a resolução das EDO 4.4 a 4.12 por Runge Kutta de 4ª ordem, foram:

Para dextrana-sacarase livre – fase líquida:

$$C_1 = C_0$$

$$C_2 = 0$$

Para dextrana-sacarase adsorvida – fase sólida:

$$q_1 = q_2 = 0$$

Para sacarose:

$$S_1 = S_2 = 0$$

Para NaCl:

$$E_1 = E_2 = 0$$

Com os valores da Tabela 4.1 e as correlações para cálculo dos parâmetros cinéticos a cada concentração de NaCl, foram obtidos os perfis de concentração cada estágio, que podem ser observados nas Figuras 4.1(a) a (d).

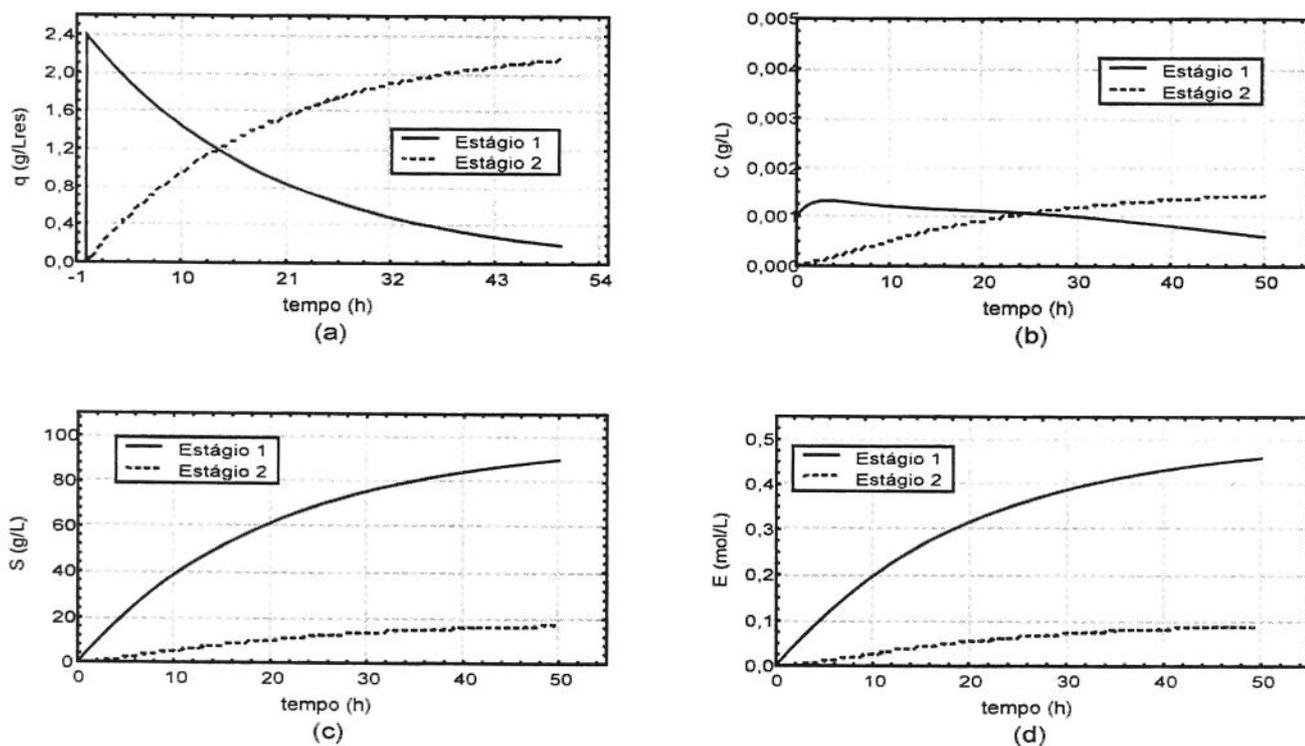


Figura 4.1: Perfis de concentração de dextrana-sacarase adsorvida (a), livre (b), sacarose (c) e NaCl (d), nos dois estágios

Observando os perfis obtidos é possível verificar que a concentração de enzima adsorvida assume um comportamento esperado, saindo de zero em ambos os estágios e diminuindo no estágio 1, ou seja a enzima está sendo dessorvida com o aumento da concentração de NaCl (Figura 4.1 d). No estágio 2, a concentração de enzima adsorvida aumenta, pois a baixa concentração de NaCl, provoca a adsorção da enzima, para reduzir sua saída do sistema.

Analisando a Figura 4.1 (b), pode-se avaliar a evolução na concentração de enzima livre, sendo importante frisar que no tempo zero a concentração de enzima livre no 1º estágio é 0,6 g/L (C_0), conforme mostra a Tabela 4.1. Este valor não aparece no gráfico devido à grande diferença entre a concentração inicial e aquela observada depois de trinta minutos (0,00097 g/L). Para uma melhor visualização do comportamento da concentração de enzima livre em função do tempo, a Tabela 4.2 apresenta esses valores para as 4 primeiras horas de simulação.

O comportamento da concentração de enzima livre pode parecer estranho a princípio, pois aparentemente, a concentração no primeiro estágio diminui e no segundo aumenta, diferentemente do que se esperava. É importante salientar no entanto que, apesar deste comportamento ocorrer, as concentrações em ambos os estágios são extremamente baixas, provavelmente devido à dificuldade de dessorção da enzima, mesmo em concentrações elevadas de NaCl. Além disso, há uma perda contínua de enzima através da saída do segundo reator, o que dificulta o estabelecimento do equilíbrio no 1º estágio, pois há uma diminuição contínua na concentração de enzima que entra através do reciclo.

A Figura 4.1 (c), mostra o perfil da concentração de sacarose, que também assume um comportamento esperado, havendo no entanto para estas condições de simulação, uma concentração relativamente alta de açúcar no segundo estágio, o que não é desejável do ponto de vista operacional e de custos, já que esta quantidade (em torno de 20 g/L) de açúcar está sendo descartada.

O perfil de concentração de NaCl é bastante coerente, sendo atingido nestas condições uma concentração pouco inferior a 0,5 mol/L no primeiro estágio, como era desejado. No segundo estágio entretanto, a concentração de NaCl é ainda alta, permitindo uma maior perda de dextrana-sacarase.

Tabela 4.2: Variação na concentração de enzima livre ao longo do tempo no 1° e 2° estágios, nas condições apresentadas na tabela 4.1.

<i>Tempo (h)</i>	$C_1 \times 10^3$ (g/L)	$C_2 \times 10^3$ (g/L)
0,00	600,00	0,00
0,50	0,97	0,0024
0,10	0,99	0,0048
0,15	1,01	0,0072
0,20	1,02	0,0095
0,25	1,04	0,012
0,30	1,05	0,014
0,35	1,06	0,017
0,40	1,08	0,019
0,45	1,09	0,021
0,50	1,10	0,024
1,00	1,19	0,047
1,50	1,25	0,071
2,00	1,28	0,094
2,50	1,30	0,118
3,00	1,31	0,142
3,50	1,31	0,167
4,00	1,31	0,192

A Tabela 4.3 apresenta os valores de regime pseudo-permanente obtidos para as variáveis do processo, assim como rendimento, produtividade e retenção enzimática, nas condições simuladas. Por haver uma perda contínua de enzima no 2° estágio, o valor das variáveis estabelecido em 50 horas de operação foi assumido como o valor de regime pseudo estacionário, pois as variações observadas são menores.

Tabela 4.3: Valores encontrados no regime pseudo estacionário

<i>1º Estágio</i>	<i>2º Estágio</i>
$C_1 = 1,0 \times 10^{-3} \text{ g/L}$	$C_2 = 2,0 \times 10^{-3} \text{ g/L}$
$q_1 = 0,2 \text{ g/Lres}$	$q_2 = 2,5 \text{ g/Lres}$
$S_1 = 90 \text{ g/L}$	$S_2 = 19 \text{ g/L}$
$E_1 = 0,46 \text{ mol/L}$	$E_2 = 0,1 \text{ mol/L}$
Rendimento = 90%	
Produtividade = 73,5 g/L.h	
Retenção enzimática = 97%	

4.3. Estudo Dinâmico do Processo

O comportamento dinâmico do processo foi estudado com o objetivo de conhecer o comportamento das concentrações no primeiro e segundo estágios mediante perturbações provocadas no sistema. Estas informações são de grande valia na montagem e operação do sistema, pois é possível prever o comportamento das concentrações frente às perturbações: se serão permanentes, ou retornarão ao valor inicial e qual a sensibilidade do sistema, ou seja qual a magnitude dos desvios das respostas frente às perturbações.

Este estudo permite ainda a escolha da variável manipulável para estudos futuros de estratégias de controle do processo.

Os parâmetros operacionais considerados para este estudo foram a vazão de alimentação no 1º estágio (F_1), a vazão de alimentação no 2º estágio (F_2), a vazão de reciclo (F_r), que se relacionam diretamente com os tempos de residência hidráulicos no 1º e 2º

estágios (τ_{h1} e τ_{h2}) e o tempo de residência de sólidos (τ_s). Por influenciarem os parâmetros cinéticos, foi avaliado o efeito da variação da concentração inicial de dextrana-sacarase (C_0) e da concentração inicial de NaCl (E_0). Foram provocadas perturbações da ordem de 20% acima dos valores das vazões, expostos na Tabela 4.1 e dos valores de C_0 e E_0 em relação ao valores de regime permanente, apresentados na Tabela 4.3.

Os resultados obtidos são apresentados na forma adimensional, representados pela razão entre as concentrações obtidas ao longo do tempo depois das perturbações e aquela obtida em regime estacionário antes da perturbação (C/C_e)

As Figuras 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam as respostas para perturbações na concentração inicial de cloreto de sódio, (E_0), na vazão de entrada do primeiro reator (F_1), na vazão de entrada do segundo reator (F_2), e na vazão de reciclo (F_r). A Figura 4.4 mostra a resposta a uma perturbação de 50% no valor de referência de F_1 .

Pode-se perceber uma resposta bastante semelhante para todas as perturbações, no segundo estágio (linha pontilhada). As respostas são típicas de um sistema de 1ª ordem e bastante lentas, já que um novo valor de regime só começa a se delinear em torno de 50 horas para perturbação em E_0 (Figura 4.2) e F_r (Figura 4.6), sendo um pouco mais rápidas para F_1 e F_2 (Figuras 4.3 e 4.4), ficando entre 35 e 40 horas o tempo para restabelecimento do regime permanente.

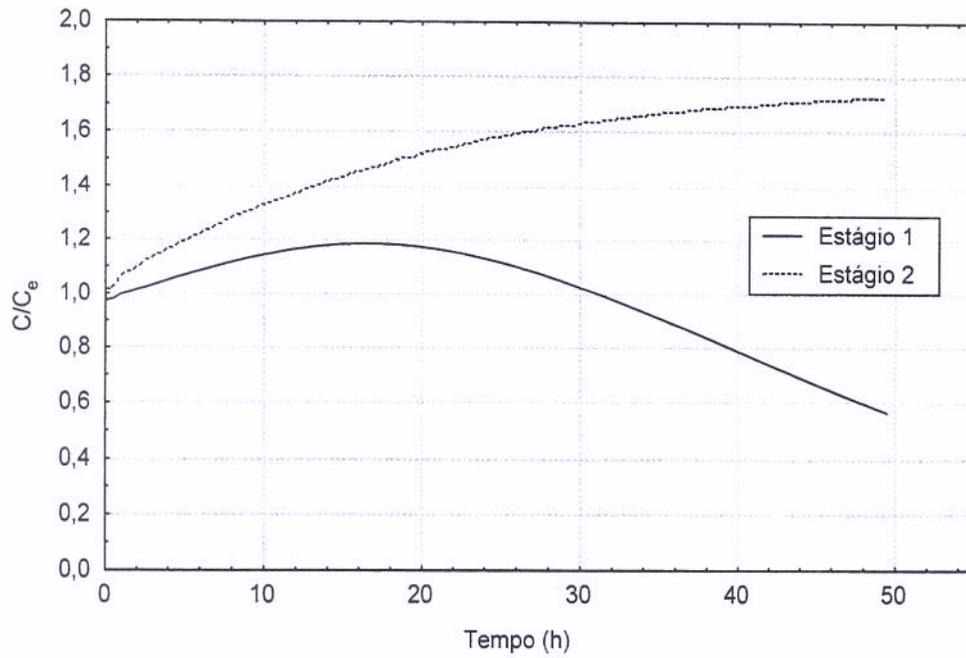


Figura 4.2: Comportamento dinâmico para a concentração adimensional de enzima livre frente a uma perturbação degrau de 20% acima do valor de referência em E_0 .

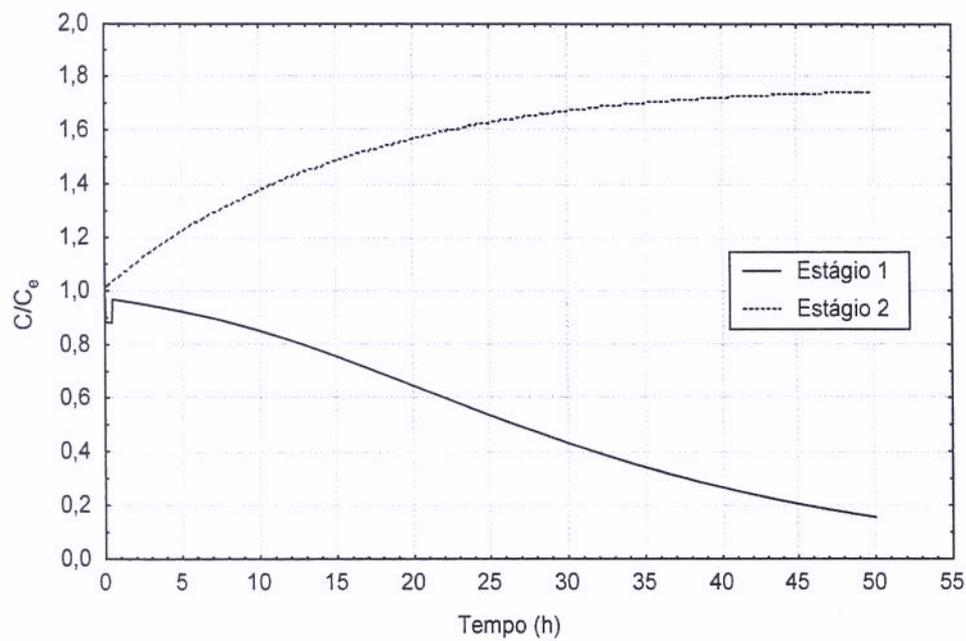


Figura 4.3: Comportamento dinâmico para a concentração adimensional de enzima livre frente a uma perturbação degrau de 20% acima do valor de referência em F_1 .

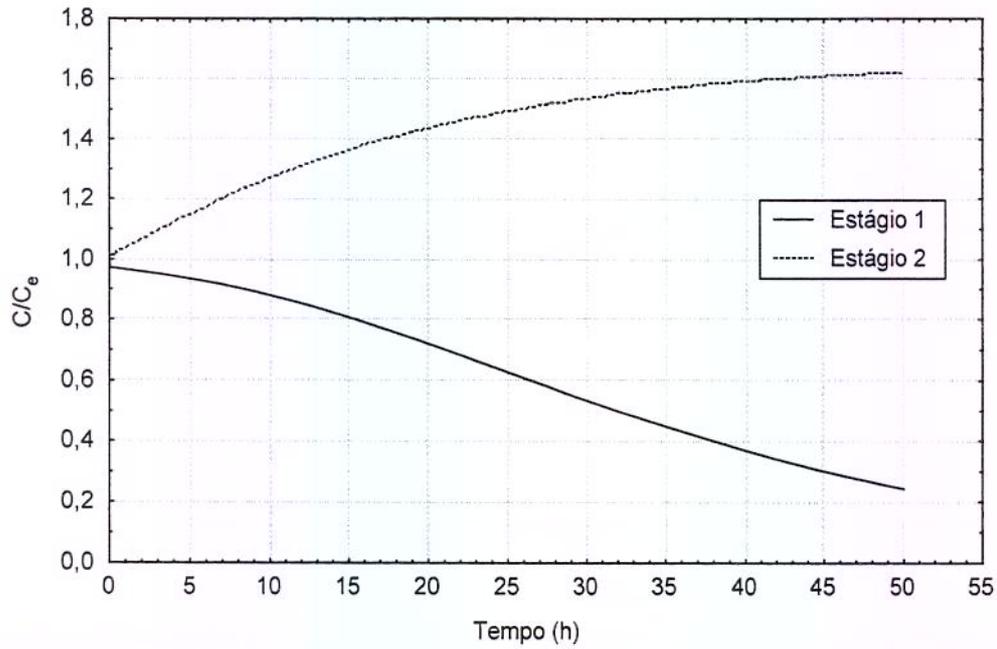


Figura 4.4: Comportamento dinâmico para a concentração adimensional de enzima livre frente a uma perturbação degrau de 20% acima do valor de referência em F_2 .

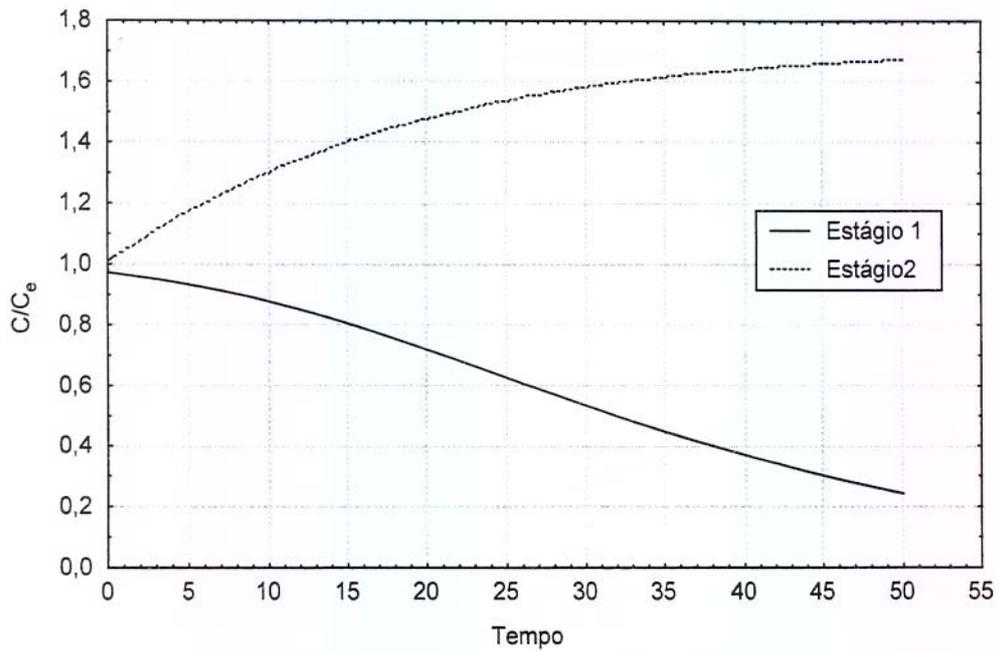


Figura 4.5: Comportamento dinâmico para a concentração adimensional de enzima livre frente a uma perturbação degrau de 20% acima do valor de referência em F_r .

De maneira geral as respostas às perturbações no 1º estágio, parecem ser em todos os casos, respostas não lineares e bastante semelhantes para todas as perturbações. Nas primeiras 20 horas há um aumento na concentração de enzima livre, que passa então a cair, sendo que mesmo após 50 horas, não alcançou-se um valor estacionário.

A resposta a uma variação na concentração salina, E_0 (Figura 4.2) é um pouco mais suave que as variações nas vazões F_1 , F_2 e F_r . Se o valor da concentração enzimática for verificado após 35 horas para todas as perturbações, pode-se verificar que no caso das vazões, esta situa-se aproximadamente num correspondente a 40% do valor de referência, enquanto que com o acréscimo de 20% na concentração de NaCl este valor sofre uma redução de apenas 10%.

4.4. Conclusões:

Neste capítulo foi realizada a modelagem matemática do processo e avaliado o seu comportamento dinâmico frente à perturbações que possam ocorrer levando-o para uma nova condição de estado estacionário. Analisando os perfis de resposta em função do tempo para as perturbações, foi possível perceber que o segundo estágio apresenta em todos os casos respostas típicas de um sistema de 1ª ordem. Para o primeiro estágio foi observado um comportamento não linear.

As respostas são de maneira geral bastante alteradas com as perturbações chegando a acréscimos (no segundo estágio) e decréscimos (no primeiro) da ordem de 80%. As respostas são ainda bastante lentas, não atingindo novo regime permanente antes de 40 horas em nenhum caso.

Estas informações são úteis para trabalhos futuros de estratégias de controle, e a modelagem matemática será utilizada no próximo capítulo de estudo prévio de otimização de processos através de simulações.

5. Otimização do Processo

5.1. Introdução

O estudo da otimização do processo foi feito através de técnicas de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta utilizando o modelo determinístico desenvolvido no capítulo 4. As condições operacionais para obtenção de rendimento, produtividade e retenção enzimática máximos foram investigadas, analisando inicialmente sete variáveis independentes: tempos de residência de sólidos e hidráulicos nos dois reatores, fração de líquidos e concentrações iniciais de sacarose, dextrana-sacarase e NaCl.

Com o grande número de variáveis envolvidas e a complexidade do sistema em estudo, a otimização do processo através de uma metodologia de tentativa e erro além de não levar em conta os efeitos de interação entre os parâmetros, seria bastante complicada do ponto de vista operacional. Assim a análise de superfícies de resposta e as simulações a partir de um modelo determinístico mostram-se como importantes ferramentas no planejamento e otimização de bioprocessos, como citado por Kalil, (2000).

Assim, a otimização do processo poderia ser feita através de planejamento fatorial completo, envolvendo neste caso 128 ensaios, apenas para o modelo linear, já que sete variáveis seriam analisadas. Mesmo lançando mão de simulações de operação através do modelo desenvolvido, o número de ensaios seria bastante grande e poderia ser diminuído por um “screening design”, ou seja, selecionar as variáveis que apresentam maior efeito sobre as respostas em estudo. Esta seleção foi feita pelo método de Plackett & Burman, (1946) sendo as variáveis selecionadas, com maior influência sobre o sistema, utilizadas num planejamento fatorial completo.

A análise dos resultados através da ANOVA (análise de variância) permitiu elaborar um modelo matemático para correlacionar as respostas desejadas em função dos parâmetros estatisticamente significativos, gerando então superfícies de resposta que forneceram

informações sobre as faixas mais adequadas das variáveis que conduziam ao máximo de rendimento e retenção se prejuízo da produtividade.

5.2. Seleção das variáveis – “Screening Design”

A metodologia de “screening design” desenvolvida por Plackett & Burman (PB) (1946), foi utilizada na seleção das variáveis mais importantes do processo. Os planejamentos mais usuais propostos neste método, envolvem a execução de 12, 20, 24, 28 ou 36 ensaios, podendo ser usados para qualquer número de variáveis de entrada, sendo conveniente realizar pelo menos quatro ensaios a mais que o número de variáveis, aumentando os graus de liberdade e conseqüentemente determinando o erro padrão.

Para o processo em estudo neste trabalho, foram consideradas 7 variáveis, cujos efeitos sobre rendimento, produtividade e retenção enzimática, deveriam ser avaliadas: tempo de residência de sólidos nos reatores (τ_s), tempo de residência da porção líquida no reator 1 e 2 (τ_{h1} e τ_{h2}), fração de líquido (ϵ), concentrações de enzima (C_o), sacarose (S_o) e NaCl (E_o) na alimentação. Neste caso um planejamento completo a 2 níveis corresponderia a 128 ensaios (2^7). Foi usado então um planejamento Plackett-Burman de 12 ensaios, sendo estabelecidas as faixas de trabalho das variáveis, com nível inferior (-1) e superior (+1), como mostra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Faixas de estudo das variáveis em análise: tempo de residência de sólidos nos reatores (τ_s), tempo de residência da porção líquida no reator 1 e 2 (τ_{h1} e τ_{h2}), fração de líquido (ε), concentrações de enzima (Co), sacarose (So) e NaCl (Eo)

<i>Níveis</i>	<i>Variáveis</i>						
	$\tau_s(h)$	$\tau_{h1}(h)$	$\tau_{h2}(h)$	ε	<i>Co(g/L)</i>	<i>So(g/l)</i>	<i>Eo(mol/L)</i>
-1	50	1	0,2	0,8	4	75	0,4
+1	400	3	0,6	0,9	12	125	0,6

Os valores das variáveis apresentados na Tabela 5.1 foram baseados em experiências anteriores no trabalho com a produção de dextrana. O tempo de residência hidráulico no 1º reator foi estimado entre 1 e 3 horas, que é o tempo necessário para se obter rendimento máximo para concentração de enzima na faixa indicada (Co). No segundo reator, como teoricamente não há reação enzimática, o tempo de residência imposto, foi o julgado suficiente para que se atingisse o equilíbrio no processo de dessorção, segundo ensaios realizados. A fração de líquidos foi imposta numa faixa, em que a quantidade de sólidos não fosse muito pequena e nem muito grande, permitindo a circulação da resina no sistema. A concentração de sacarose foi escolhida numa faixa onde a inibição pelo substrato não se tornasse evidente e a de NaCl, baseada em ensaios anteriormente relatados (Capítulo 3)

Tabela 5.2: Planejamento Experimental baseado no Plackett-Burman de 12 ensaios e respostas obtidas de rendimento, produtividade e retenção enzimática.

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis</i>								<i>Rend.</i> (%)	<i>Prod.</i> (g/L.h)	<i>Ret.</i> (%)
	τ_s	τ_{h1}	τ_{h2}	ε	<i>Co</i>	<i>So</i>	<i>Eo</i>				
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1		94	260	13
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1		41	38	27
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1		92	46	65
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1		81	40	66
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1		94	140	38
6	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1		80	200	26
7	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1		84	140	10
8	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1		44	35	62
9	-1	+1	-1	1	+1	-1	+1		97	260	28
10	+1	-1	+1	1	-1	+1	+1		43	24	13
11	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1		87	68	77
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1		82	120	33

A Tabela 5.2 mostra as respostas obtidas em cada ensaio para rendimento, produtividade e retenção enzimática, através de simulações do modelo anteriormente desenvolvido.

Com os resultados obtidos foram calculados através do aplicativo STATISTICA, versão 5.0, os efeitos das variáveis investigadas sobre as respostas de interesse (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Estimativa dos efeitos das variáveis sobre as respostas: rendimento, produtividade e retenção enzimática

<i>Variáveis</i>	<i>Efeitos</i>		
	<i>Rendimento</i>	<i>Produtividade</i>	<i>Retenção Enzimática</i>
τ_s	-8,83	5,50	-15,30*
τ_{h1}	28,50*	42,83*	19,30*
τ_{h2}	-23,83*	-144,30*	27,00*
ε	-2,83	27,50	24,30*
So	-5,50	58,50*	1,30
Co	-4,50	-6,17	-5,30
Eo	4,17	15,50	-3,00
Média	76,60	114,30	38,2

(*) Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$).

Pelos resultados obtidos na tabela pode-se verificar que o tempo de residência hidráulico no 1º reator tem influência em todas as respostas, assim como o tempo de residência hidráulico no 2º estágio. O tempo de residência de sólidos só influi significativamente sobre a retenção da enzima no sistema, da mesma maneira que a fração de líquidos. A concentração inicial de sacarose só afeta a produtividade.

Assim, dentro da faixa estudada verifica-se que as variáveis Co e Eo, não alteram as respostas de interesse, sendo então eliminadas do planejamento experimental.

A seguir foi realizado então um planejamento experimental completo levando em conta as variáveis τ_s , τ_{h1} , τ_{h2} , ε e So, com o objetivo de aumentar o rendimento, a retenção enzimática e a produtividade. Como geralmente as condições de operação que levam a um aumento no rendimento ocasionam um decréscimo na produtividade, foi definida uma função denominada resposta otimizada (RO), através da qual foi possível estabelecer faixas

adequadas de operação, para obtenção de níveis tão altos quanto possível de rendimento, retenção e produtividade. A resposta otimizada é representada pela Equação 5.1.

$$RO = REND \times PROD \times RET \quad (5.1)$$

5.3. Planejamento Experimental e Análise de Superfícies de Resposta

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são o simplex, o planejamento fatorial fracional e o fatorial completo. O método simplex e suas derivações são mais adequados para ensaios rápidos, já que as condições em que devem ser feitos os ensaios, dependem da resposta do ensaio anterior (Box et al.,1978).

O método de otimização por análise de superfícies de resposta tem como base o planejamento fatorial. Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas como rendimento e produtividade, que possam ser medidas analiticamente, e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas. Através destas técnicas pode-se avaliar como uma resposta numa região de interesse é afetada por um conjunto de variáveis de entrada, ou ainda que conjunto de variáveis de entrada resultarão em respostas dentro de especificações desejadas ou no melhor valor para uma resposta específica.

Para aplicar o método de análise de superfícies de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Para tanto um número fixo de níveis devem ser selecionados para cada variável de entrada, sendo realizados experimentos com todas as combinações possíveis. Para reduzir o número de experimentos ao mínimo possível, um planejamento com 2 níveis (+1 e -1) mostra-se eficiente. Num sistema onde serão analisadas n variáveis de entrada, deverão ser realizados 2^n ensaios para investigar todas as combinações possíveis. Para estimar o erro experimental

devem ainda ser realizados ensaios em triplicata nas condições intermediárias a cada nível (nível zero ou ponto central do planejamento) (Box et al., 1978).

Com os dados obtidos é possível calcular os efeitos simples e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado, através dos intervalos de confiança e teste p, e ajustar um modelo de primeira ordem para correlacionar variáveis e respostas.

Caso se deseje outras condições experimentais não previstas pelo planejamento ou se o modelo de 1ª ordem não estiver bem correlacionado com os valores experimentais, pode-se complementar o planejamento fatorial inicial realizando ensaios segundo a configuração estrela (Khuri & Cornell, citado por Rodrigues, 1993), para obter um modelo quadrático. Neste caso, se o número de variáveis for g , deverão ser feito $2 \times g$ experimentos distribuídos rotacionalmente a uma distância α do ponto central (pontos axiais), onde α é dado por

$$\alpha = \sqrt[4]{2^g} \quad (5.2)$$

Para avaliar se os modelos empíricos apresentam grau de ajuste adequado aos dados experimentais, Box et al. (1978) indicam a análise estatística baseada no coeficiente de correlação da regressão e no valor estimado para o teste F, descritos a seguir.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita e quando o valor for zero, não há correlação. De maneira simplificada, em termos qualitativos, quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste do modelo aos pontos experimentais.

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

O fundamento do teste F consiste em verificar se existe relação entre as variáveis e a resposta. Segundo Barros Neto et al. (1995), quando não há essa relação pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQR / MQ_r) segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devido exclusivamente a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada pelo valor efetivamente calculado de MQR (média quadrática da regressão) / MQ_r (média quadrática do resíduo) para comparação com o valor de F tabelado. Se os valores forem próximos pode-se afirmar que o modelo não é significativo estatisticamente e se MQR / MQ_r for maior que o valor de F tabelado a regressão é significativa.

Segundo Box & Wetz (1973), para assegurar que o modelo além de estatisticamente significativo é também preditivo o valor da razão MQR / MQ_r deve ser 4 a 5 vezes o valor de F tabelado.

Como citado no ítem anterior, foi feito um único planejamento com cinco variáveis, englobando as três respostas; rendimento, produtividade e retenção enzimática. Assim foram executados 2^5 ensaios para verificação de um modelo linear e mais 10 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais), a uma distância α do ponto central. Para o trabalho em questão, utilizando a equação 5.1 com $g = 5$ tem-se $\alpha = 2,38$, portanto para o modelo quadrático serão incluídas as faixas $-2,38$ e $+2,38$.

Na Tabela 5.4 são apresentadas as faixas das variáveis utilizadas para o planejamento fatorial completo.

Tabela 5.4: Faixa de valores das variáveis, usadas no planejamento fatorial

<i>Níveis</i>	<i>Variáveis</i>				
	$\tau_s(\mathbf{h})$	$\tau_{h1}(\mathbf{h})$	$\tau_{h2}(\mathbf{h})$	ε	$So(\text{g/L})$
-2,38	50,0	1,0	0,2	0,8	75,0
-1	151,5	1,6	0,33	0,83	89,5
0	225,0	2,0	0,4	0,85	100,0
+1	298,5	2,4	0,48	0,87	110,5
+2,38	400,0	3,0	0,6	0,9	125

Definidas as faixas, foram obtidos as respostas para os 43 ensaios, sendo 32 correspondentes ao modelo linear (2^5), mais 10 ensaios para completar o modelo quadrático e 1 ensaio no ponto central. As condições dos ensaios e seus resultados estão apresentados na Tabela 5.5, e foram obtidos assumindo o volume de líquido igual a 1 litro nos dois reatores.

Pelos resultados apresentados na Tabela 5.5, pode-se observar que o valor máximo da função RO (resposta otimizada) é obtido no ensaio 19 e não coincide com o máximo de nenhuma das outras três respostas, no entanto é maior produto das três, ou seja os maiores valores possíveis para as três respostas.

Tabela 5.5: Planilha do planejamento fatorial completo com valores codificados das variáveis e respostas obtidas por simulação

<i>Ensaio</i>	τ_s	τ_{h1}	τ_{h2}	ε	<i>So</i>	<i>REND</i>	<i>PROD</i>	<i>RET</i>	<i>ROx10⁻⁵</i>
1	-1	-1	-1	-1	-1	81	93	40	3,01
2	1	-1	-1	-1	-1	81	93	38	2,86
3	-1	1	-1	-1	-1	88	100	45	3,96
4	1	1	-1	-1	-1	88	100	42	3,70
5	-1	-1	1	-1	-1	72	55	52	2,06
6	1	-1	1	-1	-1	71	55	50	1,95
7	-1	1	1	-1	-1	83	63	57	2,98
8	1	1	1	-1	-1	82	63	54	2,79
9	-1	-1	-1	1	-1	82	98	29	2,33
10	1	-1	-1	1	-1	81	98	27	2,14
11	-1	1	-1	1	-1	89	110	34	3,33
12	1	1	-1	1	-1	88	110	32	3,10
13	-1	-1	1	1	-1	73	57	42	1,75
14	1	-1	1	1	-1	72	57	39	1,60
15	-1	1	1	1	-1	83	66	47	2,57
16	1	1	1	1	-1	82	66	44	2,38
17	-1	-1	-1	-1	1	81	110	40	3,56
18	1	-1	-1	-1	1	81	110	38	3,39
19	-1	1	-1	-1	1	88	120	45	4,75
20	1	1	-1	-1	1	88	120	42	4,44
21	-1	-1	1	-1	1	72	67	52	2,51
22	1	-1	1	-1	1	71	67	50	2,38
23	-1	1	1	-1	1	83	77	57	3,64
24	1	1	1	-1	1	82	77	54	3,41
25	-1	-1	-1	1	1	81	120	29	2,82
26	1	-1	-1	1	1	81	120	27	2,62
27	-1	1	-1	1	1	89	130	34	3,93
28	1	1	-1	1	1	88	130	32	3,66
29	-1	-1	1	1	1	72	71	42	2,15
30	1	-1	1	1	1	71	71	39	1,97
31	-1	1	1	1	1	83	81	47	3,16
32	1	1	1	1	1	82	81	44	2,92
33	-2,38	0	0	0	0	85	86	53	3,87
34	2,38	0	0	0	0	81	86	42	2,93
35	0	-2,38	0	0	0	61	64	34	1,33
36	0	2,38	0	0	0	88	93	47	3,85
37	0	0	-2,38	0	0	91	190	22	3,80
38	0	0	2,38	0	0	73	51	55	2,05
39	0	0	0	-2,38	0	81	81	54	3,54
40	0	0	0	2,38	0	82	91	28	2,09
41	0	0	0	0	-2,38	82	64	43	2,26
42	0	0	0	0	2,38	82	110	43	3,88
43 (C)	0	0	0	0	0	82	86	43	3,03

Com os resultados de cada ensaio, o aplicativo STATISTICA versão 5.0 foi mais uma vez utilizado para verificar os efeitos das variáveis, os coeficientes de regressão do modelo quadrático, a análise da variância do modelo e as superfícies de resposta através das quais foi feita o estudo da otimização do processo.

A Figura 5.1 apresenta os valores dos efeitos principais das variáveis sobre as três respostas, que correspondem à média dos efeitos na resposta devido a mudança da variável da faixa +1 para -1. Isto significa por exemplo que se τ_{h2} passar de 0,33 para 0,48 h, a resposta, produtividade cai em média 43%.

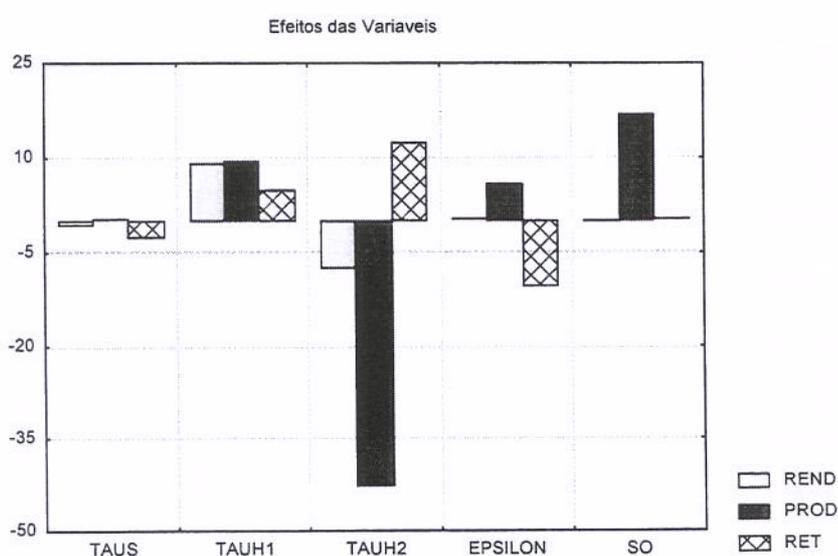


Figura 5.1: Efeitos das variáveis sobre o rendimento, a produtividade e a retenção enzimática

Analisando cada resposta pode-se perceber que no caso do rendimento afetam significativamente a resposta apenas os tempos de residência hidráulicos nos dois reatores τ_{h1} e τ_{h2} . Um aumento no primeiro causa um aumento no rendimento e um aumento no segundo um decréscimo de mesma magnitude. É possível verificar a concordância destes resultados com os obtidos do Plackett-Burman (Tabela 5.4).

Para a produtividade, nota-se que têm influência mais marcante, τ_{h2} , S_0 , τ_{h1} e ε , nessa ordem. O aumento no tempo de residência hidráulico do segundo reator, acarreta uma diminuição acentuada na produtividade. Aumentos de S_0 e τ_{h1} implicam em aumento de produtividade. A variável ε não aparece como significativa no PB e pode-se perceber que no planejamento fatorial completo, sua influência não é muito grande, podendo ser desprezada sem prejuízo na estratégia de otimização.

Ainda analisando a Figura 5.1 é possível perceber que como previu o planejamento de Plackett-Burman as variáveis τ_{h1} , τ_{h2} , ε e τ_s tem efeito significativo sobre a retenção da dextrana-sacarase no sistema. Um acréscimo no valor de ε (diminuição na quantidade de adsorvente), faz com que mais enzima seja perdida, o que é lógico do ponto de vista do processo. Um aumento no tempo de residência de sólidos, traz um pequeno decréscimo na retenção e não afeta nenhuma das outras respostas. Assim como nas demais respostas estudadas, o aumento do tempo de residência hidráulico no primeiro reator incrementa a retenção enzimática. O tempo de residência hidráulico no 2º reator, entretanto tem um comportamento oposto, enquanto seu aumento diminui o rendimento e a produtividade, aumenta a retenção da dextrana-sacarase. Neste caso é marcante a importância da análise das superfícies de resposta para que se possa determinar faixas de operação que possam trazer resultados razoáveis para as três variáveis.

Além dos efeitos principais das variáveis sobre as respostas, descrito acima, existem os efeitos de interação, ou seja variações que surgem nas respostas em consequência da interação de duas ou mais variáveis.

Serão apresentados a seguir os resultados obtidos do planejamento fatorial completo, para cada uma das variáveis, apresentando os coeficientes de regressão para o modelo quadrático obtido, a tabela de Análise de Variância ou ANOVA, um gráfico com os valores preditos pelo modelo e os observados e as superfícies de resposta.

- **Rendimento**

Na Tabela 5.6 encontram-se os coeficientes de regressão para o modelo quadrático para predição do rendimento. É importante salientar que os parâmetros obtidos são para o modelo codificado, ou seja, os valores das variáveis não assumem seus valores reais, mas os codificados, dentro da faixa estudada. Os valores expostos são os estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Tabela 5.6: Coeficientes de regressão para o modelo quadrático - RENDIMENTO

<i>Variável</i>	<i>Coefficiente</i> <i>Regressão</i>	<i>Erro</i> <i>Padrão</i>	<i>t(37)</i>	<i>p</i>	<i>-95, %Lim.</i> <i>Conf.</i>	<i>+95, % Lim.</i> <i>Conf.</i>
Med/Inters.	82,22	0,157	523,67	0,000	81,900	82,534
(1) τ_s (L)	-0,474	0,116	-4,100	0,0002	-0,708	-0,240
(2) τ_{h1} (L)	4,784	0,116	41,407	0,000	4,550	5,018
τ_{h1} (Q)	-1,346	0,105	-12,811	0,000	-1,559	-1,133
(3) τ_{h2} (L)	-3,782	0,116	-32,7334	0,000	-4,016	-3,548
2L por 3L	0,906	0,134	6,742	0,000	0,634	1,179

Onde:

L é o coeficiente do termo linear e Q do termo quadrático.

O modelo obtido pela regressão, que relaciona o rendimento com τ_s , τ_{h1} e τ_{h2} , é o seguinte:

$$\text{REND} = 82,22 - 0,47 \tau_s + 4,78 \tau_{h1} - 3,78 \tau_{h2} + 0,91 \tau_{h1} \tau_{h2} - 1,35 \tau_{h1}^2 \quad (5.2)$$

Para avaliação do desempenho do modelo, conforme colocado por Barros Neto et al. (1995), inicialmente analisa-se os desvios das observações com respeito à média global. Isto pode ser feito pela Soma Quadrática Total (SQ_T), expressa como segue:

$$SQ_T = \Sigma(\text{valor obs} - \text{valor m\u00e9dio})^2 \quad (5.3)$$

SQ_T compreende a soma quadr\u00e1tica devido \u00e0 regress\u00e3o (SQ_R) e devido ao res\u00edduo (SQ_r). Estes resultados, bem como os graus de liberdade, a m\u00e9dia quadr\u00e1tica e o teste F calculado encontram-se na tabela ANOVA (tabela 5.7).

A porcentagem de varia\u00e7\u00e3o explicada \u00e9 dada por:

$$\% \text{ de varia\u00e7\u00e3o explicada} = SQ_R / SQ_T \quad (5.4)$$

A Figura 5.2 mostra os valores observados versus os previstos pelo modelo, podendo-se observar que o modelo pode ser aplicado em toda faixa de estudo, pois os pontos observados, est\u00e3o bem pr\u00f3ximos da reta dos valores previstos. O valor da % de vari\u00e2ncia explicada foi 98,78%.

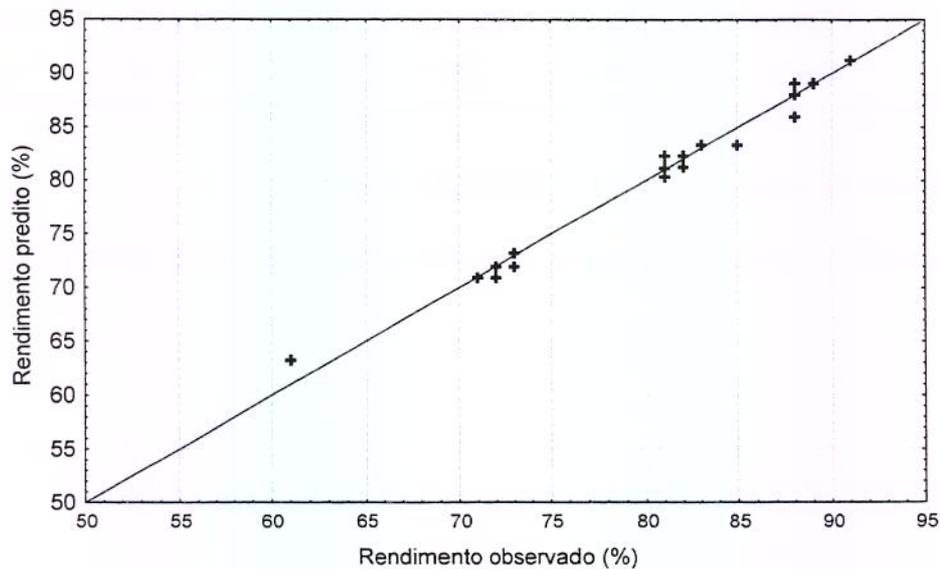


Figura 5.2: Valores previstos vs. observados – RENDIMENTO

Tabela 5.7: Tabela ANOVA para o RENDIMENTO

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	1741,77	5	348,35	602,46
Resíduo	21,39	37	0,578	
Total	1763,16	42		

% de variação explicada = 0,9878

$F_{0,99; 5; 37} = 3,56$

De modo a verificar se o modelo explica adequadamente a variação nos dados experimentais ou de simulação, ou seja se o modelo é preditivo, foi utilizado o teste F de significância. Para isto, é feita a comparação entre o valor de F estimado com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência $F_{\delta; j-1; s-j}$ (δ é o nível de significância, j é o número de parâmetros no modelo e s é o número total de observações). O fundamento consiste em verificar se a hipótese nula é válida, ou seja se as modificações introduzidas nas condições experimentais não tiveram nenhum efeito nos resultados obtidos e as variações nos valores destes resultados foram devido exclusivamente a valores aleatórios.

O valor tabelado para F a 99% de confiança foi 3,56, bem inferior ao valor obtido com o modelo, assim a hipótese nula é rejeitada a um nível δ de significância e pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, e o modelo é considerado válido.

Sendo o modelo obtido válido, é possível gerar as superfícies de resposta para todas as combinações possíveis de variáveis, que serão analisadas para verificar as faixas de operação que levam à otimização do rendimento.

As superfícies de resposta representam a variação da resposta com as variáveis selecionadas duas a duas, enquanto as demais estão no ponto central. As Figuras 5.3 apresentam as superfícies de resposta para o rendimento em função de τ_{h1} , τ_{h2} e τ_s .

As Figuras 5.3 (a) e (b) mostram que o rendimento é maior para valores baixos de τ_{h2} e altos de τ_{h1} , quando o primeiro está no limite mínimo e o segundo em torno de 2,5 h, o rendimento um máximo, da ordem de 90%. Verifica-se ainda que para valores baixos de τ_{h2} o rendimento varia pouco com o aumento de τ_{h1} , passando de 80 a 90%, o mesmo não acontece para valores altos de τ_{h2} , quando a variação de τ_{h1} de 1 para 3 horas causa um acréscimo no rendimento de algo em torno de 40% para 85%.

Pelas Figuras 5.3 (c) e (d) é possível verificar que tanto para valores altos como baixos de τ_{h1} o rendimento praticamente não se altera com a variação de τ_s . De maneira inversa, para valores altos ou baixos de τ_s o rendimento varia consideravelmente com o tempo de residência hidráulico no 1° reator, passando de 60 para 85%.

A observação das Figuras 5.3 (e) e (f), leva à conclusão de que a variação de τ_s não influencia significativamente no rendimento, para τ_{h2} no limite mínimo ou máximo da faixa estudada. A diminuição de τ_{h2} de 0,6 para 0,2 h, faz com que o rendimento passe de 70 para 90%.

Assim, a maximização do rendimento está associado a valores altos do tempo de residência hidráulico no 1° reator, em torno de 2,5 h, e valores baixos do tempo de residência hidráulico no 2° reator, abaixo de 0,2 h.

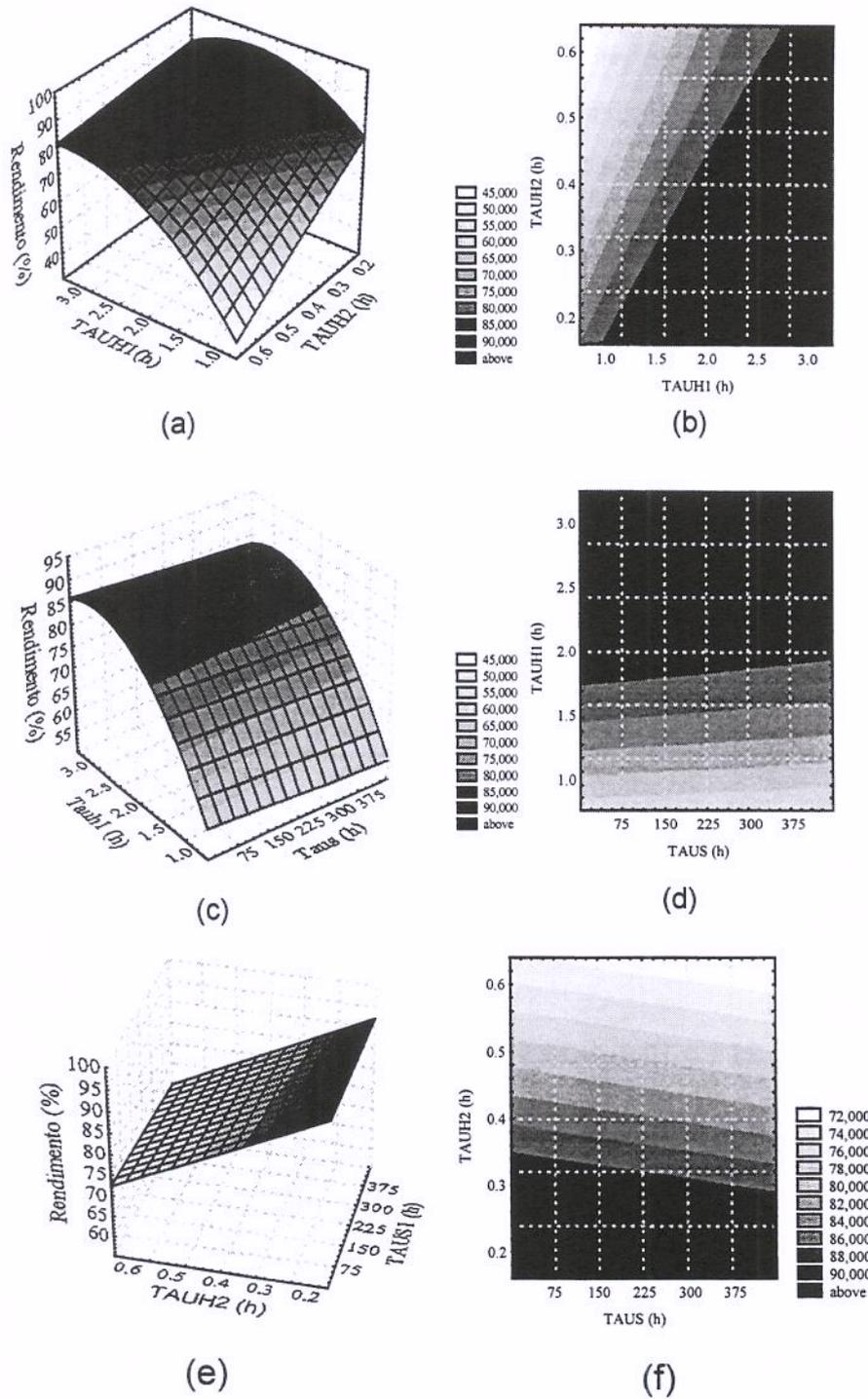


Figura 5.3: Superfícies de resposta e de contorno do rendimento da produção de dextrana em função de (a) e (b) τ_{h1} e τ_{h2} , (c) e (d) τ_{h1} e τ_s e (e) e (f) τ_{h2} e τ_s .

- **Produtividade**

Assim como foi feito para o rendimento, a partir dos resultados do planejamento apresentado na Tabela 5.8, foi feita a otimização da produtividade, partindo da obtenção de um modelo quadrático. A Tabela 5.8 apresenta os coeficientes de regressão estatisticamente significativos para 95% de confiança.

Tabela 5.8: Coeficientes de regressão para o modelo quadrático – Produtividade.

<i>Variável</i>	<i>Coefficiente</i> <i>Regressão</i>	<i>Erro</i> <i>Padrão</i>	<i>t(37)</i>	<i>p</i>	<i>-95, %Lim.</i> <i>Conf.</i>	<i>+95, % Lim.</i> <i>Conf.</i>
Med/Inters.	82,845	0,978	84,734	0,000	80,864	84,8261
(2) τ_{h1} (L)	5,102	0,720	7,091	0,000	3,644	6,560
(3) τ_{h2} (L)	-23,5168	0,720	-32,984	0,000	-24,975	-22,059
τ_{h2} (Q)	6,364	0,654	9,726	0,000	5,039	7,690
(4) ε (L)	2,766	0,720	3,844	0,0005	1,308	4,223
(5) So (L)	8,713	0,720	12,110	0,000	7,256	10,171

Com os valores da tabela 5.8 foi obtido o modelo codificado para predição da produtividade em função de τ_{h1} , τ_{h2} , ε e So, sob a forma da equação 5.5.

$$\text{PROD} = 82,85 + 5,10 \tau_{h1} - 23,51 \tau_{h2} + 2,77 \varepsilon + 8,71 \text{ So} + 6,36 \tau_{h2}^2 \quad (5.5)$$

A Figura 5.4 mostra os valores observados, obtidos por simulação e os previstos pelo modelo acima. Novamente houve um ótimo ajuste, sendo obtido uma % de variância explicada (R^2) de 97,4%.

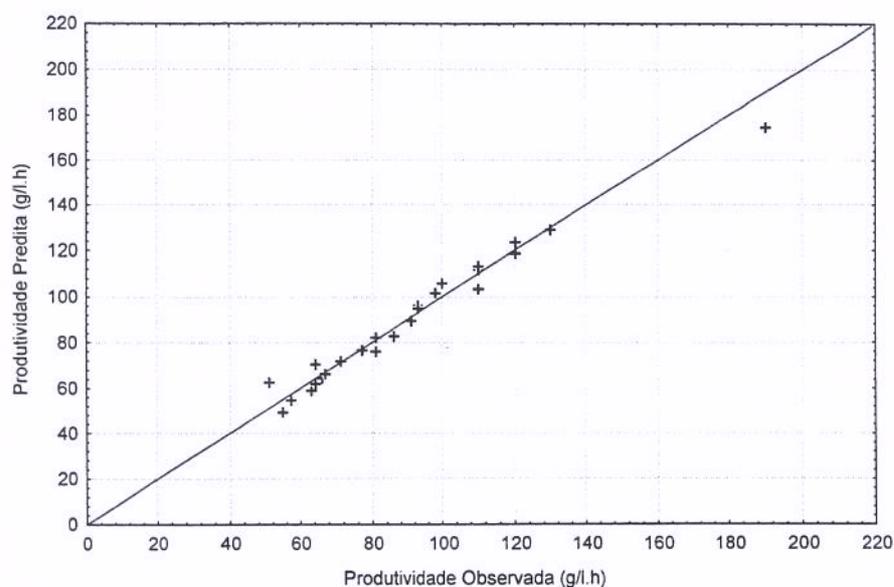


Figura 5.4: Valores previstos versus observados – PRODUTIVIDADE

A análise de variância para o modelo encontra-se na Tabela 5.9, onde pode ser observado o valor de $F = 274,9$, mais de 77 vezes maior que o valor tabelado, 3,56, o que indica que foi obtido um modelo preditivo.

Tabela 5.9: Tabela ANOVA para a PRODUTIVIDADE

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	30822,52	5	6164,50	274,9
Resíduo	829,67	37	22,42	
Total	31652,19	42		

% de variação explicada = 0,9738

$F_{0,99; 5; 37} = 3,56$

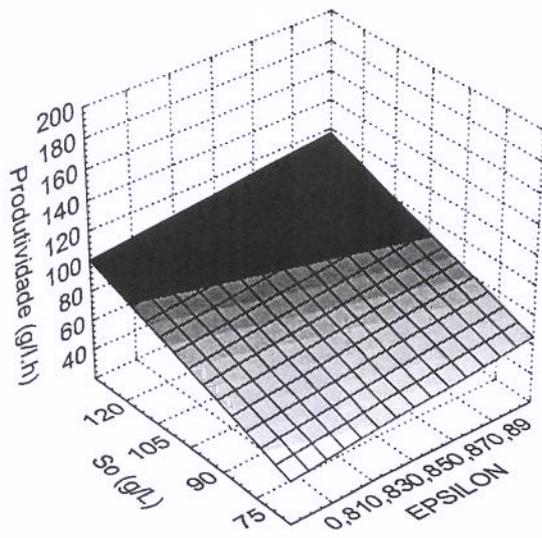
As Figuras 5.5 (a) até (l) apresentam as respostas de produtividade para variações dos parâmetros envolvidos no modelo, duas a duas.

As Figuras 5.5 (a) e (b), mostram que as produtividades alcançadas com valores mais altos de S_0 são maiores. Para concentração de sacarose de 75 g/L a produtividade passa de 55 para 73 g/L.h, um aumento de pouco mais de 30%, quando passamos de 0,81 para 0,90 a fração de líquidos nos reatores. Usando S_0 na faixa de 120 g/L, a produtividade passa de algo em torno de 98 g/L.h para mais de 111 g/L.h, um aumento de apenas 13%. A superfície indica que dentro da faixa estudada das variáveis, a produtividade é máxima para valores elevados de S_0 e de ε , embora este último não apresente uma influência tão grande quanto o outro.

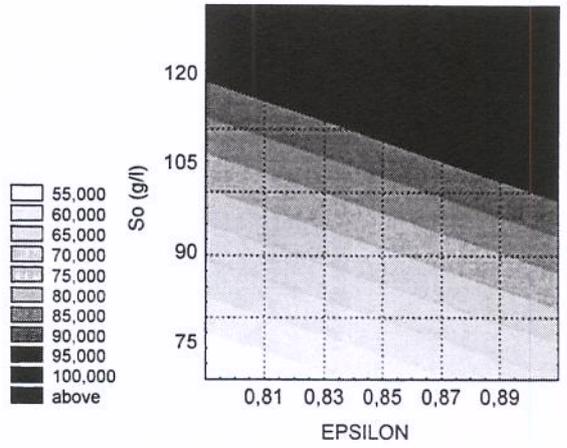
As Figuras 5.5 (c) e (d) tem um comportamento semelhante à anterior, envolvendo no entanto a fração de líquidos e o tempo de residência hidráulico no 1º estágio. São obtidas produtividades mais elevadas para valores mais altos de ε e τ_{h1} . O acréscimo em ε para qualquer faixa de τ_{h1} , ocasiona uma alteração menos pronunciada na produtividade. Para tempos de residência próximos a 3 horas a produtividade gira em torno de 90 a 100 g/L.h, para qualquer valor de ε .

Analisando-se a variação da produtividade com a fração de líquido e tempo de residência hidráulico no 2º reator (Figura 5.5 (e) e (f)), pode-se perceber que a produtividade varia muito com τ_{h2} , sendo máxima para valores pequenos, em torno de 0,2 h. O parâmetro ε , tem pouca influência, ou seja, a produtividade praticamente não se altera com a variação da fração de líquidos.

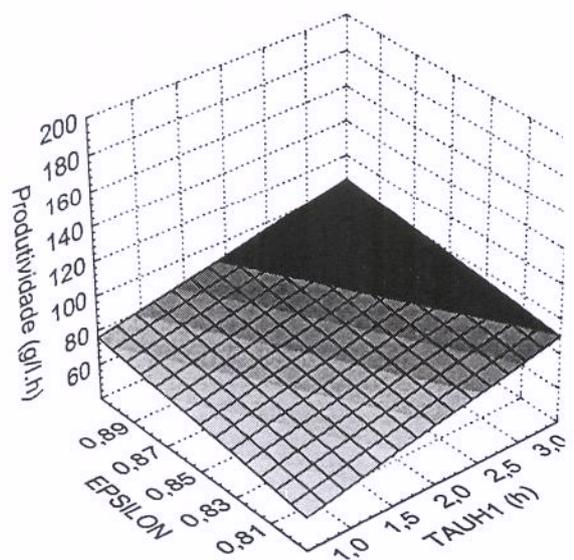
A produtividade atinge um valor muito baixo quando o tempo de residência é superior a 0,4 h, como pode ser também constatado pela Figura 5.5 (g). Para valores em torno de 0,2 h, a produtividade atinge seus valores mais altos, principalmente para concentrações de sacarose altas, embora sua influência não seja muito marcante.



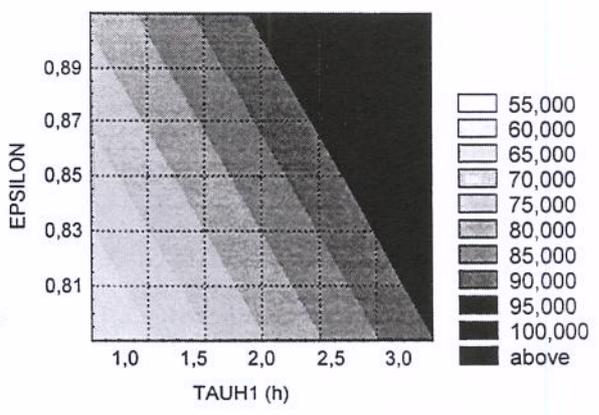
(a)



(b)

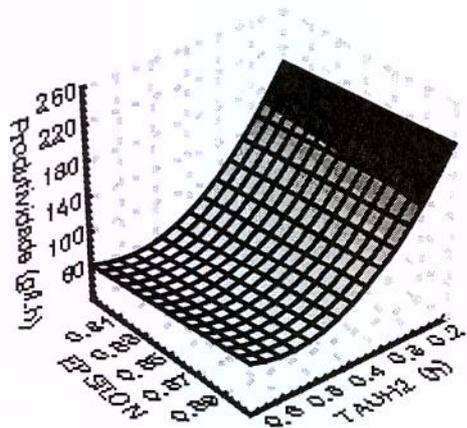


(c)

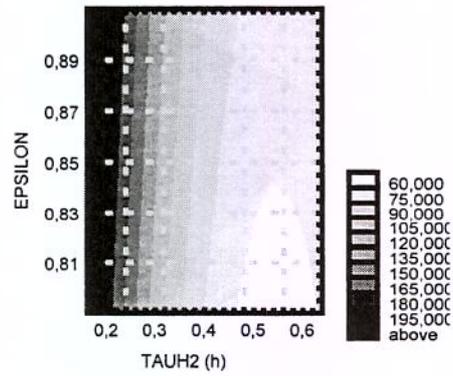


(d)

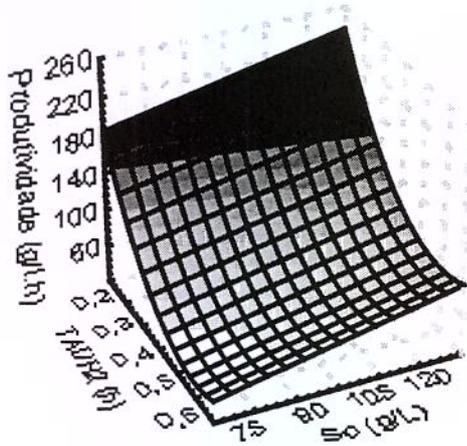
Figura 5.5: Superfícies de resposta e de contorno da produtividade em função de (a) e (b) ϵ e S_o e (c) e (d) τ_{h1} e S_o .



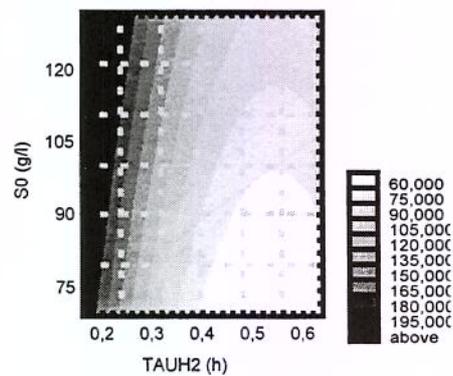
(e)



(f)

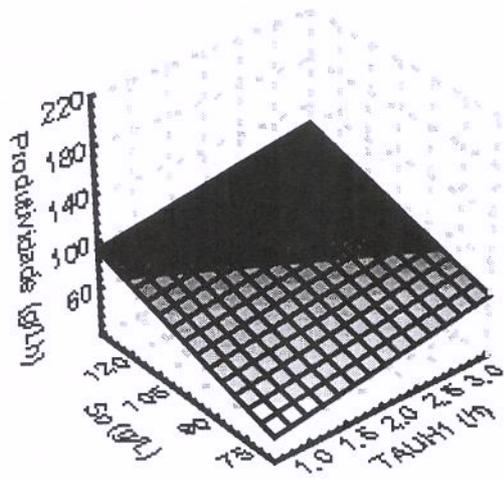


(g)

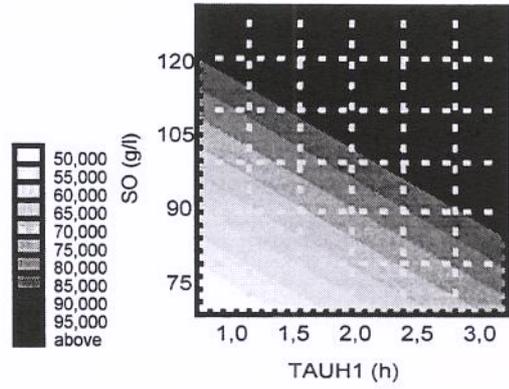


(h)

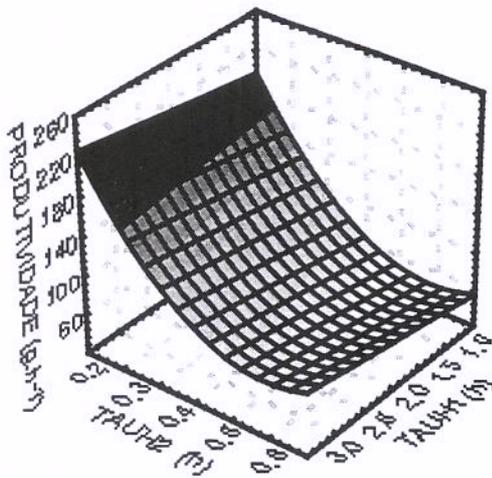
Figura 5.5 (continuação): Superfícies de resposta e de contorno da produtividade em função de (e) e (f) ϵ e τ_{h2} e (g) e (h) τ_{h2} e S_o .



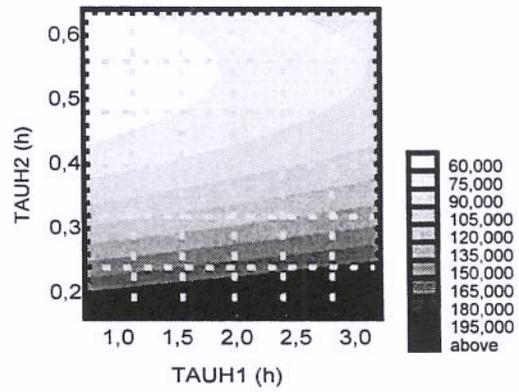
(i)



(j)



(k)



(l)

Figura 5.5 (continuação): Superfícies de resposta e de contorno da produtividade em função de (i) e (j) τ_{h1} e S_o e (k) e (l) τ_{h1} e τ_{h2} .

Analisando-se a variação da produtividade com S_o e τ_{h1} , através das Figuras 5.5 (i) e (j), observa-se um máximo de produtividade em altas concentrações de sacarose e grandes tempos de residência no primeiro estágio. O aumento da produtividade com o aumento do tempo de residência é da ordem de 50% para concentrações baixas, sendo atingido um valor máximo de 80 g/L.h , com 75 g/L de sacarose e tempo de residência de 3 horas. No limite oposto, com $S_o = 125$ g/L o acréscimo é menor, mas o máximo de produtividade é atingido com 3 h de tempo de residência, ao redor de 120 g/L.h.

Assim para se atingir altas produtividades (120 g/L.h), concentrações de sacarose da ordem de 125 g/L devem necessariamente ser alimentadas no sistema.

O último par de variáveis a ser analisado quanto à sua influência na produtividade são os tempos de residência hidráulica no 1° e 2° reatores. Da Figura 5.8 (b) pode-se concluir que τ_{h2} , tem uma importância muito maior que τ_{h1} , em se tratando da produtividade. Desde que valores baixos de τ_{h2} sejam verificados, a produtividade será alta, para qualquer valor de τ_{h1} .

Através das superfícies de resposta analisadas até aqui já se pode afirmar que tanto rendimento quanto produtividade são favorecidos por tempo de residência de líquidos baixo no 2° reator (τ_{h2}) e alto no 1° (τ_{h1}).

- **Retenção Enzimática**

Assim como foi feito para o rendimento e a produtividade, a partir dos resultado do planejamento apresentado na tabela 5.6, foram feitas as análises de superfícies de resposta para a retenção enzimática, partindo da obtenção de um modelo quadrático. A tabela 5.10 apresenta os coeficientes de regressão estatisticamente significativos para 95% de confiança.

Tabela 5.10: Coeficientes de regressão para o modelo quadrático – RETENÇÃO ENZIMÁTICA.

<i>Variável</i>	<i>Coefficiente</i> <i>Regressão</i>	<i>Erro</i> <i>Padrão</i>	<i>t(37)</i>	<i>p</i>	<i>-95, %Lim.</i> <i>Conf.</i>	<i>+95, % Lim.</i> <i>Conf.</i>
Med/Inters.	42,060	0,299	140,658	0,000	41,459	42,667
(1) τ_s (L)	-1,528	0,127	-12,120	0,000	-1,786	-1,270
τ_s (Q)	0,983	0,123	7,587	0,000	0,687	1,190
(2) τ_{h1} (L)	2,468	0,127	19,424	0,000	2,210	2,726
τ_{h1} (Q)	-0,300	0,124	-2,418	0,021	-0,550	-0,0480
(3) τ_{h2} (L)	6,337	0,127	49,866	0,000	6,079	6,595
τ_{h2} (Q)	0,653	0,124	-5,277	0,000	-0,904	-0,401
(4) ε (L)	-5,306	0,127	-41,7546	0,000	-5,564	-5,048

Com os valores da Tabela 5.10 foi obtido o modelo codificado para predição da retenção da dextrana-sacarase no sistema em função de τ_{h1} , τ_{h2} , τ_s e ε , sob a forma da equação 5.6.

$$RET = 42,06 - 1,53 \tau_s + 2,47 \tau_{h1} + 6,34 \tau_{h2} - 5,31 \varepsilon + 0,94 \tau_s^2 - 0,30 \tau_{h1}^2 - 0,65 \tau_{h2}^2 \quad (5.6)$$

A Figura 5.6 mostra os valores observados, obtidos por simulação e os previstos pelo modelo acima. Novamente houve um ótimo ajuste, sendo obtido uma % de variância explicada de 99,3%.

A análise de variância para o modelo encontra-se na tabela 5.12, onde pode ser observado o valor de $F = 691,98$, quase 200 vezes maior que o valor tabelado, 3,21, o que indica que foi obtido um modelo preditivo.

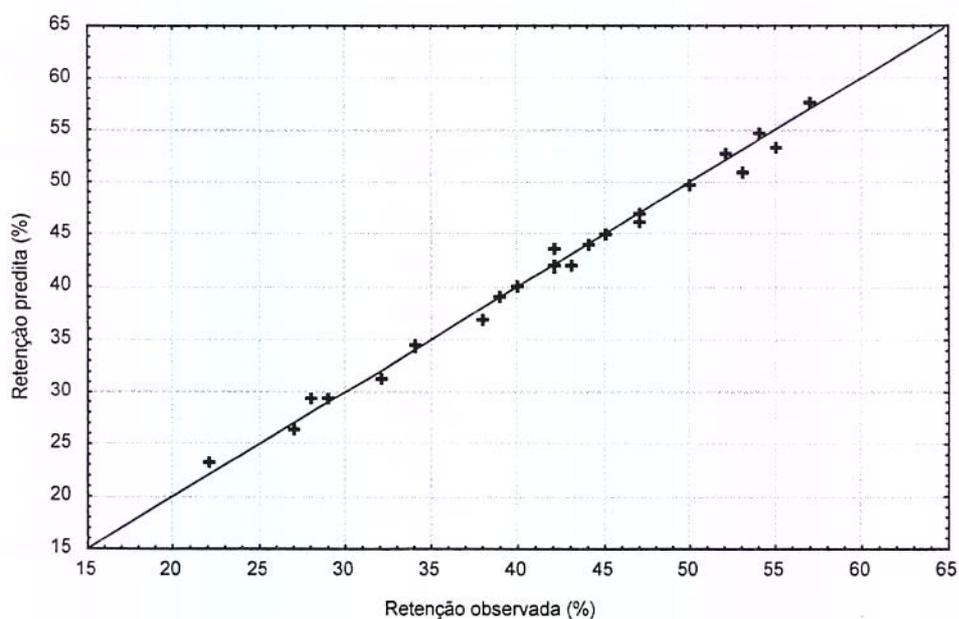


Figura 5.6: Valores previstos versus observados – RETENÇÃO ENZIMÁTICA

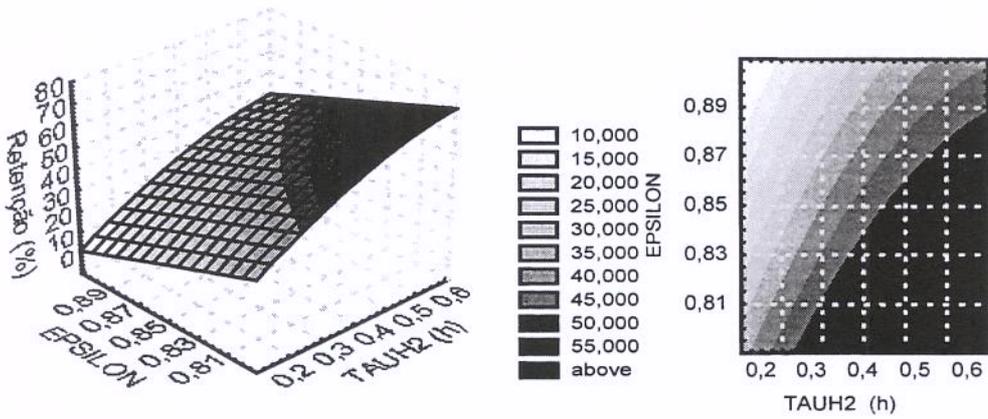
Tabela 5.11: Tabela ANOVA para a RETENÇÃO ENZIMÁTICA

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	3387,92	7	614,50	483,99
Resíduo	24,24	35	22,42	
Total	3412,40	42		

% de variação explicada = 0,993

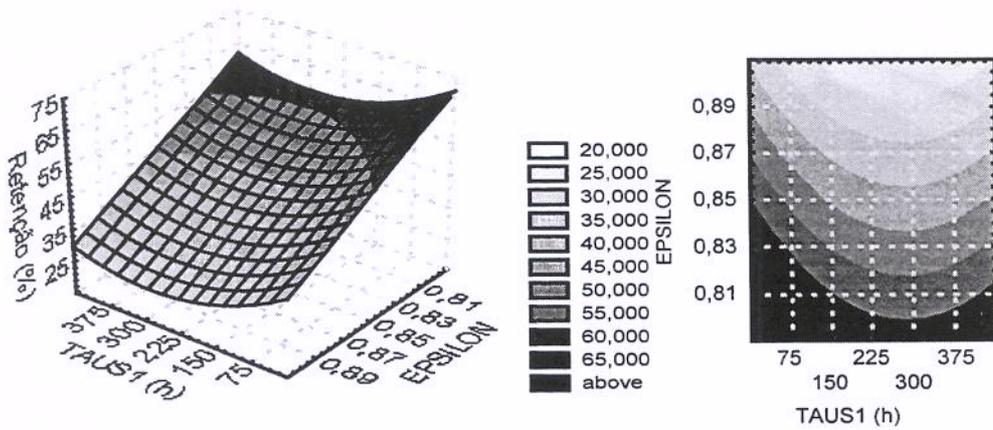
$F_{0,99; 7; 35} = 3,21$

As Figuras 5.7 (a) a (l), apresentam as respostas de retenção enzimática para variações dos parâmetros envolvidos no modelo, dois a dois.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura 5.7 : Superfícies de resposta e de contorno da retenção enzimática em função de (a) e (b) τ_{h2} e ϵ e (c) e (d) τ_s e ϵ .

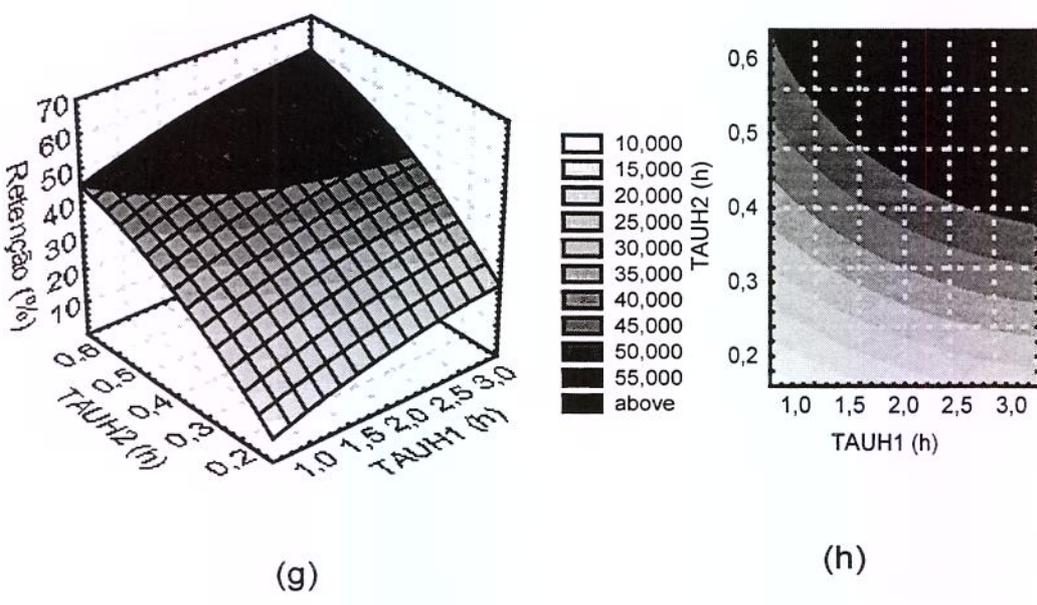
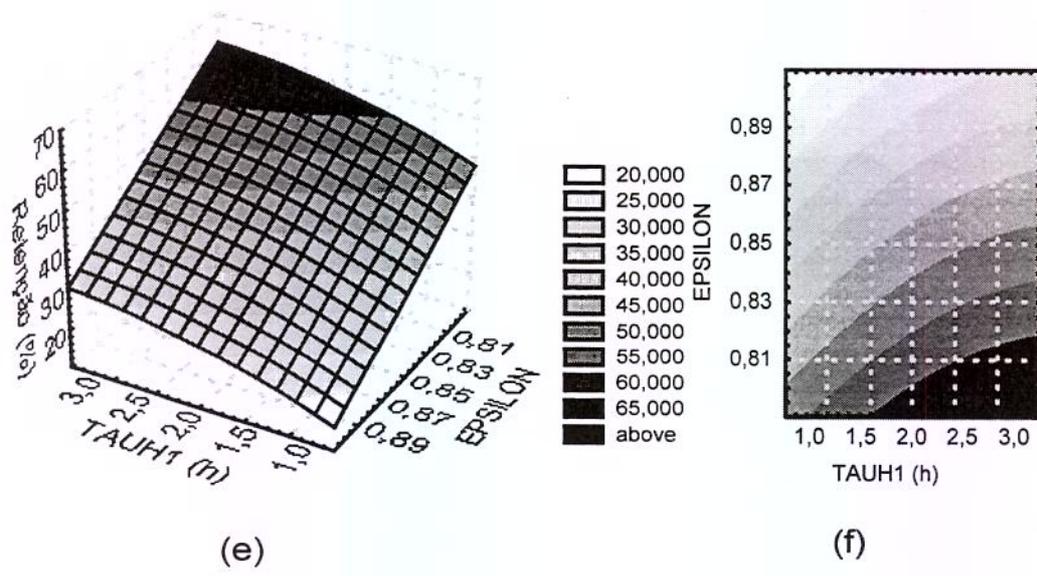
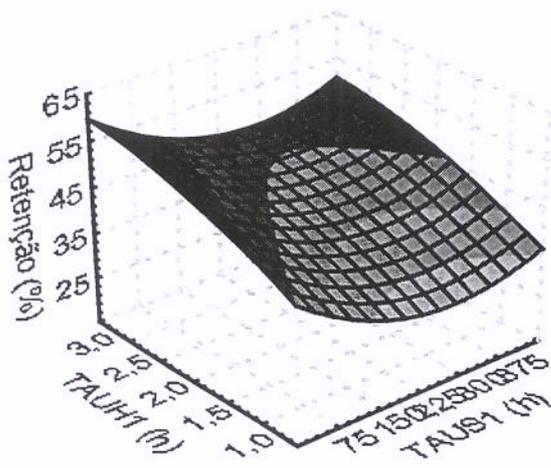
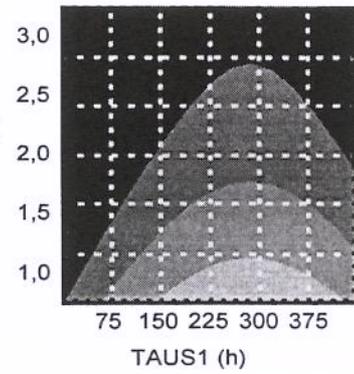
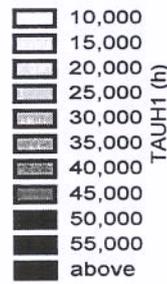


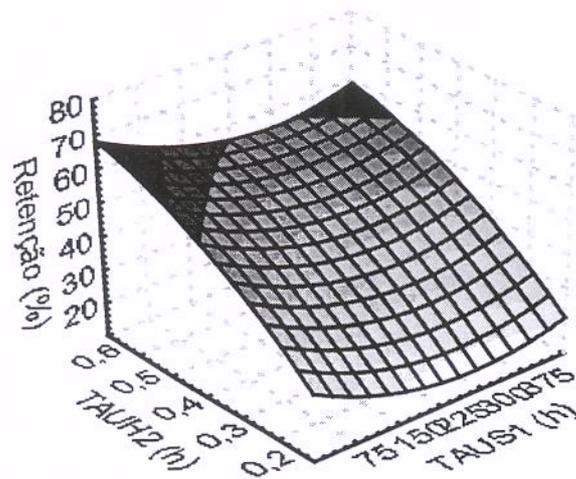
Figura 5.7 (continuação): Superfícies de resposta e de contorno da retenção enzimática em função de (e) e (f) τ_{h1} e ϵ e (g) e (h) τ_{h1} e τ_{h2}



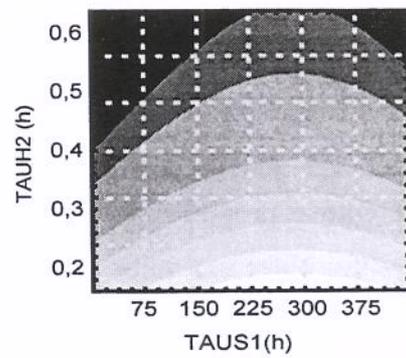
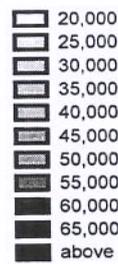
(i)



(j)



(k)



(l)

Figura 5.7 (continuação) : Superfícies de resposta e de contorno da retenção enzimática em função de : (i) e (j) τ_{h1} e τ_s e (k) e (l) τ_{h2} e τ_s

Observando a Figura 5.7 (a) e (b) para verificar a influência de τ_{h2} e ε na retenção da dextrana-sacarase no sistema, podemos perceber que neste caso a fração de líquidos tem influência significativa sobre a retenção, sendo esta tanto maior quanto menor ε . A enzima fica mais retida no sistema quanto maior for o tempo de residência hidráulico no 2º reator.

Pela Figura 5.7 (c) e (d), pode-se comprovar a influência de ε na retenção, sendo esta favorecida por valores pequenos de ε , ou seja maior quantidade de sólidos. Quanto ao tempo de residência de sólidos, surge aqui um comportamento curioso devido ao termo quadrático. Utilizando valores baixos de ε , pode-se obter máximos de retenção tanto abaixo de 150 h de τ_s , como acima de 300 h.

Através da Figura 5.7 (a) e (b), fica confirmado que a otimização da retenção enzimática está associada com valores baixos de ε . Assim pode-se dizer que se forem usados quantidade de resina de maneira que a fração de líquido fique em torno de 80%, tem-se condições de obter valores ótimos de rendimento, produtividade e retenção.

Examinando a Figura 5.7 (c) e (d), mais uma vez percebe-se que ao contrário do rendimento e da produtividade, τ_{h2} deve ser tão grande quanto possível para otimizar a retenção enzimática, sendo grande a dependência desta resposta em relação a este tempo de residência. Isto fica definitivamente comprovado com a Figura 5.7 (g) . Assim é possível concluir que os valores de tempo de residência hidráulico no 2º reator que maximizam rendimento e produtividade (em torno de 0,2 h) conduzem a muita perda enzimática. É impossível obter um valor ótimo para as três respostas concomitantemente. Na prática, é necessário que se opte por quais respostas otimizar, ou que sejam utilizados valores que levem a respostas com valores abaixo do ótimo, mas aceitáveis do ponto de vista econômico. Uma alternativa para este impasse é a otimização da função resposta otimizada, citada anteriormente, onde pode-se fazer o estudo da otimização do produto das três respostas.

As Figuras 5.7 (i) a (l) confirmam mais uma vez a forte dependência entre a retenção da enzima e os tempos de residência, ficando claro que τ_{h1} deve ser da ordem de 3

h, valor este que leva à otimização das três respostas. Quanto ao tempo de residência de sólidos podem ser usados valores abaixo de 150 h ou maiores que 375 h.

Dessa maneira, podemos resumir as verificações anteriores, analisando como cada variável influi nas três respostas estudadas.

- S_0 : Sua variação só causa mudanças importantes na produtividade, como já havia sido constatado pelo algoritmo de PB. O valor que otimiza a produtividade dentro da faixa estudada é 125 g/L.
- ϵ : Apesar de estar incluído no modelo da produtividade, seu efeito é muito mais significativo sobre a retenção enzimática, devendo permanecer no valor 0,8 para otimizá-la, como constatado pela análise das superfícies de resposta. Este valor pode trazer efeito prejudicial para a produtividade se τ_{h2} for alto ou τ_{h1} baixo.
- τ_s : Seu efeito mais significativo é mais acentuado sobre a retenção enzimática, trazendo efeitos negativos para esta apenas na faixa entre 150 e 300h. Fora desta faixa resultados mais baixos de rendimento podem ser obtidos se o valor de τ_{h2} for alto (acima de 0,3 h), ou τ_{h1} for pequeno (abaixo de 2 h). Um valor razoável seria 75 h.
- τ_{h1} : Esta variável tem importância na otimização das três respostas, devendo ser da ordem de 3,0 h para otimizá-las.
- τ_{h2} : Como já citado anteriormente, esta é a variável mais controversa, pois mantida em valores baixos (0,2 h), otimiza rendimento e produtividade e em valores altos (0,55 – 0,6 h), otimiza a retenção.

Para melhor visualização dos resultados das três respostas utilizando os valores colocados acima, usaremos o modelo determinístico (capítulo 4) e o probabilístico (Equações 52, 5.5 e 5.6) para calcular a produtividade, o rendimento e a retenção enzimática. Além dos valores acima serão feitos cálculos com τ_{h2} intermediário em 0,4 h.

Os valores de τ_s , ε e S_0 foram 50 h, 0,8 e 125 g/L respectivamente. A Tabela 5.12 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5.12: Valores calculados para rendimento, produtividade e retenção enzimática, pelos modelos determinístico e probabilístico, para diferentes valores de τ_{h2} . Os valores utilizados para a concentração de dextrana-sacarase e NaCl na alimentação foram: $C_0 = 8,0$ g/l e $E_0 = 0,5$ mol/L

τ_{h1} (h)	τ_{h2} (h)	<i>Rend</i>		<i>Prod</i>		<i>Ret</i>	
		<i>Det.</i>	<i>Prob</i>	<i>Det</i>	<i>Prob</i>	<i>Det</i>	<i>Prob</i>
3,0	0,2	95,0	91,0	220	214	48	49
3,0	0,6	86	83	81	89	76	79
3,0	0,4	91	87	110	109	67	68

Pode-se perceber pela Tabela 5.12 que a variação de τ_{h2} não altera muito o rendimento, mas afeta bastante a retenção e a produtividade. O rendimento apresenta nos três casos, um valor bastante razoável, não sendo inferior a 86%, passando da faixa ótima para a intermediária ($\tau_{h2} = 0,4$ h), o rendimento sofre um pequeno decréscimo, de 95 para 91%, o que é bastante razoável, levando em conta o ganho na retenção da enzima no sistema, da ordem de 40%. A produtividade no entanto sofre uma queda da ordem de 50%, para essa diminuição no tempo de residência no 2º reator.

Dependendo da estratégia que se adote na operação do sistema, fazendo uma reposição constante de dextrana-sacarase no sistema, ou operação em ciclos não muito longos, pode-se optar por quais das condições de operação é a melhor. Assim, uma decisão de qual das três condições é a mais interessante na prática, depende de uma avaliação econômica e operacional do processo.

- **Resposta Otimizada:**

Uma outra estratégia para encontrar as faixas de operação que levem aos valores mais elevados de rendimento, retenção enzimática e produtividade é otimizar a função objetivo definida anteriormente como resposta otimizada (Equação 5.1).

Os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 95% de confiança, para o modelo quadrático obtido a partir dos resultados da Tabela 5.6 estão apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Coeficientes de regressão para o modelo quadrático – RESPOSTA OTIMIZADA

<i>Variável</i>	<i>Coefficiente</i> <i>Regressão</i>	<i>Erro</i> <i>Padrão</i>	<i>t(37)</i>	<i>p</i>	<i>-95, %Lim.</i> <i>Conf.</i>	<i>+95, % Lim.</i> <i>Conf.</i>
Med/Inters.	2,925	0,0266	109,843	0,000	2,871	2,980
(1) τ_s (L)	-0,126	0,150	-8,439	0,000	-0,157	-0,0959
τ_s (Q)	0,080	0,140	5,709	0,000	0,051	0,108
(2) τ_{h1} (L)	0,499	0,150	33,338	0,000	0,469	0,529
τ_{h1} (Q)	-0,064	0,140	-4,590	0,000	-0,092	-0,036
(3) τ_{h2} (L)	-0,405	0,150	-27,089	0,000	-0,435	-0,375
(4) ε (L)	-0,287	0,150	-19,511	0,000	-0,317	-0,256
(5) So (L)	0,292	0,150	19,511	0,000	0,261	0,322
2L por 5L	0,045	0,174	2,556	0,015	0,009	0,080
3L por 4L	0,0784	0,174	4,503	0,000	0,043	0,114

O modelo quadrático obtido para a resposta otimizada foi expressa pela Equação 5.7.

$$RO = 2,92 - 0,13 \tau_s + 0,08 \tau_s^2 + 0,50 \tau_{h1} - 0,06 \tau_{h1}^2 - 0,41 \tau_{h2} - 0,29 \varepsilon + 0,29 So + 0,05 \tau_{h1} So + 0,08 \tau_{h2} \varepsilon \quad (5.7)$$

A tabela ANOVA para este modelo encontra-se na Tabela 5.14 e novamente foi obtido um modelo preditivo, sendo o F calculado mais de 100 vezes maior que o tabelado.

Tabela 5.14: Tabela ANOVA para a RESPOSTA OTIMIZADA

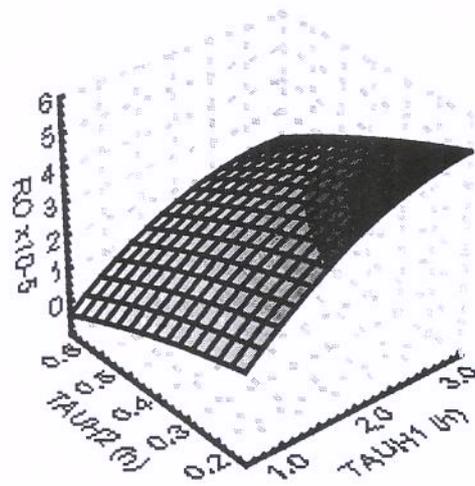
<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	26,70	9	2,97	304.88
Resíduo	0,32	33	0,01	
Total	27,09	42		

% de variação explicada = 0,988

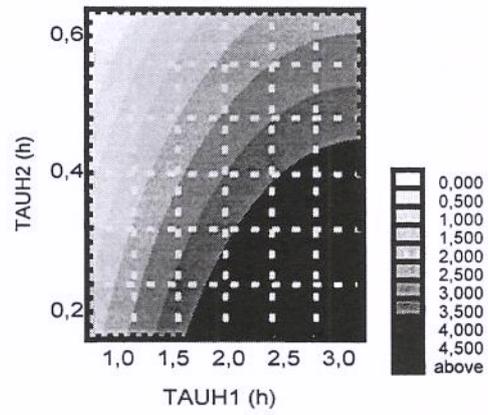
$F_{0,99; 9; 33} = 3,02$

Do que foi exposto anteriormente, com relação à influência das variáveis nas respostas estudadas, percebeu-se que a variável τ_{h2} tem efeitos discordantes em relação à retenção enzimática e à produtividade. Assim, analisando as superfícies de resposta que relacionam esta variável às demais (Figura 5.8) foi possível determinar um tempo de residência no 2º estágio que leva aos melhores resultados para as três respostas.

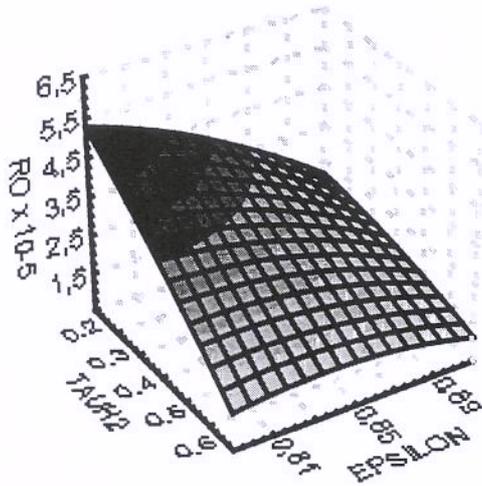
Pode-se observar que os valores das variáveis que levam ao máximo da resposta otimizada, coincidem com aqueles já definidos anteriormente na análise individual de cada resposta, ou seja, τ_s de 50h, τ_{h2} de 3h, ϵ de 0,8 e S_0 igual a 125 g/L, como esperado. Examinando ainda as figuras 5.8 de (a), até (h), pode-se verificar em todas elas, que para otimizar a RO o valor de τ_{h2} deve ser da ordem de 0,2h. Portanto se o que se deseja é obter valores tão altos quanto possível para as três variáveis, deve-se operar nas faixas estabelecidas acima, obtendo rendimento da ordem de 91-95%, produtividade em torno de 220 g/L.h e retenção enzimática de 49%, como mostrado na Tabela 5.12



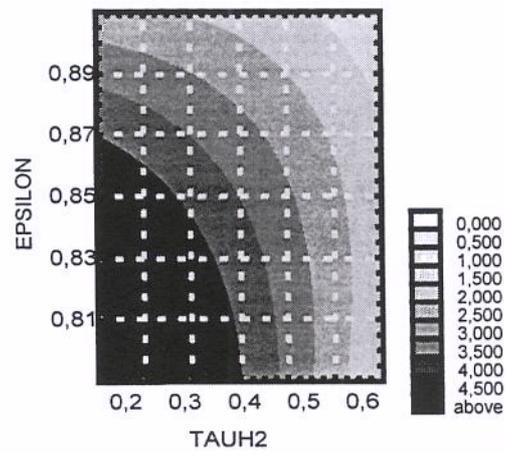
(a)



(b)

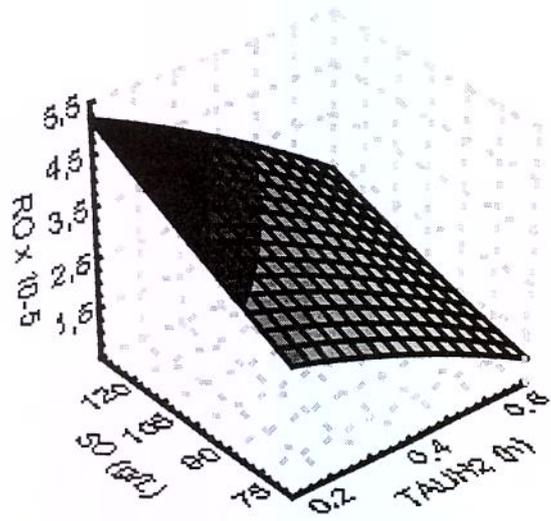


(c)

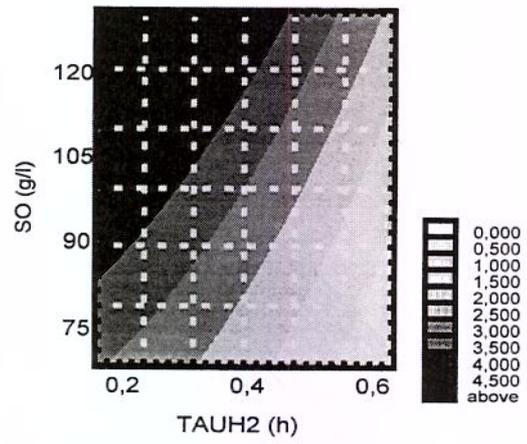


(d)

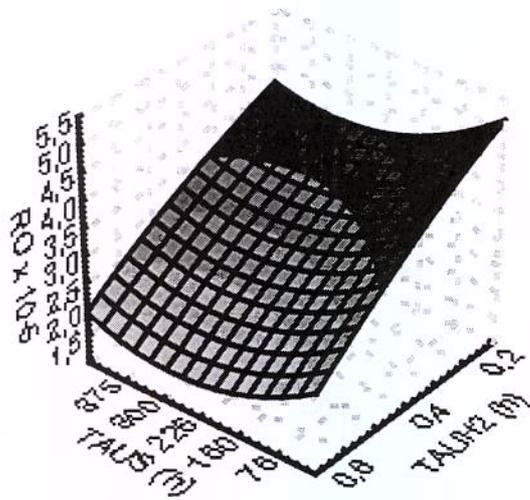
Figura 5.8: Superfícies de resposta e de contorno da resposta otimizada em função de τ_{h2} e τ_{h1} (a) e (b) e ϵ e τ_{h2} (c) e (d)



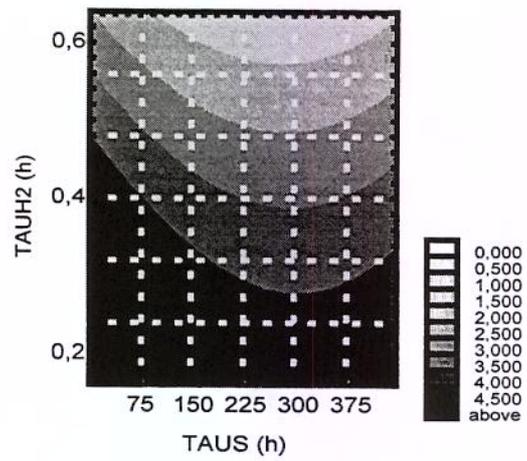
(e)



(f)



(g)



(h)

Figura 5.8(continuação): Superfícies de resposta e de contorno da resposta otimizada em função de τ_{h2} e S_o (e) e (f) e τ_s e τ_{h2} (g) e (h)

5.4. Conclusões

Do exposto neste capítulo, ficou claro a importância, praticidade e confiabilidade do uso planejamento de Plackett-Burman na seleção prévia das variáveis estatisticamente mais importantes no processo. Foi possível a seleção entre as 7 variáveis estudadas, com 12 ensaios de simulação.

Uma vez determinadas as variáveis mais importantes para as três respostas desejadas (rendimento, produtividade e retenção enzimática), realizou-se um planejamento completo, com número de variáveis reduzido de 7 para 5, diminuindo o total de ensaios de 128 (2^7), para 32 (2^5), mais os do ponto central e pontos axiais, totalizando 43 ensaios para os estudos de otimização.

Mesmo em se tratando de obtenção de resultados por simulação, esta redução é bastante significativa, evidenciando a importância destas ferramentas em trabalhos experimentais.

A otimização por análise de superfícies de resposta possibilitou além da escolha de valores adequados de operação, um conhecimento importante do processo frente a variações das variáveis. Além disso os modelos obtidos para cálculo das respostas, forneceu valores bastante próximos daqueles obtidos pelo modelo determinístico apresentado no capítulo anterior.

6. Operação do Sistema

6.1. Introdução

Nos capítulos anteriores foi elaborado um modelo determinístico para o sistema de produção de dextrana proposto, a partir de parâmetros de adsorção e dessorção obtidos experimentalmente e realizado o estudo de otimização do rendimento, produtividade e retenção enzimática. Neste capítulo foram realizados testes preliminares para a verificação da operacionalidade do sistema em duplo estágio para síntese de dextrana. Assim o processo proposto foi montado em escala de laboratório, com volumes de reação da ordem de 500 mL.

Foram feitos vários testes preliminares com o intuito de verificar os equipamentos mais apropriados para o processo em pequena escala, as vazões mais adequadas, do ponto de vista operacional e finalmente ensaios usando os reagentes necessários, primeiramente na ausência de sacarose, para evitar aumento de viscosidade e posteriormente com sua utilização para verificar a formação de dextrana.

6.2. Descrição do Sistema

Tomando como base o processo apresentado anteriormente, esquematizado na Figura 3.1, foi montado no laboratório um conjunto de equipamentos que pudessem implementar o funcionamento de tal sistema.

Foram usados dois reatores graduados com capacidade de 1000 mL cada, equipados com agitador magnético, para os estágios de dessorção e adsorção. Os reatores tinham uma tampa de silicone maleável, com várias perfurações onde foram adaptados termômetros para monitoramento da temperatura nos estágios e tubos ligados a mangueiras de silicone de diâmetro adequado para proporcionar as vazões de operação. Estas mangueiras faziam a

ligação entre os estágios (reciclo) e permitiam a entrada e saída de soluções, através de bombas peristálticas com ajuste fino de vazão. A temperatura de 25°C foi mantida através de banho termostatizado.

A clarificação da corrente de saída do segundo reator, para impedir a saída de resina foi feita através de um filtro tangencial de fibra oca, com membranas de porosidade de 2 µm, fornecido pela Microdyn Modulblau GmbH & Co.

A Figura 6.1, traz um esquema dos equipamentos utilizados e a Figura 6.2 uma fotografia da montagem do sistema em operação.

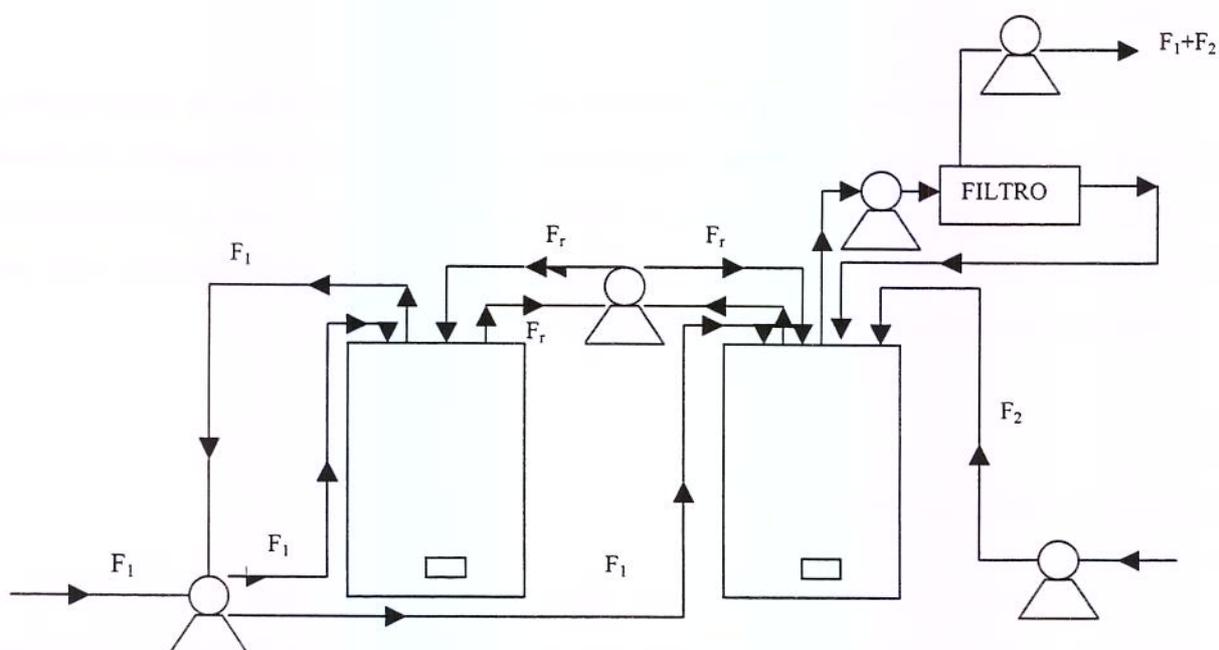


Figura 6.1 – Esquema da montagem do processo bifásico duplo estágio para produção de dextrana



Figura 6.2: Fotografia do sistema em duplo estágio para produção de dextrana em operação.

Antes de iniciar a operação foram necessários vários testes para verificar qual o filtro mais adequado para esse sistema. Foram testados filtros com várias capacidades, todos com filtração tangencial, pela necessidade de retorno dos sólidos para o sistema. Filtros de membrana plana, não forneceram bons resultados, pois mesmo com vazões muito altas, havia muita retenção de sólidos e conseqüentes entupimento e queda na vazão de saída, que deve permanecer constante para manter regime permanente. O melhor arranjo foi obtido com o filtro tubular de fibra oca, embora tenha sido necessário utilizar na sua alimentação uma bomba peristáltica de alta capacidade, para conseguir altas pressões na entrada e diminuir a possibilidade de entupimento.

Entre cada operação o filtro teve que passar por um procedimento de limpeza que incluía lavagem com solução de NaOH e celulase, para eliminar resíduos de resina (DEAE CELULOSE) dos poros do filtro e impedir a diminuição na vazão de saída.

As demais vazões foram determinadas em função da vazão máxima de saída do filtro e de uma circulação adequada da suspensão através das mangueiras sem provocar entupimento ou deposição do sólido, de maneira a tornar não homogênea os conteúdos dos reatores.

6.3 Metodologia Experimental

Serão descritos a seguir os procedimentos analíticos utilizados para monitoramento do processo, assim como da operação propriamente dita. A metodologia analítica é a mesma já descrita no capítulo 3.

6.3.1 Metodologia analítica:

Durante a operação do sistema foram retiradas amostras, na primeira hora de 15 em 15 minutos, depois de 1 em 1 hora. As amostras foram coletadas do 1º reator, do 2º e da saída do filtro, centrifugadas e analisadas conforme a metodologia indicada abaixo, para obtenção dos perfis de concentração de sacarose, dextrana-sacarase livre (itens 3.3.2.2 a 3.3.2.4) e NaCl e açúcar redutor para evidenciar a ocorrência da reação enzimática e produção de dextrana, que também pode ser constatada através da cromatografia líquida

6.3.1.1 Determinação de sacarose e frutose por cromatografia líquida

Devido à limitação na quantidade de amostra, a sacarose e a frutose foram dosadas por cromatografia líquida. A fase móvel utilizada foi água purificada pelo sistema Milli-Q Plus, com um fluxo de 0,6 mL/min e um volume de injeção de 98µL. Foi usada pré coluna IONPACK da SHODEX e coluna KS801, mantida a 60°C. Foi usado detetor de índice de refração.

A quantificação foi feita através do aplicativo MILLENIUM CHROMATOGRAPHY MANAGER - Waters, usado para aquisição e processamento dos dados da cromatografia líquida. Foram injetados padrões de glicose, frutose e sacarose, em várias concentrações, obtendo-se uma curva padrão, associada ao tempo de retenção de cada um dos padrões, como pode ser observado na figura 6.3.

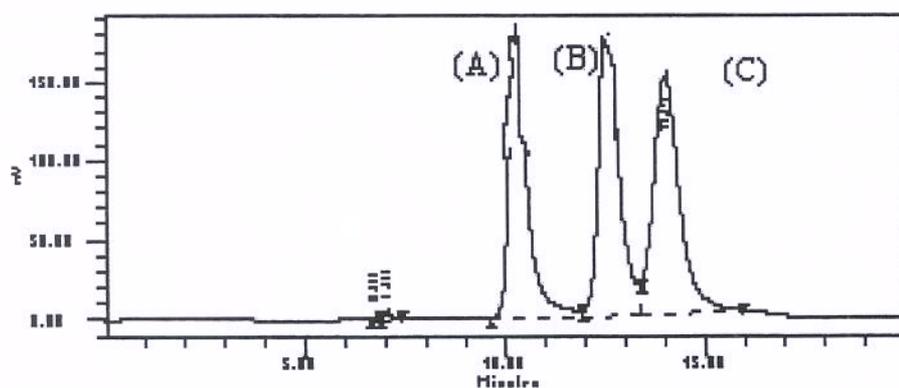


Figura 6.3: Cromatograma dos padrões de sacarose(A), glicose (C) e frutose (B)

6.3.1.2 Detecção de dextrana por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Como no item anterior, foi utilizada água como fase móvel, num fluxo de 1,0 mL/min e mesmo volume de injeção. Foram usadas um conjunto de três colunas e uma pré coluna Varian série Micropak em série, cujas características são apresentadas na Tabela 6.1. As colunas foram mantidas a 40°C assim como o detetor de índice de refração.

Tabela 6.1: Características das colunas utilizadas para as análises em GPC

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

Foram injetados como padrões soluções de dextrana de diferentes pesos moleculares, para localização da faixa de peso molecular da dextrana formada no processo.

Um exemplo típico de cromatograma do padrão de dextrana é o apresentado na figura 6.4.

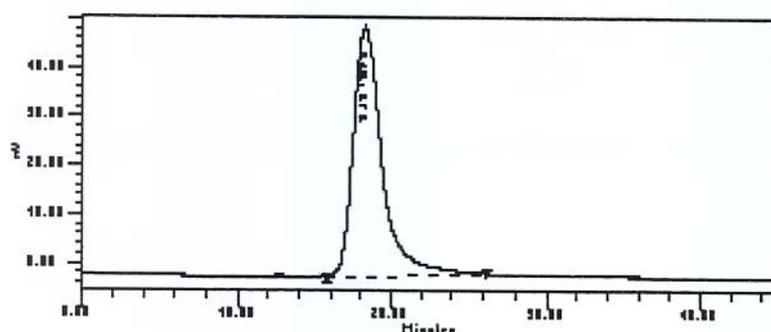


Figura 6.4: Cromatograma do padrão de dextrana DXT 5000 K, de peso molecular médio 5×10^6 daltons.

6.3.1.3 Curva padrão para proteína utilizando albumina bovina

Foi utilizada a mesma curva apresentada na Figura 3.3, para correlacionar resultados de atividade enzimática (UDS/mL) obtidos, com valores correspondentes para a concentração de albumina bovina, que foi usada como proteína de referência e serviu de base para cálculos.

Em virtude da solução a ser analisada ser multicomponente, podendo conter sacarose, dextrana e a enzima dextrana-sacarase, foi feita uma análise de varredura em espectrofotômetro, para verificar as possíveis interferências na região de comprimento de onda de 280 nm. A absorbância observada quando soluções de dextrana são submetidas a diferentes comprimentos de onda pode ser observada na Figura 6.5. A Figura 6.6 mostra a evolução da absorbância em vários comprimentos de onda para uma solução de dextrana-sacarase contendo atividade de 25 UDS/mL ou 0,8 g/L.

Através deste dois gráficos podemos perceber que a melhor faixa para detecção da enzima é entre 240 e 280 nm pois a dextrana-sacarase apresenta nessa faixa um pico de absorbância, enquanto as soluções de dextrana apresentam leitura bastante baixa, não interferindo nas determinações de enzima.

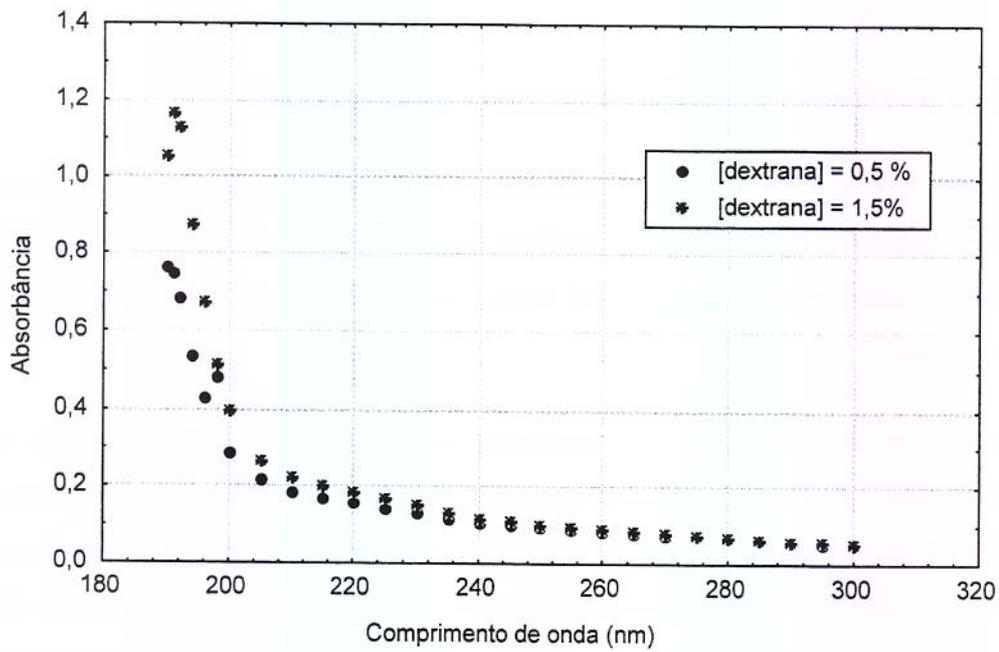


Figura 6.5: Varredura de soluções de dextrana em espectrofotômetro em vários comprimentos de onda

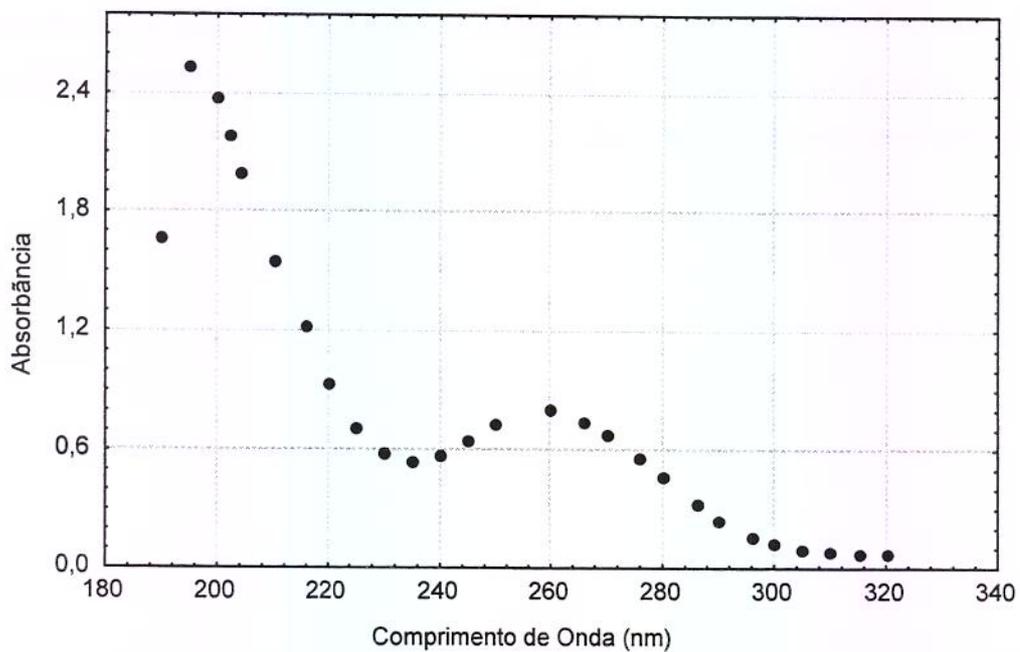


Figura 6.6: Medida da absorvância de solução de dextrana-sacarase contendo 25UDS/ml, em vários comprimentos de onda.

6.3.1.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.3.2.2. no capítulo 3.

6.3.1.5 Determinação da concentração de NaCl:

A determinação da concentração de eletrólito foi feita por titulação com nitrato de prata e dicromato de potássio como indicador.

Um volume de amostra variando de 1 a 5 mL, dependendo da concentração de cloretos presente, foi titulada com solução padronizada de AgNO_3 0,05 mol/L, até viragem do indicador K_2CrO_4 . devido à presença de CaCl_2 , foi feito um branco e a concentração, em mols/L de NaCl pode ser obtida pela expressão:

$$[\text{NaCl}] = 1,07 \times \text{Vol}_{\text{AgNO}_3}$$

6.3.2. Operação

Como já citado anteriormente, antes do início dos ensaios com o sistema, foram necessários vários testes preliminares para escolha do filtro mais adequado para o processo, procedimentos para sua limpeza e em função de sua vazão máxima escolha das demais vazões. As vazões de alimentação dos dois reatores e a de reciclo (F_1 , F_2 e F_r), foram definidas tendo em vista o objetivo de obter uma vazão homogênea tão alta quanto possível para evitar deposição de material sólido e entupimento das mangueiras, que eram de diâmetro pequeno. Assim não foi possível operar nas condições ótimas, definidas no capítulo 5, como era a primeira intenção deste trabalho.

Além disso a fração de líquidos teve que ser bastante alta, ou seja foi utilizada pequena quantidade de resina, para evitar entupimentos tanto nas mangueiras como do filtro. A concentração enzimática utilizada foi de 40 UDS/mL, equivalente a 1,6 g/L, com um volume total nos reatores de 400 mL em cada um.

Os primeiros ensaios foram feitos sem a adição de sacarose, para verificar a dinâmica do processo sem a preocupação de entupimentos devido ao aumento de viscosidade pela formação de dextrana. Por esse mesmo motivo quando a sacarose foi utilizada, uma concentração baixa foi mantida, da ordem de 50 g/L.

A Tabela 6.2 traz as condições de operação usadas nos ensaios, onde F_s é a vazão de saída do filtro, igual à soma das vazões F_1 e F_2 . A partir das vazões foram calculados os tempos de residência hidráulicos e de sólidos, resultando em $\tau_{h1} = 0,6$ h, $\tau_{h2} = 0,25$ h e $\tau_s = 24$ h.

A partida no processo foi dada assim que a enzima foi adicionada ao primeiro reator que já continha solução de CaCl_2 a 0,05 g/L e DEAE CELULOSE, nas mesmas quantidades que no segundo reator.

Tabela 6.2: Condições das variáveis utilizadas na operação do sistema

$F_1 = 6$ mL/min
$F_2 = 14$ mL/min
$F_r = 4$ mL/min
$F_s = 20$ mL/min
$C_o = 1,6$ g/L
$\varepsilon = 0,97$
$S_o = 50$ g/L
$E_o = 0,5$ mol/L
$V_1 = V_2 = 400$ mL

Temendo que a alta concentração salina pudesse trazer uma perda acentuada de enzima, interferindo nos resultados obtidos, foi feito ensaio de estabilidade da enzima em solução de CaCl_2 a 0,05 g/L e NaCl 0,5 mol/L. A dextrana-sacarase foi incubada nessa solução a 25°C, sob agitação, sendo retiradas amostras periodicamente. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.7.

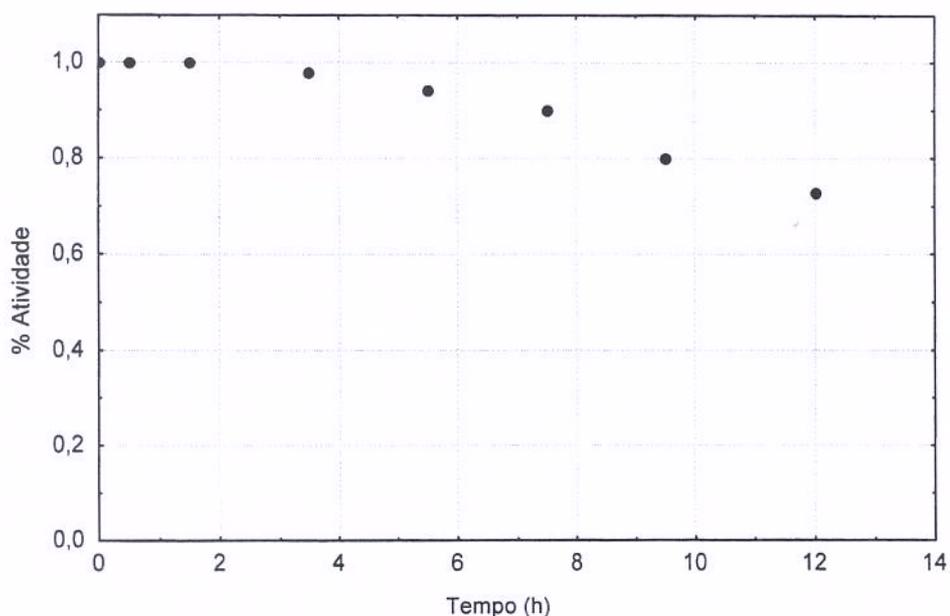


Figura 6.7: Perda de atividade da enzima dextrana-sacarase em solução de NaCl 0,5 mol/L e CaCl_2 0,05 g/L.

Pode-se perceber que nessas condições, passadas 12 horas são perdidas aproximadamente 30% da atividade inicial.

O tempo máximo de operação alcançado foi de 10 horas. Terminado cada ciclo o filtro tangencial foi submetido à lavagem por recirculação com solução 5% de celulase aquecida a 40°C e pH entre 4,8 e 5,0 por 2 horas. A seguir para inativar a celulase foi feito tratamento com solução de NaOH 7%, por aproximadamente 1 hora seguida de água até pH neutro.

6.4. Obtenção dos perfis de concentração e comparação com os dados obtidos por simulação

Como citado anteriormente os primeiros ensaios foram feitos sem utilização da sacarose, para verificar apenas o mecanismo de adsorção, seguidos de outros, onde a formação de dextrana pode ser verificada.

6.4.1. Ensaio na ausência de sacarose

Estes ensaios foram realizados nas condições descritas na tabela 6.2, com exceção da sacarose, que não foi utilizada.

Os resultados típicos destes ensaios estão representados na figura 6.8, onde se encontram a variação na concentração de enzima livre, de NaCl e no volume para o 1º estágio durante a operação. A figura 6.9 mostra os mesmos parâmetros para o 2º estágio.

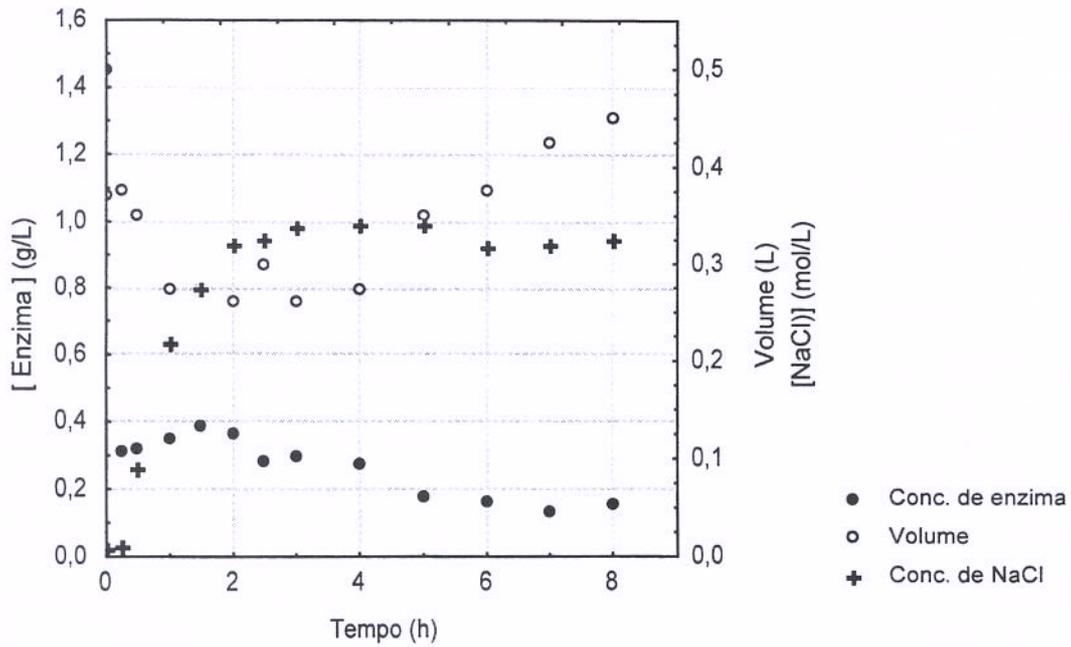


Figura 6.8: Variação do volume e concentrações de dextrana-sacarase livre e NaCl no 1º estágio durante a operação.

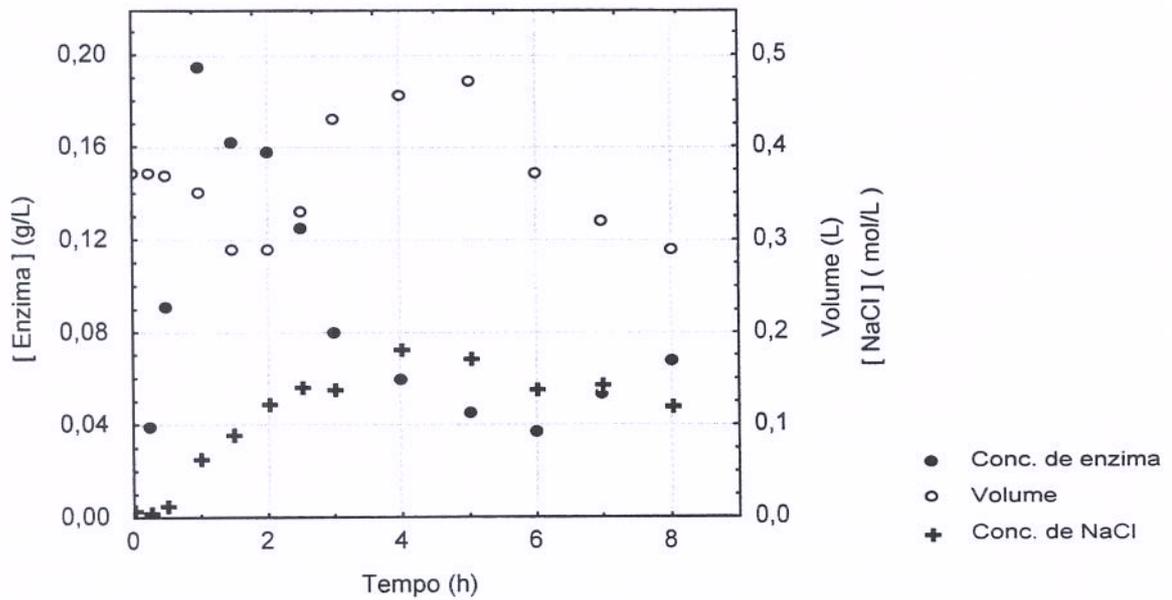


Figura 6.9: Variação do volume e concentrações de dextrana-sacarase livre e NaCl no 2º estágio durante a operação.

Através das figuras podemos perceber uma grande flutuação nos volumes dos reatores, principalmente no segundo reator. Isto se deve à grande dificuldade na manutenção das vazões dentro dos valores estipulados. Por serem vazões bastante baixas, houve dificuldade em mantê-las além disso frequentemente os sólidos em suspensão obstruíam as mangueiras e até que o problema fosse detectado e sanado, os volumes reacionais já tinham se alterado consideravelmente. Com isto nas nove horas de operação não foi possível atingir condições de regime permanente e um tempo maior não pode ser alcançado pela diminuição constante na vazão de saída do filtro devido ao depósito da resina. Outro fato observado durante a operação que deve ser levado em conta na análise dos resultados é a não uniformidade da quantidade de sólidos nos dois estágios, ou seja, devido aos constantes entupimentos e retenção da resina nas mangueiras e no filtro, foi possível perceber uma concentração maior de adsorvente no 1º reator.

Assim podemos perceber que aparentemente o 1º reator sofreu menos as inúmeras perturbações no sistema, havendo uma concentração de enzima em torno de 0,2 g/L no final do processo e uma concentração relativamente estável de NaCl, permanecendo em torno de 0,35 mol/L.

No segundo reator, apesar das oscilações observadas nos parâmetros, acompanhando a variação de volume, podemos perceber uma concentração enzimática menor que no 1º, entre 0,15 e 0,05 g/L, o que é coerente em se tratando do estágio de adsorção. Da mesma maneira a concentração de NaCl, menor que no primeiro estágio ficou em torno de 0,15 mol/L.

6.4.2. Ensaio com sacarose

Tendo adquirido maior experiência na operação do processo, foi então introduzida a sacarose, para observação da formação de dextrana. As condições de processo foram as mesmas apresentadas anteriormente (Tabela 6.1).

As Figuras 6.10 e 6.11 apresentam os perfis de concentração obtidos para o primeiro e segundo reatores respectivamente, possibilitando a observação da variação do volume, bem menor desta vez no 1º estágio, mas ainda grande no 2º.

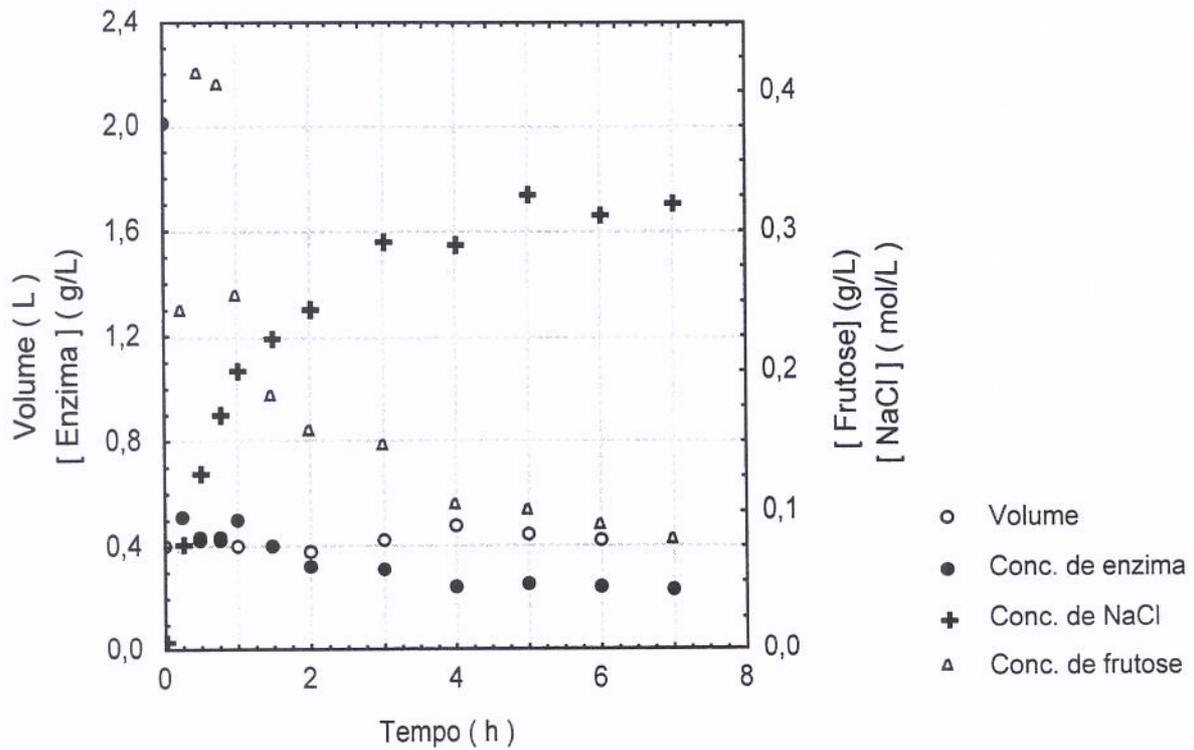


Figura 6.10: Perfis de concentração de dextrana-sacarase, NaCl, frutose e de variação de volume no 1º reator.

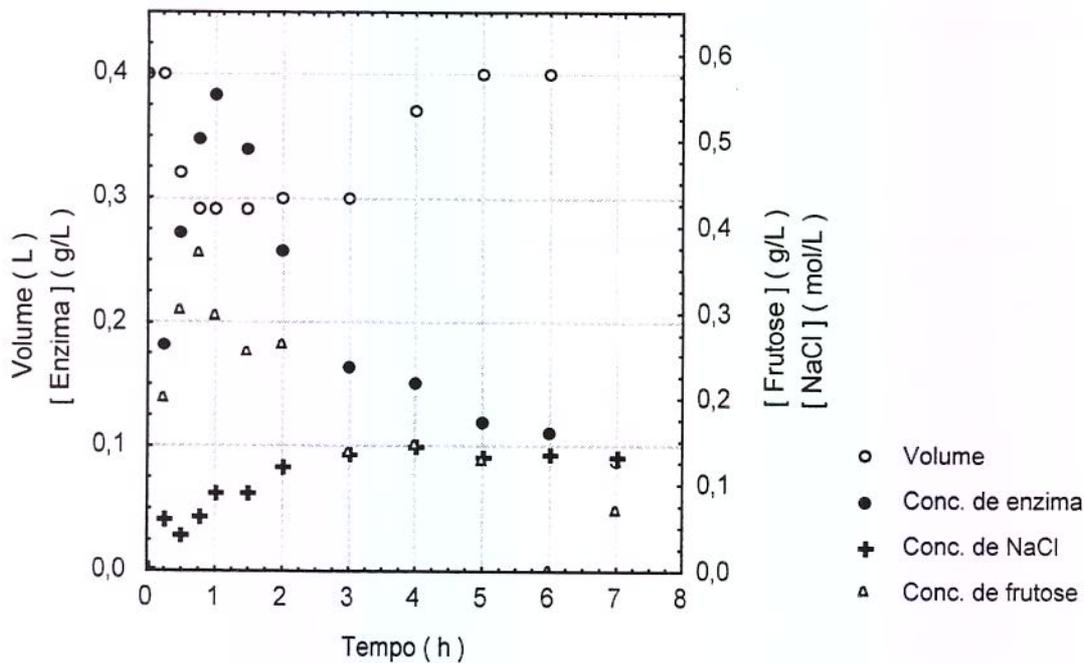


Figura 6.11: Perfis de concentração de dextrana-sacarase, NaCl, frutose e de variação de volume no 2º reator.

Devido à maior estabilidade no volume, as concentrações ficaram mais estáveis depois de 4 horas de processo. Em torno de 1 hora, pode-se perceber um pico na concentração de frutose, que coincide com o pico na concentração enzimática, indicando que nesse período a concentração de dextrana foi máxima, já que a concentração deste açúcar é proporcional à dextrana formada. Observa-se a seguir, que embora a concentração de enzima não caia drasticamente a de frutose cai bastante, isto pode ser devido a uma perda de atividade enzimática. Embora a perda de atividade seja inferior a 5%, com quatro horas de exposição a altas concentrações de NaCl (Figura 6.7), o processo de adsorção e dessorção pode interferir na atividade enzimática.

Na Figura 6.12, podemos verificar através do cromatograma da amostra retirada do 1º reator no tempo correspondente ao máximo de frutose, um pequeno pico com tempo de

retenção em torno de 18min. Este tempo de retenção é bastante próximo daquele apresentado pelo padrão de dextrana mostrado na Figura 6.5, confirmando a formação de dextrana durante o processo.

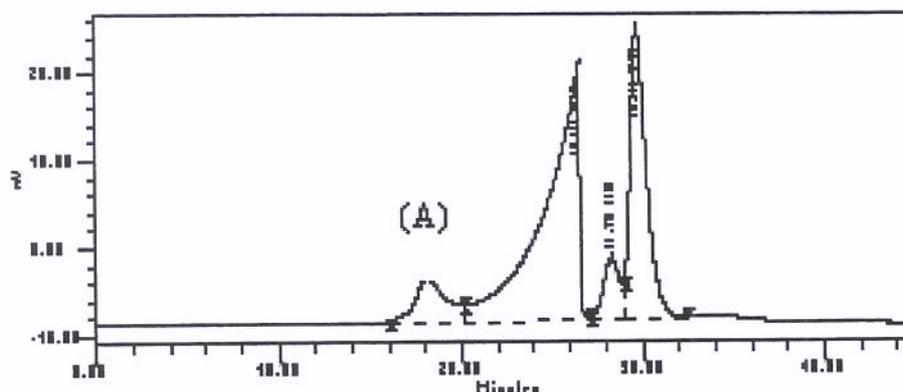


Figura 6.12: Cromatograma de amostra , onde (A), é pico correspondente à dextrana.

As Figuras 6.13 e 6.14 mostram os perfis de sacarose, dextrana-sacarase e NaCl nos dois reatores, em comparação com os valores previstos por simulação do modelo obtido no capítulo 4.

No 1º estágio pode-se observar um bom ajuste para a concentração de NaCl, o mesmo não acontecendo para a concentração de sacarose e de dextrana-sacarase. Embora aparentemente o comportamento de ambas previsto pelo modelo, seja semelhantes ao observado, os valores experimentais são aproximadamente 10% maiores para a sacarose e quase 10 vezes maiores para a enzima. Apesar dos problemas citados na operação do sistema, estes valores são reprodutíveis, pois são muito semelhantes aos obtidos na operação sem sacarose, indicando que o modelo precisa de alguns ajustes, principalmente no que diz respeito ao processo adsorptivo, para que seja mais representativo da situação real. A concentração de sacarose maior que o previsto pode ser consequência ainda de queda na atividade enzimática.

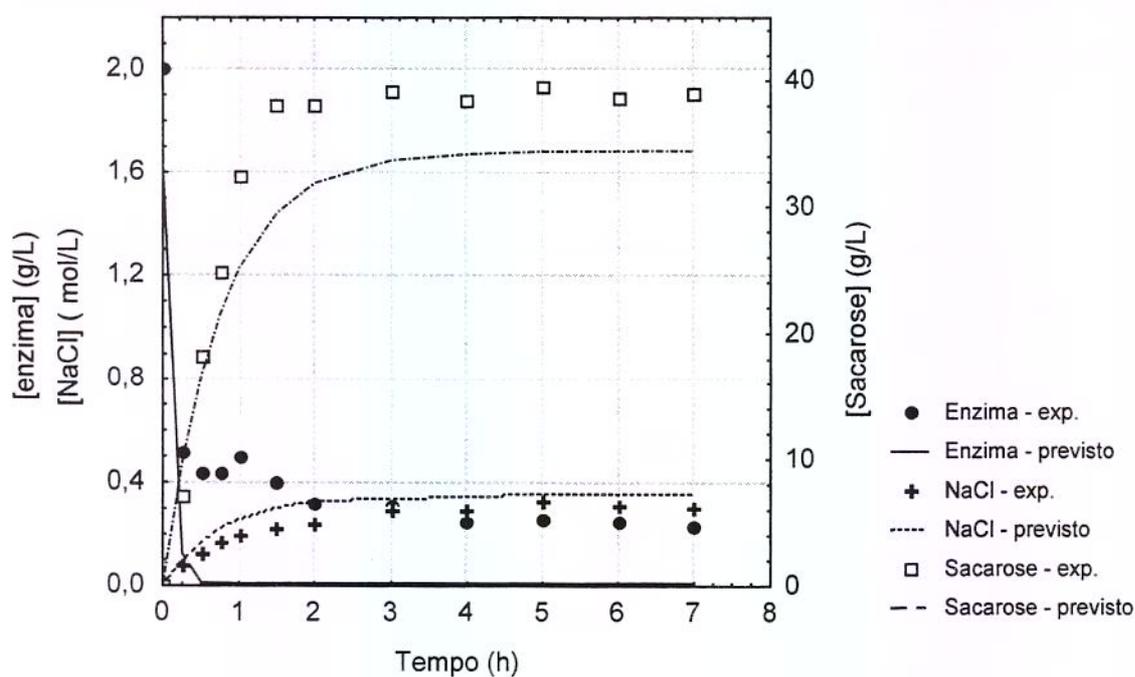


Figura 6.13: Valores de concentrações da enzima dextrana-sacarase, sacarose e NaCl, obtidos experimentalmente e previstos pelo modelo determinístico, no 1º estágio.

No 2º estágio, as observações são bastante semelhantes ao que já foi dito para o 1º estágio, levando em conta ainda que este estágio sofre mais com a variação das vazões. O comportamento de variação dos parâmetros é bastante semelhante ao previsto pelo modelo, mas ficam bem acima dos valores preconizados, embora bastante semelhantes aos obtidos no processo realizado na ausência de sacarose.

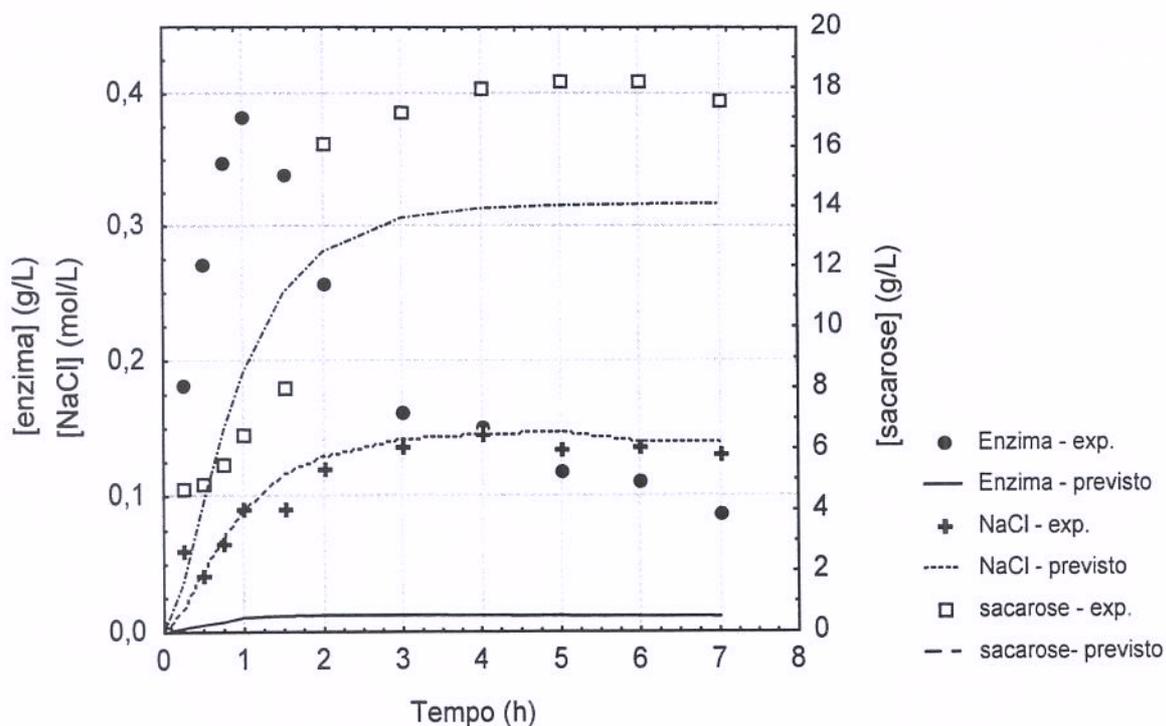


Figura 6.14: Valores de concentrações da enzima dextrana-sacarase, sacarose e NaCl, obtidos experimentalmente e previstos pelo modelo determinístico, no 2º estágio.

6.5. Conclusões:

Pelos resultados obtidos neste capítulo verificou-se a viabilidade da utilização deste sistema para a produção de dextrana. No entanto, muitos problemas quanto à operação do sistema foram detectados tais como: oscilação das vazões, entupimentos nas linhas e filtro. Uma alternativa que poderá solucionar grande parte das questões levantadas é a operação do sistema em escala maior, resultando em menores flutuações de vazões e consequentemente diminuição de entupimentos.

Ficou claro ainda a necessidade de ajustes no modelo matemático, provavelmente no que diz respeito ao processo de adsorção e dessorção. É importante alertar ainda para o fato de que durante o desenvolvimento do trabalho, mais de um lote de resina foi utilizado, o que pode explicar parte dos desvios observados.

7. Conclusões

- ◆ A metodologia proposta por Chase (1984) para obtenção dos parâmetros de adsorção e dessorção mostrou-se bastante eficiente para o sistema estudado. O estudo da variação dos parâmetros com a concentração de NaCl mostrou que o aumento desta causa um deslocamento do equilíbrio no sentido da dessorção não podendo ser desprezada, no entanto, a taxa de adsorção, mesmo em altas concentrações de NaCl. O valor da constante de adsorção k_1 permanece aproximadamente constante e igual a 2,22 L/g.h.
- ◆ A determinação experimental destes parâmetros possibilitou a obtenção de um modelo matemático mais condizente com a realidade prática. O modelo desenvolvido através de balanços de massa e equações cinéticas forneceu importantes informações sobre o comportamento do processo no estado dinâmico, mostrando ainda que o sistema não atinge o regime estacionário, devido à perda constante de dextrana-sacarase. Além disso é uma ferramenta extremamente útil para a seleção de variáveis importantes do processo bem como a otimização do mesmo.
- ◆ A metodologia baseada na metodologia de Plackett & Burman (1946) foi muito importante para estabelecer previamente as variáveis mais relevantes para otimização do rendimento, retenção enzimática e produtividade do processo. Das sete variáveis inicialmente investigadas foram selecionadas cinco: tempo de residência de sólidos (τ_s), tempo de residência hidráulico no 1º estágio (τ_{h1}), tempo de residência hidráulico no 2º estágio (τ_{h2}), fração de líquidos (ϵ) e concentração de sacarose na alimentação (S_0).
O método de planejamento experimental fatorial e análise de superfícies de resposta mostrou-se útil no estudo da otimização do processo. Através dele foi possível estabelecer as condições de operação para obtenção de rendimento e produtividade elevados com boa porcentagem de retenção da dextrana-sacarase no sistema.
Utilizando uma fração de líquidos de 0,8, tempo de residência de sólidos de 50 h, tempo de residência hidráulico no 1º estágio de 3 h e no 2º de 0,2 h, com concentrações de sacarose, NaCl e dextrana-sacarase na alimentação de 125 g/L, 0,5 mol/L e 8 g/L

respectivamente obtém-se um rendimento de 91%, produtividade em torno de 220 g/L.h e quase 50% da enzima permaneceu retida no sistema depois de 40 h de operação. Estes resultados foram confirmados pela otimização da resposta otimizada. Para obter valores mais elevados de retenção enzimática (em torno de 79%), deve-se manter um tempo de residência no 2º estágio de 0,6 h, havendo neste caso pequena queda no rendimento, para 85%, e uma diminuição bastante significativa da produtividade para 81-89 g/L.h. Esta metodologia possibilitou ainda prever as respostas em termos de rendimento, produtividade e retenção da enzima frente a alguma perturbação do sistema. Isto é muito interessante não só para melhorar o conhecimento do processo, como também para fornecer informações úteis a trabalhos futuros como estratégias de controle operacional.

- ◆ A operação do sistema foi bastante importante para a verificação da viabilidade de sua utilização para síntese de dextrana. Muitos problemas foram encontrados durante os testes preliminares, mas foi possível chegar a um conjunto de equipamentos bastante adequados ao funcionamento do processo. Grande parte dos problemas encontrados na operação do sistema poderão ser solucionados com um aumento de escala, que possibilitará condições mais estáveis de vazão e menos problemas com entupimentos. O processo mostrou-se viável para produção de dextrana, sendo uma alternativa bastante interessante pela possibilidade de reutilização da dextrana-sacarase, insumo de alto custo de produção e que não pode ser obtida comercialmente.

8. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Testar outras resinas para retenção de dextrana-sacarase e obtenção dos parâmetros de adsorção e dessorção
- Testes de operação em escala ampliada.
- Estudos sobre perda de atividade da enzima durante o processo em tempo prolongado de operação
- Estudo de estratégias de controle do processo

9. Referências Bibliográficas

- AFEYAN, N. B. ; GORDON, N. F. ;COONEY, C. L. - Mathematical modelling of the continuous affinity-recycle extraction purification technique. **J. Chromatography**,478 : 1-19, 1989.
- AJONGWEN, N. J. & BARKER, P. E. - Scale-up studies of non-aerated fed-batch fermentation of dextransucrase and the industrial synthesis of dextran using the enzymatic route. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 56, 1, 113-118, 1993.
- ALSOP, L. - Industrial production of dextran. **Progress in Ind. Microbiol.**, 18 : 1-44,1983.
- BARBOZA, M. – **Estudo cinético de adsorção, modelagem dinâmica e otimização de processo contínuo de purificação de Cefalosporina C.** Campinas, 1998. 167p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.
- BARKER, P. E., GANETSOS, G. & AJONGWEN, N. J. - A Novel Approach to the Production of Clinical Grade Dextran. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, 57, 21-26, (1993)
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**; 1ª edição. Campinas; Editora da UNICAMP, 1995. 278 p. Série Manuais
- BLANCH, H. W., DREW, S. ; WANG, D. I. C. **Comprehensive Biotechnology.**, 3:1005-1043, 1986.
- BLANCH, H. W. & CLARK, D. S. **Biochemical Engineering.** New York: Marcel Dekker, Inc. 1997, 702 p.
- BOX, G. E. P. ; HUNTER, S. W. ; HUNTER, J. S. - **Statistics for Experimenters - an introduction to design, data analysis and model building.** New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1978.

- BOYER, P. M. & HSU, J. T. – Adsorption Equilibrium of proteins on a dye-ligand adsorbent. **Biotechnol. Techniques**, 4 (1): 61-66, 1990
- BROWN, D. E. & McAVOY, A. A pH controlled fed-batch process for dextransucrase production. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, 48: 405-414, 1990.
- BUSSO, E. M.; RESNICK, L. - Anti-human immunodeficiency virus effects of dextran sulfate are strain dependent and synergistic on antagonistic when dextran sulfate is given in combination with dideoxynucleosides. **Antimicrob. And Chemoth.**, 34 (10): 1991-1995, 1990.
- CASTRO, P. M. L., HAYTER, P. M., ISON, A. P., BULL, A. T. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by chinese hamster ovary cells. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 38, 84-90, 1992
- CHANG, H. N.; GHIN, Y. S., CHO, Y. R.; LANDIS, D. A.; REILLY, P. J. Immobilization of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase to porous phenoxycetyl cellulose scads **Biotech. Bioeng.**, 23, 2642-2653, 1981.
- CHASE, H. A. – Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. **J. Chromatography**, 297: 179-202, 1984
- CHASE, H. A. – Adsorption separation processes for protein purification. In: Alan R. Liss Inc. **Downstream Processes: Equipment and Techniques**. P. 159-204, 1988.
- CHASE, H. A & DRAEGER, N. M. – Affinity purification of proteins using expanded beds. **J. Chromatography**, 597: 129-145, 1992.
- COWAN, G. H. ; GOSLING, I. S. ; SWEETENHAM, W. P. - Modelling for scale-up and optimisation of packed - bed columns in adsorption and chromatography., In: VERRALL, M. S. & HUDSON, M. J. , ed. **Separations for Biotechnology**. Ellis Horwood Ltd., cap. 10, p. 152-75, 1987.

- CURRALERO, I. C. B. - **Estudo da produção e dextrana de baixo peso molecular por via enzimática.** Campinas, 1993. 164p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.
- DE BELDER, A. N. - Dextran. In : **Ulman's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Weinheim, W. Gerhart, A-8: 449-454,1987.
- EBERT, K. H. ; SCHENK, G. - Mechanisms of biopolymer growth : the formation of dextran and levan. **Adv. Enzymol.**, 30: 179-221, 1968.
- GARCIA, J.O. ; PALASI, V.V. - *Microbiologia Industrial*, 391-415, 1962
- GORDON, N. F. ; TSUJIMURA, H. ; COONEY, C. L. - Optimization and simulation of continuous affinity-recycle extraction (care). , **Bioseparation** 1: 9-21, 1990.
- GOODMAN, G. A . In: **Goodman and Gilman's - The Pharmacological basis of therapeutics**, 7^a Ed., vol 12, MacMillan Publishing Company, NY, 1985.
- GUIMARÃES, D. P., COSTA, F. A . A ., RODRIGUES M.I. and MAUGERI, F. - Optimization of Dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian J. of Chem. Eng.**,16 (2), 129-139, 1999.
- HARSA, S. ; PYLE, D. L. ; ZAROR, C. A. - Adsorption of polygalacturonase in CM-sephadex gels. , In : PYLE, D. L., ed. **Separations for biotechnology II**. Elsevier, 1990.
- HEFTMANN, E. - **J. Chromatography**, 1983., v. 22A, cap. 7.
- HEHRE, E. J. - Production from sucrose of a serologically reactive polyssacharide by a sterile bacterial extract. **Science**, 93, 237-239, 1941.
- HEHRE, A. J. - Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. **J. Bol. Chem.** , 163, 221-223, 1946.

- HEHRE, E. J. - Low molecular weight dextran as a modifier of dextran synthesis. **J. Am. Chem. Soc.** , 75, 4866, 1953.
- HEHRE, E. J. Polysaccharide synthesis from disaccharides, In; Colowick, S. P. & Kaplan, N. O ., ed. **Methods in Enzimology**. Academic Press, New York, 1955,p. 178-184.
- HORSTMANN, B. J. ,KENNEY, C. N., CHASE, H. A . – Adsorption of proteins on Sepharose affinity adsorbents of varying particle size. **J. Chromatography**, 361: 179-190, 1996
- JEANE, A.; WILHAM,C.A.; JONES,R.W.; TSUCHIYA,H.M.; RIST,C.E.- Isomaltose and isomaltotriose from enzymic hydrolyses of dextran. **J. Am. Soc.** , 75, 5911-5915 ,1954.
- JEANES, A. - Extracellular microbial polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technol.**, 28, 34-40, 1974.
- JUNG, S. M.; MAYER, R. M. - Dextran-sucrase : donor substrate reactions. **Arch Biochem. Biophys.**, 208, 288-295, 1981.
- KABOLI,H.; REILLY,P.J.-Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. **Biotech. Bioeng.**, 23, 1055-1069, 1980.
- KALIL, S. J. **Modelagem, simulação e otimização de um processo de fermentação alcoólica contínua e com reciclo de células em reator cascata**. Campinas, 1997. 93p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.
- KALIL, S. J. **Estudo da recuperação e purificação de inulinase utilizando coluna de leite expandido**. Campinas, 2000 Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

- KALIL, S. J., MAUGERI, F., RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, 35, 539-550, 2000a.
- KAMIMURA, E. S., MANDIETA, O. , SATO, H. H., PASTORE, G. and MAUGERI, F. Production of lipase from *Geotrichum* sp and adsorption studies on affinity resin. *Brazilian J. of Chem. Eng.*, 16 (2), 103-112, 1999.
- KARTHIKEYAN, R. S.; RAKSHIT, S. K.; BARADARAJAN, A. Optimization of batch fermentation conditions for dextran production. **Bioprocess. Eng.** 15 (5): 247-251, 1996.
- KIM, D. & ROBYT, J. F. Properties and use of dextransucrase elaborated by a new class of *Leuconostoc mesenteroides* mutants. **Prog. Biotechnol.**; 12, 125-144, 1996.
- KISAALITA, W. S., SLININGER, P. J., BOTHAST, R. J., Defined media for optimal pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* 2-79, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 39, 750-755, 1993
- KOBAYASHI, M.; MATSUDA, K.- Structural Characteristics of Dextran synthesized by dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F , **Agric. Biol. Chem.**, 41(10), 1931-1937, 1977.
- KOBAYASHI, M. ; MATSUDA, K. - Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, **Biochem. Biophys. Acta**, 614, 46-62, 1980.
- KOBS, S. F. Acceptor activity of affinity- immobilized dextransucrase from *Streptococcus sanguis* ATCC 10558. **Carbohydrate Res.** 211, 337-342, 1991.
- KOEPSSELL, H. J. ; TSUCHIYA, H. M. - Enzymatic syntesis of dextran, **J. Bact.**, 63,293-295, 1952.

- KUBOTA, N., KOUNOSU, M., SAITO, K., SUGITA, K., WATANABE, K. SUGO, T. – Protein adsorption and elution performances of porous hollow fiber membranes containing various hydrophobic ligands. **Biotechnol. Progress**, 13:89-95, 1997.
- LANDON, R. S. ; WEBB, C. - Separating enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process , **Proc. Biochem.**, 19-23, 1990.
- LEE, S.; CHOI, S. ; KIM, E.; KOO, Y. - Continuous production of clinical dextran using two-stage reactor, **Biotechnology Letters** , 14, 379-384, 1992.
- LOPES, A. - **Production, purification et immobilization de la dextran-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F.** Toulouse, 1979. Tese (Doutor em Engenharia) n° 26 - INSA - França.
- MANDIETA, O. **Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica.** Campinas, 1999. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP.
- MARGARITIS, A. , TE BOKKEL, D. - Rheology and air bubble terminal velocity measurements in non-Newtonian polysaccharide solutions **Am. Chem.Soc.**,26-31,1983.
- MARTINEZ- ESPÍNDOLA, J. P. & LOPEZ - MUNGUÍA, C. A. - On the kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batchreactors., **Biotechnol. Letters** 7(7): 483-486, 1985.
- McINTIRE, J. J., BULL, A . T., BUNCH, A . W. Vancomycin production in batch and continuous culture, **Biotechnology and Bioeng.**, 49, 412-420, 1996
- MILAGRES, A. M. F. & LACIS, L. S. Efficient screening of process variables in *Penicilium janthinellum* fermentations. **Biotechnolgy Letters**, 13 (2): 113-118, 1991.

- MILLER, A. W.; EKLUND, S. H.; ROBYT, J.F. - Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F., **Carbohyd. Res.** 14 : 119-133, 1986.
- MILLER, A. W. & ROBYT, J. F. - Activation and inhibition of dextransucrase by calcium, **Biochem. Biophys. Acta**, 880(1): 32-39, 1986.
- MILLER, A. W. & ROBYT, J. F. - Stabilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, polyethylene glycol and highmolecular weight dextran., **Biochem. Biophys. Acta** 785(3): 89-96, 1984.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, 31, 426-428, 1959.
- MIZUTANI, N. ; YAMADA, M.; TAKAYAMA, K.; SHODA, M. Constitutive mutants for dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL b 512-F, **J. Ferm. Bioeng.** 77(3), 248-251, 1994.
- MONSAN, P. & LOPES, A. - On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase., **Biotech. Bioeng.** 23: 2027-2037, 1981.
- MONSAN, P.; ORIOL, E.; AURIOL, D.; PAUL, F. - Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled molecular weight dextrans, **Carbohyd. Res.**, 149,433-441, 1986.
- PAUL, F.; AURIOL, D.; ORIOL, E.; MONSAN, P. Production and purification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512-F. **Enzyme Eng.** 7, 267-270, 1984.
- PEREIRA, A. M. Estudo da produção de dextrana clínica utilizando glicose como receptor. Campinas, 1996. 120 p. TESE (Mestre em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

- 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**, 20 (4), 397-401, 1998.
- PLACKETT, R. L. & BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305-325, 1946.
- PUNGOR, E.; AFEYAN, N. B.; GORDON, N. F.; COONEY, C. L. Continuous Affinity-recycle extraction: a novel protein separation technique, **Biotechnology**, 5, 604-608, 1987.
- QUEIROZ , J. H. - **Contribuição ao estudo da dextrana - sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***, Campinas, 1989. 118p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.
- QUEIROZ, J. H. & Maugeri, F. Otimização da produção de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melão como fonte de carbono. **Ver Microbiol.** 20(2), 150-156, 1989.
- REH, K. D. BORCHERS, M. N., BUCHOLZ, K. Productivity of immobilized dextransucrase for leucrose formation. **Enzyme and Microbial Technology** 19 : 518-524, 1996
- REISCHWITZ, A. ; REH, K. D. ; BUCHOLZ, K. Unconventional immobilization of dextransucrase with alginate. **Enzyme and Microbial Technology** 17 : 457-461, 1995.
- ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K. WALSETH, T. F. The mechanism of dextransucrase action: direction of dextran biosynthesis. **Arch. Biochem. Biophys.** 165, 634-640, 1974
- ROBYT, J. F.; TANIGUCHI, H. The mechanism of dextransucrase action: biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. **Arch. Biochem. Biophys.**, 174, 129-135, 1976.

- ROBYT, J. F.; CORRIGAN, ^a J. The mechanism of dextransucrase action: activation of dextransucrase from *Streptococcus mutans* OMZ 176 by dextrans and the non existence of the primer requirement for the synthesis of dextrans. **Arch. Biochem. Biophys.** 183, 726-731, 1977.
- ROBYT, J. F.; WALSETH, T. F. - The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase, **Carbohy. Res.**, 61, 433-445, 1978.
- ROBYT, J. F. ; WALSETH, T. F. - Production , purification and properties of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, **Carbohy. Res.**, 68, 95-111, 1979.
- ROBYT, J. F. Mechanism of action of dextransucrase. Proc Symp. Mechanism of saccharide polymerization and depolymerization- Miami Beach, 1978 Publ. Academic Press 43-45, 1980.
- RODRIGUES, M. I.; ZAROR, C. A. *et al.* - Dynamic modelling simulation and control of continuous adsorption recycle extraction., **Chem. Eng. Science** 47(1) : 263-269, 1992.
- RODRIGUES, M. I. - **Modelagem, simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas.** Campinas, 1993. 208 p. TESE (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
- RODRIGUES, M. I., KALIL, S. J., MAUGERI, F. **Planejamento Fatorial e “Screening Design” como ferramenta para otimização de processos bioquímicos,** XII SINAIFERM, 1998
- SANDFORD, P. A. & BAIRD, J. - Industrial utilization of polysaccharides. **The polysaccharides** Academic Press, N. Y., 1983. cap.2, p. 412-90.
- SANTOS, V. M. **Estudo das condições de hidrólise ácida para obtenção de dextrana clínica.** Campinas, 1996. 107 p. TESE (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

- SCHISLA, D. K. CARR, P. W., CUSSLER, E. L. – Role fiber array affinity chromatography. *Biotechnol. Prog.*, 11: 651-658, 1995
- SETFORD, J. S. & BARKER, P. E. Combined bioreaction and separation in centrifugal fields using zonal rotors. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 61: 19-29, 1994.
- SILMAN, R. W. ; NELSEN, T. C. ; BOTHAST, R. J. Comparison of culture methods for production of *Colletotrichum truncatum* spores for use as a mycoherbicide. **FEMS Microbiology Letters** .79: 69-74, 1991.
- SILVA, C. F. **Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose.** Campinas, 1998. TESE (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP
- SKIDMORE, G. L. & CHASE, H. A. - Multi-component adsorption of proteins to ion exchangers , *Sep. Biotechnol. (Pap. Int. Symp.)*, Dep. Chem. Eng. , Univ. Cambridge, U. K., 2: 418-427, 1990.
- STOWE, R. A. & MAYER, R. P. Efficient screening of process variables. **Ind. Eng. Chem.** 58 (2), 36-40, 1966.
- STRINGER, C. S. ; TSUCHIYA, H. M. - A kinetic study of dextransucrase, **J. Am.Chem. Soc.**, 80, 6620-6625, 1958.
- TAILLANDIER, P.; GILIS, F.; PORTUGAL, F. R. ; LAFORCE, P. ; STREHAIANO, P. Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology Letters**, 17 (8), 775-780, 1996.
- TSUCHIYA, H. M. - Dextransucrase, **Bull. Soc. Chem. Biol.**, 42(12), 1778-1788, 1960.
- TSUCHIYA, H. M.; KOEPESELL, H. J.; CORMAN, I.; BRYANT, G.; BOGARD, M. °; FEGER, V. H.; JACKSON, R. W. The effect of certain culture factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Bacteriol.**, 64, 513-519, 1952.

YAMAMOTO, S.; NAKANISHI, K.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Ion exchange chromatography of proteins – Prediction of Elution curves and operating conditions. II. Experimental verification. **Biotech. Bioeng.**, 25, 1373-1391, 1983.

VELJKOVIC, B. V. ; LAZIC, M. L.; SCALA, D. U. - Studies on dextran fermentation broth rheology, **Enzyme Microb. Technol.**, 10, 683-686, 1988.

APÊNDICE A

Tabela A .1: Dados experimentais da adsorção em batelada de dextrana-sacarase em DEAE
CELULOSE a 25° C em solução de CaCl₂ 0,05 g/L e pH 5,2, com diferentes
concentrações de NaCl (Figura 3.5)

<i>Sem NaCl</i>		<i>[NaCl]=0,1 mol/L</i>		<i>[NaCl]=0,25 mol/L</i>		<i>[NaCl]=0,5 mol/L</i>	
<i>C*(g/L)</i>	<i>q*(g/Lres)</i>	<i>C*(g/L)</i>	<i>q*(g/Lres)</i>	<i>C*(g/L)</i>	<i>q*(g/Lres)</i>	<i>C*(g/L)</i>	<i>q*(g/Lres)</i>
0,043	100,34	0,14	208,21	0,15	120,39	0,127	57,09
0,063	151,47	0,24	358,32	0,16	141,78	0,39	129,64
0,10	204,79	0,34	428,28	0,28	205,14	0,54	160,56
0,12	268,17	0,36	538,44	0,36	320,65	0,75	162,19
0,18	348,15	0,49	628,37	0,44	348,66	0,73	286,48
0,20	448,23	0,53	728,49	0,66	476,99	0,92	322,83
0,28	518,16	0,69	768,30	0,79	590,53	1,02	393,12
0,32	644,91	0,85	968,39	0,88	609,01	1,40	376,90
0,38	724,89			0,91	676,56	1,54	489,48
0,48	784,77						
0,59	981,44						

Tabela A .2: Dados de C/Co experimentais e ajustados com valores estimados de k_1 , em função do tempo, nas várias concentrações de NaCl (Figura 3.7)

Tempo(min)	sem NaCl				[NaCl]=0,1 mol/L				[NaCl]=0,25 mol/L				[NaCl]=0,5 mol/L			
	150 Exp	150 Aj.	300 Exp	300 Aj.	150 Exp	150 Aj.	300 Exp	300 Aj.	150 Exp	150 Aj.	300 Exp	300 Aj.	150 Exp	150 Aj.	300 Exp	300 Aj.
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1,2	0,80	0,80	0,78	0,79	0,86	0,80	0,83	0,71	0,85	0,80	0,90	0,81	0,98	0,96	0,94	0,93
2,4	0,63	0,65	0,62	0,64	0,60	0,65	0,53	0,55	0,64	0,66	0,67	0,68	0,91	0,93	0,88	0,88
3,6	0,51	0,54	0,52	0,54	0,47	0,54	0,41	0,45	0,55	0,57	0,56	0,60	0,87	0,90	0,84	0,85
4,8	0,44	0,46	0,45	0,46	0,42	0,47	0,35	0,39	0,50	0,51	0,51	0,54	0,85	0,88	0,82	0,82
6,0	0,39	0,40	0,40	0,40	0,39	0,41	0,32	0,35	0,46	0,47	0,48	0,50	0,84	0,86	0,80	0,80
8,4	0,36	0,35	0,36	0,35	0,37	0,37	0,31	0,33	0,45	0,45	0,47	0,47	0,82	0,84	0,79	0,80
9,6	0,34	0,32	0,33	0,32	0,36	0,34	0,30	0,31	0,43	0,23	0,46	0,45	0,81	0,83	0,78	0,78
10,8	0,29	0,28	0,31	0,30	0,35	0,32	0,30	0,31	0,43	0,42	0,45	0,44	0,81	0,81	0,78	0,77
12,0	0,28	0,27	0,29	0,28	0,34	0,31	0,29	0,30	0,42	0,41	0,44	0,43	0,80	0,80	0,77	0,77
13,2	0,26	0,25	0,28	0,26	0,34	0,30	0,29	0,30	0,42	0,40	0,44	0,43	0,80	0,79	0,77	0,77
14,4	0,26	0,24	0,26	0,25	0,34	0,28	0,29	0,30	0,42	0,40	0,44	0,43	0,80	0,79	0,77	0,76
15,6	0,25	0,23	0,25	0,24	0,34	0,28	0,28	0,30	0,42	0,40	0,44	0,42	0,79	0,78	0,77	0,76
16,8	0,25	0,22	0,24	0,24	0,33	0,28	0,28	0,29	0,41	0,40	0,44	0,42	0,79	0,77	0,76	0,76
18,0	0,24	0,22	0,24	0,23	0,33	0,27	0,28	0,29	0,41	0,39	0,43	0,42	0,79	0,77	0,76	0,76
19,2	0,24	0,21	0,23	0,23	0,32	0,27	0,28	0,29	0,41	0,39	0,43	0,41	0,78	0,76	0,76	0,76
20,4	0,23	0,21	0,22	0,22	0,32	0,27	0,28	0,29	0,41	0,39	0,43	0,41	0,78	0,76	0,76	0,76
22,8	0,22	0,20	0,22	0,22	0,32	0,27	0,28	0,29	0,41	0,39	0,43	0,41	0,78	0,76	0,76	0,76
24,0	0,22	0,20	0,21	0,22	0,32	0,27	0,28	0,29	0,41	0,39	0,43	0,41	0,77	0,75	0,76	0,76

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE