



Produção biotecnológica de sorbitol e ácido lactobiónico com separação simultânea em sistema de leito móvel simulado

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto para o grau de
Doutor em Engenharia Química e Biológica

por

Israel Pedruzzi

Supervisionado pelo professor Doutor Alírio Egídio Rodrigues e
Doutor Eduardo Alberto Borges da Silva



Laboratório de Processos de Separação e Reacção, Laboratório Associado LSRE/LCM
Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto



Programa Operacional Ciência e Inovação 2010
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



Maio 2010

FEUP-LSRE/LCM - Universidade do Porto

© Israel Pedruzzi, 2010

Todos os direitos reservados

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar aos meus orientadores, Professor Doutor Alírio Egídio Rodrigues e Doutor Eduardo Alberto Borges da Silva. Ao Professor Alírio, agradeço toda a atenção e apoio para que eu pudesse realizar este estudo e os objetivos mais importantes do meu trabalho. Ao Doutor Eduardo, quero lhe agradecer toda a atenção e dedicação nas diversas fases deste meu estudo e, também, a amizade nas diversas situações que acompanham a vida longe de casa.

Estou muito grato ao Professor Doutor Mauricio Moura da Silveira e a Professora Doutora Eloane Malvessi pela grande amizade, cultivada desde o tempo da minha graduação, e por todo o apoio necessário na realização deste estudo.

Agradeço a todos os meus colegas do LSRE, especialmente de Carla Pereira, Sofia Rodrigues, Marta Abrantes, Isabel Martins, Pedro Sá Gomes, Viviana Silva, Miguel Granato, João Pedro Lopes, Alexandre Ferreira, Miguel Teixeira, Nuno Lourenço e Susana Cruz pela amizade, colaboração e apoio sempre que necessário.

A Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pelo apoio financeiro (Bolsa de Investigação: SFRH / BD / 24709 / 2005), através do co-financiamento do POCI 2010 e do FSE .

Em especial, gostaria de agradecer profundamente a minha família e amigos, pelo carinho, amor, apoio e confiança, principalmente aos meus pais que estão sempre juntos comigo em minhas conquistas e em meu coração.

Agradeço a minha querida Amy por todo o carinho, amor, confiança e equilíbrio que dá a minha vida.

Por último, porém o mais importante, agradeço a Deus pela vida e por todos os momentos, as experiências e conquistas, as pessoas com quem compartilho o tempo, as emoções e o conhecimento.

Muito obrigado!

Para minha família

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte.”

Mahatma Ghandi

Resumo

A temática deste estudo foi a produção e separação cromatográfica, empregando a tecnologia de Leito Móvel Simulado (LMS), do sorbitol e ácido lactobiónico (AL), formados na reacção de bioconversão da mistura lactose e frutose catalisada pelas enzimas glicose-frutose oxidoretutase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), contidas em células da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC29191. As diversas etapas inerentes ao processo foram subdivididas em duas linhas principais de investigação: de bioprocesso e de separação.

A cinética de bioconversão da mistura lactose e frutose usando as enzimas GFOR e GL figura o comportamento de enzimas regulatórias do tipo cooperativo com efeito heterotrópico. A cinética da GFOR modelada pela clássica equação ping-pong é eficiente para baixas concentrações da lactose (20 a 100 mM). A cinética para altas concentrações de lactose (400 a 700 mM), mantendo obrigatoriamente fixa a concentração da frutose em 350 mM, foi ajustada através do modelo de Hill com o mecanismo do tipo ping-pong. A cinética com células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio igual a 1,2 mm não apresentou importante efeito de resistência à transferência de massa, e promoveram o aumento do rendimento e da produtividade do processo. A melhor condição investigada para o processo de bioconversão é alcançada com uma composição inicial de lactose e frutose não equimolar, 700 mM e 350 mM, respectivamente, e gera no final da reacção uma mistura ternária equimolar dos produtos e da lactose não convertida.

O estudo da separação das substâncias decorrente do processo de bioconversão (lactose, frutose, AL e sorbitol) incluiu o estabelecimento de uma metodologia de quantificação rápida e eficiente em cromatografia líquida, assim como a seleção de resinas e a determinação das condições de equilíbrio e cinética de adsorção nas fases estacionárias com contra-íão K^+ e Ca^{++} . A separação por cromatografia líquida com a tecnologia de leito móvel simulado e suas configurações derivadas foram avaliadas como instrumentos para a obtenção dos produtos AL e sorbitol puros, bem como possibilitar o reciclo dos substratos. Arranjos em série com duas unidades de LMS se mostram indicados para a separação, mas são necessárias duas fases estacionárias distintas, uma para cada unidade. Uma unidade pseudo-LMS de 4 secções carregada com resina na forma K^+ é indicada à separação da mistura de bioconversão que leva o consumo completo da frutose e à obtenção de uma mistura ternária equimolar.

Abstract

The thematic of this study was the production and chromatographic separation, using the Simulated Moving Bed technology (SMB), of the sorbitol and lactobionic acid (AL) formed in the bioconversion reaction from a mixture of lactose and fructose, catalyzed by glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) and glucono- δ -lactonase (GL) enzymes contained in cells of the bacterium *Zymomonas mobilis* ATCC29191. The various steps involved in the process were divided into two main lines of research: bioprocess and separation.

The bioconversion kinetics from the mixture of lactose and fructose, using GFOR and GL enzymes, figure the behavior of regulatory enzymes with cooperative and heterotropic effects. The kinetics of GFOR modelled by the classical equation ping-pong is efficient for low concentrations of lactose (20 to 100 mM). The kinetics for high concentrations of lactose (400 to 700 mM), maintained fixed the concentration of fructose in 350 mM mandatorily, was fitted through the Hill model with mechanism ping-pong type. The kinetic with *Z. mobilis* cells immobilized in Ca-alginate beads with 1.2 mm of the average diameter showed no important effect to mass transfer resistance, and promoted an increased efficiency and productivity of the process. The best condition investigated for the bioconversion reaction process is achieved with a not equimolar initial composition of lactose and fructose, 700 mM and 350 mM, respectively, and an equimolar ternary mixture of the products and the lactose unconverted is produces at the end of the reaction.

The study about separation of substance from the bioconversion process (lactose, fructose, sorbitol and AL) included the establishment of a methodology in liquid chromatography to quantify rapidly and efficiently, as well as the selection of resins and determining the conditions of equilibrium and kinetics adsorption in stationary phases with counter-ion K^+ and Ca^{++} . The separation by liquid chromatography system with simulated moving bed technology and its derivatives configuration were evaluated as tools for obtaining pure LA and sorbitol products, and enable the recycling of substrates. Two SMB units arranged in series are shown suitable for the separation, but require two different stationary phases, one for each unit. A single pseudo-LMS 4 sections load with K^+ resin form shown indicated to the separation of the mixture from the bioconversion carried out to the total fructose consumption and obtaining an equimolar ternary mixture.

Résumé

La thématique de cette étude a été la production et la séparation chromatographique, à l'aide de la technologie à lit mobile simulé (SMB), de sorbitol et l'acide lactobionique (AL) formé durant la réaction de bioconversion d'un mélange de lactose et de fructose, catalysé par des enzymes glucose-fructose oxidoreductase (GFOR) et gluconique- δ -lactonase (GL) contenues dans les cellules de la bactérie *Zymomonas mobilis* ATCC29191. Les différentes étapes impliquées dans le processus ont été divisées en deux grands axes de recherche: des bioprocédés et de séparation.

La cinétique de la bioconversion du lactose et le mélange de fructose utilisant des enzymes et GL GFOR figure le comportement des enzymes de régulation de l'effet coopératif avec effet hétérotopique. La cinétique de GFOR modélisée par l'équation classique « ping-pong » est efficace pour de faibles concentrations de lactose (20 à 100 mM). La cinétique de fortes concentrations de lactose (400 à 700 mM), maintenant obligatoirement une concentration fixe de fructose de 350 mM, a été ajustée par le modèle de Hill dans le type de mécanisme « ping-pong ». La cinétique avec des cellules *Z. Mobilis* immobilisées dans des billes d'alginate de Ca d'un diamètre moyen de 1,2 mm n'a pas montré d'effet significatif de résistance au transfert de masse, et a amené une plus grande efficacité quant à la productivité du processus. Les conditions optimales du processus de bioconversion sont réalisées avec une composition initiale de lactose et de fructose non équimolaire, soit 700 mM et 350 mM respectivement, et à la fin de la réaction nous constatons la présence d'un mélange équimolaire ternaire de produits et avec du lactose non converti.

L'étude de la séparation des substances dérivées du procédé de bioconversion (lactose, fructose, sorbitol et AL) a inclus la mise en place d'une méthodologie permettant une quantification rapide et efficace en chromatographie en phase liquide, ainsi que la sélection de résines, la détermination des conditions de l'équilibre et la cinétique d'adsorption dans les phases stationnaires avec des contre-ions K^+ et Ca^{++} . La séparation par chromatographie en phase liquide avec la technologie à lit mobile simulé et ses dérivés paramètres ont été évalués comme outils pour obtenir des produits purs LA et sorbitol, et de permettre le recyclage des substrats. Disposés en série avec les unités de LMS, deux sont ainsi indiqués et conviennent pour la séparation ; mais cela nécessite deux types de phases stationnaires, un pour chaque

unité. La unité pseudo-LMS à 4 sections avec des résine sous forme K^+ c'est indiqué à la séparation du mélange de bioconversion qui porte la consommation totale de fructose et de l'obtention d'un mélange équimolaire ternaire.

TABELA DE CONTEÚDOS

LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE TABELAS	xxviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 RELEVÂNCIA E MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJECTIVOS E DELINEAMENTO	4
2 ESTADO DA ARTE.....	7
2.1 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS	7
2.2 MERCADO DO SORBITOL E DO ÁCIDO LACTOBIÓNICO	12
2.3 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE SORBITOL E ÁCIDO LACTOBIÓNICO	16
2.3.1 SORBITOL – PROCESSOS FÍSICO-QUÍMICOS	16
2.3.2 ÁCIDO LACTOBIÓNICO – PROCESSOS FÍSICO-QUÍMICOS	19
2.3.3 ÁCIDO LACTOBIÓNICO – BIOPROCESSOS	20
2.3.4 GLICOSE-FRUTOSE OXIDOREDUCTASE (GFOR)	21
2.3.5 PROCESSOS DE REACÇÃO E SEPARAÇÃO COM GFOR	24
2.3.6 PROCESSOS DE ADSORÇÃO E LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)	26
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA*	39
3.1. INTRODUÇÃO.....	39
3.1 MATERIAIS.....	42
3.1.1 PRODUTOS QUÍMICOS.....	42
3.1.2 EQUIPAMENTOS	42
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.2.1 SEPARAÇÃO SOBRE A RESINA β -CYCLODEXTRINA	43
3.2.2 TESTES DE SEPARAÇÃO COM RESINAS DE TROCA IÓNICA FORTES	44
3.3 CONCLUSÕES.....	49
3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

4 CULTIVO DA <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i>, PRÉ-TRATAMENTOS E CINÉTICA DE BIOCONVERSÃO DA GFOR PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍONICO E SORBITOL	53
4.1 INTRODUÇÃO	54
4.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	56
4.2.1 CULTIVO CELULAR.....	56
4.2.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	58
4.2.3 IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	66
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.3.1 MICRORGANISMO.....	67
4.3.2 MEIO DE CULTIVO	67
4.3.3 PRODUTOS QUÍMICOS	67
4.3.4 EQUIPAMENTOS	68
4.3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	68
4.3.6 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	70
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.4.1 EXPERIÊNCIAS DE CULTIVO CELULAR	77
4.4.2 EXPERIÊNCIAS DE CINÉTICA DE BIOCONVERSÃO	82
4.5 CONCLUSÕES.....	103
4.6 NOMENCLATURA	106
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
5 SELEÇÃO DE RESINAS, EQUILÍBRIO E CINÉTICA DE ADSORÇÃO*.....	111
5.1 INTRODUÇÃO	112
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	114
5.2.1 PRODUTOS QUÍMICOS	114
5.2.2 EQUIPAMENTOS	114
5.2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	115
5.2.4 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	116
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
5.3.1 SELECÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA PARA A SEPARAÇÃO QUATERNÁRIA	122
5.3.2 ISOTÉRMICAS DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO	131
5.3.3 CINÉTICA DE DSORÇÃO	136
5.3.4 ADSORÇÃO DE MISTURAS MULTI-COMPONENTE	140
5.4 CONCLUSÕES	142

5.5 NOMENCLATURA.....	144
LETRAS GREGAS.....	144
SUBSCRITOS	145
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
6 TECNOLOGIA DE LEITO MÓVEL SIMULADO APLICADA À BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍONICO	149
6.1 INTRODUÇÃO.....	150
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	155
6.2.1 ESTRATÉGIAS PARA A SEPARAÇÃO QUATERNÁRIA.....	155
6.2.2 PARÂMETROS DE ADSORÇÃO DOS COMPONENTES NA RESINA DOWEX 50W-X4 - Ca ⁺⁺	157
6.2.3 ARRANJO E CONFIGURAÇÕES DE UNIDADES DE SEPARAÇÃO PARA O PROCESSO	159
6.2.3.1 - SISTEMA 1- TRÊS UNIDADES DE LMS EM CASCATA.....	159
6.2.3.2 - SISTEMA 2 - DUAS UNIDADES DE LMS EM CASCATA.....	161
6.2.3.3 - SISTEMA 3 - COLUNA CROMATOGRÁFICA DE LEITO FIXO E UMA UNIDADE DE LMS.....	161
6.2.3.4 - SISTEMA 4 - TECNOLOGIA DE PSEUDO-LMS.....	162
6.3 DESCRIÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS DAS UNIDADES DE SEPARAÇÃO	163
6.3.1 UNIDADE DE LMS	163
6.3.2 UNIDADE DE PSEUDO-LMS	165
6.3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A RESOLUÇÃO NUMÉRICA DOS MODELOS MATEMÁTICOS	170
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	171
6.4.1 PARÂMETROS DE EQUILÍBRIO – RESINA DOWEX 50W-X4 NA FORMA Ca ⁺⁺	171
6.4.2 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS - DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	172
6.4.2.1 - SISTEMA 2	175
6.4.2.2 - SISTEMA 3	192
6.4.2.3 - SISTEMA 4	200
6.5 CONCLUSÕES.....	208
6.6 NOMENCLATURA.....	211
SUBSCRITOS	212
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213
7 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	217

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.01	Estrutura dos açúcares mono- e dissacarídeos nas configurações cíclica e acíclica da cadeia carbônica. <i>ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software</i>	8
Figura 2.02	Estrutura dos ácidos aldônicos e do poliálcool (sorbitol). <i>ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.</i>	10
Figura 2.03	Produtos comerciais derivados da lactose obtidos através de processos biotecnológicos. <i>ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.</i>	14
Figura 2.04	Mecanismo de formação do sorbitol, gluconato e etanol a partir de uma solução de glicose e frutose por <i>Z. mobilis</i> . <i>ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.</i>	22
Figura 2.05	Diagrama do tetrâmero da GFOR, com o espaço compreendido pelo NADP indicado por setas. Cada uma dos monômeros da GFOR apresenta intensidade de cor diferenciada (Kingston <i>et al.</i> , 1996).	23
Figura 2.06	Diagrama dos monômeros da GFOR (a) e da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase G6PD (b). Em ambas estruturas o domínio do N-terminal está em azul e o domínio do C-terminal em púrpura. Os contornos estão em amarelo. (Kingston <i>et al.</i> , 1996)	24
Figura 2.07	Fluxograma típico das unidades de separação em LMV e LMS de quatro secções.	28
Figura 2.08	Fluxograma das etapas de operação do sistema JO quatro secções, sendo a operação do LMS na segunda etapa representada em um LMV equivalente.	29

Capítulo 3

- Figura 3.01** Cromatogramas mono-componente de lactose, frutose, sorbitol e AL ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), em coluna carregadas com β -Cyclodextrin (Cyclobond I 2000, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$). A coluna foi eluída a $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com uma solução de acetonitrila: NaH_2PO_4 10mM (70:30), pH 3.0 e a 20°C . (1 – frutose, 2 – sorbitol, 3 – lactona, 3' – ácido lactobiônico e 4 – lactose), (Malvessi, 2005). 43
- Figura 3.02** Efeito da temperatura sobre o cromatograma da solução de referência (ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol) em eluente contendo ácido sulfúrico (0.450 mM , pH 3.1). Coluna ICSep ICE-ION-300, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$ a 20°C e 75°C eluída com 0.5 mL min^{-1} . (1 - ácido lactobiônico, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol). 45
- Figura 3.03** Efeito do pH do eluente na separação da mistura de lactose, frutose, sorbitol e AL. Cromatograma da mistura das substâncias na concentração de $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Eluente: diversas concentrações de ácido sulfúrico. Coluna ICSep ICE-ION-300 ($300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$) a 75°C e eluída a $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. (1 - AL, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol). 46
- Figura 3.04** Cromatograma da solução de referência preparada com o eluente acidificado (H_2SO_4 , 0.450 mM , pH 3.1) mostrando a presença da lactobionolactona no tempo de retenção de 6 min. e o pico assimétrico do ácido lactobiônico. Coluna ICSep ICE-ION-300, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$ a 20°C e 75°C eluída com 0.5 mL min^{-1} . (1 - ácido lactobiônico, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol). 47
- Figura 3.05** Cromatograma da solução de referência preparada em (H_2SO_4 , 0.450 mM , pH 3.1) mostrando a presença da lactobionolactona no tempo de retenção de 6 min. e o pico assimétrico do ácido lactobiônico. Coluna ICSep ICE-ION-300, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, $7 \mu\text{m}$ a 20°C e 75°C eluída com 0.5 mL min^{-1} . (1 - ácido lactobiônico, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol). 48
- Figura 3.06** Cromatograma individual do ácido lactobiônico, lactose, frutose e sorbitol ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) preparado em solução de H_2SO_4 (0.500 mM , pH 2.8). Coluna HPX-87H, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, $9 \mu\text{m}$ a 60°C eluída com 0.6 mL min^{-1} . (1 - ácido lactobiônico, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol). Este cromatograma foi obtido em CLAE Agilent Technology modelo 9100 (Malvessi, 2005). 49

Capítulo 4

Figura 4.01	Curva de correlação da densidade óptica em função da massa seca, em amostra de células da <i>Z. mobilis</i> ATCC29191.	69
Figura 4.02	Cromatograma da solução de referência 3 g·L ⁻¹ utilizada na quantificação da glicose, etanol e sorbitol das amostras de fermentação durante o cultivo da <i>Z. mobilis</i> ATCC29191. (1) glicose; (2) sorbitol; (3) etanol.	70
Figura 4.03	Unidade de fermentação utilizada no cultivo das células de <i>Z. mobilis</i> ATCC29191. a) reservatório de nutrientes; b) reservatório de glicose; c) módulo de controle do biorreactor e módulo de ação do controlador do pH; d) entrada de KOH no reactor; e) biorreactor; f) bomba peristáltica; g) conector de amostragem do biorreactor.	71
Figura 4.04	Experiência de bioconversão iorreactor enzimático utilizado nos ensaios de cinética da GFOR. a) biorreactor enzimático; b) controlador da frequência de agitação e de temperatura; c) módulo de controle do biorreactor e módulo de ação do controlador do pH; d) válvula solenóide; e) termopar; f) sonda de pH; g) pipeta graduada com KOH.	74
Figura 4.05	Curvas de consumo de glicose (S), de crescimento celular (X) e de formação de etanol (P) em cultivo da <i>Z. mobilis</i> ATCC29191. Curvas obtidas durante a terceira fermentação (a) e a nona fermentação (b) no processo fermentativo conduzido em modo semi-contínuo.	78
Figura 4.06	Curvas de velocidade específica do consumo de glicose (μ_S), de crescimento celular (μ_X) e de formação de etanol (μ_P) em cultivo da <i>Z. mobilis</i> ATCC29191. Curvas obtidas para a terceira (a) e a nona (b) corrida de fermentação do processo fermentativo em modo semi-contínuo.	81
Figura 4.07	Cinética da GFOR para a produção do AL com células de <i>Z. mobilis</i> ATCC 29191. (a) Efeito da concentração inicial da lactose em meio com concentração inicial de frutose em 350 mM. (b) Efeito da concentração inicial da frutose em meio com concentração inicial de lactose em 700 mM. Quantificação do AL pelo método indireto (o), em HPLC através da leitura da área (Δ) e altura (∇) de pico. Condições: 39°C, pH 6.4, 350 rpm, $[X] = 7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (células, peso seco).	83

- Figura 4.08** Gráfico de Lineweaver-Burk considerando o modelo cinético do mecanismo ping-pong para o substrato lactose na faixa de altas e baixas concentrações, em fixadas concentrações iniciais de frutose (350, 550 e 700 mM). Componentes quantificados (o) pelo consumo de KOH; (Δ), (∇) pela área e altura, respectivamente, de pico em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 5M), 350 rpm, $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (massa celular, peso seco). 85
- Figura 4.09** Cinética da GFOR para a produção de AL em sistemas com distintas concentrações iniciais de lactose e frutose. Concentrações iniciais: (a) 350 mM de frutose e 10 e 20 mM de lactose. (b) 550 mM de frutose e 10, 20 e 40 mM de lactose. (c) 700 mM de frutose e 10, 20 e 100 mM de lactose. (d) 350, 550 e 700 mM de frutose e 10 e 20 mM de lactose. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2 a 0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco). 86
- Figura 4.10** Linearização das velocidades de reação inicial do AL para os sistemas com lactose à baixa concentração usando as diversas representações gráficas para obtenção de parâmetros cinéticos. Valores de coeficientes angulares e lineares da equação da velocidade de reação linearizada para o modelo ping-pong (Eq. 19). 87
- Figura 4.11** Cinética da GFOR para o consumo da lactose (10 e 20 mM) e produção do AL. Concentrações iniciais de frutose: (a) 350 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através da equação da velocidade de reação modelo ping-pong. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco). 89
- Figura 4.12** Cinética da GFOR para o consumo da lactose (700 mM) e produção do AL, com distintas concentrações iniciais de frutose: (a) 350 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através da equação da velocidade de reação modelo ping-pong. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco). 90

- Figura 4.13** Gráfico da velocidade de reacção em função da concentração da lactose, mantendo a concentração inicial de frutose em 350 mM. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 5M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco). 92
- Figura 4.14** Cinética da GFOR para o consumo da lactose em distintas concentrações iniciais e produção do AL, mantendo a concentração inicial de frutose em 350 mM. Concentração inicial da lactose (a) 450 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através do modelo de Hill. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco). 93
- Figura 4.15** Cinética da GFOR para o consumo da lactose e produção do AL mantendo a concentração inicial de lactose em 700 mM. Concentração inicial de frutose (a) 350 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através do modelo de Hill. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco). 94
- Figura 4.16** Cinéticas de produção de AL usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* na condição de células livres. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), células (7.19 g.L^{-1} e 4.79 g.L^{-1}). Concentrações determinadas pelo método indireto (o), e em HPLC ($\square$). Valores previstos através da equação de Hill com $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ e $[X] = 4.79 \text{ g.L}^{-1}$ (—). 96
- Figura 4.17** Cinéticas de produção do AL usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* na condição de células imobilizadas em esferas de Ca-alginato (diâmetro médio $\phi_{\text{médio}} = 1.2 \text{ mm}$). Concentrações iniciais da lactose/frutose (700/350 mM). Concentrações determinadas pelo método indireto (o), e por HPLC ($\square$). $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.4 \text{ g.L}^{-1}$ de Ca-alginato, e $[X]_{\text{livre}} = 4.79 \text{ g.L}^{-1}$ (volume do reactor). (—) Valores previstos através da equação de Hill para $[X]_{\text{imobilizado}}$ e (---) para $[X]_{\text{livre}}$. 98

- Figura 4.18** Cinéticas de consumo da lactose usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1,2 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), biocatalisador $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Concentrações determinadas pelo método indireto (o), e por HPLC (Δ). Curva prevista pelo modelo de Hill com $[X] = 14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ convertida para volume da fase fluída (—). 99
- Figura 4.19** Cinéticas de consumo da frutose e formação do sorbitol usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1.2 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), células totais por volume de reactor ($4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Concentrações determinadas em HPLC (o) sorbitol ($\square$) frutose. (—) Curva predita pelo modelo de Hill com $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ convertida para volume da fase fluída. 100
- Figura 4.20** Cinéticas de produção do AL usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1.7 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), $[X]_{\text{imobilizado}} (14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1})$. Concentrações determinadas pelo método indireto ($\square$), e em HPLC (o). 101
- Figura 4.21** Cinética de consumo da lactose usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio de 1.7 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM). Substâncias quantificadas em HPLC. Condições: 39°C , pH6.4 (KOH 3.5 M), 350 rpm, concentração celular $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (peso seco). 102
- Figura 4.22** Cinética de consumo da frutose e formação do sorbitol usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio de 1,7 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM). Substâncias quantificadas em HPLC. Condições: 39°C , pH6.4 (KOH 3,5 M), 350 rpm, concentração celular $[X]_{\text{imobilizado}} = 14,40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (peso seco). 103

Capítulo 5

- Figura 5.01** Cromatogramas de pulsos mono-componentes para a frutose, lactose, AL e sorbitol sobre o leito de resina Dowex Monosphere 99 na forma Ca^{2+} (134 mm $\times$ 26 mm I.D.). Eluente: água deionizada. Caudal: 9 mL $\cdot$ min $^{-1}$. Temperatura: 293K. 123
- Figura 5.02** Cromatogramas de pulsos mono-componentes para a frutose, lactose, AL e sorbitol e da mistura quaternária sobre o leito de resina: (a) Dowex 50WX8 H^+ (114 mm $\times$ 26 mm I.D.) e (b) Dowex 50WX4 H^+ (116 mm $\times$ 26 mm I.D.) usando água deionizada como eluente; e (c) Dowex 50WX4 H^+ usando solução de H_2SO_4 como eluente. Caudal: 4 mL $\cdot$ min $^{-1}$. Temperatura: 293K. 124
- Figura 5.03** Cromatogramas de pulsos mono-componentes para a frutose, lactose, AL e sorbitol e da mistura quaternária sobre o leito de resina: (a) Dowex 50WX8 K^+ (114 mm $\times$ 26 mm I.D.) e (b) Dowex 50WX4 K^+ (116 mm $\times$ 26 mm I.D.). Eluente: água deionizada. Caudal: 4 mL $\cdot$ min $^{-1}$. Temperatura: 293K. 130
- Figura 5.04** Isotermas de equilíbrio de adsorção de resina Dowex 50WX4 K^+ (4% DVB) adsorvendo AL, (L) lactose, (S) sorbitol e (F) frutose à (a) 293 K, (b) 313K e (c) 333K. (símbolos) – pontos experimentais, (linhas) – curvas de ajuste. (aberto) método de adsorção-dessorção; (fechado) método de análise frontal. 133
- Figura 5.05** Calor de adsorção para a frutose (F), lactose (L) e sorbitol (S) sobre a resina Dowex 50WX4 (K^+). Gráfico de *van't Hoff*. 136
- Figura 5.06** Perfis experimentais e numéricos de concentração de (a) lactose, (b) frutose, (c) sorbitol adsorvendo sobre a resina Dowex 50WX4 K^+ (4% DVB; 50 μm) em 293K. Caudal: 6 mL $\cdot$ min $^{-1}$ (104 mm $\times$ 26 mm I.D.); (símbolos) – pontos experimentais, (linhas) – curvas de ajuste. 138
- Figura 5.07** Perfis experimentais e numéricos de concentração adimensional de AL adsorvendo sobre a resina Dowex 50WX4 K^+ (4% DVB; 50 μm) em (a) 293K, (b) 313K e (c) 333K. Caudal: 6 mL $\cdot$ min $^{-1}$. (símbolos) – pontos experimentais, (linhas) – curvas de ajuste. (—) modelo de equilíbrio dispersivo; (—) modelo de equilíbrio não-dispersivo para mais alta concentração de alimentação em cada temperatura. 139

- Figura 5.08** Dados experimentais e resultados calculados para a separação da mistura de lactose/AL sobre a resina Dowex[®] 50W-X4 K⁺. Condições de alimentação: (□) lactose, $C_o=121.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (○) AL, $C_o=50.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; eluente, H₂O em $6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; comprimento do leito, 9.85 cm (293K). 141
- Figura 5.09** Dados experimentais e resultados calculados para a separação da mistura quaternária sobre a resina Dowex[®] 50W-X4 K⁺. Condições de alimentação: (○) AL, $C_o=35.4\text{g/L}$; (□) lactose, $C_o=79.2\text{g/L}$; (△) sorbitol, $C_o=18.4\text{g/L}$; (◇) frutose, $C_o=42.0\text{g/L}$; eluente, H₂O a 6mL/min ; comprimento do leito, 9.85 cm (293K). 142

Capítulo 6

- Figura 6.01** Unidade de Leito Móvel Simulado; (a) esquema representativo da permutação das correntes de entrada e saída na unidade (t^* - tempo de permutação das correntes), (b) princípio de separação da mistura dos componentes A (menos adsorvido) e B (mais adsorvido) nas quatro secções da unidade (ads. – adsorve, des. – desorve). 150
- Figura 6.02** Esquema das etapas de operação do sistema JO, sendo a operação da unidade de LMS na segunda etapa (sem alimentação) representada conforme uma unidade de Leito Móvel Verdadeiro equivalente. Ordem de afinidades dos componentes A, B e I com a fase adsorvente: $A < I < B$. 154
- Figura 6.03** Unidade de Leito Móvel Simulado, e equivalente unidade de Leito Móvel Verdadeiro, para a separação de substratos de produtos da reacção de oxidação da lactose através das enzimas GFOR/GL. 157
- Figura 6.04** Arranjo de três unidades de LMS, empacotadas com a resina sob a forma potássio, para a separação da mistura composta de lactose, frutose, AL e sorbitol (substratos e produtos da oxidação de lactose usando as enzimas GFOR/GL). 160

Figura 6.05	Arranjo de duas unidades de LMS (LMS 1 - resina sob a forma potássio; LMS 2 - resina sob a forma cálcio), para a separação da mistura composta de lactose, frutose, AL e sorbitol (substratos e produtos da oxidação de lactose usando as enzimas GFOR/GL)	161
Figura 6.06	Arranjo de uma coluna cromatográfica (leito de resina sob a forma potássio) e uma unidade de LMS (resina sob a forma cálcio), para a separação da mistura composta de lactose, frutose, AL e sorbitol (substratos e produtos da oxidação de lactose usando as enzimas GFOR/GL).	162
Figura 6.07	Esquema das etapas de operação para a unidade de pseudo-LMS na separação quaternária de AL, lactose, sorbitol e frutose. (A operação da unidade de LMS na etapa 2 é representada por uma operação equivalente em uma unidade de LMV).	163
Figura 6.08	Esquema da unidade baseada no sistema pseudo-LMS operando na etapa 1.	166
Figura 6.09	Esquema da unidade baseada no sistema pseudo-LMS operando na etapa 2.	167
Figura 6.10	Tempo estequiométrico do componente em função da razão volume do leito e caudal de eluente. Pulsos injectados em duas concentrações das substâncias: 130g/L e 65g/L. Adsorvente: resina DOWEX 50W-X4 na forma Ca^{+2} ; eluente: água destilada e deionizada. Temperatura: 293K.	171
Figura 6.11	(a) Plano de separação $m_{2,LMS2}$ versus $m_{3,LMS2}$ (pureza superior a 99.9%) para valores de $m_{1,LMS2}$ iguais a 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 ($t_{LMS2}^* = 2.72\text{min}$; $m_{4,LMS2} = 0.28$), da unidade de LMS 2 na separação de frutose e lactose (refinado) do sorbitol (extracto); (b) Volume de separação $m_{1,LMS2} \times m_{2,LMS2} \times m_{3,LMS2}$ ($t_{LMS2}^* = 2.72\text{min}$; $m_{4,LMS2} = 0.28$) da unidade de LMS 2.	181
Figura 6.12	Perfis de concentração média nas secções da unidade de LMS 2, no estado cíclico estacionário, na separação da mistura ternária (lactose, frutose e sorbitol) decorrente da corrente de extracto da unidade de LMS 1 ($Q_{El} = 73.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Al} = 26.95 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ra} = 46.19 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ex} = 53.89 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Re} = 34.37 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $t_{LMS2}^* = 2.72\text{min}$). Propriedades na Tabela 6.3. Sorbitol recuperado no Extracto.	183

- Figura 6.13** Condições de operação no plano $m_{2,LMSI}$ versus $m_{3,LMSI}$ com distintos tempos de permutação para cada valor do parâmetro $m_{2,LMSI}$, permitindo a separação de AL de (F+S+L) com pureza >99.9% nas correntes de colecta. Comparação de três caudais de extracto na unidade de LMS 1: 12, 19 e 26mL/min. (a) $m_{1,LMSI} = 1.2$; (b) $m_{1,LMSI} = 0.7$. 184
- Figura 6.14** Condições de operação no espaço $m_{1,LMSI} \times m_{2,LMSI} \times m_{3,LMSI}$ com distintos tempos de permutação para cada valor do parâmetro $m_{1,LMSI}$ e $m_{2,LMSI}$, permitindo a separação de AL de (F+S+L) com pureza >99.9% nas correntes de colecta. Caudais de extracto na saída da unidade de LMS1: (a) 26mL·min⁻¹, (b) 19 mL·min⁻¹ e (c) 12 mL·min⁻¹. 186
- Figura 6.15** Fluxograma da estratégia de obtenção das condições de operação no sistema de conexão directa entre as duas unidades de LMS. Condições restritivas baseadas nas purezas nas correntes de colecta das duas unidades. 188
- Figura 6.16** Perfis de concentração média nas secções da unidade de LMS 1, no estado cíclico estacionário, na separação de ácido lactobiónico da fracção composta por lactose, frutose e sorbitol, mistura decorrente do processo de oxidação de lactose usando GFOR/GL ($Q_{EILMSI} = 38.92$ mL·min⁻¹; $Q_{AILMSI} = 15.67$ mL·min⁻¹; $Q_{RaLMSI} = 16.45$ mL·min⁻¹; $Q_{ExLMSI} = 38.14$ mL·min⁻¹; $Q_{ReLMSI} = 30.00$ mL·min⁻¹; $t^*_{LMSI} = 1.0$ min). Propriedades na Tabela 6.3. AL recuperado no refinado. 192
- Figura 6.17** Princípio de operação no processo cromatografico de eluição. 193
- Figura 6.18** Produtividade total máxima para valores otimizados de t_{ciclo} e t_{inj} em função do caudal de eluição no processo descontínuo de separação de ácido lactobionico da fracção contendo lactose, frutose e sorbitol. Características da coluna: $L_D=1.2$ m; $D_D=0.026$ m; $\varepsilon=0.34$; $Pe=700$. 196
- Figura 6.19** (a) Perfil de concentração das substâncias da mistura quaternária ao longo da coluna cromatográfica (8 colunas da unidade de LMS 1) no tempo igual a 8.17min; (b) e (c) Perfil de concentração da primeira e segunda fracção, respectivamente, no intervalo de tempo de colecta no primeiro ciclo do processo. (d) Ciclos de operação da colunas cromatográfica nas condições: $t_{ciclo}= 27.23$ min, $t_{inj} = 2.27$ min e $Q_{Elu} = 25.0$ mL·min⁻¹. 197

Figura 6.20	Perfis de concentração dos componentes na separação ternária na unidade de pseudo-LMS (estado cíclico estacionário); (—) lactose (L); (.....) frutose (F) e (----) sorbitol (S). Tempo de operação: (a) no final da etapa 1; (b) no final da etapa 2. Condições de operação: Tabela 6.8.	207
--------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.01	Propriedades físico-químicas das substâncias.	12
Tabela 2.02	Estimativa de valores de mercado para a lactose, frutose, sorbitol e AL.	15

Capítulo 4

Tabela 4.01	Parâmetros do cultivo da bactéria <i>Z. mobilis</i> ATCC 29191 para a produção das enzimas GFOR e GL.	80
Tabela 4.02	Valores obtidos para os parâmetros cinéticos $v_{\max}$, K_F e K_L da equação da velocidade derivada do modelo ping-pong para prever a cinética de oxidação da lactose, a baixas concentrações, usando a GFOR.	88
Tabela 4.03	Valores obtidos para os parâmetros cinéticos $v_{\max}$, K_F , K_L e n da equação de Hill para a velocidade, derivada do modelo ping-pong, para prever a cinética de oxidação da lactose, a baixas concentrações, usando a GFOR.	92
Tabela 4.04	Análise granulométrica das esferas de Ca-alginato contendo as células da <i>Z. mobilis</i> imobilizadas.	95

Capítulo 5

Tabela 5.01	Características das resinas de troca iónica e dos empacotamentos de leito fixo.	115
Tabela 5.02	Propriedades das substâncias.	121
Tabela 5.03	Valores do factor de retenção (k_s) e do factor de separação (α) para as diferentes resinas.	127
Tabela 5.04	Constantes de equilíbrio de adsorção para soluções mono-componentes de frutose, lactose e sorbitol sobre a resina Dowex [®] 50WX4 na forma K^+ (4% DVB) em diferentes temperaturas. Calor de adsorção de compostos.	132
Tabela 5.05	Calor de adsorção e parâmetros anti-Langmuir para soluções mono-componentes de ácido lactobiónico sobre a resina Dowex [®] 50WX4 na forma K^+ (4% DVB) em diferentes temperaturas.	135
Tabela 5.06	Efeito da temperatura e concentração do ácido lactobiónico sobre a porosidade do leito.	135

Capítulo 6

Tabela 6.01	Constantes de adsorção linear e de transferência de massa das substâncias lactose, sorbitol e lactose. Colunas empacotadas com resina DOWEX 50W-X4 na forma potássio e na forma cálcio (293K).	172
Tabela 6.02	Restrições de fluxo para operação dos sistemas sugeridos com unidades de LMS.	175
Tabela 6.03	Características das colunas das unidades de LMS no sistema 1.	177
Tabela 6.04	Variáveis de desempenho para os parâmetros $m_{1,LMSI}$, $m_{2,LMSI}$ e $m_{3,LMSI}$ ($m_{4,LMSI}=0.046$) com maior produtividade e menor consumo de eluente na separação de AL da fracção (F+L+S) para diferentes caudais de extracto.	187

Tabela 6.05	Condições de operação e variáveis de desempenho para o sistema de duas unidades de LMS em cascata (Tabela 6.3). Metodologia do fluxograma da Figura 6.15.	190
Tabela 6.06	Parâmetros de operação e de desempenho para a separação de AL da fracção (lactose+frutose+sorbitol) na unidade de LMS 1 (sistema 2) e na coluna cromatográfica (sistema 3).	199
Tabela 6.07	Estratégias de determinação das condições de operação de uma unidade de pseudo-LMS para uma separação ternária com isothermas lineares. (Borges da Silva e Rodrigues, 2008).	203
Tabela 6.08	Condições operacionais usadas na separação da mistura ternária composta de lactose, frutose e sorbitol na unidade de pseudo-LMS.	206
Tabela 6.09	Parâmetros de desempenho para diferentes condições de alimentação na separação da mistura ternária em um sistema JO.	206

LISTA DE QUADROS

Capítulo 2

Quadro 2.1	Processos de hidrogenação catalítica de açúcares para a produção de sorbitol.	17
-------------------	---	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 RELEVÂNCIA E MOTIVAÇÃO

A capacidade de produção e a diversidade dos sistemas biológicos têm promovido uma competição entre os processos biotecnológicos e os físico-químicos, principalmente nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, desde a década de 1950. A descoberta das vias metabólicas permitiu delinear as condições específicas de obtenção dos bio-produtos e oferecer uma via alternativa para a geração de novos produtos de interesse. Em especial, a indústria biotecnológica evoluiu significativamente desde que a insulina humana foi sintetizada, pela primeira vez em 1982, em células de *Escherichia coli*. Entretanto, tecnologias mais avançadas de separação têm sido aplicadas para completar o estágio de purificação e recuperação dos produtos. Entre elas, a separação por cromatografia tem se tornado mais popular nas indústrias, como uma poderosa técnica para a obtenção de diversos produtos farmacêuticos e de alimentos, a nível laboratorial e industrial. Neste contexto, a produção de sorbitol e ácido lactobiónico (e seus sais) por uma única reacção de bioconversão é investigada.

O sorbitol é um poliálcool encontrado naturalmente em várias frutas e tem um teor edulcorante em torno de 60% quando comparado ao da sacarose. Este poliol tem aplicação na indústria de alimentos não apenas como um adoçante mas também como texturizante, humectante, estabilizante e amaciante. É igualmente importante na confecção de gomas, alimentos dietéticos, doces e sorvetes. A indústria farmacêutica também utiliza o sorbitol principalmente nos produtos de higiene (por exemplo pasta dental) e também como matéria-prima na síntese de sorbose, ácido ascórbico, propilenoglicol entre outros.

O mercado mundial do sorbitol, desenvolvido a partir de 1950, de acordo com a empresa consultora *SRI Consulting's Chemical*, está em constante crescimento, com uma produção anual superior a um milhão de toneladas. Este produto é comercializado sob a forma líquida (70%) ou em cristais, principalmente nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Ásia. Em 2004, o consumo de sorbitol nestas regiões foi estimado em cerca de 690 mil toneladas, representando um movimento aproximado de 420 a 520 milhões de dólares. O crescimento médio deste mercado varia em torno de 1 a 2% ao ano desde 1997. Segundo as previsões da *SRI Consulting's Chemical*, a taxa de crescimento foi em torno de 1% ao ano para o período compreendido entre 2004 e 2009. A indústria de alimentos representa a maior quota do mercado (39%), seguida pelas companhias farmacêuticas, com os sectores de higiene e cosméticos (27%), e da produção de vitamina C (13%). A China lidera o consumo mundial de sorbitol (aproximadamente 33%) com uma optimista previsão de crescimento para o período de 2007 a 2012, o que reflete em um aumento da demanda deste produto.

O ácido lactobiónico (AL) é um ácido poli-hidroxi-biônico, reconhecido como a nova geração dos ácidos α -hidroxi, com especial aplicação na indústria de cosméticos como substância activa nos tratamentos e cuidados com a pele devido a sua elevada capacidade hidratante. Este ácido possui uma forte acção quelante sobre os metais e, também, um forte acção antioxidante. Estas características conferem ao AL o status de ser um importante ingrediente activo em soluções para o armazenamento de órgãos para transplante. A sua propriedade quelante reduz a actividade da metaloquinase, que é a enzima responsável pela degradação do colágeno da pele após a exposição ao sol, e, desta forma, ajuda a reduzir os efeitos de envelhecimento.

O AL é também utilizado em formulações de detergentes e de tensoactivos, além de reforçar a formação de um complexo mediador de troca iónica que facilita a remoção dos iões magnésio e cálcio provenientes dos processos de lavagem e limpeza (especialmente nas indústrias têxteis). Aminas sintetizadas a partir do AL são empregadas nas formulações de detergentes (emulsionantes, estabilizadores de espuma), como agentes de limpeza (amaciantes) e ainda como aditivos em formulações cosméticas. Mundialmente, o AL é um produto de alto valor acrescentado e tem despertado o interesse da comunidade científica para a optimização da sua produção e dos processos tecnológicos envolvidos.

A produção biotecnológica de sorbitol e AL por uma única reacção de bioconversão foi divulgada em 1997 por Satory e colaboradores. Uma mistura de frutose e lactose é

catalisada pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL), que estão presentes nas células da bactéria *Zymomonas mobilis*, para a formação destes respectivos produtos. A GFOR foi descoberta e isolada originalmente a partir da fermentação alcoólica da sacarose ou da mistura de frutose e glicose usando esta bactéria. O processo de bioconversão desta enzima revelou a elevada selectividade para a redução da frutose a sorbitol e a capacidade de oxidar diversos açúcares alternativos a glicose, entre eles a lactose, levando à produção da correspondente lactona. Na etapa subsequente, a enzima GL hidrolisa a lactona e produz o ácido orgânico correspondente. Este ácido, entretanto, é convertido no respectivo sal devido à adição de álcalis para manter constante o pH durante a reacção. Devido a estequiometria da reacção substratos:produtos (1:1), uma análise de mercado dos diversos e importantes ácidos orgânicos sintetizados pela GFOR juntamente com o sorbitol foram considerados para a viabilidade desta enzima industrialmente. AL e sorbitol podem ser produzidos a partir de uma solução de lactose e frutose em altas concentrações, entretanto com as mais baixas velocidades de reacção quando comparados com os demais ácidos orgânicos produzidos pela enzima. Após a descoberta desta importante capacidade de bioconversão da GFOR, onde a aplicabilidade não se limita apenas a produção do sorbitol e do AL, as demais etapas necessárias para a viabilidade deste processo em escala piloto-industrial têm sido pouco exploradas.

Diversas tecnologias de separação convencionais podem ser aplicadas neste processo, entre elas a precipitação através da adição de solventes e iões, a separação por membranas e por electrodialise e a separação por adsorção. A separação por adsorção em sistema de Leito Móvel Simulado (LMS) é uma das tecnologias mais avançadas para a obtenção dos produtos biotecnológicos puros. O crescente interesse por esta tecnologia na área da bioseparação é devido às suas intrínsecas vantagens como a redução do consumo de solventes, a sua alta produtividade e a elevada pureza final dos produtos. Algumas de suas principais aplicações incluem as separações de açúcares, isômeros ópticos (racêmicos, enantiômeros e compostos quirais), moléculas iónicas, proteínas, entre outros. Diversas configurações da unidade clássica de LMS de quatro secções têm sido propostas para separações de misturas multicomponentes como por exemplo: LMS em cascata (duas ou mais unidades), LMS com três portas de saída, pseudo-LMS e LMS de oito e nove secções.

1.2 OBJECTIVOS E DELINEAMENTO

O objectivo geral desta tese de doutoramento é investigar a viabilidade das técnicas avançadas de separação cromatográfica (tecnologia de leito móvel simulado (LMS) e o conceito de pseudo-LMS), como instrumentos de optimização do bioprocessamento de produção do sorbitol e do ácido lactobiónico (AL). O processo chave desta investigação é a exclusiva reacção de bioconversão capaz de produzir estes produtos a partir da mistura dos açúcares frutose e lactose, catalisada pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL).

Esta tese está dividida em sete capítulos, onde o capítulo seguinte descreve o estado da arte. Para tanto, são reportadas as propriedades físico-químicas das principais substâncias (glicose, frutose, lactose, sorbitol, ácido glicónico e AL), a análise do mercado global do sorbitol, os valores de comércio destes produtos e seus precursores e as diferentes tecnologias para a produção e separação dos produtos de interesse.

O capítulo 3 apresenta o método analítico desenvolvido, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para quantificar a mistura quaternária (lactose, frutose, AL e sorbitol) formada durante a reacção de bioconversão. A metodologia proposta é rápida e prática e utiliza um eluente simples e ecológico. Além disso, o comportamento da separação encontrado nesta metodologia ajudou a esclarecer o mecanismo de separação dos componentes da mistura em colunas preparativas, que é discutido mais adiante no capítulo 5.

As etapas do bioprocessamento, desde a produção de células da bactéria *Zymomonas mobilis* por fermentação etílica até a determinação dos parâmetros de cinética de reacção de bioconversão são apresentadas no capítulo 4. O desempenho do cultivo é comparado com os resultados publicados na literatura em termos de produtividade das células, os factores de conversão (substrato em células e substrato em etanol) e as respectivas velocidades específicas. As células contendo as enzimas GFOR e GL são permeabilizadas, reticuladas e as cinéticas de bioconversão são conduzidas sob a condição de células livres e imobilizadas. A etapa da reacção de bioconversão revela uma importante característica intrínseca à equação da velocidade e seus efeitos sobre a composição final da mistura reacional. Alguns modelos cinéticos e seus respectivos parâmetros, que descrevem o mecanismo enzimático de GFOR, são investigados. O efeito de difusão das substâncias no suporte contendo as células da *Z. mobilis* imobilizadas é observado através da comparação das taxas de reacção entre os dois modos de operação (células livres e imobilizadas). Adicionalmente, são definidas as

condições de processo para a produção AL e sorbitol e a composição de mistura bioconvertida para ser aplicada no processo de separação em LMS.

O capítulo 5 aborda a questão da separação das substâncias lactose, frutose, sorbitol e AL em colunas de cromatografia preparativa. O estudo começa com a selecção de resinas de troca iónica. Posteriormente, são determinados os parâmetros de equilíbrio de adsorção sobre a resina seleccionada para as soluções mono-componente e em misturas binária e quaternária. Os mecanismos de cada uma das substâncias sobre as diferentes características das resinas investigadas são discutidos com base nas propriedades físico-químicas das substâncias. Adicionalmente, são propostas condições operacionais para a composição da mistura bioconvertida definida no capítulo 4.

O capítulo 6 apresenta os resultados da investigação dos diferentes modelos de separação em cromatografia de leito móvel simulado para o caso específico da mistura de reacção final, definida no capítulo 4. Esta secção inicia com a discretização do modo de operação do LMS e o emprego da teoria de volumes de separação. Os resultados das soluções numéricas dos diferentes modelos conformacionais do LMS são discutidos. A modelagem dos processos cromatográficos com distintas configurações da unidade, para a purificação e recuperação dos produtos e substratos não convertidos, é apresentada. A tecnologia de pseudo-LMS é explorada como viável para o processo em questão, onde são definidas as condições e operação do sistema.

Finalmente, no último capítulo são apresentadas as conclusões gerais de todo o trabalho e algumas sugestões para trabalhos futuros.

2 ESTADO DA ARTE

Este capítulo apresenta uma revisão sobre os processos de produção e de separação do ácido lactobiônico (AL) e do sorbitol descritos na literatura especializada. Para tanto, a secção inicia com as características e propriedades físico-químicas das substâncias de maior relevância, como os açúcares (glicose, frutose e lactose), os ácidos aldónicos (ácido glicónico e AL) e o poliálcool (sorbitol). Adicionalmente, são apresentadas algumas informações sobre o mercado do sorbitol e do AL assim como o valor comercial destes produtos e seus precursores. Posteriormente, as tecnologias de produção do sorbitol e AL disponíveis e actualmente empregadas nas indústrias químicas e de biotecnologia são reportadas. Este assunto, então, converge para a possibilidade do processo enzimático catalisado pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL). O histórico a respeito da GFOR, a sua estrutura e o mecanismo enzimático de bioconversão são descritos. O fechamento desta secção trata dos processos de separação com ênfase a cromatografia líquida e a tecnologia de leito móvel simulado (LMS).

2.1 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS

As hexoses glicose e frutose são os monossacarídeos (açúcares simples) mais importantes para os seres vivos. Estes açúcares são utilizados como fonte de energia primária para a realização de todas as atividades metabólicas das células, e também como precursores para a síntese das diversas substâncias orgânicas. A frutose (ou levulose) é um monossacarídeo que contém cinco grupos hidroxila e uma função cetona (cetose). Ela é encontrada em abundância em todas as frutas e no mel (Lehninger *et al.*, 2005). Sua estrutura química (Figura 2.1) apresenta isomeria molecular com a glicose ($C_6H_{12}O_6$). A cadeia

carbônica da frutose pode ser encontrada sob duas formas cíclicas, denominadas de frutopiranosose (com 5 átomos de carbono) e frutofuranose (com 4 átomos de carbono). Quando em solução aquosa, a frutose está em equilíbrio a 70% na forma de frutopiranosose e aproximadamente 22% na forma de frutofuranose. A frutose pode ser encontrada, ainda, sob três outras formas intermediárias que, em menor quantidade, estão relacionadas com o processo de abertura da cadeia carbônica incluindo a sua forma acíclica (Collins e Ferrier, 1995; Lehninger *et al.*, 2005).

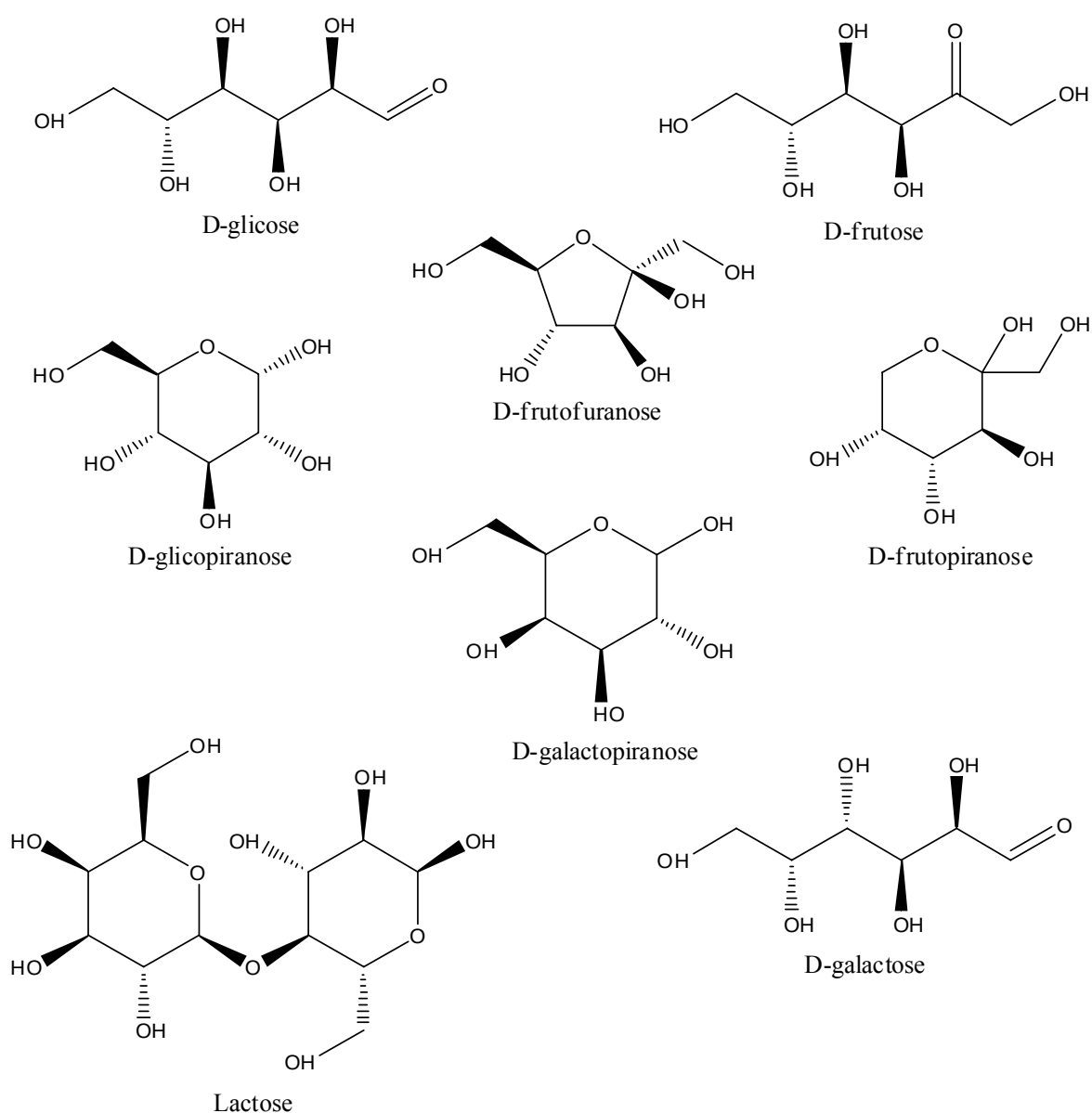


Figura 2.01 – Estrutura dos açúcares mono- e dissacarídios nas configurações cíclica e acíclica da cadeia carbônica. ChemDraw Ultra[®] 12.0, Cambridge Software.

A glicose (Figura 2.1) é o monossacarídeo mais importante nos sistemas biológicos. Sua cadeia carbônica comporta uma função aldeído (aldose) e co-existe em equilíbrio sob as formas aberta, acíclica, ou em anel, cíclica (glicopiranosose) (Lehninger *et al.*, 2005). A forma cíclica deste açúcar predomina em solução aquosa a pH 7 e, ainda, pode ser diferenciada sob as suas duas formas estereoisômeras (L-glicose e D-glicose). A forma D-glicose é encontrada preferencialmente nos organismos vivos. O isômero epímero da glicose é a galactose que difere a posição da hidroxila no carbono C4. A galactose é produzida em pequenas quantidades pelo corpo humano (geralmente tem origem exógena) e é o precursor para a síntese de diversos polímeros complexos, como exemplos os glicolípidos e as glicoproteínas (Collins e Ferrier, 1995; Lehninger *et al.*, 2005).

A lactose (Figura 2.1) é o único dissacarídeo que ocorre exclusivamente no leite de praticamente todos os mamíferos em concentrações na ordem de 2% a 10% (Ganzle *et al.*, 2008; Schaafsma, 2008). Este dissacarídeo é formado por uma ligação glicosídica β 1-4 entre a galactose e a glicose. Na lactose, o grupo hemiacetal da molécula de glicose está potencialmente livre (com propriedades redutoras) e pode co-existir nas formas de anômeros α ou β (Fox e McSweeney, 1998). Na forma de anômero α , o grupo hidroxila no C1 da glicose está na posição *cis* em relação ao grupo hidroxila em C2. Quando a lactose está em solução, a configuração em torno do átomo de carbono anomérico C1 da glicose pode facilmente mudar da sua forma α para a forma β , e vice-versa, ocasionando o efeito de mutarotação. Esta mutarotação é devida ao equilíbrio existente entre a forma hemiacetal da cadeia aberta com a forma aldeídica, que pode ser convertida em uma das suas duas formas de isômeros (Collins e Ferrier, 1995; Fox e McSweeney, 1998). A lactose tem interessantes propriedades nutricionais, como exemplos, baixo teor edulcorante, valor calórico e índice glicêmico. Seus derivados (lactulose, lactitol e galacto-oligossacarídeos) têm aplicações em alimentos e preparações farmacêuticas como prebióticos (melhoram a absorção intestinal de cálcio e magnésio). Outros derivados da lactose, como exemplo, tagatose e ácido lactobiónico (AL) têm aplicações potenciais como ingredientes bioativos em alimentos (Schaafsma, 2008).

O sorbitol (Figura 2.2) também é conhecido como glucitol, um poliólcool do mesmo grupo químico do glicerol ou etilenoglicol. É um poliol encontrado naturalmente em quantidades significativas em algas vermelhas e em frutas como peras, maçãs, cerejas e pêssegos e especialmente em ameixas. Esta substância apresenta uma cadeia acíclica com 6 átomos de carbono e 6 grupos hidroxila ligados a cada unidade de carbono. Sua fórmula

química $C_6H_{14}O_6$ é isômera de três outros polióis (dulcitol, manitol e iditol) (Collins e Ferrier, 1995). O sorbitol tem um teor edulcorante equivalente a 60% ao da sacarose. Ao contrário dos açúcares, não apresenta outra função química, como exemplo aldeído ou cetona. É usado principalmente como um edulcorante para substituir a sacarose, bem como agente sequestrante, excipiente, umectante ou estabilizador de medicamentos, cosméticos e alimentos em muitos produtos manufacturados (Collins e Ferrier, 1995). É lentamente metabolizado no corpo humano sem a necessidade da insulina, produzindo poucas calorias o que o torna um componente importante em alimentos dietéticos (Silveira e Jonas, 2002).

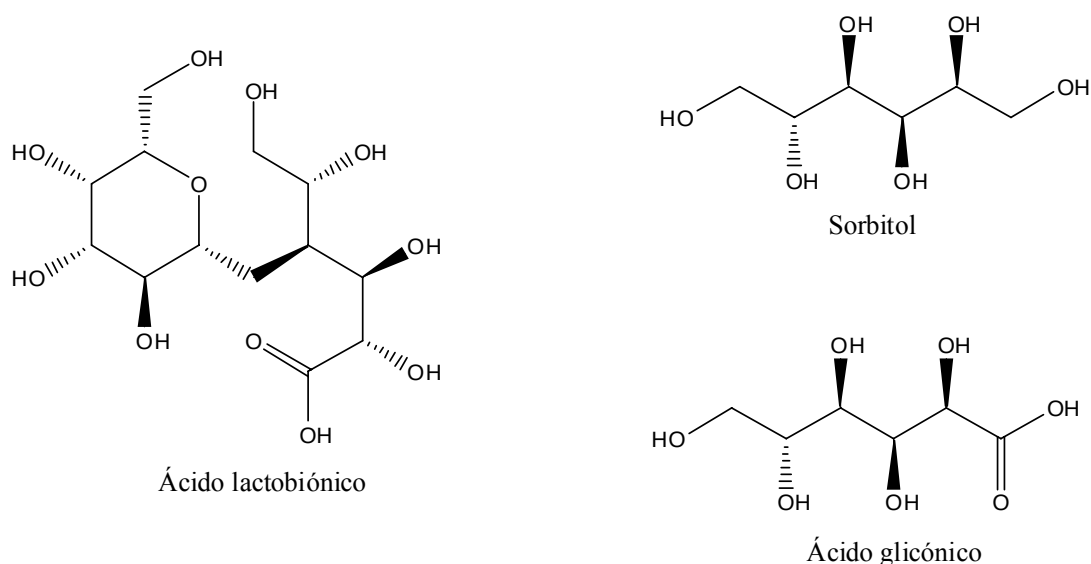


Figura 2.02 – Estrutura dos ácidos aldônicos e do poliálcool (sorbitol). *ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.*

Os ácidos aldônicos (como o ácido lactobiônico e o ácido glicônico), por sua vez, são substâncias derivadas dos açúcares (aldoses). Eles são o produto da oxidação do grupo funcional aldeído do açúcar precursor para formar um grupo funcional carboxílico. Os aldeídos alifáticos são facilmente oxidados aos seus respectivos ácidos carboxílicos em condições brandas, enquanto as cetonas são mais resistentes. Desta forma, D-glicose é transformada em ácido D-glicônico, em uma ampla faixa de pH e com bom rendimento, utilizando soluções aquosas de bromo (cloro ou iodo) (Collins e Ferrier, 1995). A glicose nesta solução de bromo, a pH levemente ácido, é oxidada pela desidrogenação do C1 do hemiacetal para formar a lactona. Em solução aquosa, a forma lactona está em equilíbrio com

a forma do ácido aldónico e o sistema é controlado pelas condições de temperatura e pH da solução inicial do açúcar. A oxidação de um outro grupo hidroxila terminal ($-\text{CH}_2\text{OH}$) em vez do grupo funcional aldeído produz a classe dos ácidos urônicos (*e.g.*, o ácido glicurónico), enquanto a oxidação de ambas as extremidades terminais da cadeia carbônica destes açúcares ($-\text{CHO}$ e $-\text{CH}_2\text{OH}$) produz os ácidos aldáricos (*e.g.*, o ácido glicárico). Desta forma, as lactonas não têm um carbono quiral anomérico e não podem formar ligações glicosídicas. Os ácidos aldónicos, como os ácidos glicónico ou galactónico, são encontrados em muitos sistemas biológicos, como produtos da oxidação de aldoses com os reagentes de Benedict ou de Fehling. Sua lactonas são importantes intermediários para a síntese de açúcares de Kiliani-Fischer (Collins e Ferrier, 1995).

As diversas estruturas e funções químicas que compõem as moléculas dos ácidos aldónicos conferem importantes e distintas características físico-químicas, como exemplo, a solubilidade em água e o grau hidrofílico da molécula (parâmetro p na Tabela 2.1), a existência de grupos iônicos (polaridade da molécula) e a geometria molecular. A Tabela 2.1 mostra algumas propriedades físico-químicas das substâncias glicose, frutose, lactose, ácido glicónico e AL. A primeira informação a ser considerada é a massa molecular destas substâncias, uma vez que ela pode definir algumas condições importantes em processos de separação (Andersson *et al.*, 2006). Os valores da constante “ p ” da Tabela 2.1 revelam um caráter hidrofílico maior para a forma acíclica dos açúcares monossacarídios do que para a respectiva estrutura cíclica. Com base no estado natural das substâncias, a frutose ocupa a posição menos hidrofílica enquanto que os ácidos se sobressaem apresentando os maiores valores.

Em termos de solubilidade em água, a Tabela 2.1 mostra que o sorbitol e os monossacarídios apresentam os maiores valores, devido a elevada facilidade na formação de pontes de hidrogênio. Entretanto, a lactose apresenta o menor valor de solubilidade. α e β -lactose diferem com respeito a solubilidade, forma cristalina e tamanho, hidratação de forma cristalina, higroscopicidade, rotação específica e grau edulcorante. Quando as formas isômeras estão dissolvidas em água, há uma mudança gradual de uma forma para a outra até que o equilíbrio mutarotacional seja estabelecido ($+55.4^\circ$), sendo possível de ser acompanhada pela medida da variação da rotação óptica da molécula com o tempo (Fox e McSweeney, 1998). Desta forma, a mistura em equilíbrio a 20°C é composta por 62,7% na forma β -lactose e 37,3% na forma α -lactose. A constante de equilíbrio, β/α é 1,68 a 20°C . A

percentagem de lactose na forma α aumenta com o aumento da temperatura e, consequentemente, a constante de equilíbrio diminui. A constante de equilíbrio não é influenciada pelo pH, mas a taxa de mutarotação é dependente de temperatura e do pH da solução. A mudança da forma α para β -lactose é total e praticamente instantânea a cerca de 75 °C, sendo reduzida de forma lenta e graduativamente para os percentuais de 51,1, 17,5 e 3,4% nas respectivas temperaturas de 25, 15 e 0 °C, após 1 h. Em relação ao pH da solução, a taxa de mutarotação é a mais lenta para valores de pH 5,0, aumentando a velocidade rapidamente quando nos valores extremos desta escala (mais ácida ou alcalina), onde o equilíbrio é estabelecido em poucos minutos.

Tabela 2.01 – Propriedades físico-químicas das substâncias.

Propriedade\Compostos	frutose	sorbitol	glicose	ácido glicónico	lactose	AL
Peso molecular (g·mol ⁻¹)	180	182	180	196	360	358
Log(p) ^a	-2.08	-2.94	-2.38	-4.86	-4.12	-4.68
pKa	12.0	13.6	12.3	3.9	12.2	3.6
Solubilidade (g·mL ⁻¹)	0.78	0.75	0.90	0.31	0.20	1.00 ^c
Temperatura crítica (K) ^a	794.3	815.83	800.98	802.9	1196.4	1343.46
Volume crítico (cm ³ /mol) ^a	423.5	461.5	416.5	457.5	777.5	865.5
Calor de formação (kJ/mol) ^{a,b}	-1045.6	-1101.7	-1087.4	-1138.4	-1959.1	-2059.9
Energia de Gibbs (kJ/mol) ^{a,b}	-762.65	-831.04	-776.97	-875.76	-1334.4	-1482.2

^a ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.

^b Temperatura= 298.15K; pressão =1atm.

^c ChemicalBook

2.2 MERCADO DO SORBITOL E DO ÁCIDO LACTOBIÓNICO

O sorbitol é um poliol com aplicação em diversos setores da indústria de alimentos e das companhias farmacêuticas. De acordo com a empresa consultora *SRI Consulting's Chemical*, o seu mercado, desenvolvido na década de 1950, encontra-se em crescente expansão, com uma produção mundial superior a um milhão de toneladas comercializada, seja na sua forma líquida ou cristalina, principalmente nos Estados Unidos da América, Europa Ocidental e Ásia. Em 2004, o consumo de sorbitol nestas regiões foi estimado em torno de

690 mil de toneladas, representando uma movimentação de 420 a 520 milhões de dólares (Janshekar e Kishi, 2005). Desde 1997, o crescimento médio deste produto no mercado mundial tem variado de 1 a 2% ao ano sendo que a taxa de crescimento no período de 2004 a 2009 foi estimada em torno de 1% ao ano. O setor alimentício é o maior mercado de aplicação do sorbitol (39%), seguido pelo setor das indústrias de pasta dental e de cosméticos (27%) e pela fabricação de vitamina C (13%) (Bizzari *et al.*, 2008).

Em 2007, o mercado Chinês consumiu em torno de 33% da produção de sorbitol, principalmente direcionada para a produção de vitamina C, em que é líder mundial (90%). A previsão do consumo interno deste produto na China é crescente para o período de 2007-2012 e, conseqüentemente, um aumento da demanda de produção pode ser esperado. O consumo em alimentos e produtos para cuidados pessoais vai continuar a crescer a taxas significativas. Os maiores importadores de sorbitol são os países da Europa Central, da Europa Oriental, Japão e os países da América Latina. Os maiores exportadores são os países da Europa Ocidental, a China, a Indonésia e os Estados Unidos, com 90% das exportações mundiais em 2007, sendo que os países da Europa Ocidental representaram 38% das exportações (Bizzari *et al.*, 2008).

O ácido lactobiônico e seus sais são reportados por diversos consultores de mercado como uma gama de produtos de elevado valor acrescentado, o que desperta o interesse da produção sobre tais substâncias em uma perspectiva a maior escala. Entretanto, estimativas mais detalhadas sobre este mercado não estão disponíveis abertamente. A produção do AL vem sendo divulgada recentemente como forma de aproveitamento da lactose. Este açúcar é o principal carboidrato do leite e é encontrado em muitas etapas de processo da indústria de laticínios. Neste caso, a sua presença pode ser como um sub-produto de potencial econômico atrativo ou um problema que gera custo quando o destino é sua fermentação nas unidades de tratamento de efluentes. Atualmente, há um esforço por parte da comunidade científica em desenvolver formas alternativas para o emprego da lactose e a geração de produtos de maior valor acrescentado e, por conseguinte, com importantes aplicações para a sociedade (Kulbe *et al.*, 1996; Khramtsov e Kharitonov, 2007; Ganzle *et al.*, 2008).

A utilização eficiente dos recursos renováveis para a produção de alimentos e produtos químicos a partir da lactose, em particular, tem sido amplamente discutida (Kulbe *et al.*, 1996). A lactose está disponível em abundância, não apenas por ser o principal açúcar do leite e de produtos lácteos, mas também por estar na composição de um dos maiores resíduos

da indústria de laticínios como exemplo o soro de leite, Sua forma química bem definida permite-lhe compor alimentos e aplicações farmacêuticas. Os possíveis caminhos de utilização da lactose, como matéria-prima para a síntese de carboidratos derivados de elevado valor acrescentado, são apresentados na Figura 2.3 (Kulbe *et al.*, 1996; Ganzle *et al.*, 2008).

Em termos de preços para estas substâncias, uma estimativa de valores de mercado é apresentada na Tabela 2.2. Observa-se o elevado valor do AL em relação às demais substâncias apresentadas e que a quantidade é um fator importante na definição do preço do produto.

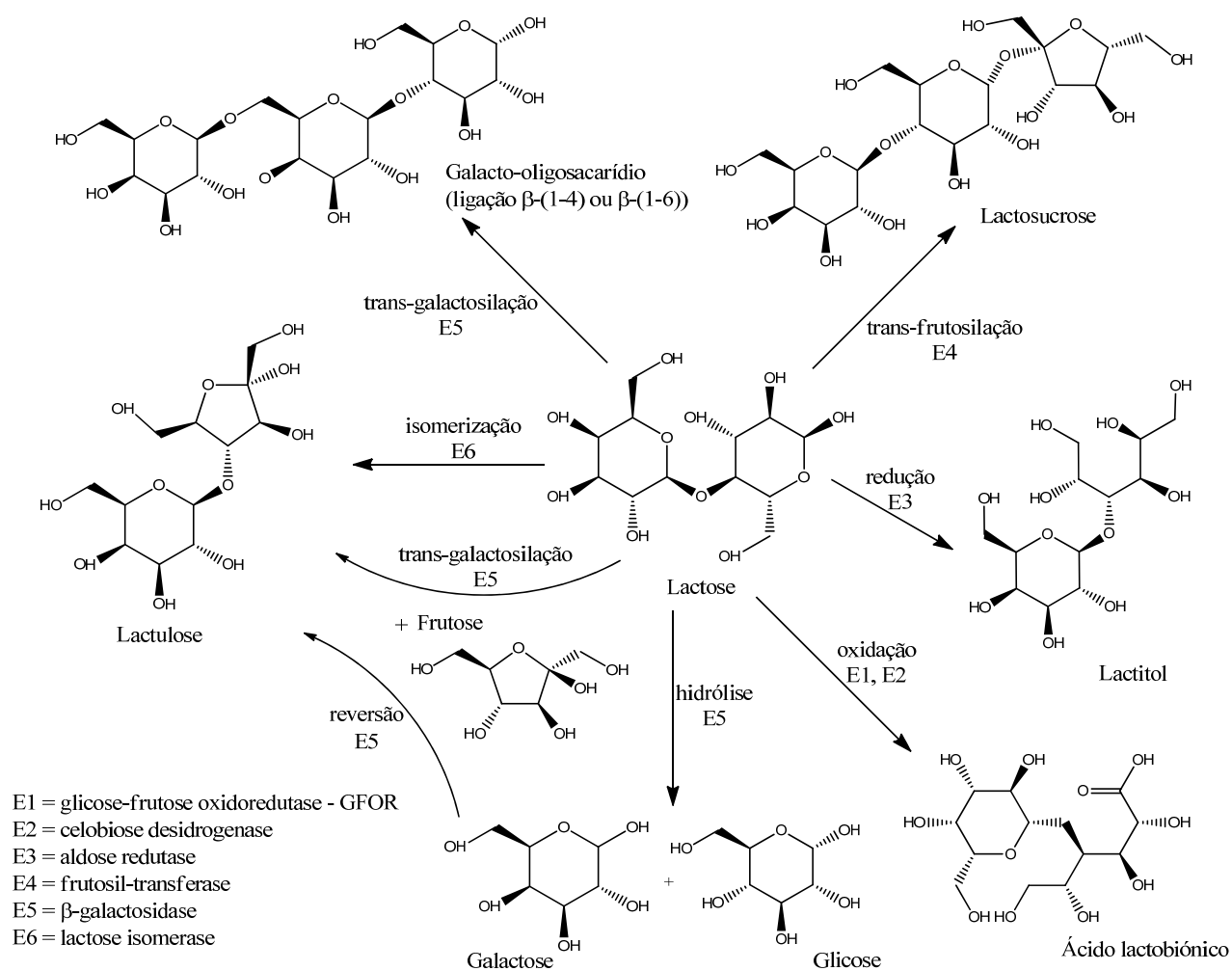


Figura 2.03 – Produtos comerciais derivados da lactose obtidos através de processos biotecnológicos. ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.

Tabela 2.02 – Estimativa de valores de mercado para a lactose, frutose, sorbitol e AL.

Valores para pequenas quantidades				
Substância	kg	Categoria	\$	\$/kg
Lactose mono-hidratada	2,5	BiotechGrade	263,60	105,44
		Powder, NF	203,40	81,36
		Powder, Reagent, ACS	184,75	73,90
Lactose anidra	2,5	NF	186,45	74,58
Frutose granular	2,5	FCC/USP	160,75	64,30
Sorbitol granular	2,5	Powder, NF	144,00	57,60
Sorbitol, solução 70%	4,0*	FCC	161,35	40,34*
AL	0,1	reagente	451,80	4518,00
Valores para grandes quantidades				
Substância	kg	Categoria	\$	\$/kg
Lactose mono-hidratada	45,0	BiotechGrade	751,75	16,71
		Powder, NF	794,60	17,66
		Powder, Reagent, ACS	794,60	17,66
Lactose anidra	45,0	NF	828,25	18,41
Frutose granular	45,0	FCC/USP	606,90	13,49
Sorbitol granular	45,0	Powder, NF	689,50	15,32
Sorbitol, solução 70%	20,0*	FCC	431,75	21,59*
AL	10,0	reagente	5906,80	590,68

Fonte: Spectrum Chemical. Cotação realizada a 10/Janeiro/2010. Valores em dolar.

(*) quantidade e valores referenciados em base (Litro).

Apesar do notável potencial da lactose para sua exploração na produção química industrial, este carboidrato se acumula em quantidades estimadas em torno de 1,2 milhões de toneladas por ano, como um subproduto da fabricação do queijo pelas indústrias de laticínios, uma vez que apenas uma pequena porcentagem dessa quantidade é utilizada (Kulbe *et al.*, 1996; Ganzle *et al.*, 2008). O excesso residual de lactose torna-se um problema ambiental, e, neste âmbito, as vias de utilização da lactose, como matéria-prima para transformação química ou biológica, se tornam potenciais alternativos a serem investigados. No entanto, uma série de problemas, que envolvem desde complicadas tecnologias de processamento até

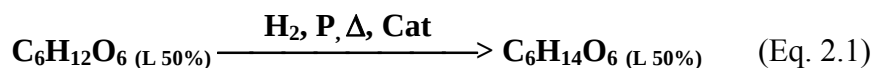
questões econômicas desfavoráveis, têm dificultado o emprego da lactose em larga escala pelas indústrias em todo o mundo (Kulbe *et al.*, 1996).

2.3 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE SORBITOL E ÁCIDO LACTOBÍONICO

2.3.1 SORBITOL – PROCESSOS FÍSICO-QUÍMICOS

A produção de sorbitol é feita por hidrogenação catalítica de xarope de D-glicose (50% m/v), sendo descrita por diversos métodos industriais de fabricação com base no processo estabelecido por I.G. Farben-Industrie AG, em 1925 (Haidegger, 1977; Silveira e Jonas, 2002). O processo em regime descontínuo alimentado representa 80% do total de sorbitol produzido. Em geral, é conduzido nas seguintes condições: pH entre 5 a 6, temperaturas entre 120 °C a 150 °C, pressão de 70 bar, catalise com níquel de Raney (3-6% m/m glicose) e tempo médio de reação de 2 a 4 horas. O sorbitol, geralmente comercializado em solução a 70%, é obtido pela evaporação da água sob condição de vácuo (Haidegger, 1977; Silveira e Jonas, 2002).

A produção de polióis por reações de redução dos grupos cetônico, ou aldônico, presente nos açúcares redutores pode ser obtida pelo processo de hidrogenação catalítica, conforme equação química (Eq. 2.1). Alguns exemplos são a conversão da xilose em xilitol, glicose e frutose em sorbitol, manose em manitol, lactose em lactositol (Kasehagen, 1953). Cabe evidenciar que o emprego da glicose converte unicamente a sorbitol enquanto que a frutose é convertida em dois produtos (D-sorbitol e D-manitol) (Collins e Ferrier, 1995).



Desta forma, é possível obter-se uma concentração de poliol equivalente à do açúcar utilizado na solução reacional inicial. Adicionalmente, outras reações de isomerização podem ser desenvolvidas pela adição de álcalis (hidróxido de sódio ou cálcio), durante ou após a hidrogenação, com o propósito de se obter outra categoria de produto final. As reações de degradação da cadeia carbônica, de hidrogenólise, de hidrogenação dos grupos hidroxil para formação de grupos hidroxycarbônicos também podem ser exploradas por essa via. Em todos

os casos há uma forte influência das condições de temperatura, pressão, pH, agentes químicos adicionados sobre os processos reacionais aplicados industrialmente (Kasehagen, 1953).

Os processos industriais de catálise para obtenção de polióis, especialmente sorbitol, são apresentados no Quadro 2.1. A redução catalítica dos açúcares foi proposta inicialmente por Ipatiev em 1912, em um sistema com elevada pressão (100 atm) e temperatura (108-135 °C) na presença dos catalisadores de Pd ou Ni. O uso de platina como catalisador foi proposto por Cake em 1922 com sucesso apenas em soluções de glicose alcalinizadas (Hefti e Kolb, 1952b).

Quadro 2.01- Processos de hidrogenação catalítica de açúcares para a produção de sorbitol.

Ano	Patente	Catalisador	T (°C)	P (atm)	Substrato	Produto
1912	BB 45,3225	Pd, Ni	108	135	açúcares	polióis
1922	AM 44,859	Pt	-	-	glicose	D-sorbitol
1934	US 1,963,997	Ni-Cr	150-275	68-200	sorbitol, dextrose,	propilenoglicol, sorbitol
1934	US 1,963,999	Ni, Ni-CrO, Cu-Zn	110-150	68-109	lactose, galactose, xilose, sacarose, dextrose	dulcitol, xilitol, sorbitol
1935	AM 57,2204	PtO	-	2-3	glicose	D-sorbitol
1935	US 1,990,245	Ni, Ni-CrO	130-160	15-80	glicose	D-sorbitol
1935	US 2,004,135	Ni, Ni ^o , Ni-CrO	150-600	68-300	glicose, sorbitol, amido	sorbitol, glicerina, glicerol, etileno e propileno glicol
1939	US 2,164,268	Ni	70-225	80-200	sorbitol, glicose, frutose	hexanepentol
1952	GB 675,527	Ni Raney	<50	1	glicose	sorbitol

Os catalisadores metálicos estudados nas reações em meio alcalino incluem Ni, Cu, Fe, Pt, Co e todos os respectivos óxidos. Adicionalmente, um ou mais óxidos metálicos de difícil redução podem ser aplicados (óxidos de Cr, cérium, titânio, Mo, Tg, Th ou Al). Estes catalisadores metálicos são geralmente empregados em pequenas concentrações (2% p/p açúcar) ou inferiores a 10% quando aplicado em processos prolongados (Mueller e Hoffmann, 1935).

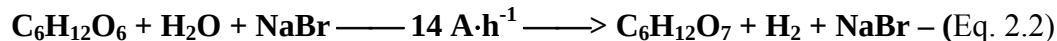
Os álcalis adicionados na mistura reacional ou na solução de açúcar podem ser os metais alcalinos e alcalinos terrosos, seus respectivos hidróxidos ou então sais sob as formas de carbonatos, silicatos e boratos. Também podem ser adicionadas outras substâncias derivadas de compostos orgânicos como ácidos graxos, álcoois, amônia de grupos alquil ou alquil aminas, e, também, de bases cíclicas, como piridina ou piperidina, ou de bases aromáticas, como a anilina. A quantidade de álcali utilizada depende do pH ideal de operação do processo, que geralmente corresponde a um valor inferior a 10. A temperatura e a pressão podem variar de 30°C a 160°C e de 10 atm a 20 atm, respectivamente (Mueller e Hoffmann, 1935). Diversos processos em sistemas alcalinos são propostos tendo como características críticas as elevadas condições de temperatura e pressão (Larchar, 1934; Rothrock, 1935; Covert, 1939; Power, 1942). Diferenciando-se dos demais processos citados, a hidrogenação catalítica em meio ácido foi proposta por (Rose JR, 1942) mantendo-se, contudo, as condições elevadas de temperatura e de pressão.

A possibilidade de conduzir o processo de hidrogenação catalítica em condições normais de temperatura e pressão para soluções aquosas de monossacarídeos opticamente ativos foi observada quando Ni metálico foi adicionado no processo como um catalisador. A velocidade da reação foi aumentada em 20 vezes quando a temperatura foi elevada de 15 °C para 50 °C (Hefti e Kolb, 1952a). No entanto, o processo contínuo de hidrogenação proposto por (Kasehagen, 1953) para a produção de sorbitol a partir de solução 50% glicose alcançou 99.17% de conversão com Ni a 2%, nas condições de 161°C e 70 atm. Recentemente, foi proposto um eficiente catalisador, contendo ouro em sua estrutura, para o processo de conversão da glicose em sorbitol e ácido glucônico, sob condição de hidrogenação e oxidação, respectivamente (Thompson, 2004). Os diversos processos utilizados para a produção do sorbitol nas indústrias químicas referenciadas anteriormente se caracterizam por manter as condições de temperatura e de pressão elevadas.

2.3.2 ÁCIDO LACTOBIÓNICO – PROCESSOS FÍSICO-QUÍMICOS

A síntese de AL foi obtida pela primeira por Fisher e Meyer, em 1889, através da reacção de oxidação da lactose catalisada com bromo (Nordkvist *et al.*, 2007). Este processo de oxidação química foi posteriormente otimizado (Hudson e Isbell, 1929) e o processo de produção de AL foi diversificado tanto pela via eletroquímica (Isbell e Frush, 1931; Magariello, 1956; Sengupta *et al.*, 1967) como pela catálise heterogênea (Dewit *et al.*, 1981).

A eletrólise é uma das técnicas pioneiras para a produção de ácidos aldónicos e que possibilita a eficiente produção de AL (Isbell, 1934). Este processo ocorre em uma célula eletrolítica contendo um cátodo de platina e um ânodo de grafite, onde uma solução de aldose (por exemplo, glicose 4.5% p/v) enriquecida com brometo de sódio 1% é submetida a uma corrente elétrica de $14 \text{ A}\cdot\text{h}^{-1}$. No final do processo, com o adequado ajuste da corrente elétrica e da concentração de brometo introduzida, é obtido o ácido aldónico (ácido glucónico) ou o respectivo sal, conforme equação cinética (Eq. 2.2).



A produção de lactobionato de cálcio como produto de oxidação direta da lactose, sem pré-tratamentos ou purificação, foi também proposta por (Isbell, 1934). Este processo ocorre em uma célula eletrolítica contendo eletrodos de grafite. Uma solução de lactose 0.5 M ($180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) enriquecida com 1% (p/v) de brometo e 3.5% (p/v) de carbonato de cálcio introduzida neste reactor, produz um precipitado que corresponde ao lactobionato de cálcio.

A produção de lactobionato de cálcio por eletrólise foi otimizada posteriormente conduzindo o processo de conversão com lactose em solução saturada a obter soluções concentradas 30 a 40% em AL ao final do processo e a rendimentos superiores a 98% (Magariello, 1956). Neste caso, o excesso de lactose contido na solução saturada no início da reacção é o diferencial que possibilita o alto rendimento do processo. Devido à elevada solubilidade do AL e seu sal de cálcio, em água, o consumo da lactose dissolvida é suprido pelo seu excesso que se encontra insolúvel, mantendo o processo oxidativo da célula eletrolítica na máxima concentração de lactose em solução. Recentemente, foram publicados outros catalisadores metálicos capazes de promover a oxidação eletrocatalítica da lactose, como por exemplo o Ni no processo de produção do lactitol e AL (Kuusisto *et al.*, 2007;

Kuusisto *et al.*, 2008) e a liga metálica de Au/TiO₂ que em solução contendo os açúcares lactose e maltose promovem a sua respectiva conversão em ácidos lactobiônico e maltobiônico (Thompson, 2004). Outros catalisadores contendo ouro em estado coloidal, presos a eletrodos de carbono em solução tampão de carbonato, alcançaram rendimentos de 91% na reacção de oxidação da lactose ao sal de lactobionato (Kokoh e Alonso-Vante, 2006).

2.3.3 ÁCIDO LACTOBIÓNICO – BIOPROCESSOS

A bioprodução de AL foi reportada inicialmente em processos fermentativos para a produção de ácidos biónicos. Em especial, os ácidos AL e maltobiônico foram obtidos em cultivos com bactérias do gênero *Pseudomonas* (*P. graveolens* 14 e *P. fragi* 25). Neste caso, o processo descontínuo proporcionou rendimentos em ácidos de 77% e 80%, respectivamente (Stodola e Lockwood, 1947; Lockwood e Stodola, 1950). A partir desses estudos com *Pseudomonas sp.*, outros sistemas enzimáticos de oxidação da lactose para a produção de AL começaram a ser investigados.

A enzima lactose desidrogenase foi isolada e purificada de cultivos de *Pseudomonas graveolens* (Nishizuka e Hayaishi, 1962). Esta enzima catalisa a desidrogenação da lactose para a formação da lactobiono- δ -lactona, que é posteriormente hidrolisada a AL. Paralelamente, um bioprocessos enzimático eficiente foi obtido com a enzima celobiose desidrogenase, que é capaz de converter completamente e sem a formação de qualquer outro subproduto, lactose em AL com produtividade de 50 g (L·h)⁻¹. Ambas as enzimas são muito estáveis e produzidas em grandes quantidades por bactérias e microrganismos fúngicos (Kulbe *et al.*, 1996). O processo de produção de AL catalisado pela celobiose desidrogenase teve maior ênfase na comunidade científica, publicados por diversos grupos de investigação, a partir de cultivos com *Pseudomonas sp.* LS13-1 (Miyamoto *et al.*, 2000). Entretanto, o processo com a enzima celobiose desidrogenase mostrou-se ineficaz para a oxidação directa da lactose a AL sem o mediador redox (lacase) (Baminger *et al.*, 2001). Outras substâncias com potencial mediador redox mostraram-se eficazes para a celobiose desidrogenase, entre elas, benzoquinonas, catecol e ABTS (Ludwig *et al.*, 2004).

Recentemente, a enzima carboidrato oxidase, clonada a partir de *Microdochium nivale* sobre *Fusarium venenatum*, foi investigada (Nordkvist *et al.*, 2007) e patenteada pela Novozymes para a produção de AL a partir da lactose. Esta enzima age de forma análoga a flavoenzimas celobiose desidrogenase e lacase (Splechtna *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 2004;

Hua *et al.*, 2007; Nordkvist *et al.*, 2007). Alguns outros bioprocessos para a conversão da lactose em AL, com o uso de *Pseudomonas* sp. (Miyamoto *et al.*, 2000) e por reações com a enzima carboidrato oxidase (hexose oxidase ou glicose oxidase) de diversas origens microbianas (*Chondrus crispus*, *Iridophycus flaccidum*, *Euthora cristata*, *Acremonium strictum*, *Acremonium fusidioides*, *Acremonium potronii* e *Microdochium nivale*), foram também investigados. As diversas formas de produção, com uma vasta gama de microrganismos capazes de promover a conversão da lactose em AL, demonstra o elevado interesse sobre este produto e a existência de um grande esforço para o desenvolvimento de tecnologias alternativas de produção do AL em escala industrial (Budtz *et al.*, 2005).

2.3.4 GLICOSE-FRUTOSE OXIDOREDUTASE (GFOR)

O potencial da bactéria *Zymomonas mobilis* para a produção de sorbitol e AL foi descoberto casualmente com a investigação intensa sobre novos microrganismos para a produção de etanol. O fenômeno foi publicado por diversos investigadores durante a década de 1980 (Lyness e Doelle, 1981; Fein *et al.*, 1983; Doelle e Greenfield, 1985; Viikari e Korhola, 1986). Em 1984, a capacidade da bactéria *Z. mobilis* em produzir sorbitol, como um subproduto da fermentação alcoólica a partir da sacarose ou da mistura de glicose e frutose foi divulgada (Barrow *et al.*, 1984; Viikari, 1984b; a). Na altura, a formação do sorbitol foi justificada como um processo conjugado de desidrogenação da glicose para formar glucono- δ -lactona (Leigh *et al.*, 1984).

Alguns caminhos possíveis para a formação de sorbitol pela bactéria *Z. mobilis* foram sugeridos, entre eles a formação de polímeros de frutose (levana) e uma aparente inibição da frutoquinase pela glicose (Viikari, 1984b; a). Dois anos mais tarde, a constatação de que o sorbitol estava associado à redução da frutose em presença de glicose possibilitou a elucidação do caminho metabólico desenvolvido pela *Z. mobilis* (Zachariou e Scopes, 1986). Os autores concluíram que a glicose participava da reacção como doadora de elétrons, sendo oxidada a gluconolactona, uma vez que a presença das enzimas glicose desidrogenase e gluconato quinase leva o metabolismo da glicose oxidada para a via de Entener-Doudoroff. Entretanto, a formação de sorbitol é independente da glicose desidrogenase, devido à incapacidade desta enzima de reduzir a frutose em sorbitol. A solução foi de que o sorbitol é produzido por uma outra enzima que abriga em sua estrutura o cofator NADP(H) e é o responsável pela oxidação da glicose a glucono- δ -lactona. Esta enzima foi denominada como

glicose-frutose oxidorredutase (GFOR, CE 1.1.1.99) e sua acção é semelhante a uma outra única enzima, lactato-malato oxidorredutase (EC1.1.99.7), que apresenta o cofator NAD fortemente ligado a estrutura da proteína. Adicionalmente, foi identificada a presença de glucono- δ -lactonase (GL; EC 3.1.1.17), uma enzima que hidrolisa glucono- δ -lactona para a formação do ácido glucônico (Zachariou e Scopes, 1986). A formação do sorbitol por essa bactéria tem sido atribuída a um efeito protetor contra o estresse osmótico causado pelas altas concentrações de açúcares no meio de cultivo (até 40% m/v) a fim de manter as atividades biológicas celulares (Swings e Deley, 1977; Loos *et al.*, 1994). O caminho metabólico da *Z. mobilis* pode ser, então, visualizado na Figura 2.4 (Silveira e Jonas, 2002).

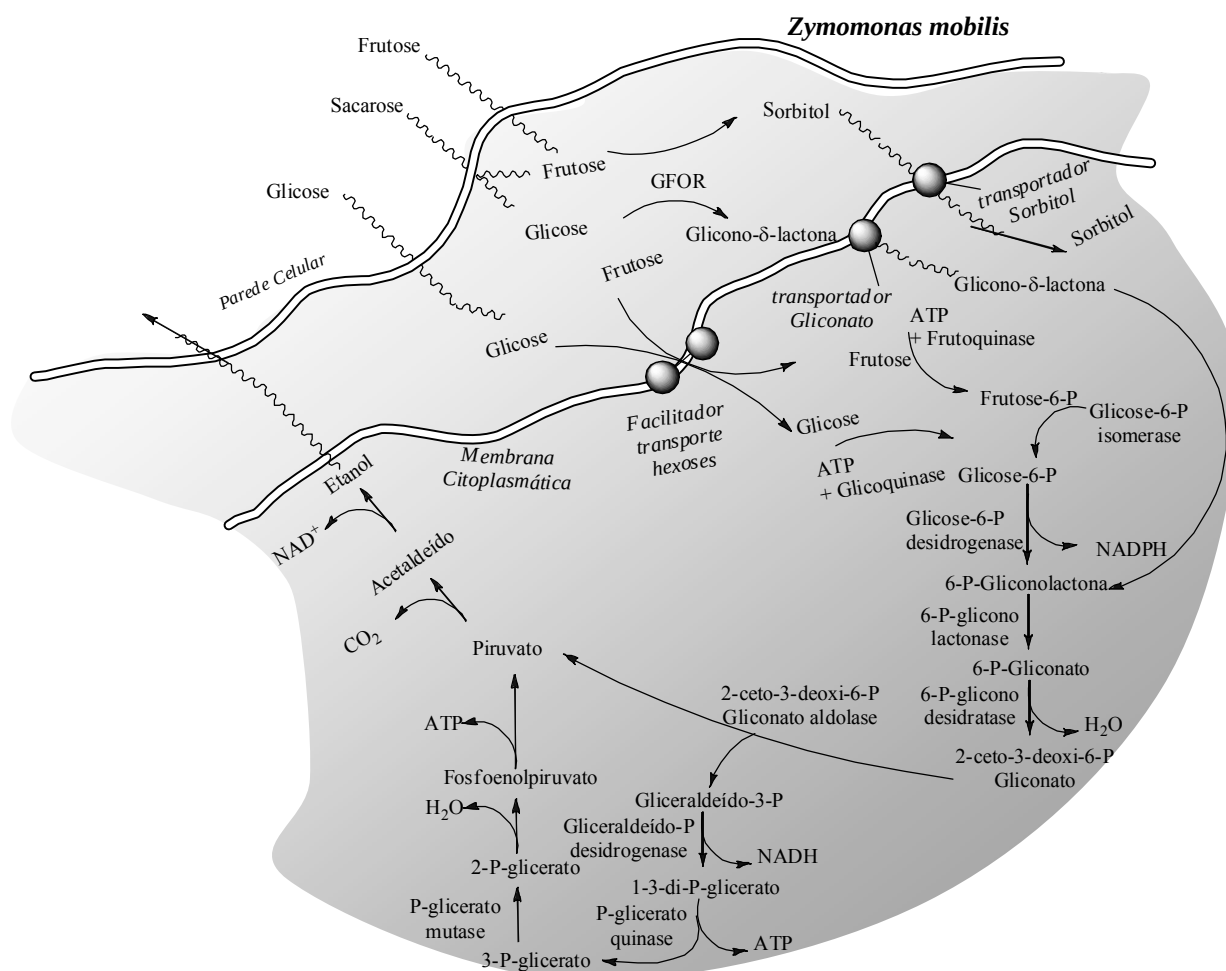


Figura 2.04 – Mecanismo de formação do sorbitol, gluconato e etanol a partir de uma solução de glicose e frutose por *Z. mobilis*. ChemDraw Ultra® 12.0, Cambridge Software.

Z. mobilis é uma bactéria gram-negativa que abriga em seu citoplasma a enzima GFOR (Loos *et al.*, 1991; Aldrich *et al.*, 1992; Loos *et al.*, 1993). A estrutura enzimática da GFOR foi determinada inicialmente pela técnica de filtração em gel e classificada como uma estrutura tetramérica (Zachariou e Scopes, 1986). Posteriormente, com a análise por cristalografia de raios-X, concluiu-se que o cofator NADP encontrava-se fortemente ligado à estrutura protéica da enzima, sendo impossível haver uma dissociação do mesmo. Esta estrutura, formada por dois domínios de uma clássica ligação dinucleotídica (Figura 2.5), possui um braço N-terminal que envolve o NADP e é responsável por estabilizar a enzima na forma tetramérica (Kingston *et al.*, 1996). Recentemente, o aprofundamento dos estudos da estrutura tridimensional da GFOR mostrou a possibilidade do truncamento do braço N-terminal favorecendo uma mutação na estrutura quaternária da enzima para a sua forma dímera (Lott *et al.*, 1998). A estrutura é bastante similar a das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e diidrodipicolinato redutase (DHPR) e muito semelhante à glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *Leuconostoc mesenteroides*, conforme Figura 2.6 (Kingston *et al.*, 1996).

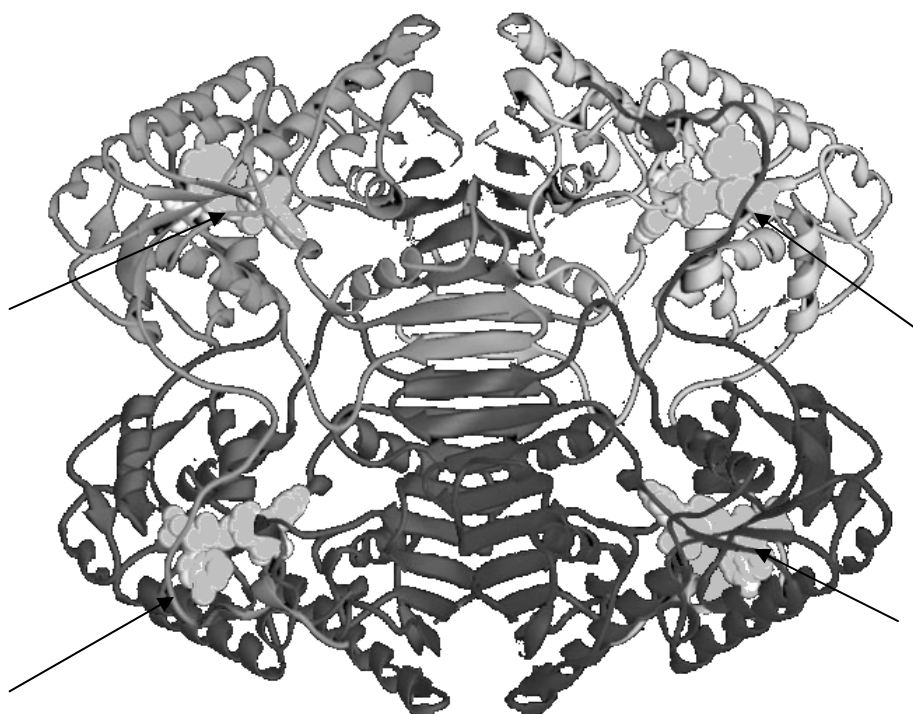


Figura 2.05 – Diagrama do tetrâmero da GFOR, com o espaço compreendido pelo NADP indicado por setas. Cada uma dos monômeros da GFOR apresenta intensidade de cor diferenciada (Kingston *et al.*, 1996).

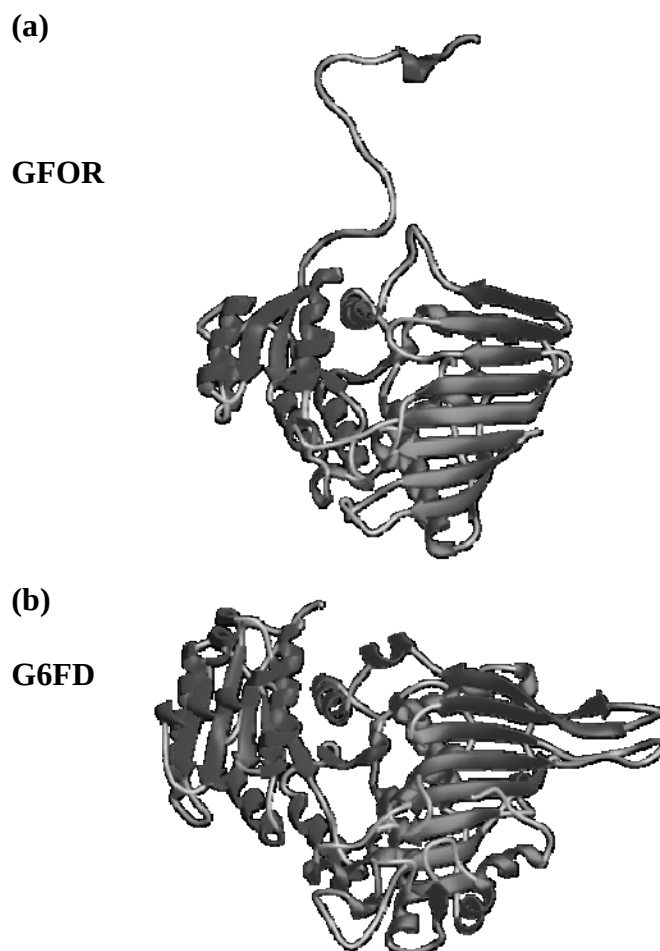


Figura 2.06 – Diagrama dos monômeros da GFOR (a) e da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase G6PD (b). Em ambas estruturas o domínio do N-terminal está em azul e o domínio do C-terminal em púrpura. Os contornos estão em amarelo. (Kingston *et al.*, 1996)

2.3.5 PROCESSOS DE REACÇÃO E SEPARAÇÃO COM GFOR

Desde que as enzimas GFOR/GL foram identificadas no processo de bioconversão da mistura de frutose e glicose à produção de sorbitol e ácido glicónico, outros açúcares oxidativos em substituição a glicose foram investigados (Zachariou e Scopes, 1986). Apenas em 1997 a viabilidade do processo para a produção de AL, empregando um biorreator de membrana de ultrafiltração foi sugerida (Satory *et al.*, 1997). Anteriormente, o processo

enzimático da GFOR/GL era considerado, basicamente, para a conversão da mistura glicose e frutose em ácido glicónico e sorbitol. A produção equimolar de sorbitol e ácido glicónico pela GFOR, entretanto, é limitada pela demanda deste ácido no mercado. Composições de substratos alternativos à glicose, com o propósito de viabilizar o processo de produção do sorbitol usando as enzimas GFOR e GL, foram reportados na literatura (Zachariou e Scopes, 1986; Satory *et al.*, 1997).

A produção de ácido glicónico e sorbitol usando as enzimas GFOR/GL resulta na obtenção de uma mistura binária, quando o consumo completo dos substratos é alcançado ou, então, uma mistura quaternária contendo junto com os produtos os substratos não convertidos. Uma vez que a cinética enzimática é equimolar e a conversão total é alcançada a custa de baixas velocidades de reacção, um sistema de separação dos produtos e substratos deve ser considerado no processo produtivo. Na reacção de bioconversão usando GFOR para a produção de AL, a etapa de separação se mostra ainda mais necessária tendo em vista as baixas velocidades de reacção do sistema e a máxima conversão em 85% (Malvessi, 2008).

Os sistemas de separação clássicos, com base nos processos de precipitação por adição de solventes ou sais, para a obtenção do sorbitol e do ácido orgânico formados durante a reacção de bioconversão usando as enzimas GFOR/GL podem aplicados, entretanto, tecnologias mais avançadas aplicadas durante a etapa reacional vem sendo divulgadas. Um sistema contínuo de ultrafiltração em biorreactor de membrana (Nidetzky *et al.*, 1997), bem como o sistema de biorreactores acoplados a unidades de eletrodialise se mostraram eficientes na remoção do ácido do meio reacional, mantendo a estabilidade enzimática. No entanto, foi verificado que a adição de NaOH para o controle do pH nos ensaios de bioconversão reduzia em 80% a velocidade de reacção, indicando que a perda da estabilidade enzimática tinha relação com o acúmulo de gluconato no meio reacional (Ferraz *et al.*, 2001). A eletrodialise acoplados ao processo de biotransformação também mostrou-se eficiente e eficaz à estabilidade das enzimas GFOR/GL eliminando do sistema a acção de controlo do pH (Ferraz *et al.*, 2001). Para a separação do AL, as membranas de eletrodialise selectoras de iões demonstraram ser eficientes na remoção de apenas 16,2% do AL contido na mistura reacional, porém com uma alta selectividade em relação aos outros componentes da mistura (Perreti *et al.*, 2009). A separação por eletrodialise teve melhores resultados em sistemas reactores com módulos de fibras ocas, onde as células de *Z. mobilis* permaneceram contidas. Neste sistema, a taxa de reacção específica foi entre 0,14 e 2,87 mmol.g_{cél}⁻¹.h⁻¹ e a eficiência de remoção do AL foi

superior a 95 %. O processo integrado, com reacção e separação simultânea obteve uma taxa de reacção 10 vezes superior do que as registadas em outros sistemas que não empregam a eletrodialise para a separação do AL produzido durante o processo de bioconversão (Severo Júnior, 2008).

2.3.6 PROCESSOS DE ADSORÇÃO E LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)

Os processos de separação compreendem uma das mais importantes áreas de estudos da engenharia química. Devido aos altos custos de implementação e operação associados a este processo, que podem atingir 70% do montante industrial (Wankat, 2007), o aprimoramento e constante optimização do processo com tecnologias criativas para melhorar a produtividade são necessários. O surgimento das indústrias de bio- e nano-tecnologia intensificou as exigências de novas e aperfeiçoadas técnicas de separação (Rousseau, 1987). Uma melhor e mais eficaz relação entre as condições para a obtenção da máxima velocidade de conversão da reacção e do grau de pureza e produtividade requerida no processo modelam os sistemas de separação a serem empregados. A aplicação de estratégias de separação evita a sobrecarga em um dos estágios do processo e, conseqüentemente, a adição de unidades complementares para a obtenção do produto final (Blanch e Clark, 1997). Existem ainda diversos outros factores que regem a seleção do sistema de separação de um processo, entre elas, a questão económica, o impacto ambiental, as especificações de pureza superiores aos padrões comuns de mercado e as limitações políticas, naturais e da disponibilidade de matérias-primas (Rousseau, 1987).

O processo de separação por adsorção consiste no aumento da concentração seletiva (adsorção) de uma ou mais substâncias (adsorbato) presentes em uma mistura, quer seja na forma de um gás ou um líquido, sobre a superfície de um sólido microporoso (adsorvente) (Keller_II *et al.*, 1987). Esse processo é dependente das condições de pressão (ou concentração quando em líquido) e da temperatura do sistema, onde uma substância ou conjunto específico de substâncias é acumulado sobre a superfície interfacial do sólido (Rouquerol *et al.*, 1998). As forças atractivas que promovem o efeito de adsorção são geralmente mais fracas do que as de ligações químicas e permitem uma fácil regeneração do adsorvente através do aumento da temperatura ou de uma redução da concentração do adsorbato. Esta etapa de regeneração ou dessorção é muito importante pois define as

condições para a recuperação da substância ou conjunto específico adsorvido sobre a resina bem como a reutilização do adsorvente para ciclos posteriores (Keller_II *et al.*, 1987).

A cromatografia é a técnica de separação universal em processos de purificação de bio-fármacos. A capacidade desta técnica em fornecer, com a pureza necessária, os bio-fármacos não pode ser comparada com outras tecnologias. A separação, entretanto, pode ser alcançada por uma infinidade de modos de adsorção que estão relacionados com a matriz e grupo funcional do adsorvente. Efeitos de interações secundárias adicionais fazem com que o estudo de seleção da melhor resina seja necessário para garantir uma separação segura e com uma melhor economia de processo (Shukla e Han, 2007). O emprego da técnica de cromatografia com colunas preparativas nos processos de purificação de produtos de origem biotecnológica é crescente, principalmente na indústria farmacêutica. Quando os fatores de separação entre as substâncias de uma mistura são muito próximos a cromatografia contínua em leito móvel simulado (LMS) mostra-se como uma técnica promissora e eficiente a ser aplicada (Imamoglu, 2002).

A tecnologia de LMS tem sido usada em muitos processos de separação para a obtenção de importantes produtos, além de conferir a técnica de elevado potencial de purificação em modo contínuo contracorrente (Nicoud e Majors, 2000; Imamoglu, 2002). A tecnologia de separação em LMS foi originalmente desenvolvida e patenteada pela UOP (*Universal Oil Products*) em 1961. Esta técnica foi uma alternativa avançada desenvolvida com base no processo de separação em fases sólida e fluida que movimentam-se em sentidos opostos, conforme Figura 2.7 (Ruthven, 1984; Ruthven e Ching, 1989). A unidade de separação em leito móvel contracorrente verdadeiro (LMV) promove a separação das substâncias contidas na mistura fluida de acordo com a afinidade destas substâncias com a fase sólida. Desta forma as substâncias com menor afinidade permanecem na fase fluida enquanto que as que apresentam maior afinidade são fortemente adsorvidas pela fase sólida e, então, obten-se a separação binária da mistura original. O sistema de separação em LMS foi uma inovadora solução encontrada para associar a condição de escoamento contínuo contracorrente sem a necessidade do movimento do adsorvente na unidade. Esta inovadora tecnologia foi alcançada com um conjunto mecânico de válvulas e bombas de deslocamento de fluidos de elevada precisão e sincronia associado ao perfeito conhecimento da mecânica de fluidos e transferência de massa (Keller, 1995).

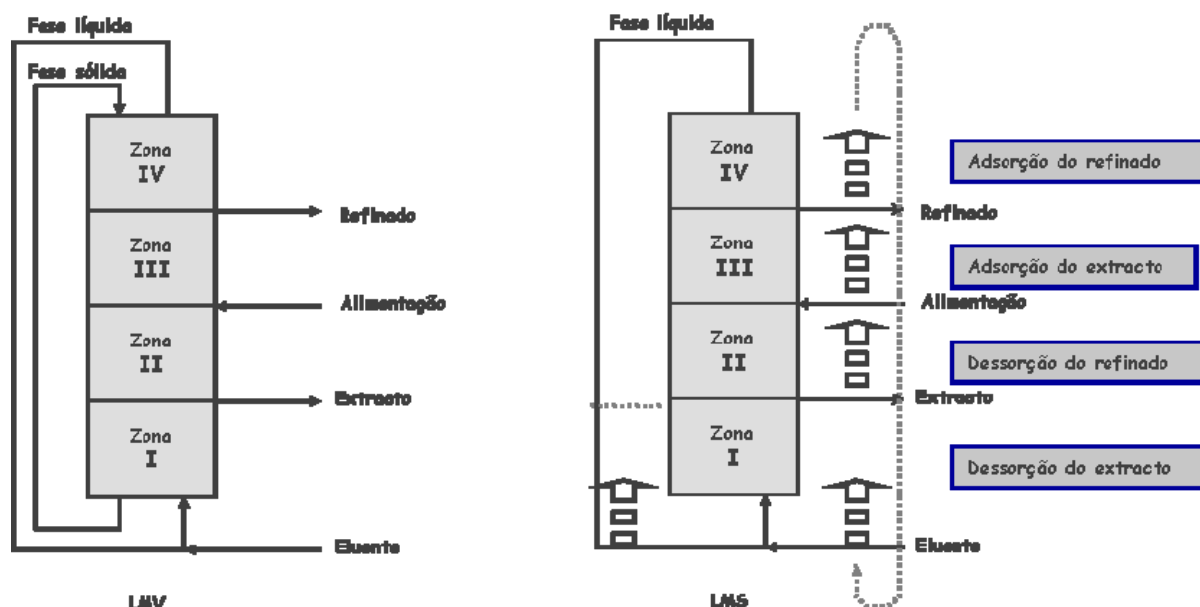


Figura 2.07 - Fluxograma típico das unidades de separação em LMV e LMS de quatro secções.

As primeiras aplicações do LMS foram agrupadas no conjunto de processos denominado *SORBEX* da *UOP*. A característica principal deste processo está no uso de uma válvula rotatória que periodicamente permuta as correntes de alimentação, de eluente, de extrato e de refinado ao longo de uma coluna de leito fixo empacotada com um adsorvente, simulando o movimento do sólido em contracorrente. Entre os processos mais bem sucedidos em LMS destaca-se o *PAREX* que trata da separação do *p*-xileno presentes em uma mistura de aromáticos com cadeia carbónica de oito unidades. O processo *SAREX* também foi eficiente para a separação da mistura frutose e glicose no processo de produção de xarope concentrado de frutose que é utilizado na indústria de alimentos (Keller, 1995).

A separação em LMS foi um avanço tecnológico muito significativo para os processos de separação. Justifica-se este grande potencial em termos de economia de solvente e eficácia de separação para ser aplicado em diversos segmentos da indústria de química fina, farmacêutica, de alimentos e de biotecnologia (Imamoglu, 2002). Esta tecnologia de separação se evidencia entre as demais pela elevada pureza final dos produtos, mesmo em misturas em que os factores de separação são muito próximos, além da diminuição do consumo de solventes, da alta produtividade. Adicionalmente, a técnica em LMS pode ser aplicada para separar uma gama imensa de substâncias químicas representadas pelos açúcares (Azevedo e Rodrigues, 2005; da Silva *et al.*, 2006), isômeros ópticos (racêmicos,

enantiômeros e compostos quirais) (Pais *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2010), moléculas iónicas, proteínas (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

Apesar das muitas vantagens do processo de separação em LMS, a clássica configuração é limitada a duas correntes de saída (extrato e refinado), permitindo assim apenas a separação em duas fracções (separações binárias). Algumas alternativas para separação de misturas multi-componentes empregando a tecnologia de leito móvel simulado têm sido investigadas como unidades de LMS em série (Wankat, 2001), LMS com três correntes de colecta, LMS com oito e nove secções (Wooley *et al.*, 1998) e pseudo-LMS (Mata e Rodrigues, 2000). Esta última concepção se refere ao chamado sistema de separação JO, que tem sido aplicado em algumas separações de misturas multicomponentes como separação de misturas de monossacarídeos, polissacarídeos e maltitol para recuperação de maltitol de alta pureza, purificação de isômeros de dietilnaftaleno, entre outras. O sistema JO usa a tecnologia de separação cromatográfica desenvolvida pela Japan Organo Co. (Ando *et al.*, 1990; Masuda *et al.*, 1993), conforme é ilustrado na Figura 2.8.

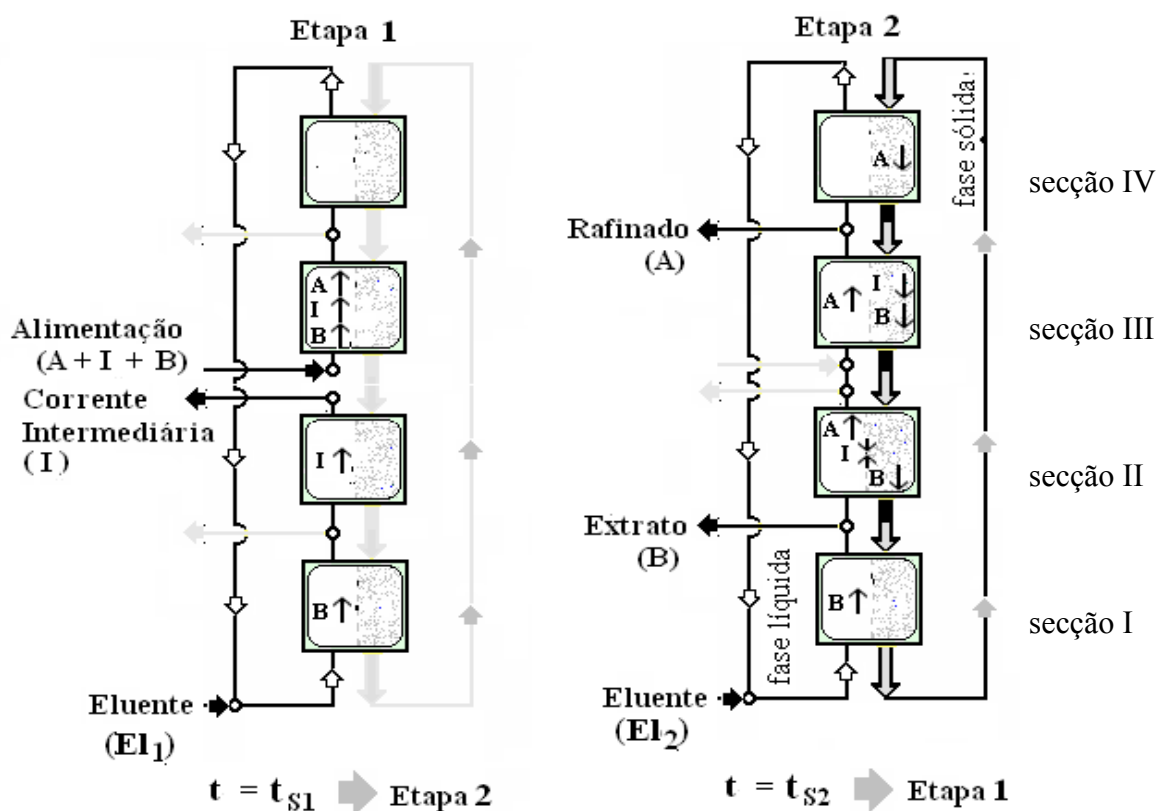


Figura 2.08 – Fluxograma das etapas de operação do sistema JO quatro secções, sendo a operação do LMS na segunda etapa representada em um LMV equivalente.

O sistema tem quatro secções, as quais podem ter uma ou mais subsecções (colunas de leito fixo). Nesta configuração, durante a etapa 1, a secção 3 é alimentada com a mistura ternária (substâncias A, I e B), cujos componentes são transportados pela fase fluida. As secções 3, 4, 1 e 2 estão conectadas em série nesta sequência operando segundo uma coluna cromatográfica. No final da secção 2 está a chamada corrente de saída intermediária, por onde as substâncias de afinidade adsorptiva intermediária são colectadas. Entre as secções 4 e 1 existe uma entrada de eluente que auxilia na eluição das espécies B e I das secções do sistema. Após finalizado o tempo da etapa 1 (t_{S1}), a unidade já tem sido carregada e a substância intermediária coletada, e, então, inicia a etapa 2 onde as substâncias menos e mais adsorvidas são recuperadas. Na etapa 2, a fase adsorvente move-se em contracorrente com a fase líquida e isto pode ser realizado usando a tecnologia de LMS, isto é, pela permutação das correntes de entrada e saída da unidade em intervalos de tempos regulares na direcção da fase fluida. Na Figura 2.7, a operação é representada em um leito móvel verdadeiro (LMV) equivalente á uma unidade de LMS. A corrente de alimentação é removida do sistema nesta etapa. Entre as secções 3 e 4 e entre as secções 1 e 2 é introduzida uma corrente de refinado e de extracto, respectivamente. Para uma bem sucedida separação das substâncias, é necessário escolher adequados caudais nas diferentes secções e também tempo de permutação (ou caudal da fase sólida). A substância A deve se propagar em direcção a corrente de refinado, enquanto a substância B deve ser adsorvida nas secções 2 e 3 e ser transportada pelo sólido afim de ser colectada no extracto. O componente I no final da etapa 2 deve estar posicionado principalmente na secção 2 para ser recuperado posteriormente durante a etapa 1. Na secção 1 deve ocorrer a remoção da substância mais retida do adsorvente para garantir sua regeneração; e na secção 4 a substância menos retida deve ser adsorvida para permitir o reciclo do eluente.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldrich, H. C., L. McDowell, M. D. S. Barbosa, L. P. Yomano, R. K. Scopes and L. O. Ingram (1992). "Immunocytochemical Localization of Glycolytic and Fermentative Enzymes in *Zymomonas-Mobilis*." Journal of Bacteriology **174**(13): 4504-4508.

Andersson, R., E. Westerlund and P. Åman (2006). Cell-Wall Polysaccharides: Structural, Chemical, and Analytical Aspects. Carbohydrates in Food. A.-C. Eliasson. Boca Raton, CRC Press.

Ando, M., M. TANIMURA and M. TAMURA (1990). Method of Chromatographic Separation. USA. **4.970.002**.

- Azevedo, D. C. S. and A. E. Rodrigues (2005). "Separation of Fructose and Glucose from Cashew Apple Juice by Smb Chromatography." Separation Science and Technology **40**(9): 1761-1780.
- Baminger, U., R. Ludwig, C. Galhaup, C. Leitner, K. D. Kulbe and D. Haltrich (2001). "Continuous Enzymatic Regeneration of Redox Mediators Used in Biotransformation Reactions Employing Flavoproteins." Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic **11**(4-6): 541-550.
- Barrow, K. D., J. G. Collins, D. A. Leigh, P. L. Rogers and R. G. Warr (1984). "Sorbitol Production by Zymomonas-Mobilis." Applied Microbiology and Biotechnology **20**(4): 225-232.
- Bizzari, S., H. Janshekar and A. Kishi (2008). Sweeteners - Polyols - Sorbitol. Overview of the Food Additives Industry. C. E. Handbook, SRI Consulting's Chemical.
- Blanch, H. W. and D. S. Clark (1997). Product Recovery. Biochemical Engineering. H. W. Blanch and D. S. Clark. New York, CRC Taylor & Francis: 702.
- Budtz, P., J. T. Vindeloev, P. M. Nielsen, I. Ashie and N. Mikkil (2005). Enzymatic Process for Obtaining Increased Yield of Lactobionic Acid. H. L. [DK], N. A. [DK], P. D. BUDTZ, J. T. D. VINDELOEV, P. M. D. NIELSEN, I. U. ASHIE and M. D. NORDKVIST. Dinamark, * USA. **WO2005104859 (A2)** 26.
- Collins, P. M. and R. J. Ferrier (1995). Monosaccharides - Their Chemistry and Their Roles in Natural Products. Great Britain, John Wiley Sons.
- Covert, L. W. (1939). Hexanepentols and Their Process of Preparation. R. HAAS. USA. **US2164268 (A)**: 03.
- da Silva, E. A. B., A. A. U. de Souza, S. G. U. de Souza and A. E. Rodrigues (2006). "Analysis of the High-Fructose Syrup Production Using Reactive Smb Technology." Chemical Engineering Journal **118**(3): 167-181.
- Dewit, G., J. J. Devlieger, A. C. Kockvandalen, R. Heus, R. Laroy, A. J. Vanhengstum, A. P. G. Kieboom and H. Vanbekkum (1981). "Catalytic Dehydrogenation of Reducing Sugars in Alkaline-Solution." Carbohydrate Research **91**(2): 125-138.
- Doelle, H. W. and P. F. Greenfield (1985). "The Production of Ethanol from Sucrose Using Zymomonas-Mobilis." Applied Microbiology and Biotechnology **22**(6): 405-410.
- Fein, J. E., H. G. Lawford, G. R. Lawford, B. C. Zawadzki and R. C. Charley (1983). "High Productivity Continuous Ethanol Fermentation with a Flocculating Mutant Strain of Zymomonas-Mobilis." Biotechnology Letters **5**(1): 19-24.

Ferraz, H. C., T. L. M. Alves and C. P. Borges (2001). "Coupling of an Electrodialysis Unit to a Hollow Fiber Bioreactor for Separation of Gluconic Acid from Sorbitol Produced by *Zymomonas Mobilis* Permeabilized Cells." Journal of Membrane Science **191**(1-2): 43-51.

Fox, P. F. and P. L. H. McSweeney (1998). Lactose. Dairy Chemistry and Biochemistry. T. Science. London, Blackie Academic & Professional,: 482.

Ganzle, M. G., G. Haase and P. Jelen (2008). "Lactose: Crystallization, Hydrolysis and Value-Added Derivatives." International Dairy Journal **18**(7): 685-694.

Gomes, P. S., M. Zabkova, M. Zabka, M. Minceva and A. E. Rodrigues (2010). "Separation of Chiral Mixtures in Real Smb Units: The Flexsmb-Lsre (R)." Aiche Journal **56**(1): 125-142.

Haidegger, E. (1977). "Importance of Hydrogenation in Processing of Carbohydrates." Starke **29**(12): 430-435.

Hefti, H. R. and W. Kolb (1952a). A Process for the Catalytic Reduction of Sugars England, Switzerland. **GB675527 (A)**: 02.

Hefti, H. R. and W. Kolb (1952b). A Process for the Catalytic Reduction of Sugars. England. **GB675527 (A)**: 02.

Hua, L., M. Nordkvist, P. M. Nielsen and J. Villadsen (2007). "Scale-up of Enzymatic Production of Lactobionic Acid Using the Rotary Jet Head System." Biotechnology and Bioengineering **97**(4): 842-849.

Hudson, C. S. and H. S. Isbell (1929). "Improvements in the Preparation of Aldonic Acids." Bureau of Standards Journal of Research **3**(1): 57-62.

Imamoglu, S. (2002). "Simulated Moving Bed Chromatography (Smb) for Application in Bioseparation " Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **76**: 211-231.

Isbell, H. S. (1934). Process of Oxidizing Aldose Sugars and Products Resulting Therefrom USA. **US1976731 (A)**: 03.

Isbell, H. S. and H. L. Frush (1931). "The Oxidation of Sugars. I. The Electrolytic Oxidation of Aldose Sugars in the Presence of a Bromide and Calcium Carbonate." Bureau of Standards Journal of Research **6**(4/6): 1145-1152.

Janshekar, H. and A. Kishi (2005). Sweeteners - Polyols - Sorbitol. Overview of the Food Additives Industry. C. E. Handbook, SRI Consulting's Chemical.

Kasehagen, L. (1953). Process for Continuous Hydrogenation of Sugars A. P. CO. USA. **US2642462 (A)** 06.

Keller, G. E. (1995). "Adsorption: Building Upon a Solid Foundation." Chem. Eng. Prog. **91**: 56.

Keller, G. E., R. A. Anderson and C. M. Yon (1987). Adsorption. Handbook of Separation Process Technology. R. W. Rousseau. New Jersey, USA, John Wiley & Sons: 1048.

Khrantsov, A. and V. Kharitonov (2007). International Dairy Federation Symposium "Lactose and its Derivatives". Moscow - Russian, International Dairy Federation - IDF: 399.

Kingston, R. L., R. K. Scopes and E. N. Baker (1996). "The Structure of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas Mobilis*: An Osmoprotective Periplasmic Enzyme Containing Non-Dissociable NADP." Structure **4**(12): 1413-1428.

Kokoh, K. B. and N. Alonso-Vante (2006). "Electrocatalytic Oxidation of Lactose on Gold Nanoparticle Modified Carbon in Carbonate Buffer." Journal of Applied Electrochemistry **36**(2): 147-151.

Kulbe, K. D., S. Riva, M. Ciaramella, M. D. Rorsa, J. Wöllinger, R. Mattes, P. Adlercreutz, W. Kneifel, H. Lampola and W. M. D. Vos (1996). Valorising of Lactose by Enzymatic Conversions to Compounds with Application in the Food and Non-Food Industries FAIR - Agriculture and Agro-Industry including Fisheries Programme of Research and Technological Development. **1,803,053 ECU**.

Kuusisto, J., J. P. Mikkola, M. Sparv, J. Warna, H. Karhu and T. Salmi (2008). "Kinetics of the Catalytic Hydrogenation of D-Lactose on a Carbon Supported Ruthenium Catalyst." Chemical Engineering Journal **139**(1): 69-77.

Kuusisto, J., A. V. Tokarev, E. V. Murzina, M. U. Roslund, J. P. Mikkola, D. Y. Murzin and T. Salmi (2007). "From Renewable Raw Materials to High Value-Added Fine Chemicals - Catalytic Hydrogenation and Oxidation of D-Lactose." Catalysis Today **121**(1-2): 92-99.

Larchar, A. W. (1934). Hydrogenation of Aliphatic Polyhydric Alcohols. D. PONT. USA. **US1963997 (A)**: 03.

Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox (2005). Carbohydrates and Glycobiology. Lehninger Principles of Biochemistry. D. L. Nelson and M. M. Cox. New York, W.H. Freeman: 1119.

Leigh, D., R. K. Scopes and P. L. Rogers (1984). "A Proposed Pathway for Sorbitol Production by *Zymomonas-Mobilis*." Applied Microbiology and Biotechnology **20**(6): 413-415.

Li, P., G. H. Xiu and A. E. Rodrigues (2007). "Proteins Separation and Purification by Salt Gradient Ion-Exchange Smb." Aiche Journal **53**(9): 2419-2431.

Li, P., J. G. Yu, G. H. Xiu and A. E. Rodrigues (2008). "Separation Region and Strategies for Proteins Separation by Salt Gradient Ion-Exchange Smb." Separation Science and Technology **43**(1): 11-28.

Lockwood, L. B. and F. H. Stodola (1950). Process of Culturing Bacteria USA. **US2496297 (A)**.

Loos, H., R. Kramer, H. Sahm and G. A. Sprenger (1994). "Sorbitol Promotes Growth of *Zymomonas-Mobilis* in Environments with High-Concentrations of Sugar - Evidence for a Physiological-Function of Glucose-Fructose Oxidoreductase in Osmoprotection." Journal of Bacteriology **176**(24): 7688-7693.

Loos, H., H. Sahm and G. A. Sprenger (1993). "Glucose-Fructose Oxidoreductase, a Periplasmic Enzyme of *Zymomonas-Mobilis*, Is Active in Its Precursor Form." Fems Microbiology Letters **107**(2-3): 293-298.

Loos, H., M. Voller, B. Rehr, Y. D. Stierhof, H. Sahm and G. A. Sprenger (1991). "Localization of the Glucose Fructose Oxidoreductase in Wild-Type and Overproducing Strains of *Zymomonas-Mobilis*." Fems Microbiology Letters **84**(2): 211-216.

Lott, J. S., D. Halbig, H. M. Baker, M. J. Hardman, G. A. Sprenger and E. N. Baker (1998). "Crystal Structure of a Truncated Mutant of Glucose-Fructose Oxidoreductase Shows That an N-Terminal Arm Controls Tetramer Formation." Journal of Molecular Biology **304**(4): 575-584.

Ludwig, R., M. Ozga, M. Zamocky, C. Peterbauer, K. D. Kulbe and D. Haltrich (2004). "Continuous Enzymatic Regeneration of Electron Acceptors Used by Flavoenzymes: Cellobiose Dehydrogenase-Catalyzed Production of Lactobionic Acid as an Example." Biocatalysis and Biotransformation **22**(2): 97-104.

Lyness, E. and H. W. Doelle (1981). "Ethanol-Production from Cane Juice by *Zymomonas-Mobilis*." Biotechnology Letters **3**(5): 257-260.

Magariello, E. R. (1956). Production of Lactobionic Acid and Its Delta-Lactone N. D. R. L. INC. USA. **US2746916 (A)**: 06.

Malvessi, E. (2008). Produção De Sorbitol E Ácidos Orgânicos Por *Zymomonas Mobilis*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. **Doutoramento**: 235.

Masuda, T., T. Sonobe, F. Matsuda and M. Horie (1993). Process for Fractional Separation of Multi-Component Fluid Mixture. USA. **5.198.120**.

Mata, V. G. and A. E. Rodrigues (2000). " Separation of Ternary Mixtures by Pseudo-Simulated Moving Bed Chromatography." J.Chromatog. A **939**: 23-40.

Miyamoto, Y., T. Ooi and S. Kinoshita (2000). "Production of Lactobionic Acid from Whey by *Pseudomonas Sp Ls13-1*." Biotechnology Letters **22**(5): 427-430.

Mueller, J. and U. Hoffmann (1935). Production of Polyhydric Alcohols. I. F. AG. USA, Germany. **US1990245 (A)** 03.

Nicoud, R. M. and R. E. Majors (2000). "Simulated Moving Bed Chromatography for Preparative Separations." LC-GC Europe **18**(7): 887-891.

- Nishizuka, Y. and O. Hayaishi (1962). "Enzymic Formation of Lactobionic Acid from Lactose." Journal of Biological Chemistry **237**(9): 2721-&.
- Nordkvist, M., P. M. Nielsen and J. Villadsen (2007). "Oxidation of Lactose to Lactobionic Acid by a Microdochium Nivale Carbohydrate Oxidase: Kinetics and Operational Stability." Biotechnology and Bioengineering **97**(4): 694-707.
- Pais, L. S., J. M. Loureiro and A. E. Rodrigues (1998). "Separation of Enantiomers of a Chiral Epoxide by Simulated Moving Bed Chromatography." Journal of Chromatography A **827**(2): 215-233.
- Perreti, F. A., M. M. Silveira and M. Zeni (2009). "Use of Electrodialysis Technique for the Separation of Lactobionic Acid Produced by *Zymomonas Mobilis*." Desalination **245**: 626-630.
- Power, J. T. (1942). Hydrogenation of Invertible Saccharides. A. P. CO. USA. **US2280975 (A)**: 08.
- Rodrigues, R. C. R., T. J. S. B. Canhoto, J. M. M. Araujo and J. P. B. Mota (2008). "Two-Column Simulated Moving-Bed Process for Binary Separation." Journal of Chromatography A **1180**(1-2): 42-52.
- Rose JR, R. S. (1942). Accelerator for Catalytic Hydrogenation of Sugars. A. P. CO. USA. **US2292293 (A)**: 07.
- Rothrock, H. S. (1935). Production of Polyhydric Alcohols. D. PONT. USA. **US2004135 (A)**: 05.
- Rouquerol, J., F. o. Rouquerol and K. Sing (1998). Absorption by Powders and Porous Solids. San Diego, USA, ACADEMIC PRESS.
- Rousseau, R. W. (1987). Preface. Handbook of Separation Process Technology. R. W. Rousseau. New York, USA, John Wiley & Sons: 1048.
- Ruthven, D. M. (1984). Principles of Adsorption and Adsorption Processes. New York, John Wiley.
- Ruthven, D. M. and C. B. Ching (1989). "Counter-Current and Simulated Counter-Current Adsorption Separation Processes." Chem. Eng. Sci. **44**: 1011-1038.
- Satory, M., M. Furlinger, D. Haltrich, K. D. Kulbe, F. Pittner and B. Nidetzky (1997). "Continuous Enzymatic Production of Lactobionic Acid Using Glucose-Fructose Oxidoreductase in an Ultrafiltration Membrane Reactor." Biotechnology Letters **19**(12): 1205-1208.
- Schaafsma, G. (2008). "Lactose and Lactose Derivatives as Bioactive Ingredients in Human Nutrition." International Dairy Journal **18**(5): 458-465.

Sengupta, M. L., Bhattach.N and U. P. Basu (1967). "Preparation of Calcium Lactobionate by Electrolytic Oxidation of Lactose .I. Oxidation in Electrolytic Cell Using Stationary Electrodes." Indian Journal of Technology 5(5): 152-&.

Severo Júnior, J. B. (2008). Síntese Biocatalítica Do Sorbitol E Ácido Lactobônico Com Separação Simultânea Por Eletrodíálise. Pós-graduação em Engenharia. Rio de Janeiro, RJ - Brasil, Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Mestre em Ciências em Engenharia Química: 156.**

Shukla, A. A. and X. S. Han (2007). Screening of Chromatographic Stationary Phases. Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry. A. Shukla, M. Etzel and S. Gadam. New York, CRC Press - Taylor & Francis Group: 564.

Silveira, M. M. and R. Jonas (2002). "The Biotechnological Production of Sorbitol." Applied Microbiology and Biotechnology 59(4-5): 400-408.

Splechtna, B., I. Petzelbauer, U. Baminger, D. Haltrich, K. D. Kulbe and B. Nidetzky (2001). "Production of a Lactose-Free Galacto-Oligosaccharide Mixture by Using Selective Enzymatic Oxidation of Lactose into Lactobionic Acid." Enzyme and Microbial Technology 29(6-7): 434-440.

Stodola, F. H. and L. B. Lockwood (1947). "The Oxidation of Lactose and Maltose to Bionic Acids by Pseudomonas." Journal of Biological Chemistry 171(1): 213-221.

Swings, J. and J. Deley (1977). "Biology of Zymomonas." Bacteriological Reviews 41(1): 1-46.

Thompson, D. (2004). Gold Catalysts in the Food Processing Industry? CatGold News, World Gold Council.

Viikari, L. (1984a). "Formation of Levan and Sorbitol from Sucrose by Zymomonas-Mobilis." Applied Microbiology and Biotechnology 19(4): 252-255.

Viikari, L. (1984b). "Formation of Sorbitol by Zymomonas-Mobilis." Applied Microbiology and Biotechnology 20(2): 118-123.

Viikari, L. and M. Korhola (1986). "Fructose Metabolism in Zymomonas-Mobilis." Applied Microbiology and Biotechnology 24(6): 471-476.

Wankat, P. (2007). Separation Process Engineering. Massachusetts, USA, Prentice Hall.

Wankat, P. C. (2001). " Simulated Moving Bed Cascades for Ternary Separations." Ind. Eng. Chem. Res. 40: 6185-6193.

Wooley, R., Z. MA and N. H. L. A. WANG (1998). "Nine-Zone Simulating Moving Bed for the Recovery of Glucose and Xylose from Biomass Hydrolyzate." Ind. Eng.Chem. Res. 37: 3699-3709.

Zachariou, M. and R. K. Scopes (1986). "Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas-Mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production." Journal of Bacteriology **167**(3): 863-869.

3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA*

Este capítulo trata da definição de um método analítico de quantificação das substâncias lactose, frutose, sorbitol e ácido lactobiónico (AL) usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A separação dos componentes desta mistura quaternária é investigada utilizando três colunas cromatográficas de empacotamento com leitos distintos e empregando diferentes eluentes em diversas composições. O principal resultado esperado neste capítulo consiste no estabelecimento de uma metodologia que empregue um eluente simples e ecológico, que resulte em uma técnica de quantificação rápida e prática. Adicionalmente, este capítulo introduz aspectos ligados ao estudo da separação dos componentes da mistura e os mecanismos envolvidos na adsorção de cada substância sobre a fase estacionária. Este assunto é discutido posteriormente no capítulo 5 nos ensaios com colunas preparativas.

3.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um método analítico quantitativo é uma etapa muito importante para o estudo da separação dos componentes de uma mistura. A análise quantitativa de carboidratos, em laboratórios de análise de alimentos, geralmente inclui a capacidade de quantificação de mono- e dissacarídeos, sendo que os mais importantes são listados pela glicose, frutose, sacarose, lactose e maltose. A composição de diversas substâncias presentes nos alimentos exige, portanto, uma elevada eficiência dos métodos analíticos, permitindo a quantificação de concentrações muito baixas de sacarídeos, com aplicação de técnicas analíticas avançadas (Folkes e Jordan, 2006). Atualmente, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem se tornado o instrumento escolhido para

*Baseado no artigo “Pedruzzi, I., Malvessi, E., Mata, V.G., Borges da Silva, E.A., Silveira, M.M., Rodrigues, A.E., Quantification of lactobionic acid and sorbitol from enzymatic reaction of fructose and lactose by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatog. A* 1145 (2007) 128–132.”

quantificar os açúcares comuns presentes em alimentos, nas suas mais variadas complexidades de composição, exigindo tanto a separação de misturas complexas como a elevada sensibilidade na detecção (Folkes e Jordan, 2006). Nos últimos anos, esta técnica de análise evoluiu expresivamente nas diversas partes que compõe um sistema de análise por HPLC (coluna e detector). Uma boa técnica deve ser eficientemente capaz de quantificar as substâncias de uma mistura sem requerer pré-tratamentos com a amostragem (Folkes e Jordan, 2006).

Dentro deste contexto, a mistura de lactose, frutose, sorbitol e AL consiste em uma solução onde está presente uma gama de funções orgânicas com mono e dissacarídeos, ácidos aldónicos e poliálcool. Esta mistura, pouco usual, não é facilmente quantificada pelas técnicas analíticas mais comuns como a refractometria ou a partir de reações colorimétricas para quantificação por espectrofotometria (Folkes e Jordan, 2006). Um método analítico por cromatografia líquida foi proposto por Simms e colaboradores (1994) que utilizaram uma coluna empacotada com resina de β -Cyclodextrin para a quantificação do AL e da lactobionolactona, ambos formados pela oxidação catalítica heterogênea da lactose. Satory e colaboradores (1997) empregaram uma coluna analítica cuja fase estacionária era composta de uma resina de troca iónica na forma cálcica e com base em copolímero de estireno-divinilbenzeno (PS-DVB). Estes autores quantificaram a lactose, a frutose, o AL ao estudar a reacção enzimática catalisada pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) para a conversão da lactose e frutose à AL e sorbitol. Neste caso a reacção ocorria em um reactor de membranas de ultra-filtração. Entretanto, a metodologia não permitia a quantificação de sorbitol e AL que eluíam no mesmo tempo de retenção. Miyamoto e colaboradores (2000) utilizaram uma coluna cromatográfica empacotada com resina de Na-PS-DVB, utilizando água como eluente, para quantificar o AL formado durante o cultivo de *Pseudomonas sp.* LS13-1, em meio contendo lactose.

As resinas de PS-DVB têm muitas vantagens como fase estacionária para separações de troca iónica. Tais adsoventes possuem excelente resistência física e química contra a degradação por oxidação, hidrólise ou elevadas temperaturas. O anel aromático pode reagir por meio de reações aromáticas eletrofílicas, como por exemplo, a incorporação de grupos sulfónicos. Os grupos iónicos, por exemplo os grupos sulfónico ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$) ou carboxílico ($-\text{COOH}$) nas resinas catiónicas, modificam as propriedades de retenção hidrofóbicas da resina e alteram o tempo de retenção dos carboidratos neutros (Huck e Bonn, 2005). Colunas

contendo a resina de PS-DVB apresentam aplicabilidade na separação de diferentes compostos biológicos tal como proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (Tanaka *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Chambers e Fritz, 1998; Masuda *et al.*, 2002; Huck *et al.*, 2005), e também polióis e ácidos carboxílicos alifáticos (Tanaka *et al.*, 1995). A natureza hidrofílica das resinas de PS-DVB é uma característica importante (Tanaka *et al.*, 1995) sendo fortemente afetada pelo grupo sulfônico (Chambers e Fritz, 1998; Huck e Bonn, 2005) e influenciada pelo pH durante as análises (Fourneron e Nait-Si, 2006).

A resina β -Cyclodextrina é produzida pela hidrólise enzimática do xarope de amido com ciclodextrin glucosil transferase (CGT), formando heptâmeros cíclicos com sete unidades de glicose unidas por ligações α -1,4. Existem três estruturas comuns das resinas α , β and γ ciclodextrinas, formadas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente. Ligações metílicas e 1,4-glucosídicas oxigenadas formam a cavidade hidrofóbica que interage com estruturas aromáticas em fase móvel aquosa, enquanto que aminas e grupos carbonil interagem com grupos hidroxil na borda da cavidade formando complexos diasteroméricos (Astec, 2005). Colunas empacotadas com as resinas ciclodextrina e sílica, na forma gel, têm aplicabilidade para separação de carboidratos (Armstrong e Jin, 1989; Simms *et al.*, 1993) e ácidos orgânicos (Simms *et al.*, 1994; Simms *et al.*, 1995). Simms e colaboradores (1994; 1995) mostraram que a separação da lactose e do AL pode ser possível nestas colunas cromatográficas utilizando uma solução eluente composta por acetonitrila e tampão fosfato na proporção 70:30 (NaH_2PO_4 50mM, pH 5.0).

Neste capítulo são apresentadas as condições para a quantificação de misturas contendo lactose, frutose, sorbitol e AL de uma solução de referência preparada para simular uma solução decorrente da bioconversão catalisada pela enzima glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) de células de *Zymomonas mobilis*. A técnica em HPLC é considerada levando em conta os benefícios do uso de fases móveis simples e das vantagens do emprego de resinas de troca iônica com base em PS-DVB, que poderiam ser selecionadas para futuros estudos em colunas cromatográficas preparativas.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 PRODUTOS QUÍMICOS

Os padrões de sorbitol, D-frutose e ácido lactobiónico (AL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis USA) enquanto o padrão de lactose foi da Panreac (Barcelona, Spain). A solução de ácido sulfúrico, empregada como eluente em análises, foi preparada a partir do ácido sulfúrico p.a. adquirido da Merck (Damstadt, Germany). A acetonitrila e diidrogenofosfato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

3.1.2 EQUIPAMENTOS

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), da marca Gilson (France), está equipado com uma bomba isocrática (Modelo 305), com um módulo manométrico (Modelo 805) e um detector de índice de refração (Modelo 131). A coluna foi mantida dentro de um tubo com circulação de água a temperatura controlada. Para a circulação da água e o controle da temperatura, foi utilizando uma bomba de circulação Haake D1 (Germany).

As colunas cromatográficas utilizadas foram: coluna Cyclobond I 2000 (250x4,6 mm, diâmetro de partícula 5 μ m, fase estacionária com β -Ciclodextrina) da Advanced Separation Technology (Whippany, NJ, USA), coluna HPX-87H com resina fortemente catiónica de troca iônica na forma hidrogênio (300 x 7.8 mm, diâmetro de partícula 9 μ m, fase estacionária com polímero de poliestireno-divinil-benzeno) da Bio-Rad Labs. (Richmond, CA, USA) e coluna ICSep ICE-ION-300 com resina de troca catiónica iônica na forma hidrogênio forte (300 x 7.8 mm, diâmetro de partícula 7 μ m, fase estacionária com polímero de poliestireno-divinil-benzeno) da Transgenomic (San Jose, CA, USA). O volume de 20 μ L era carregado manualmente no injetor Rheodyne modelo 7125 (California, USA) para obtenção dos cromatogramas.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 SEPARAÇÃO SOBRE A RESINA β -CICLODEXTRINA

Alguns testes preliminares utilizando a coluna carregada com a resina de β -Ciclodextrina não mostraram uma boa separação para a mistura das substâncias quando sorbitol está presente, conforme Figura 3.1.

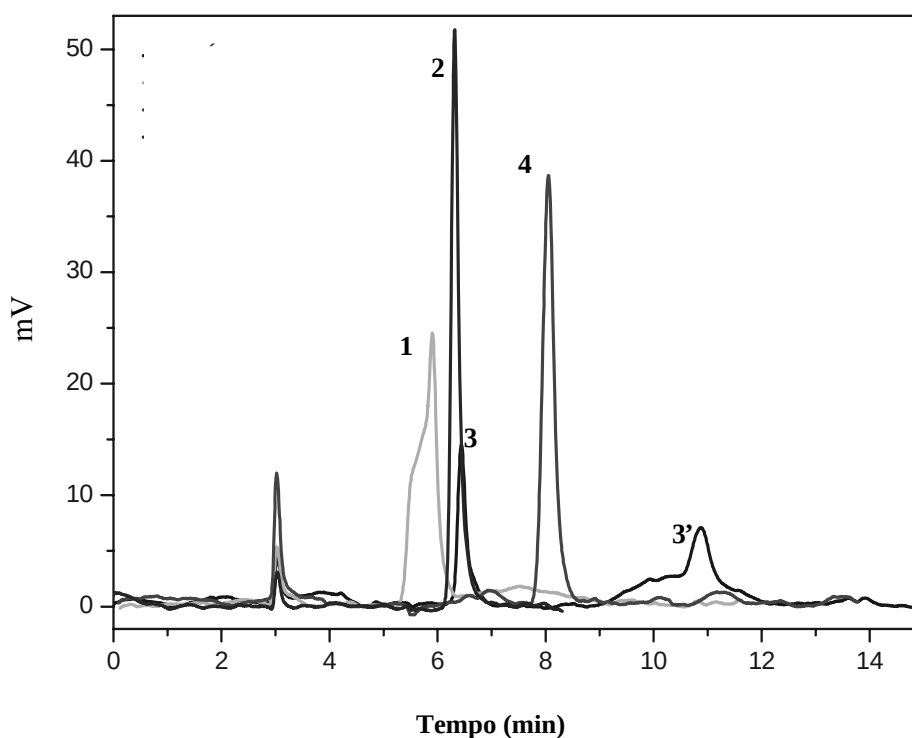


Figura 3.01 – Cromatogramas mono-componente de lactose, frutose, sorbitol e AL ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), em coluna carregadas com β -Ciclodextrina (Cyclobond I 2000, $250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$). A coluna foi eluída a $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com uma solução de acetonitrila: NaH_2PO_4 10mM ($70:30$), $\text{pH } 3.0$ e a 20°C . (1 – frutose, 2 – sorbitol, 3 – lactona, 3' – AL e 4 – lactose), (Malvessi, 2005).

As condições testadas foram baseadas nos estudos de Simms e colaboradores (1994) que mostravam uma boa separação do AL e da lactose na ausência do sorbitol e da frutose. No presente trabalho a concentração da solução de acetonitrila: tampão fosfato de sódio

(70:30) e o pH do eluente foram reformulados para 10 mM e pH 3.0. Após a incorporação da acetonitrila (70:30) o pH foi novamente corrigido com ácido fosfórico (Malvessi, 2005). A análise foi feita à temperatura ambiente com caudal de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e não foi observado problemas de saturação devido a elevada concentração de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para as substâncias, conforme é reportado por Simms e colaboradores (1994).

Os resultados apresentados na Figura 3.1 mostram uma excelente separação do sorbitol e da lactose, com picos simétricos em 6.5 e 8.0 min, respectivamente. No entanto foi observado que a lactobionolactona e o sorbitol apresentam o mesmo tempo de retenção (6.5 min). Picos assimétricos da frutose e do AL foram observados em 5.5 min e entre 9.0 e 12 min respectivamente.

A ocorrência da lactona no cromatograma (Figura 3.1) pode ser justificada por sua presença nos cristais do AL ou ser formada durante o processo de dissolução destes cristais, sendo este facto um problema na aplicação deste método quantitativo. As condições para o aparecimento do pico da lactona têm sido associadas com o pH (valores ácidos) do meio (Black *et al.*, 1965; Hicks *et al.*, 1985). A substância lactobionolactona é uma estrutura intermediária formada durante o processo de oxidação da lactose em AL (Simms *et al.*, 1994). Os picos cromatográficos na separação realizada por (Simms *et al.*, 1994) são mais simétricos e apresentam um menor tempo de retenção do que aqueles observados na Figura 3.1. Isto revela que o ajuste do pH torna-se necessário para uma melhor análise quantitativa das substâncias para a gama de concentrações consideradas. A solução para a redução do pico da lactobionolactona é uma hidrólise alcalina da solução de referência (Black *et al.*, 1965). No entanto, a importância econômica deste intermediário, formado no processo de manufatura desse cosmético pode ser atractiva. Entretanto, visando a referida separação quaternária em um sistema de leito móvel simulado (LMS) é conveniente empregar eluentes menos complexos, tal como a própria água, ao invés de eluentes orgânicos, como a acetonitrila.

3.2.2 TESTES DE SEPARAÇÃO COM RESINAS DE TROCA IÓNICA FORTES

As análises cromatográficas com ambas as colunas de PS-DVB (HPX-87H e IC Sep ICE-ION-300) foram avaliadas utilizando uma soluções de ácido sulfúrico como eluente. O pH testado para o eluente foi de 1 a 3 quando empregada a coluna HPX-87H, segundo as recomendações do fabricante, operado com uma condição de pressão máxima de até 95 bar.

No entanto, para a coluna ICSep-ICE-ION-300 a faixa de pH investigada foi de 0 a 7 e pressão máxima de 70 bar. A máxima temperatura foi de 75°C.

O efeito da temperatura na resolução dos picos pode ser observado na Figura 3.2. Em altas temperaturas os picos da frutose e do sorbitol são mais simétricos e a viscosidade do eluente é menor, permitindo o uso de caudais de eluição maiores na coluna e, assim, reduzindo o tempo de análise. Além disso, a difusividade das substâncias é aumentada com o aumento da temperatura beneficiando a resolução dos picos.

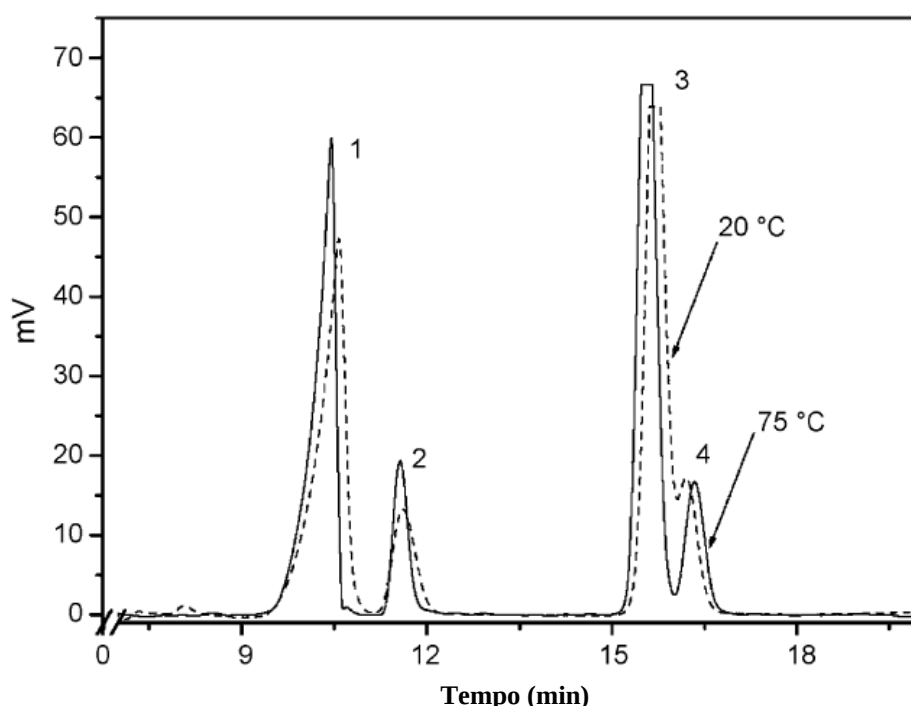


Figura 3.02 - Efeito da temperatura sobre o cromatograma da solução de referência (AL, lactose, frutose e sorbitol) em eluente contendo ácido sulfúrico (0.450 mM, pH 3.1). Coluna ICSep ICE-ION-300, 300 mm x 7.8 mm, 7 μ m a 20°C e 75°C eluída com 0.5 mL min⁻¹. (1 - AL, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol).

A Figura 3.3 mostra a influência do pH do eluente na separação da solução de referência contendo lactose, frutose, sorbitol e AL. Conforme pode ser verificado nesta figura, a simetria do pico cromatográfico do AL é melhorada quando o eluente torna-se mais ácido. Para pH < 3.1 ocorre uma sobreposição dos picos do AL, enquanto que para pH > 3.1 a

simetria do pico desta substância é afetada devido ao provável surgimento da substância lactobionolactona.

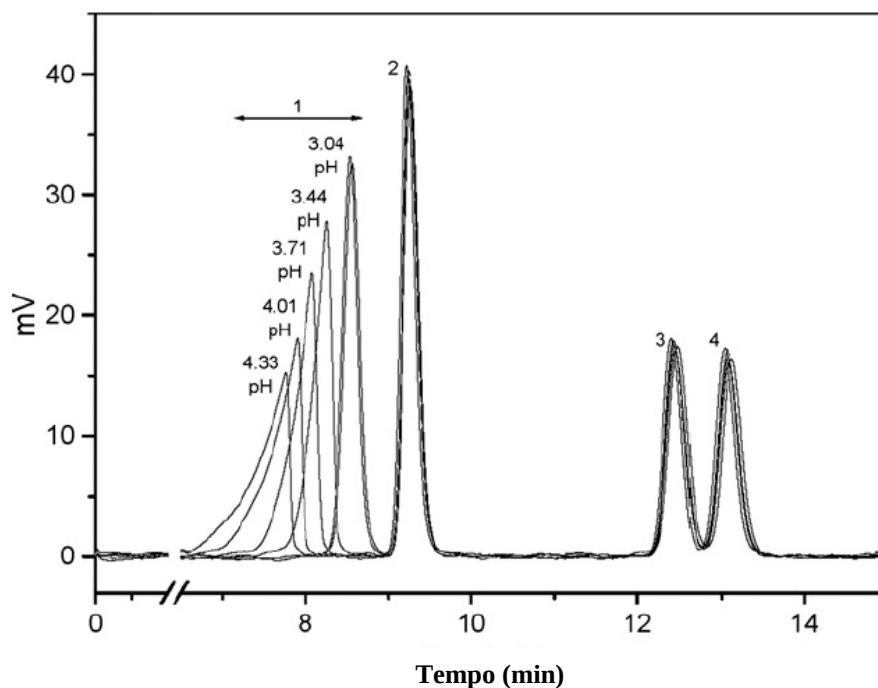


Figura 3.03 - Efeito do pH do eluente na separação da mistura de lactose, frutose, sorbitol e AL. Cromatograma da mistura das substâncias na concentração de $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Eluente: diversas concentrações de ácido sulfúrico. Coluna ICSep ICE-ION-300 (300 mm x 7.8 mm, 7 μm) a 75°C e eluída a $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. (1 - AL, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol).

A substância lactobionolactona foi encontrada em solução de referência após a dissolução dos cristais de AL no eluente, conforme Figura 3.4. Neste caso, a formação desse composto é associada com o pH ácido do solvente utilizado (água ou solução do eluente). A recomendação para prevenir à formação da lactobionolactona é a dissolução dos cristais em solução alcalina (Black *et al.*, 1965).

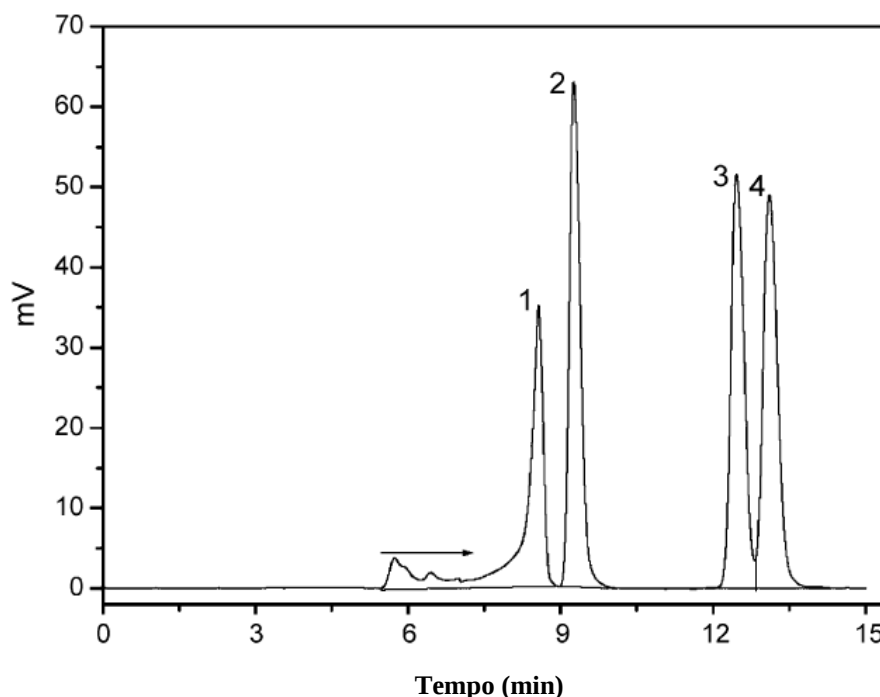


Figura 3.04 – Cromatograma da solução de referência preparada com o eluente acidificado (H_2SO_4 , 0.450 mM, pH 3.1) mostrando a presença da lactobionolactona no tempo de retenção de 6 min. e o pico assimétrico do AL. Coluna ICsep ICE-ION-300, 300 mm x 7.8 mm, 7 μm a 20°C e 75°C eluída com 0.5 mL min^{-1} . (1 - AL, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol).

No entanto, a estrutura da lactona pode ser hidrolisada pelo aumento do pH da solução em solução para 11-12 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por 30 min seguido da elevação do volume para um valor conhecido. Nesta análise os cristais de AL foram dissolvidos em $\text{Ca}(\text{OH})_2$, em razão equimolar, onde foi possível reduzir a formação da lactona, como mostrado na Figura 3.5. O lactobionato de cálcio tinha aproximadamente pH 5.5 e o volume final foi completado com solução de ácido sulfúrico do eluente a pH 3.1.

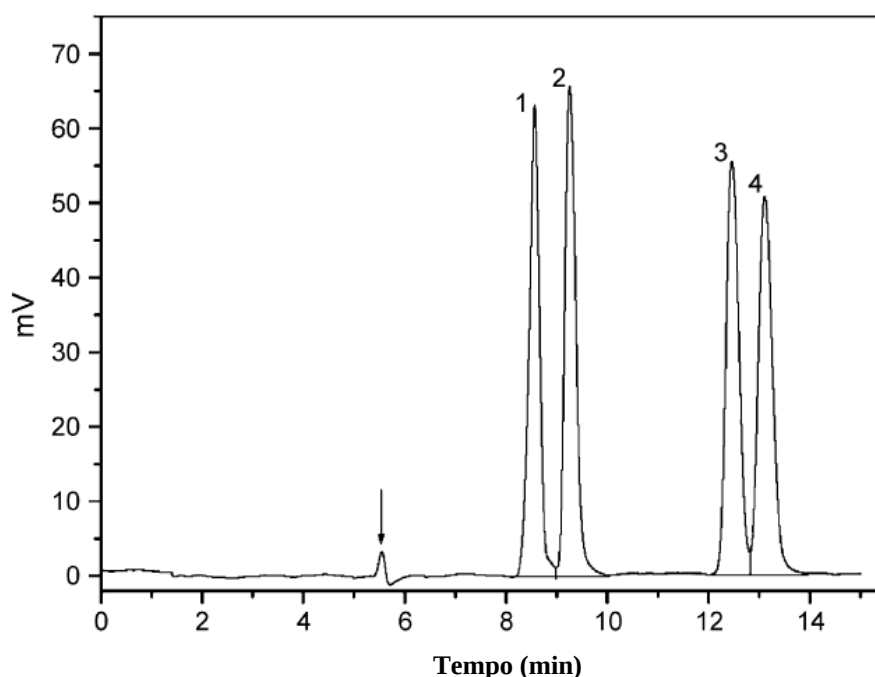


Figura 3.05 - Cromatograma da solução de referência preparada em (H_2SO_4 , 0.450 mM, pH 3.1) mostrando a presença da lactobionolactona no tempo de retenção de 6 min. e o pico assimétrico do AL. Coluna IC Sep ICE-ION-300, 300 mm x 7.8 mm, 7 μm a 20°C e 75°C eluída com 0.5 mL min^{-1} . (1 - AL, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol).

A Figura 3.6 mostra o cromatograma obtido com a coluna Bio-Rad (Malvessi, 2005). A principal diferença quando comparada com a Figura 3.3 é a menor separação dos picos. De fato, a Figura 3.3 mostra a importância do pH do eluente na eficiência da separação; é claro que com o decréscimo do pH o pico do AL tende a sobrepor o pico da lactose. A coluna da Bio-Rad também é formada por resina de troca iônica forte na forma H^+ com diâmetro de partícula de 9 μm e *crosslink* de 8%. No entanto, a coluna da Transgenomic contém a resina com 6% de *crosslink*. O *crosslink* da resina é um importante parâmetro na separação cromatográfica. Resinas formadas em estireno divinilbenzeno são do tipo gel relativamente rígido. Com menor *crosslink*, a abertura da estrutura é maior e a permeabilidade é alcançada para substâncias com maior peso molecular (Bio-Rad).

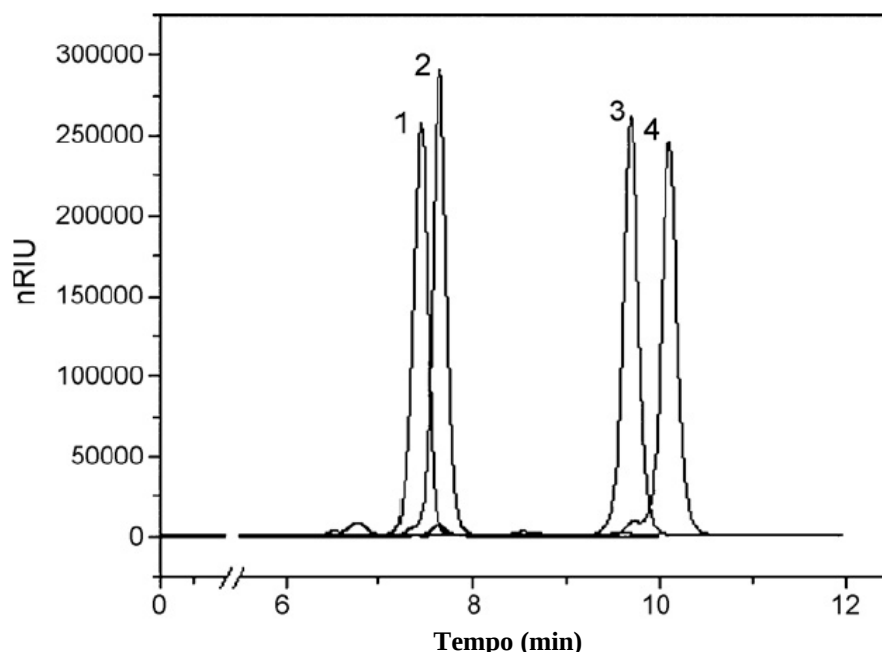


Figura 3.06 - Cromatograma individual do AL, lactose, frutose e sorbitol ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) preparado em solução de H_2SO_4 (0.500 mM , $\text{pH } 2.8$). Coluna HPX-87H, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, $9 \mu\text{m}$ a 60°C eluída com 0.6 mL min^{-1} . (1 - AL, 2 - lactose, 3 - frutose e 4 - sorbitol). Este cromatograma foi obtido em CLAE Agilent Technology modelo 9100 (Malvessi, 2005).

3.3 CONCLUSÕES

As condições experimentais para a análise da mistura de AL, lactose, frutose e sorbitol em colunas com PS-DVB foram determinadas pela primeira vez. A mistura compõe a solução de bioconversão de lactose e frutose pela enzima GFOR/GL de *Z. mobilis*. O pH do eluente e a temperatura da coluna foram os principais parâmetros estudados e têm forte influência na separação e na simetria dos picos. O método analítico proposto usa resina de troca iônica forte na forma H^+ com suporte em PS-DVB (ICEp-ION-300, $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$, diâmetro da partícula $7 \mu\text{m}$) e eluente H_2SO_4 0.450 mM ($\text{pH } 3.1$) a 75°C . Os cristais de AL têm que ser dissolvidos em solução alcalina com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, (ou hidróxido de sódio ou potássio) em proporção equimolar com o ácido para prevenir a formação da lactona. Este é um método analítico simples e rápido para a quantificação de AL e sorbitol produzidos pela

reação enzimática com GFOR e é um importante método para a determinação das concentrações em diferentes estágios do processo de separação dessas substâncias em escala preparativa.

3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armstrong, D. W. and H. L. Jin (1989). "Evaluation of the Liquid-Chromatographic Separation of Monosaccharides, Disaccharides, Trisaccharides, Tetrasaccharides, Deoxysaccharides and Sugar Alcohols with Stable Cyclodextrin Bonded Phase Columns." Journal of Chromatography **462**: 219-232.

Astec (2005). Cyclobond Handbook - a Guide to Using Cyclodextrin Bonded Phases for Chiral Lc Separation. USA, Astec.

Bio-Rad Guide to Aminex Hplc Columns for Food and Beverage Biotechnology, and Bio-Organic Analysis., Bio-Rad 80.

Black, D. S. C., G. M. Blackburn and G. A. R. Johnston (1965). Aliphatic Monohydroxy-Monocarboxylic Acids and Related Compounds, Aliphatic Compounds - Part D. Rodd's Chemistry of Carbon Compounds. Netherlands, Elsevier. **I**: 418.

Chambers, T. K. and J. S. Fritz (1998). "Effect of Polystyrene-Divinylbenzene Resin Sulfonation on Solute Retention in High-Performance Liquid Chromatography." Journal of Chromatography A **797**(1-2): 139-147.

Folkes, D. J. and M. A. Jordan (2006). Mono- and Disaccharides: Analytical Aspects. Carbohydrates in Food. A.-C. Eliasson. Boca Raton, CRC Press: 527.

Fourneron, J. D. and Y. Nait-Si (2006). "Effect of Eluent Ph on the Hplc-Uv Analysis of Hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.)." Phytochemical Analysis **17**(2): 71-77.

Hicks, K. B., P. C. Lim and M. J. Haas (1985). "Analysis of Uronic and Aldonic Acids, Their Lactones, and Related-Compounds by High-Performance Liquid-Chromatography on Cation-Exchange Resins." Journal of Chromatography **319**(2): 159-171.

Huck, C. W., R. Bakry and G. K. Bonn (2005). "Polystyrene/Divinylbenzene Based Monolithic and Encapsulated Capillary Columns for the Analysis of Nucleic Acids by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry." Engineering in Life Sciences **5**(5): 431-435.

Huck, C. W. and G. K. Bonn (2005). "Poly(Styrene-Divinylbenzene) Based Media for Liquid Chromatography." Chemical Engineering & Technology **28**(12): 1457-1472.

Malvessi, E. (2005). Produção Biotecnológica De Sorbitol E Ácido Lactobiônico: Separação De Produtos E Substratos Por Cromatografia Em Fase Líquida. Porto, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto - FEUP: 20.

Masuda, T., K. Kitahara, Y. Aikawa and S. Arai (2002). "High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Carbohydrates on a Stationary Phase Prepared from Polystyrene-Based Resin and Novel Amines." Journal of Chromatography A **961**(1): 89-96.

Miyamoto, Y., T. Ooi and S. Kinoshita (2000). "Production of Lactobionic Acid from Whey by Pseudomonas Sp Ls13-1." Biotechnology Letters **22**(5): 427-430.

Satory, M., M. Furlinger, D. Haltrich, K. D. Kulbe, F. Pittner and B. Nidetzky (1997). "Continuous Enzymatic Production of Lactobionic Acid Using Glucose-Fructose Oxidoreductase in an Ultrafiltration Membrane Reactor." Biotechnology Letters **19**(12): 1205-1208.

Simms, P. J., R. M. Haines and K. B. Hicks (1993). "High-Performance Liquid-Chromatography of Neutral Oligosaccharides on a Beta-Cyclodextrin-Bonded Phase Column." Journal of Chromatography **648**(1): 131-137.

Simms, P. J., K. B. Hicks, R. M. Haines, A. T. Hotchkiss and S. F. Osman (1994). "Separation of Lactose, Lactobionic Acid and Lactobionolactone by High-Performance Liquid-Chromatography." Journal of Chromatography A **667**(1-2): 67-73.

Simms, P. J., A. T. Hotchkiss, P. L. Irwin and K. B. Hicks (1995). "High-Performance Liquid-Chromatographic Separation of Oligogalacturonic Acids on a Cyclomaltoheptaose (Beta-Cyclodextrin) Bonded-Phase Column." Carbohydrate Research **278**(1): 1-9.

Tanaka, K., K. Ohta and J. S. Fritz (1996). "Ion-Exclusion Chromatography of Ethanolamines on an Anion-Exchange Resin by Elution with Polyols and Sugars." Journal of Chromatography A **739**(1-2): 317-325.

Tanaka, K., K. Ohta, J. S. Fritz, Y. S. Lee and S. B. Shim (1995). "Ion-Exclusion Chromatography with Conductimetric Detection of Aliphatic Carboxylic-Acids on an H⁺-Form Cation-Exchange Resin Column by Elution with Polyols and Sugars." Journal of Chromatography A **706**(1-2): 385-393.

Yang, Y. B., K. Harrison and J. Kindsvater (1996). "Characterization of a Novel Stationary Phase Derived from a Hydrophilic Polystyrene-Based Resin for Protein Cation-Exchange High-Performance Liquid Chromatography." Journal of Chromatography A **723**(1): 1-10.

4 CULTIVO DA *ZYMOMONAS MOBILIS*, PRÉ-TRATAMENTOS E CINÉTICA DE BIOCONVERSÃO DA GFOR PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LACTOBÍONICO E SORBITOL

Este capítulo trata das duas etapas principais que envolvem a produção biotecnológica do ácido lactobiónico (AL) e do sorbitol com as enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) contidas nas células da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. A primeira etapa compreende a produção do biocatalisador (células de *Z. mobilis*), com elevada actividade destas enzimas, e os tratamentos subsequentes de permeabilização e reticulação da parede celular bacteriana. O cultivo da *Z. mobilis* é obtido através da fermentação da glicose, que produz etanol como subproduto. Nesta fase, os factores de conversão do substrato (glicose) em células e em produto (etanol) e os factores de rendimento e produtividade do biocatalisador e a máxima velocidade específica de crescimento celular são determinados. Estes parâmetros são comparados com os reportados na literatura para caracterizar o processo de produção das enzimas GFOR e GL. Posteriormente, a parede celular das células da bactéria é permeabilizada para facilitar o acesso dos substratos às enzimas presentes no espaço periplásmico. Uma reticulação com glutaraldeído restabelece e fortalece as estruturas cruzadas das cadeias de polipeptídios-glicano e de polissacarídios que compõe a parede celular e as células são acondicionadas adequadamente para posterior aplicação nos ensaios cinéticos para a produção do AL e sorbitol.

A segunda etapa deste capítulo aborda a cinética de bioconversão da mistura lactose/frutose para a produção de AL e sorbitol, respectivamente. Os ensaios de cinética são avaliados nas condições de células livres e imobilizadas. Sob a condição de células livres, os

parâmetros do modelo cinético para o mecanismo do tipo ping-pong são investigados. Algumas características importantes relacionadas com a velocidade máxima e a composição de substratos não equimolares são consideradas. Nesta etapa os resultados das experiências revelam a existência de um fenómeno intrínseco quando comparados com o modelo matemático, reportado na literatura, na produção de ácido glicónico e sorbitol com GFOR. É notável que pelo menos um efeito cooperativo e uma ação inibidora poderão estar presentes na cinética de bioconversão da lactose e frutose na produção do AL e sorbitol. Entretanto, essa questão é colocada em evidência e o modelo de Hill é utilizado para modelar a cinética na condição otimizada do processo. O fechamento da secção trata da cinética na condição de células imobilizadas. Ca-alginato é utilizado como suporte para as células de *Z. mobilis* e o provável efeito da resistência à transferência de massa no alginato é avaliado em comparação com as cinéticas em modo de células livres. As condições de operação do biorreactor e a composição da solução bioconvertida são definidas e tomadas como base para a modelização dos sistemas de separação em cromatografia líquida de leito móvel simulado (LMS), tratados posteriormente no capítulo 6, com a aplicação de estratégias de separação.

4.1 INTRODUÇÃO

A fermentação de sumos e seivas de plantas, especialmente do género *Agave* que apresenta elevada concentração de açúcares, com bactérias do género *Zymomonas* ocorre em diversas regiões tropicais da América, África e Ásia (Swings e Deley, 1977). Entre elas, *Zymomonas mobilis* é a bactéria mais reportada na literatura como microrganismo substituto da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol por fermentação (Rogers *et al.*, 1979). *Z. mobilis* apresenta como principais características a elevada velocidade específica de consumo de glicose, a capacidade de crescer em condição estritamente anaeróbia, a tolerância a elevados teores de etanol e, desta forma, uma maior eficiência na conversão da glicose em etanol e, consequente, um menor factor de conversão de substrato em células (Jobses *et al.*, 1985). Impulsionada pela necessidade de novas tecnologias para a bio-produção de etanol, a capacidade da *Z. mobilis* sintetizar sorbitol como subproduto da fermentação alcoólica de soluções contendo sacarose ou mistura de glicose e frutose foi divulgada (Barrow *et al.*, 1984; Viikari, 1984a; b). Este efeito, indesejável para a produção do etanol por via fermentativa, reporta concentrações de sorbitol na ordem de 11% em peso da massa inicial do açúcar correspondente (Viikari, 1984a; b). Entretanto, existe um número muito limitado de sistemas

biológicos capazes de produzir sorbitol o que faz da GFOR uma enzima interessante para ser investigada com o propósito de otimizar esta via de produção (Jonas e Silveira, 2004).

A descoberta de uma nova enzima, glicose-frutose oxidoreductase (GFOR), responsável pela formação do sorbitol, foi elucidada mais tarde. Sua estrutura comporta o cofactor NADP ligado a estrutura protéica, tornando esta enzima activa e independente da condição vital da célula. Adicionalmente, sua configuração tetramérica foi determinada através da técnica de filtração molecular em gel (Zachariou e Scopes, 1986). Posteriormente, a análise por cristalografia de raios-X confirmou a forte ligação do cofactor NADP à estrutura protéica da enzima e sua improvável dissociação. Esta estrutura, formada por dois domínios de uma clássica ligação dinucleotídica, possui um braço N-terminal que envolve o NADP e é responsável por estabilizar a enzima na forma tetramérica (Kingston *et al.*, 1996). Posteriormente, o aprofundamento dos estudos da estrutura tridimensional da GFOR mostrou a possibilidade do truncamento do braço N-terminal favorecendo uma mutação na estrutura quaternária da enzima para a sua forma dímica (Lott *et al.*, 1998). A estrutura da enzima é um dos factores mais importantes para a modelização da cinética em sistemas bi-substratos (Leskovac, 2003).

A reacção de bioconversão catalisada pela enzima GFOR (purificada) sobre o par de substratos glicose e frutose foi determinada como sendo um clássico sistema ping-pong em que um único sítio processa todos os substratos envolvidos (Zachariou e Scopes, 1986). Essa definição foi comprovada pela medida da velocidade inicial de formação do ácido glicónico em diversas concentrações dos substratos glicose e frutose. Essas medidas, no gráfico de Lineweaver-Burk mostram o comportamento linear quando a frutose é mantida constante e, também, o comportamento paralelo característico da cinética ping-pong quando a concentração de frutose é alterada para um outro patamar de concentração. Diversos açúcares em substituição a glicose e a frutose foram investigados, concluindo-se haver uma elevada especificidade da GFOR para a redução da frutose a sorbitol, e uma baixa actividade catalítica para outros açúcares oxidativos além da glicose (Zachariou e Scopes, 1986), entre eles a lactose (Saty et al., 1997).

Estudos utilizando a GFOR contida em células permeabilizadas de *Z. mobilis*, para a produção de sorbitol e ácido glicónico, foram reportados por diversos investigadores (Chun e Rogers, 1988; Rehr *et al.*, 1991; Ferraz *et al.*, 2001) e apresentam rendimentos de conversão muito próximos àqueles obtidos nos ensaios com a enzima purificada. Posteriormente, foram

verificados os efeitos da elevada concentração de glicose no comportamento cinético da GFOR e atribuído um efeito limitante na dissociação da gliconolactona quando comparado com a etapa de transferência do hidrogênio para a redução da frutose a sorbitol, a altas concentrações iniciais dos açúcares (Hardman *et al.*, 1992).

Todos os trabalhos publicados na literatura especializada, em relação à GFOR, citam o mecanismo ping-pong como adequado para descrever as etapas de oxidação e de redução do par de substratos (glicose/frutose) que ocorrem em cada um dos sítios activos da enzima. Entretanto, os parâmetros cinéticos quando reportados são apresentados em termos da constante aparente de Michaelis-Menten. Esta aproximação, válida apenas na condição em que um dos substratos é mantido constante, impede uma discussão e melhor compreensão sobre os efeitos da composição dos substratos na cinética de bioconversão da GFOR. No trabalho de Zachariou e Scopes (1986) a faixa de concentração dos substratos investigada foi de 10 a 100 mM de glicose e 100 a 800 mM para frutose e a equação cinética obedecia ao modelo ping-pong nas condições estudadas. O par de substratos lactose e frutose para as concentrações de 50 a 650 mM da lactose e 1000 mM da frutose manteve o mesmo mecanismo e as constantes cinéticas foram obtidas por ajuste ao modelo cinético ping-pong (Satory *et al.*, 1997). No entanto, nesse estudo a equação da velocidade é determinada para uma única condição de reacção (lactose e frutose, 500 mM). Os trabalhos de Hardman e Scopes (1988) e Hardman e colaboradores (1992) buscaram determinar as constantes da reacção da GFOR para o par glicose/frutose sem aprofundamento da questão da velocidade da reacção, sendo que os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten, nesses trabalhos, foram divergentes. Portanto, não há estudos mais aprofundados sobre o mecanismo cinético da GFOR para o par de substratos lactose e frutose.

4.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.2.1 CULTIVO CELULAR

Em fermentação anaeróbica, a velocidade de formação do produto pode ser calculada a partir de equações de balanço elementares. Uma série de coeficientes de rendimento podem ser definidos para caracterizar o processo, entretanto, os mais aplicados para descrever uma

cinética de crescimento no processo fermentativo são os coeficientes de rendimento de células ($Y_{X/S}$, Eq. 4.01) e de rendimento em produto ($Y_{P/S}$, Eq. 4.02)(Blanch e Clark, 1997).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Eq. 4.01})$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (\text{Eq. 4.02})$$

onde: X é a massa de células, P é massa de produto (etanol), S é a massa de substrato (glicose) e os índices “i” e “f” representam a condição de tempo inicial e final, respectivamente.

Por definição, as velocidades de crescimento celular (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de formação de produto (etanol, μ_P) são expressos pelas equações (Eq. 4.03 a Eq. 4.05) (Blanch e Clark, 1997).

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 4.03})$$

$$\mu_S = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (\text{Eq. 4.04})$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (\text{Eq. 4.05})$$

O rendimento (ρ) e a produtividade (p) são determinados levando-se em consideração o factor estequiométrico, conforme equações (Eq. 06) e (Eq. 07).

$$\rho(\%) = \frac{Y_{P/S}}{f} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 4.06}) \quad p = \frac{(P_f - P_i)}{(t_f - t_i)} \quad (\text{Eq. 4.07})$$

onde : f é o factor estequiométrico da conversão do substrato glicose em etanol, $f = 0.511 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, t = tempo de processo.

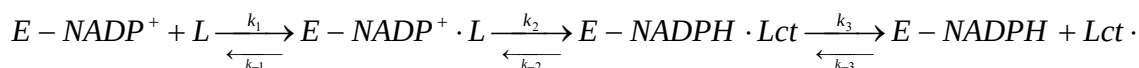
4.2.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Enzimas regulatórias, encontradas no início ou término dos caminhos metabólicos nos sistemas vivos, apresentam uma propriedade extra que implica em alterar sua actividade em função de pequenos distúrbios de concentração dos substratos, e consequentemente, não obedecendo à habitual equação de Michaelis-Menten (Monod *et al.*, 1965). Os fenómenos de regulação das enzimas são classificados como cooperatividade e alostérico, onde cooperatividade é a mudança aparente na afinidade ou actividade enzimática que se desvia de Michaelis-Menten devido a uma variação da concentração do substrato ou de outro ligante. O efeito alostérico surge quando há uma ligação de substrato ou outro ligante em um local diferente do sítio ativo da enzima e que afeta a actividade ou vinculação (Leskovac, 2003). Geralmente, interações alostéricas ocorrem devido a alterações da estrutura quaternária da enzima, sendo que existem duas classes de efeitos alostéricos (Monod *et al.*, 1965):

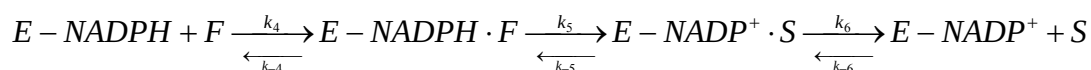
- Efeito homotrópico – caracterizados por interações entre ligantes idênticos
- Efeito heterotrópico – caracterizados por interações entre diferentes ligantes

A cinética da reacção de bioconversão para o par de substratos lactose/frutose é descrita aqui com base no mecanismo da glicose/frutose proposto por Hardman e Scopes (1988). O processo consiste em duas semi-reacções catalíticas onde o cofactor NADP é reduzido a NADPH e posteriormente oxidado retornando o ciclo catalítico regido pela cinética do tipo ping-pong. A equação do sistema lactose/frutose $\rightarrow$ AL/sorbitol, então, pode ser escrita da seguinte forma:

Semi-reacção da lactose



Semi-reacção da frutose



sendo: L = lactose; Lct = lactonolactona; F = frutose e S = sorbitol.

A redução do NADP pela lactose e a oxidação do NADPH pela lactonolactona, com base no mecanismo cinético da gliconolactona, são de primeira ordem. A oxidação do NADPH pela frutose foi determinada como de primeira ordem, com uma velocidade constante limitada em, pelo menos, 400 s^{-1} (Hardman e Scopes, 1988). Os mesmos autores concluíram que as constantes cinéticas da reacção reversível do NADP com sorbitol são inferiores a 1 s^{-1} , em ambos os sentidos e pode ser justificada pela lenta ciclização da frutose, quando na sua forma acíclica, seguida pela sua dissociação da enzima. Isso demonstra que a velocidade determinante da reacção é, provavelmente, a dissociação da lactonolactona e a transferência do hidrogênio carregado pelo NADPH para o sorbitol (Hardman e Scopes, 1988).

Desta forma, pode-se reduzir o mecanismo cinético da GFOR conforme segue:



As equações de velocidade para o sistema lactose/frutose são descritas a seguir:

$$^* = \text{NADPH} ; ^+ = \text{NADP}^+$$

$$\frac{dE^+}{dt} = 0 \longrightarrow k_{-1} \cdot [E^+ L] + k_4 \cdot [E^* F] - k_1 \cdot [E^+] \cdot [L] = 0 \quad (\text{Eq. 4.08})$$

$$\frac{dE^* F}{dt} = 0 \longrightarrow k_3 \cdot [E^*] \cdot [F] - (k_{-3} + k_4) \cdot [E^* F] = 0 \quad (\text{Eq. 4.09})$$

$$\frac{dE^+L}{dt} = 0 \longrightarrow k_1 \cdot [E^+] \cdot [L] - (k_{-1} + k_2) \cdot [E^+L] = 0 \quad (\text{Eq. 4.10})$$

$$\frac{dE^*}{dt} = 0 \longrightarrow k_2 \cdot [EL] + k_{-3} \cdot [E^*F] - k_3 \cdot [E^*] \cdot [F] = 0 \quad (\text{Eq. 4.11})$$

Isolando E^* da (Eq. 4.09) tem-se:

$$[E^*] = \frac{(k_{-3} + k_4) \cdot [E^*F]}{k_3 \cdot [F]} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

Isolando $[E.L]$ da (Eq.4.10) tem-se:

$$[E^+L] = \frac{k_1 \cdot [E^+] \cdot [L]}{(k_{-1} + k_2)} \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Utilizando $k_3[E^*][F]$ da Eq. 4.09 em Eq. 4.11, tem-se:

$$k_2 \cdot [E^+L] + k_{-3} \cdot [E^*F] - (k_{-3} + k_4) \cdot [E^*F] = 0$$

$$[E^+L] = \frac{k_4 \cdot [E^*F]}{k_2} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

Utilizando as Eq. 4.13 e Eq. 4.14 tem-se:

$$\frac{k_1 \cdot [E^+] \cdot [L]}{(k_{-1} + k_2)} = \frac{k_4 \cdot [E^*F]}{k_2}$$

$$[E^+] = \frac{k_4 \cdot (k_{-1} + k_2) \cdot [E^*F]}{k_1 \cdot k_2 \cdot [L]} \quad (\text{Eq. 4.15})$$

Utilizando a equação de conservação da enzima, tem-se:

$$[E_0] = [E^+] + [E^+L] + [E^*] + [E^*F] \quad (\text{Eq. 4.16})$$

Finalmente, utilizando a equação da velocidade da reacção tem-se:

$$v = k_4 \cdot [E^*F] \quad (\text{Eq. 4.17})$$

$$\frac{[E_0]}{v} = \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_2} + \frac{(k_1 + k_2)}{k_1 \cdot k_2 [L]} + \frac{(k_{-3} + k_4)}{k_3 \cdot k_4 [F]} \quad (\text{Eq. 4.18})$$

A forma geral pode ser então escrita como segue:

$$\frac{[E_0]}{v} = \Omega_o + \frac{\Omega_L}{[L]} + \frac{\Omega_F}{[F]} \quad (\text{Eq. 4.19})$$

$$\Omega_o = \left(\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_2} \right) \quad \Omega_L = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1 k_2} \quad \Omega_F = \frac{(k_{-3} + k_4)}{k_3 k_4} \quad (\text{Eq. 4.20})$$

Ou simplificada para:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_F}{[F]} + \frac{K_L}{[L]}} \quad (\text{Eq. 4.21})$$

sendo: $v_{\max} = [E_0]/\Omega_o$; $K_F = \Omega_F/\Omega_o$ e $K_L = \Omega_L/\Omega_o$.

O delineamento das etapas para a determinação da cinética enzimática pode ser obtido pelo método da medida da velocidade inicial da reacção. A partir de um valor inicial (aparente) da constante de Michaelis-Menten (k_M) pode-se delinear as concentrações de substratos a serem investigadas, sendo que a maior mudança na velocidade da reacção, referenciada na literatura, é na região de concentrações em torno de 0.2 a 5 vezes o valor desta constante. Posteriormente, as concentrações intermediárias podem ser tomadas a partir de uma

série aritmética que gera muitos pontos na gama alta de concentração, ou na série geométrica que distribui melhor os intervalos para uma uniforme representação dupla recíproca (Leskovac, 2003).

Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten são consideradas como as fundadoras da moderna cinética enzimática devido ao caráter definitivo das suas experiências e da viabilidade da sua teoria cinética. A equação de Michaelis-Menten é representada por um segmento de uma hipérbole retangular com uma faixa de saturação que relaciona a velocidade da reacção v_0 em função da concentração de substrato $[S]$. Nesta configuração torna-se difícil determinar com precisão a velocidade máxima (v_{max}) e a constante cinética (k_s), sendo que uma transformação linear dos resultados proporciona melhores meios para a estimativa destes parâmetros. A equação de Michaelis-Menten pode ser expressa em várias transformações lineares, sendo na prática a mais popular a de Lineweaver-Burk, Hanes e Eadie and Hofstee conforme segue (Eq.s 4.22 a 4.24) (Leskovac, 2003):

$$\text{Lineweaver-Burk} \quad \frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \left(\frac{k_s}{v_{max}} \right) \cdot \frac{1}{S} \quad (\text{Eq. 4.22})$$

$$\text{Hanes} \quad \frac{S}{v_0} = \frac{k_s}{v_{max}} + \left(\frac{1}{v_{max}} \right) \cdot S \quad (\text{Eq. 4.23})$$

$$\text{Eadie e Hofstee} \quad v_0 = v_{max} - k_s \cdot \left(\frac{v_0}{S} \right) \quad (\text{Eq. 4.24})$$

sendo: k_s interpretado como equivalente a k_M , S = substrato.

A equação de Hanes é a mais confiável para a visualização gráfica dos dados porque mostra uma melhor distribuição dos erros para uma ampla gama de concentrações de substratos. Na equação de Lineweaver-Burk, os erros são maiores em concentrações mais baixas sendo que a vantagem desta representação está na fácil aplicação dos dados experimentais. A escolha da concentração do substrato acima ou muito acima do k_M melhora a estimativa da velocidade máxima v_{max} entretanto resulta em uma má estimativa da constante específica k_M/v_{max} . Por outro lado, a escolha da concentração de substrato abaixo ou muito

abaixo do k_M melhora a estimativa da constante específica $v_{\max}/k_M$, porém penaliza com uma pobre estimativa da velocidade máxima, $v_{\max}$ (Leskovac, 2003).

As cinéticas enzimáticas envolvendo dois ou três substratos dificultam os problemas de coleta de dados e requerem uma atenção mais rigorosa. A medida da velocidade inicial deve ser determinada experimentalmente para baixas e altas concentrações de substratos, especialmente quando há inibição pelo substrato. Os mecanismos enzimáticos a serem distinguidos são o *steady-state* ordenado, equilíbrio ordenado, e ping-pong, definidos pelas equações (Eq. 4.25 a 4.27) (Leskovac, 2003):

$$v_0 = \frac{v_{\max} AB}{K_{iA} K_B + K_A B + K_B A + AB} \quad (\text{Eq. 4.25})$$

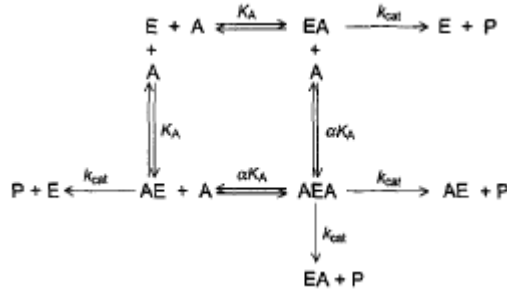
$$v_0 = \frac{v_{\max} AB}{K_{iA} K_B + K_B A + AB} \quad (\text{Eq. 4.26})$$

$$v_0 = \frac{v_{\max} AB}{K_A B + K_B A + AB} \quad (\text{Eq. 4.27})$$

onde: A e B representam os dois substratos envolvidos.

Equação de Hill

Modelos matemáticos para descrever o fenômeno cooperativo requerem uma atenção para o mecanismo enzimático e a configuração estrutural da enzima. Considerando uma enzima com idênticos dois sítios de ligação de substrato e após a ligação da primeira molécula, a constante de dissociação K_A passa a ser multiplicada por um factor α mantendo o mesmo K_{cat} em cada local. Conforme apresentado na Eq. 4.28, independentemente se o outro sítio está ocupado, a sequência de reacção é representada a seguir, onde $v_{\max}$ é igual a $2k_{cat}E_0$ (Leskovac, 2003).



$$\frac{v_0}{v_{\max}} = \frac{\frac{[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{\alpha K_A^2}}{1 + \frac{2[A]}{K_A} + \frac{[A]^2}{\alpha K_A}} \quad (\text{Eq. 4.28})$$

O modelo proposto para uma enzima tetramérica é representado a seguir, onde $v_{\max}$ é igual a $4k_{\text{cat}}E_0$, conforme segue (Leskovac, 2003):

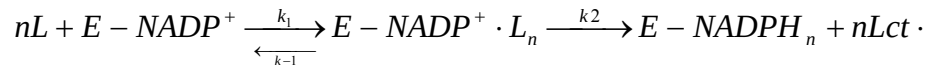
$$\frac{v_0}{v_{\max}} = \frac{\frac{[A]}{K_A} + \frac{3[A]^2}{\alpha K_A^2} + \frac{3[A]^3}{\alpha^2 \beta K_A^3} + \frac{[A]^4}{\alpha^3 \beta^2 \gamma K_A^4}}{1 + \frac{4[A]}{K_A} + \frac{6[A]^2}{\alpha K_A^2} + \frac{4[A]^3}{\alpha^2 \beta K_A^3} + \frac{[A]^4}{\alpha^3 \beta^2 \gamma K_A^4}} \quad (\text{Eq. 4.29})$$

Para uma cooperatividade positiva, onde o substrato de ligação é muito forte, torna-se significativo apenas a concentração de enzima completamente complexada. Desta forma, consideram-se os demais factores α , β , γ , e da equação acima desprezíveis para qualquer concentração de A , que é sensível em relação ao K_A . A equação proposta para esse sistema é a seguinte (Leskovac, 2003):

$$\frac{v_0}{v_{\max}} = \frac{[A]^n}{K_X + [A]^n}$$

$$K_X = \alpha^3 \beta^2 \gamma K_A^4 \quad (\text{Eq. 4.30})$$

Se a ligação de uma molécula de substrato em uma enzima induz mudanças estruturais que resultam em afinidades alteradas para os locais vagos, a curva de velocidade deixará de obedecer a Michaelis-Menten. Desta forma, o mecanismo cinético da GFOR para o par de substratos lactose/frutose, seguindo uma analogia da equação de Hill, pode ser determinado conforme segue:



As equações de velocidade para o sistema lactose/frutose são descritas de forma análoga às apresentadas pelas equações Eq. 4.08 a Eq. 4.21. Desde que “n” represente o número de sítios da enzima, a equação da velocidade pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\frac{[E_0]}{v} = \frac{1}{K_4} + \frac{1}{K_2} + \frac{(K_1 + K_2)}{K_1 \cdot K_2 [L]^n} + \frac{(K_{-3} + K_4)}{K_3 \cdot K_4 [F]^n} \quad (\text{Eq. 4.31})$$

A forma geral pode ser então escrita como segue:

$$\frac{[E_0]}{v} = \Omega_o + \frac{\Omega_L}{[L]^n} + \frac{\Omega_F}{[F]^n} \quad (\text{Eq. 4.32})$$

$$\Omega_o = \left(\frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_2} \right) \quad \Omega_L = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1 k_2} \quad \Omega_F = \frac{(k_{-3} + k_4)}{k_3 k_4} \quad (\text{Eq. 4.33})$$

Ou simplificada para:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_F}{[F]^n} + \frac{K_L}{[L]^n}} \quad (\text{Eq. 4.34})$$

sendo: $v_{\max} = [E_0]/\Omega_o$; $K_F = \Omega_F/\Omega_o$ e $K_L = \Omega_L/\Omega_o$.

4.2.3 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização celular é uma das estratégias empregadas para conduzir os bioprocessos em modo semi-contínuo ou contínuo. Entre as vantagens do emprego de suportes imobilizantes estão a facilidade de condução dos processos e da recuperação e reciclo da enzima, a estabilidade enzimática. Processos que envolvam múltiplos estágios e adição de cofatores geralmente empregam a imobilização celular como alternativa mais rentável. A eliminação do estágio de extração e purificação torna a imobilização de biocatalisadores uma alternativa econômica (Karel *et al.*, 1985). Entretanto, um dos maiores problemas da tecnologia industrial está no uso de operações que apresentam limitações a transferência de massa, entre eles os biocatalisadores imobilizados (Karel *et al.*, 1985; Jen *et al.*, 1996). A compreensão dos efeitos da imobilização sobre as células requer um conhecimento sobre as propriedades físicas e químicas da matriz suporte. Adicionalmente, o mecanismo pelo qual as células são mantidas fixas, a resistência da estrutura imobilizante no conjunto, o tipo de agente imobilizante e as interações hidrodinâmicas completam o cenário do processo com biocatalisadores imobilizados (Karel *et al.*, 1985). A obtenção da imobilização de enzimas e células pode ocorrer sob uma das quatro formas possíveis de agregação com o suporte, denominadas de acordo com a forma de interação em: adsorção sobre uma superfície, encapsulamento em uma matriz porosa, auto-agregação e contenção em barreiras físicas (Karel *et al.*, 1985). A imobilização de células à matriz formada por hidrogéis pode ocorrer sob três formas: aderência, retenção na estrutura da matriz ou micro encapsulação (Jen *et al.*, 1996).

Diversos autores reportam a produção de ácido glicónico e sorbitol com células da *Z. mobilis* imobilizadas em Ca-alginato (Chun e Rogers, 1988; Ferraz *et al.*, 2001; Erzinger *et al.*, 2003; Malvessi, 2008). A imobilização das células em Ca-alginato é caracterizada pelo aprisionamento e representa a segunda maior categoria de imobilização de biocatalisadores (Karel *et al.*, 1985). A imobilização das células nesta matriz pode ser desenvolvida através do crescimento das células sobre a estrutura já formada ou, então, durante a síntese da matriz porosa contendo as células a serem imobilizadas *in situ* (Karel *et al.*, 1985). A segunda forma de produção consiste na obtenção do gel com a forma e dimensão desejada (geralmente esféricas com diâmetros que variam de 1 a 5 mm), a serem utilizadas posteriormente como partículas de catalisadores em reactores de leito empacotado ou fluidizado.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 MICRORGANISMO

A cepa da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 (doadada pelo Laboratório de Bioprocessos, Universidade de Caxias do Sul, Brasil) foi utilizada neste estudo. Tubos de repique foram preparados para a conservação da cepa. As células de *Z. mobilis* contidas no tubo de repique inicial foram fracionadas a cada 2 mL e adicionadas a 5 mL do meio de cultivo previamente esterilizado, em tubo de ensaio de 10 mL parcialmente fechado, a temperatura de 30 °C. Após o período de crescimento, compreendido entre 48 a 72 horas, os tubos contendo as células de *Z. mobilis* crescidas foram lacrados e conservados sob temperatura de refrigeração (aproximadamente 4°C) para posterior uso como inóculo no cultivo das células em biorreactor de bancada.

4.3.2 MEIO DE CULTIVO

A composição do meio de cultivo da bactéria *Z. mobilis* foi (g·L⁻¹) (Malvessi *et al.*, 2006): glicose, 20 (tubos de repique) e 150 (cultivo); (NH₄)₂SO₄, 1,0; MgSO₄·7H₂O, 0,5; FeSO₄·7H₂O, 0,01; KH₂PO₄, 0,5; extrato de levedura, 5,0. O meio foi esterilizado em autoclave, na temperatura de 120 °C durante 15 min. A solução de glicose foi esterilizada separadamente dos demais nutrientes do meio de cultivo, excepto para o meio de repique. O pH deste meio era de 5.5 sem a necessidade de correção.

4.3.3 PRODUTOS QUÍMICOS

As substâncias utilizadas como referência para a quantificação (sorbitol, D-frutose e ácido lactobiónico) foram adquiridas na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e a lactose e o etanol anidro na Panreac (Barcelona, Spain). Os substratos utilizados na reacção de bioconversão enzimática, D-frutose 99% e α-D-Lactose monoidratada 97%, foram adquiridos na Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanha). O ácido sulfúrico, utilizado na preparação do eluente para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e KOH, utilizado no controle do pH dos processo de cultivo da bactéria *Z. mobilis* e da cinética de bioconversão, foram

adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As demais substâncias químicas utilizadas neste estudo foram de grau p.a.

4.3.4 EQUIPAMENTOS

O cultivo das células da bactéria *Z. mobilis* foi realizado em biorreactor SGI/SET2 (SGI, França) com volume nominal de 2L conectado a unidade de controle composta pelos controladores de frequência de agitação, temperatura e pH. A separação das células contidas nas amostras durante o crescimento celular foi feita em centrífuga modelo 203 (Sigma, Alemanha). A massa celular produzida no final da fermentação foi separada da fase líquida em centrífuga modelo Digtor 20 (Ortoalresa, Espanha), bem como todas as etapas de lavagem após os tratamentos de permeabilização e reticulação das células de *Z. mobilis*. A concentração celular foi determinada indiretamente em espectrofotômetro UV/VIS modelo 7800 (Jasco, Japão).

A quantificação das substâncias químicas presentes nas amostras foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo era constituído por uma bomba isocrática modelo 305, um módulo manométrico modelo 805 e um módulo de detecção de índice de refração modelo 131 (Gilson, France). A separação e quantificação das substâncias contidas nas amostras do cultivo celular (glicose e etanol) e da reacção de bioconversão (frutose, lactose, sorbitol e AL) foram desenvolvidas em coluna cromatográfica Transgenomic ICsep ICE-ION-300 (300 x 7.8 mm e diâmetro de partícula 7µm. - San Jose, CA, USA) acondicionada em um compartimento para coluna (Jetstream 2 Plus, Alemanha). As amostras eram diluídas apropriadamente (geralmente entre 50 e 100 vezes) e filtradas em filtro de acetato de celulose (0.20 µm). O volume do *loop* de análise era de 20 µL, carregado manualmente no injetor Rheodyne modelo 7125 (Califórnia, USA).

4.3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

A concentração celular foi determinada indiretamente por densidade óptica a 560 nm em espectrofotômetro UV/VIS e convertida em unidade de concentração, em base de massa de células secas, por gravimetria, conforme apresentada na Figura 4.01.

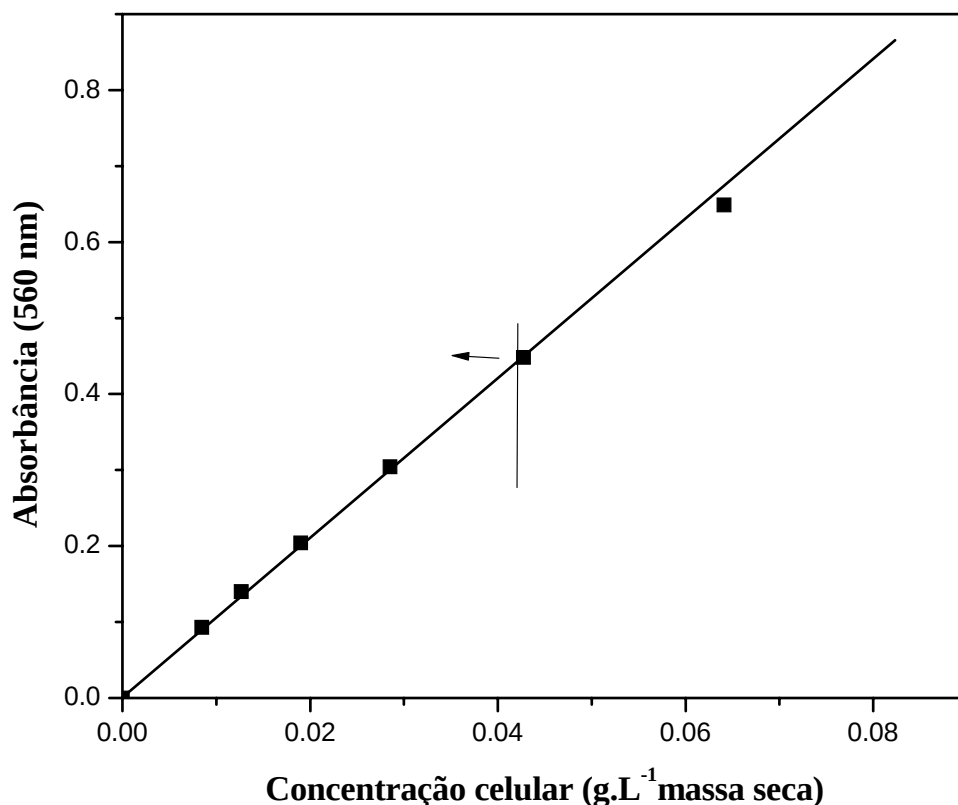


Figura 4.01 – Curva de correlação da densidade óptica em função da massa seca, em amostra de células da *Z. mobilis* ATCC29191.

A quantificação, em HPLC, da glicose e do etanol presente nas amostras coletadas durante a etapa de cultivo das células de *Z. mobilis* foi realizada nas mesmas condições operacionais do método de quantificação das amostras da reação de bioconversão, descritas a seguir. A Figura 4.02 mostra o cromatograma do padrão utilizado para quantificar essas amostras. O sorbitol foi incluído na referência para quantificação devido à pequena quantidade eventualmente detectada durante o cultivo celular.

As concentrações de frutose, lactose, sorbitol e AL, provenientes das amostras da reação de bioconversão catalisadas pelas enzimas GFOR/GL, foram determinadas por cromatografia líquida (Pedruzzi *et al.*, 2007). O método analítico utiliza, como eluente, água acidificada (H_2SO_4 0.450 mM, pH 3.1) previamente filtrada (filtro de poliamida, 0.20 μm) e degaseificada. A análise consiste no carregamento da amostra no volume do *loop* de injeção (20 μL) que é posteriormente introduzida na coluna cromatográfica e eluída a 0.500 mL.min⁻¹ na temperatura de 75°C. O cromatograma gerado é quantificado através da curva de

calibração obtida por uma solução de referência com concentrações máximas na ordem de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para efeitos de estimativa de erro, os cromatogramas são quantificados em termos de área e altura de pico cromatográfico.

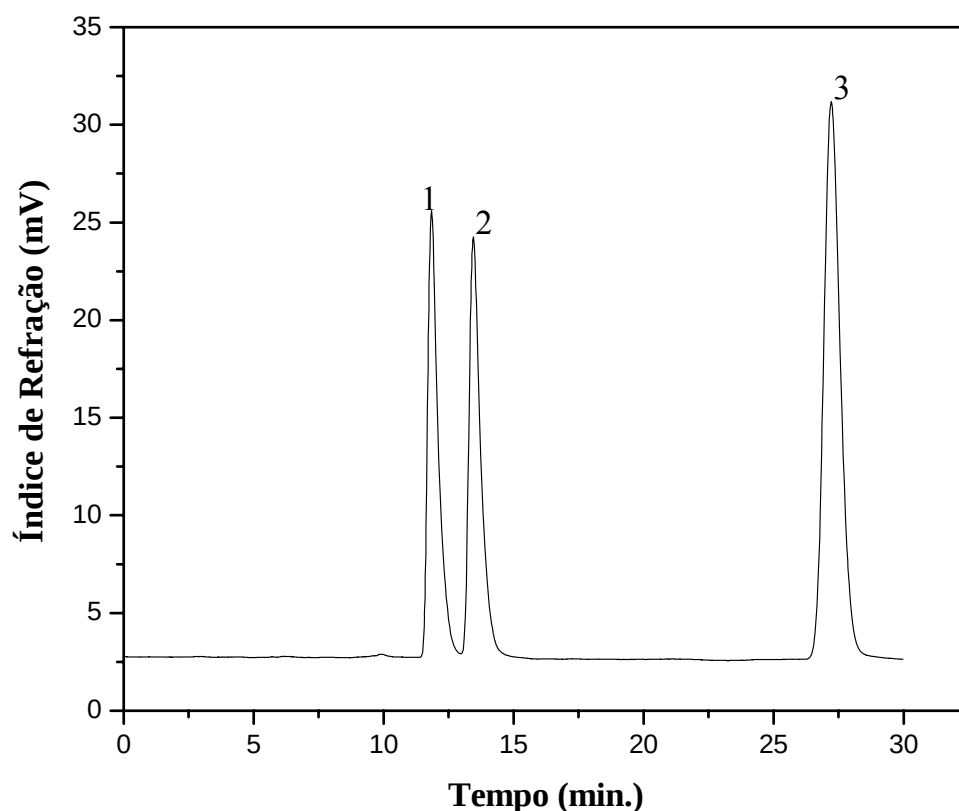


Figura 4.02 – Cromatograma da solução de referência $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizada na quantificação da glicose, etanol e sorbitol das amostras de fermentação durante o cultivo da *Z. mobilis* ATCC29191. (1) glicose; (2) sorbitol; (3) etanol.

4.3.6 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Ensaio de cultivo celular

O cultivo das células de *Z. mobilis* foi conduzido em biorreactor de bancada, com volume operacional de 1.5 L e concentração de glicose a $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A esterilização do meio de cultivo foi feita em dois volumes, sendo um deles a solução de glicose e o outro a solução contendo os demais nutrientes. O processo fermentativo foi conduzido nem modo semi-contínuo devido ao pequeno volume do biorreactor e o baixo factor de conversão de substrato

em células. Um circuito fechado foi construído, contendo duas ligações para os reservatórios de glicose ($225 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e de nutrientes (concentrado 10 vezes para que a cada 1L fermentado fosse adicionado 100 mL de solução de nutrientes) e uma conexão para a coleta de amostras e recolha do meio fermentado. A Figura 4.03 mostra o biorreactor sendo operado durante o cultivo celular. O circuito estava unido ao biorreactor em duas extremidades, uma ao fundo e outra na parte superior. Desta forma, o volume interno do circuito podia ser descarregado sempre que uma amostra ou uma etapa de descarga do fermentado fosse realizada. No início do processo, o biorreactor encontrava-se carregado com 1.35 L de solução de glicose ($167 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

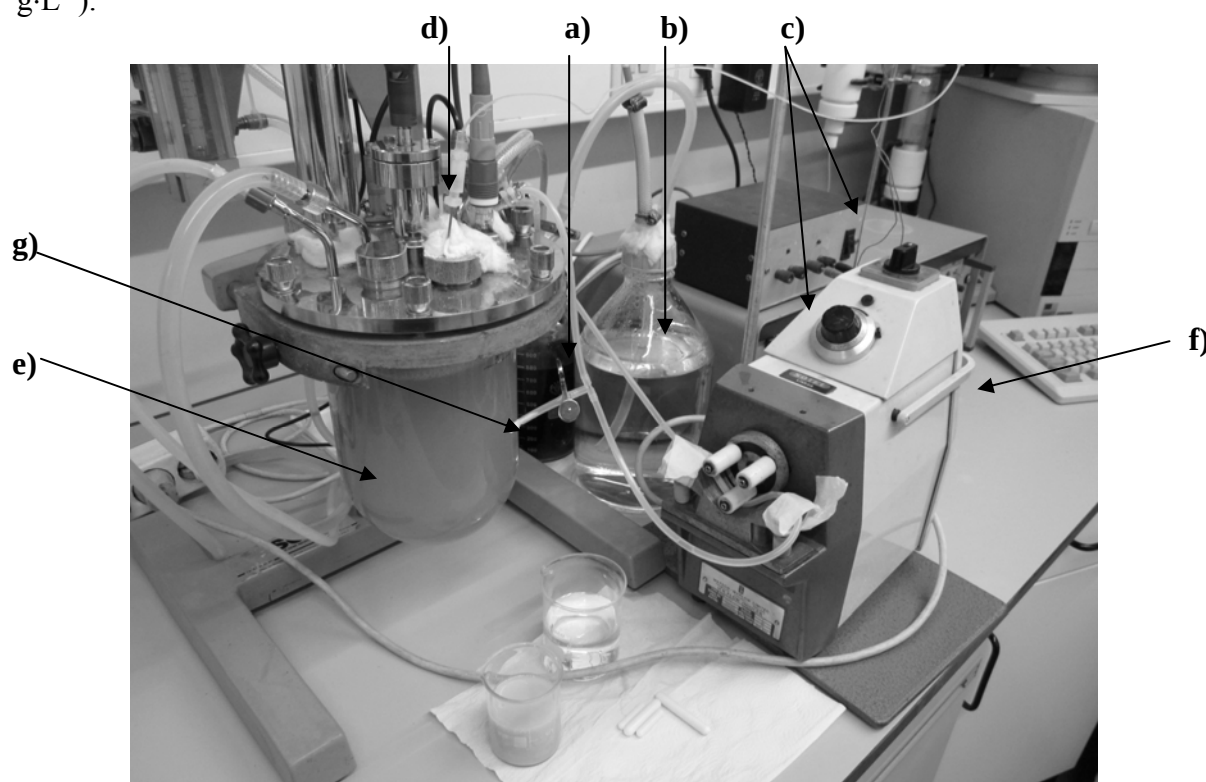


Figura 4.03 – Unidade de fermentação utilizada no cultivo das células de *Z. mobilis* ATCC29191. a) reservatório de nutrientes; b) reservatório de glicose; c) módulo de controle do biorreactor e módulo de ação do controlador do pH; d) entrada de KOH no reactor; e) biorreactor; f) bomba peristáltica; g) conector de amostragem do biorreactor.

As condições de operação foram: temperatura $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH controlado em 5.5 com solução de KOH 5M e frequência de agitação de 350 rpm. O volume de 150 mL da solução de

nutrientes era então adicionado ao biorreator juntamente com o inóculo (7 mL contido no tubo de repique) que era introduzido através do orifício de inóculo, marcando o início do processo. No final de cada fermentação, quando a concentração de glicose no meio era praticamente nula, 1.1 L do meio fermentado contendo as células de *Z. mobilis* era coletado do biorreator, através de uma bomba peristáltica, e centrifugado a 3000 rpm durante 7 minutos para a obtenção das células. Após a recolha do fermentado, o biorreator era carregado com o volume de 100 mL da solução de nutrientes e 1L da solução de glicose, e uma nova fermentação era então iniciada. O volume total de meio fermentado era de 11.5 L de glicose ($150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). As amostras coletadas (1 mL), durante o cultivo, nos ensaios de avaliação do crescimento celular, eram centrifugadas e lavadas com água duas vezes. A massa celular era então diluída adequadamente para ser medida por turbidimetria. A fração líquida era diluída adequadamente para a quantificação, em HPLC, da glicose, etanol e eventual sorbitol presente no meio fermentado. A produção de células para cada fermentação era aproximadamente entre 2.5 a $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (massa seca). As células obtidas após a centrifugação eram lavadas com água deionizada por 3 vezes e conservadas, em concentração aproximada de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sob temperatura de refrigeração (4°C) para os posteriores tratamentos de permeabilização e reticulação.

Para o processo de permeabilização das células uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) foi utilizada. Volumes iguais da solução de células na concentração de $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (base seca) e CTAB (0.2% w/v) foram misturados e mantidos sob agitação branda a temperatura de 4°C durante 10 min, conforme procedimentos de (Malvessi *et al.*, 2006). A seguir, a mistura foi centrifugada e as células tratadas foram, então, lavadas com água deionizada por duas vezes. A prevenção da perda da enzima contida no espaço periplásmico permeabilizado foi obtida através do tratamento de reticulação com glutaraldeído. Volumes iguais das soluções contendo as células permeabilizadas ($25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ base seca) e glutaraldeído 0.5 % (v/v) foram misturados e mantidos sob agitação branda durante 15 min. Após esta etapa, as células foram separadas por centrifugação a 3000 rpm durante 7 min e lavadas três vezes com água. A suspensão celular obtida no final do processo apresenta uma característica viscosa, de cor âmbar, em concentração em torno de $144 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e foi conservada sob temperatura de refrigeração (4°C) para utilização nos ensaios de cinética de bioconversão.

Imobilização das células de *Z. mobilis* in Ca-alginato

A imobilização das células de *Z. mobilis* em Ca-alginato (2% m/v) foi obtida utilizando o procedimento a seguir descrito. Em um copo de Becker de 250 mL contendo aproximadamente 150 mL de água deionizada foi adicionado 4 g de Na-alginato, a temperatura ambiente (20-25°C), e mantida em agitação mecânica (100 rpm) por 15 horas para a completa homogeneização. Após esse período, foi adicionado a esta solução 20 mL da suspensão concentrada das células de *Z. mobilis* (144 g·L⁻¹) e mantida a agitação mecânica durante 3 horas. O volume da solução de Na-alginato contendo as células foi totalmente transferida para um balão volumétrico de 200 mL onde foi feita a aferição do volume. Esta solução foi utilizada a seguir para a obtenção das esferas de Ca-alginato. O volume de 500 mL de uma solução de CaCl₂ (20 g·L⁻¹) foi utilizado para promover a troca iônica subsequente complexação da solução contendo Na-alginato e células. As esferas foram obtidas por meio de um caudal vertical extremamente fino posicionado a 1.2 m da superfície da solução de CaCl₂ que se encontrava em agitação (350 rpm). O aparato utilizado para a obtenção deste caudal foi uma bomba peristáltica operada a 8 rpm, uma mangueira de silicone (diâmetro interno, 3mm), uma agulha (diâmetro interno, 0.5 mm ; comprimento, 40 mm). As esferas obtidas foram mantidas na solução por 1 hora e após transferidas para 500 mL de uma nova solução de CaCl₂ (20 g·L⁻¹), permanecendo nesta solução por uma noite à temperatura de refrigeração (4°C). As esferas foram posteriormente lavadas com água deionizada, separadas por granulometria e conservadas em água a (4°C) para serem usadas nos ensaios de cinética.

Ensaio de cinética de bioconversão

As experiências de bioconversão foram desenvolvidas em biorreactor com capacidade para 150 mL, contendo 100 mL de meio reacional (lactose, frutose e biocatalisador). As massas correspondentes a concentração de substrato desejada para 100 mL foram dissolvidas em água a 60°C e após resfriamento, aferidas para o volume de 90 mL. Posteriormente, a fração de 10 mL restante para completar o sistema, composta por 5 mL da suspensão celular concentrada (144 g·L⁻¹) e 5 mL de água deionizada, era adicionada no biorreactor totalizando uma suspensão com 7.2 g·L⁻¹ de biocatalisador. As condições operacionais do sistema foram: frequência de agitação 350 rpm, temperatura da reacção 39°C,

pH controlado em 6,4 através da adição de KOH. A Figura 4.04 ilustra a unidade utilizada nas experiências de bioconversão.

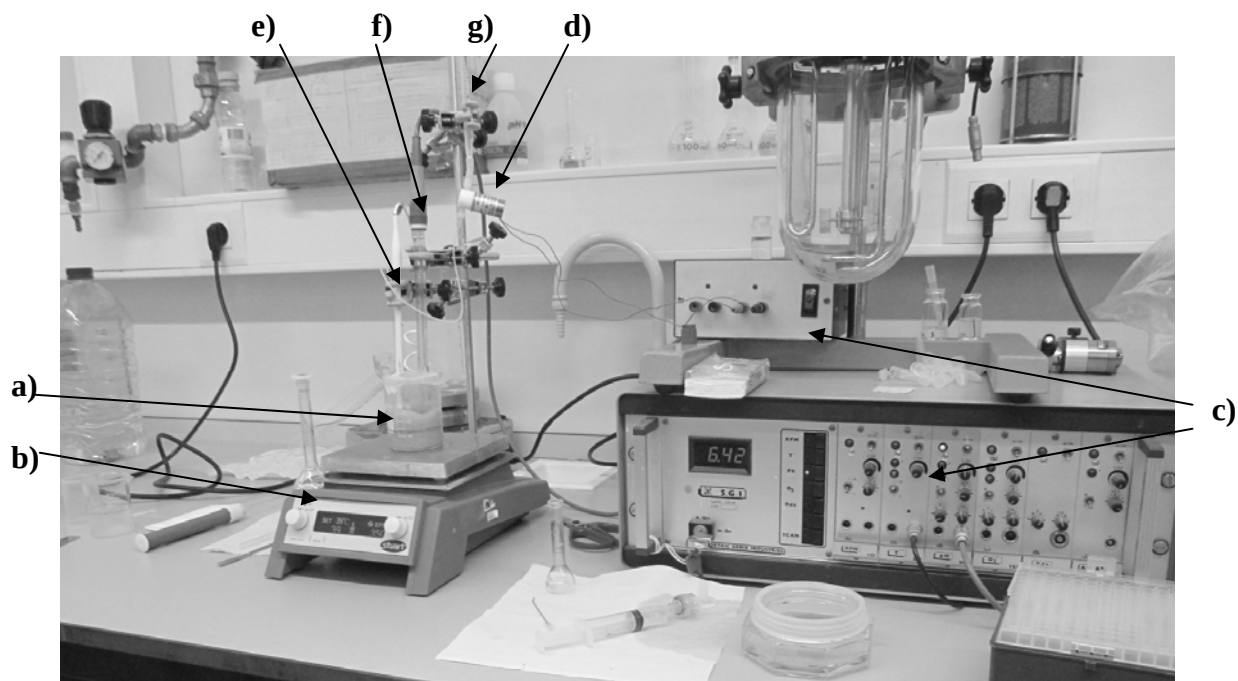


Figura 4.04 – Biorreator enzimático utilizado nos ensaios de cinética da GFOR. a) biorreator enzimático; b) controlador da frequência de agitação e de temperatura; c) módulo de controle do biorreator e módulo de ação do controlador do pH; d) válvula solenóide; e) termopar; f) sonda de pH; g) pipeta graduada com KOH.

A solução de KOH foi adicionada através da ação do controlador sobre uma válvula solenóide. Esta válvula, normalmente na posição fechada, interligava uma pipeta graduada contendo a solução de KOH e o biorreator enzimático. A concentração da solução de KOH era dependente da concentração do substrato limitante, sendo utilizados valores na ordem de 0.2M a 5.0M. O volume máximo de adição do KOH no biorreator foi estimado até 15 ml. Este volume introduzido durante a cinética de bioconversão era registrado para estimativa da curva de produção do AL, através da estequiometria da reação com base nos moles de KOH gastos para o controle do pH durante a reação (método indireto). O volume de meio

reacional era medido a cada início e término do ensaio. Cada amostra compreendia 0,2 mL nos ensaios com substratos em elevadas concentrações, e 0,4 mL para os ensaios a baixas concentrações. Estes volumes de amostragem eram diluídos em 10 e 5 mL, respectivamente. Posteriormente, estas amostras foram filtradas em filtro de acetato de celulose (0.45 μ m) e conservadas em congelador para posterior quantificação das substâncias em HPLC. O número de amostras coletadas em cada ensaio era em torno de 16. Nas primeiras horas, as amostras eram coletadas em maior frequência, a fim de determinar a velocidade da reação inicial.

O volume de KOH adicionado compensava parcialmente o balanço volumétrico computado durante a execução da experiência. A evaporação existente, confirmada visualmente pela condensação d'água nas paredes do biorreactor, foi contabilizada por uma relação linear. Esta relação considerou o evaporado, determinado pela diferença entre o volume final calculado, que assume apenas a adição e retirada de alíquotas, com aquele medido experimentalmente, no final da reação, em função do tempo de reação. Este controle define o perfil da curva de concentração do AL medida pelo método indireto. Os valores das concentrações medidas em HPLC foram corrigidos por um balanço mássico, respeitado pela aplicação de uma fração ponderal (mol inicial do substrato pela soma do número de moles mensurado do substrato e do produto correspondente) no cálculo da concentração das substâncias que, portanto, engloba os desvios decorrentes das limitações do procedimento experimental.

Interpretação dos resultados cinéticos

A interpretação dos resultados cinéticos foi baseada, inicialmente, pelo método de Lineweaver-Burk para a obtenção dos coeficientes do modelo cinético do tipo ping-pong. O procedimento experimental adotado parte da determinação da velocidade inicial da reação de bioconversão e, tendo em vista o interesse em maiores produtividades, optou-se por empregar os substratos nas mais altas concentrações. O modelo cinético experimental é descrito pela equação (Eq. 4.21), sendo que este mesmo modelo foi utilizado por Zachariou e Scopes (1986) quando usaram a GFOR purificada com o par de substratos glicose e frutose na produção de ácido glicónico e sorbitol e, também, por Satory e colaboradores (1997) para o par de substratos lactose e frutose na produção do Al e sorbitol. Considerando essas referências, foi construído o gráfico duplo recíproco do inverso da velocidade de reação e do

inverso da concentração inicial da lactose, mantendo a concentração de frutose constante. Posteriormente, concentrações menores da lactose foram avaliadas mantendo a frutose constante em 3 patamares de concentração. Os resultados de velocidade de reacção inicial mostram que há um comportamento sigmoidal com o aumento da concentração da lactose, diferenciando-se do modelo hiperbólico esperado de uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Tal observação sugere que a enzima GFOR, de estrutura tetramérica, apresenta uma sensibilidade em responder sua actividade com as mudanças nas concentrações destes substratos (lactose e frutose). Este comportamento é característico de enzimas do tipo regulatórias que apresentam peculiares no comportamento cinético, denominados fenômenos de cooperatividade e/ou alostéricos. Esta observação, entretanto, deve ser considerada sobre o mecanismo ping-pong e limita-se aos respectivos substratos. A verificação de coeficientes lineares negativos da Eq. 4.35a, reorganizada a partir da Eq. 4.21, onde a frutose é mantida constante, é atribuída a efeitos de cooperatividade e/ou propriedades alostéricas da GFOR e da sua configuração estrutural.

- Quando a concentração de frutose $[F]$ é mantida constante durante a reacção, a velocidade de reacção é dada por:

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_F}{[F]_{cte}} \right) + \frac{K_L}{[L]} \quad (\text{Eq. 4.35a})$$

- Quando a concentração da lactose $[L]$ é mantida constante durante a reacção, a velocidade de reacção é dada por:

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_L}{[L]_{cte}} \right) + \frac{K_F}{[F]} \quad (\text{Eq. 4.35b})$$

Da mesma forma como foi tratada a Eq. 4.34, a cinética ping-pong no modelo de Hill (Eq. 4.36 a e b) representado na forma duplo recíproco de Lineweaver-Burk pode ser reescrita evidenciando os parâmetros envolvidos na equação de reta.

- Quando a concentração de frutose $[F]$ é mantida constante durante a reacção, a velocidade de reacção é dada por:

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_F}{[F]_{cte}^n} \right) + \frac{K_L}{[L]^n} \quad (\text{Eq. 4.36a})$$

- Quando a concentração da lactose $[L]$ é mantida constante durante a reacção, a velocidade de reacção é dada por:

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_L}{[L]_{cte}^n} \right) + \frac{K_F}{[F]^n} \quad (\text{Eq. 4.36b})$$

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 EXPERIÊNCIAS DE CULTIVO CELULAR

Nesta secção são apresentados os resultados experimentais do cultivo da bactéria *Z. mobilis* em biorreactor de bancada, operado no modo semi-contínuo. Os dois ensaios de cinética de crescimento celular, para a determinação das características de produção do biocatalisador, foram realizados durante a terceira e nona fermentação do cultivo conduzido em modo semi-contínuo. As curvas de consumo de substrato, crescimento celular e formação de etanol foram obtidas por ajuste dos pontos experimentais. O consumo completo da glicose é observado em torno de 24 horas, conforme Figuras 4.05 (a) e (b). As curvas de crescimento celular e formação de produto apresentam comportamento idêntico em ambos os ensaios, com concentração celular e de etanol, no final do processo, em torno de $2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Observa-se que o crescimento celular é finalizado após 15 horas de processo, quando as concentrações de glicose e etanol são aproximadamente $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A produção de etanol é encerrada com o completo consumo da glicose.

Silveira e colaboradores (2001) investigaram os efeitos da alteração da fonte de vitaminas no meio de cultivo da bactéria *Z. mobilis*, tamponado com ácido 2-N-morfolino etanosulfónico (MES)/ sal de potássio (MES.K), para a produção das enzimas GFOR e GL. Nesse estudo, os factores de rendimento em célula foram determinados na gama de 0.023 a $0.032 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ em meio de cultivo com concentração inicial de glicose em $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A máxima velocidade específica é reportada para o meio contendo extrato de levedura ($0,35 \text{ h}^{-1}$) resultando em fermentações com tempo de processo em torno de 12 h e rendimento em etanol, na ordem de 92 a 95%.

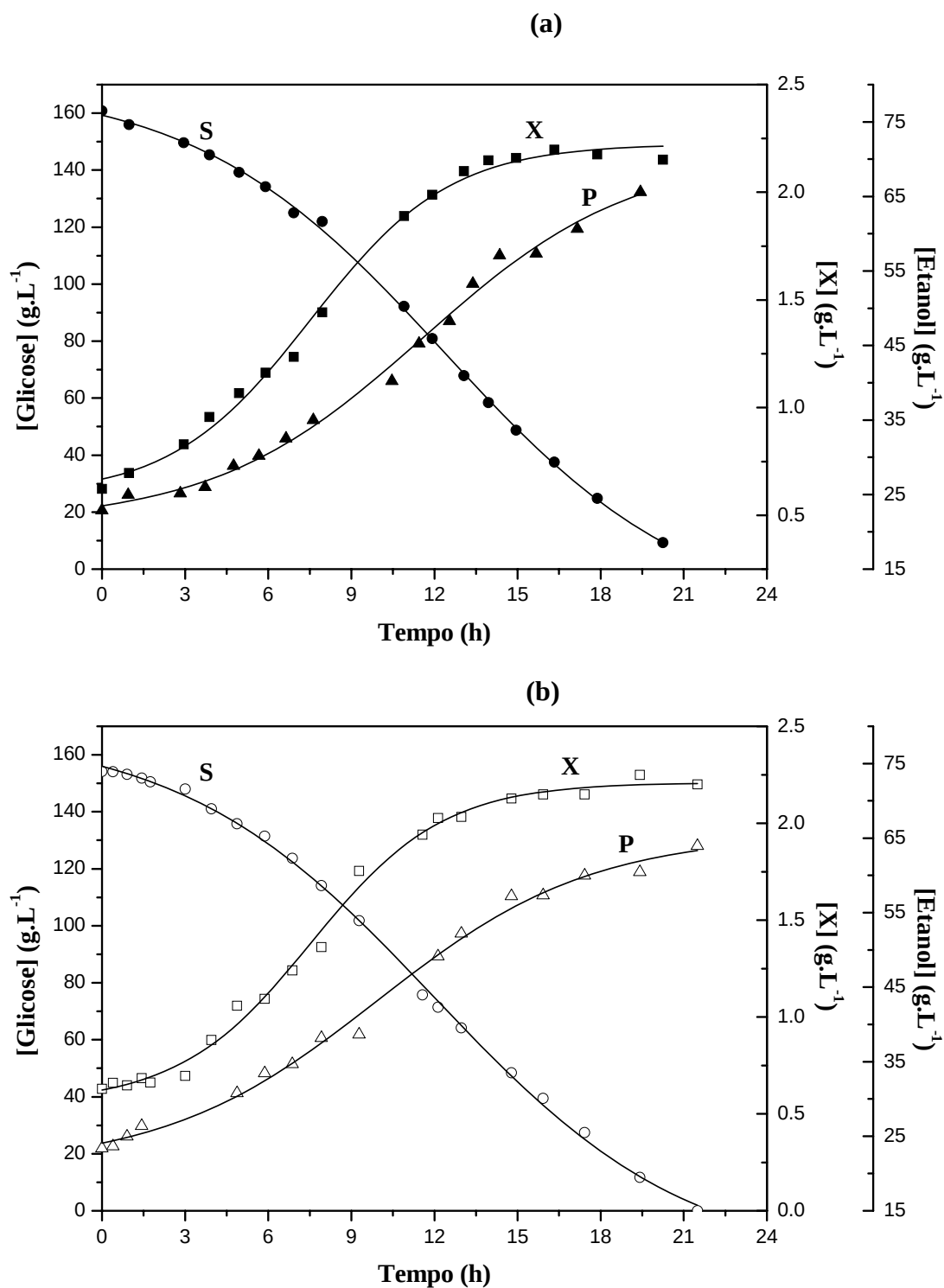


Figura 4.05 – Curvas de consumo de glicose (S), de crescimento celular (X) e de formação de etanol (P) em cultivo da *Z. mobilis* ATCC29191. Curvas obtidas durante a terceira fermentação (a) e a nona fermentação (b) no processo fermentativo conduzido em modo semi-contínuo.

Os efeitos do extrato de levedura em bruto e purificado sobre o crescimento celular, em frascos agitados com concentração inicial de glicose em 100 e 150 g·L⁻¹ foram reportados por Malvessi e colaboradores (2006). Nesse estudo, bons resultados de crescimento celular e produção das enzimas GFOR e GL são alcançados com o extrato de levedura em bruto em concentração mais elevada de 5 a 8 vezes. Esses mesmos autores avaliaram a influência do carbonato de cálcio e sua ação como solução tampão a conduzir os ensaios sem correções pH. Ensaio com meio não tamponado mostraram interrupção do crescimento celular a pH 5.0 quando o meio encontrava-se com concentração de glicose em torno de 50 g·L⁻¹. Esse ponto desperta maior atenção tendo em vista que as curvas de crescimento celular reportadas por Silveira e colaboradores (2001) também mostram uma tendência de término do crescimento celular quando a concentração de glicose atinge essa concentração. Adicionalmente, o modelo proposto por Lee e Huang (2000) para descrever a velocidade de crescimento celular específica da *Z. mobilis* durante o processo de fermentação considera um parâmetro de inibição do etanol formado. O limiar da concentração de etanol inibidora é definido em 50 g·L⁻¹ de etanol sendo que este valor condiz com as curvas de consumo de substrato e formação de etanol reportado por Silveira e colaboradores (2001) e com os resultados apresentados aqui neste estudo.

Dentro deste contexto, as curvas de crescimento celular ilustradas na Figura 4.06 mostram um comportamento semelhante. Os resultados dos coeficientes de rendimento em célula ($Y_{X/S}$) e em produto ($Y_{P/S}$), o rendimento e produtividade do processo, conforme (Eqs. 4.01, 4.02, 4.06 e 4.07) são listados na Tabela 4.01. Apesar de serem inferiores ao reportado na literatura, os resultados quando comparados entre si apresentam parâmetros de cultivo muito semelhantes e indicam uma homogeneidade da composição celular obtida no processo em modo semi-contínuo. Uma forte influência da composição de vitaminas utilizada no meio de cultivo pode justificar a lentidão do processo e os baixos valores de concentração celular encontrados (Silveira *et al.*, 2001). Em consequência do maior tempo de processo, a perda parcial do etanol formado por arraste pode justificar a baixa concentração encontrada.

Tabela 4.01 – Parâmetros do cultivo da bactéria *Z. mobilis* ATCC 29191 para a produção das enzimas GFOR e GL.

Parâmetros da fermentação	3º fermentação	9º fermentação
t_f (h)	22.5	22.0
S_i (g·L ⁻¹)	159.3	156.0
S_f (g·L ⁻¹)	0.0	0.0
X_i (g·L ⁻¹)	0.66	0.62
X_f (g·L ⁻¹)	2.21	2.20
P_i (g·L ⁻¹)	23.5	19.8
P_f (g·L ⁻¹)	65.3	62.0
$Y_{X/S}$ (g·g ⁻¹)	0.010	0.010
$Y_{P/S}$ (g·g ⁻¹)	0.262	0.270
ρ (%)	51.3	52.8
p (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	1.86	1.92
$\mu_{S_{\text{máx}}}$ (h ⁻¹)	5.70	6.18
$t_{\mu_{S_{\text{máx}}}}$ (h)	5.5	5.3
$\mu_{X_{\text{máx}}}$ (h ⁻¹)	0.13	0.14
$t_{\mu_{X_{\text{máx}}}}$ (h)	5.85	5.93
$\mu_{P_{\text{máx}}}$ (h ⁻¹)	1.66	2.20
$t_{\mu_{P_{\text{máx}}}}$ (h)	9.22	5.50

t_f = tempo de fermentação para consumo completo da glicose; S = glicose; X = células (massa seca); P = etanol; Y = coeficiente de rendimento; ρ = rendimento; p = produtividade; $\mu_{i_{\text{máx}}}$ = máxima velocidade específica do componente i; $t_{\mu_{i_{\text{máx}}}}$ = tempo onde se obtém a máxima velocidade específica do componente i.

As Figuras 4.06 (a) e (b) apresentam as curvas de velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S), crescimento celular (μ_X) e formação de etanol (μ_P), determinadas pelas Eq. 4.03 a 4.05.

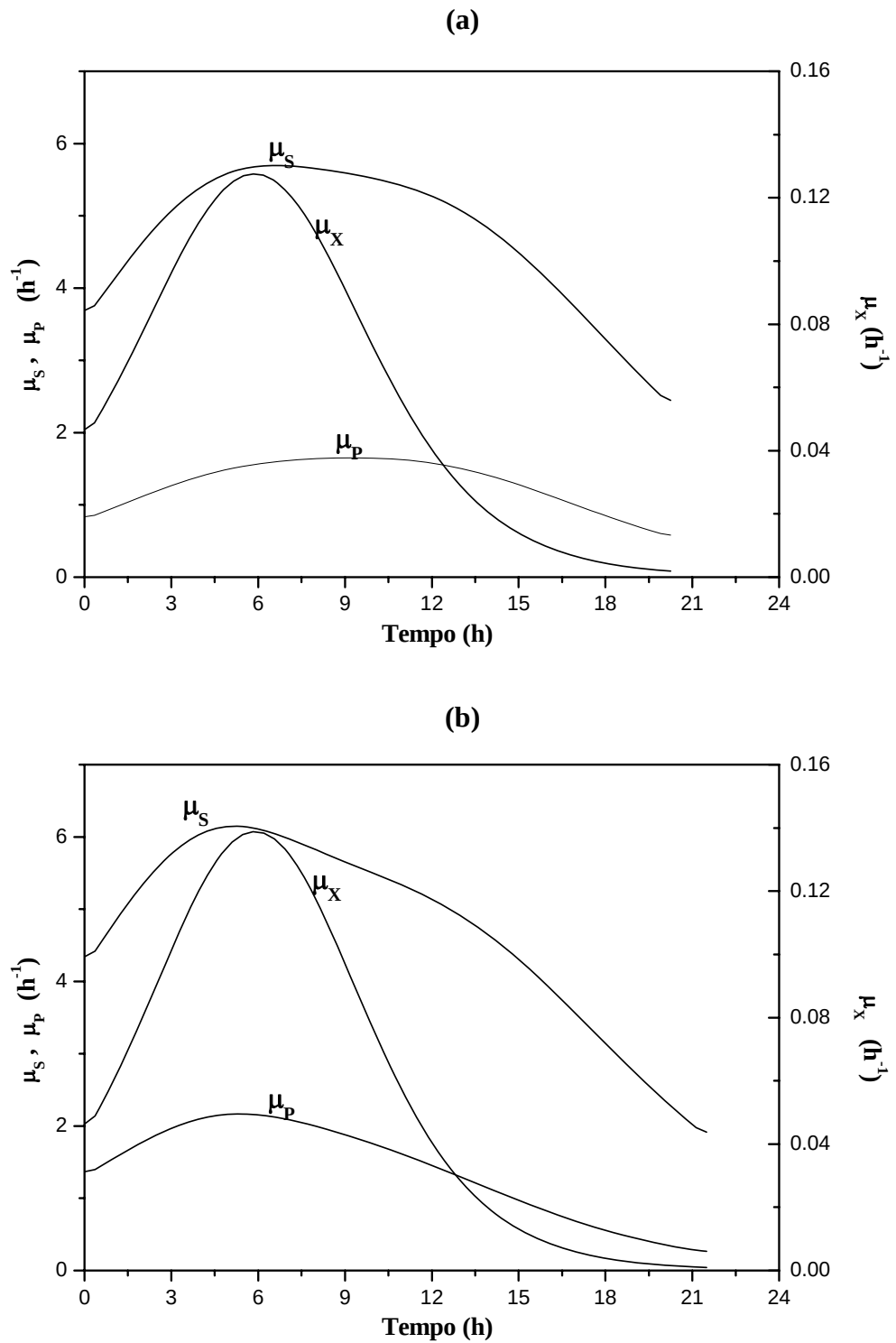


Figura 4.06 – Curvas de velocidade específica do consumo de glicose (μ_s), de crescimento celular (μ_x) e de formação de etanol (μ_p) em cultivo da *Z. mobilis* ATCC29191. Curvas obtidas para a terceira (a) e a nona (b) corrida de fermentação do processo fermentativo em modo semi-contínuo.

Conforme ilustrado na Figura 4.06 e listado na Tabela 4.01, as máximas velocidades específicas de consumo de substrato, crescimento celular e formação de etanol ocorrem em aproximadamente 6 h. de processo, com uma ligeira deslocação entre μ_x e μ_p . Esse mesmo tempo é reportado por Silveira e colaboradores (2001) nos ensaios contendo licor de milho na concentração de $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nesse estudo, essa condição foi a que resultou na menor velocidade específica ($0.027 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) quando comparado com outras concentrações inferiores deste nutriente e com extrato de levedura ($0.032 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, em 5 h. de processo). A esse comportamento, esses autores atribuem um efeito inibidor causado pela elevada concentração.

4.4.2 EXPERIÊNCIAS DE CINÉTICA DE BIOCONVERSÃO

Nesta secção são apresentados os resultados das experiências de cinética de bioconversão com células de *Z. mobilis* permeabilizadas e reticuladas, contendo em seu interior as enzimas GFOR e GL. Para este estudo de cinética, inicialmente foram realizados ensaios com altas concentrações da lactose (700, 550, 450 e 400 mM) e de frutose (700, 550 e 350 mM) e os resultados são apresentados em termos da formação do AL. A Figura 4.07 (a) mostra os resultados dos ensaios de bioconversão com concentrações iniciais da lactose em 700, 550, 450 e 400 mM e de frutose em 350 mM. As cinéticas foram interrompidas após 2.5 horas do início da reacção, onde o efeito do excesso da lactose no meio reacional foi avaliado em relação aos valores da velocidade de reacção inicial. Esta figura mostra claramente uma forte influência e aumento da velocidade inicial com o aumento da concentração da lactose. É importante mencionar que o ponto de maior concentração do dissacarídeo (700mM) já se encontra na zona limite de solubilidade da lactose a 39°C . Comparativamente, a Figura 4.07 (b) mostra as curvas de cinética com a concentração inicial da lactose fixada em 700 mM e com concentrações iniciais crescentes para a frutose, a partir de 350 mM para 550 mM e 700 mM. Neste ensaio observa-se uma ligeira diferença entre as curvas cinéticas com distintas concentrações da frutose, havendo praticamente uma sobreposição dos pontos experimentais nas primeiras 7 horas de processo. Adicionalmente, é possível observar a sobreposição das concentrações de AL determinadas pelo método indireto, com base nos moles de KOH gastos no controle do pH da reacção durante o processo e os valores determinados pela quantificação das amostras em HPLC.

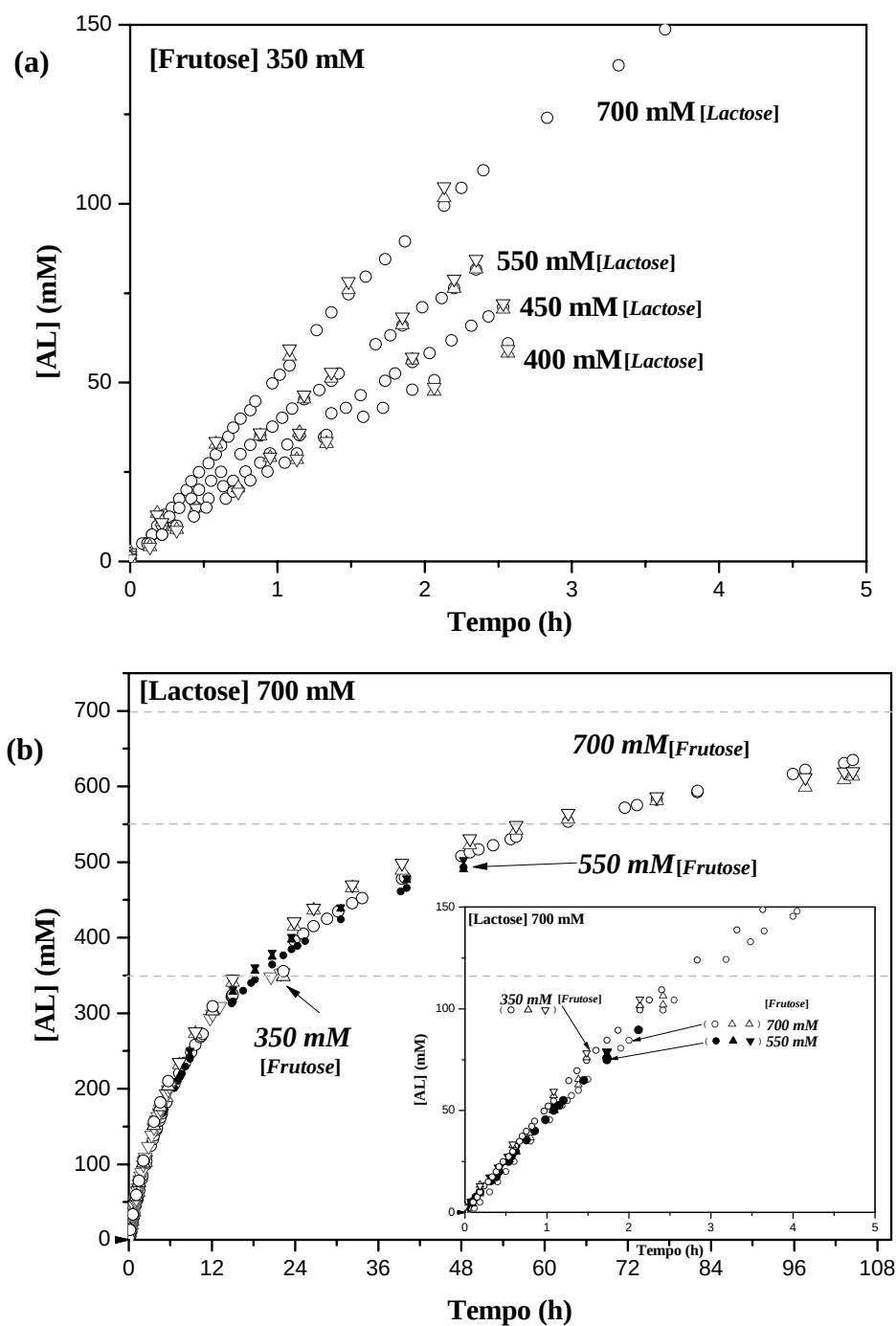


Figura 4.07 – Cinética da GFOR para a produção do AL com células de *Z. mobilis* ATCC 29191. (a) Efeito da concentração inicial da lactose em meio com concentração inicial de frutose em 350 mM. (b) Efeito da concentração inicial da frutose em meio com concentração inicial de lactose em 700 mM. Quantificação do AL pelo método indireto (o), em HPLC através da leitura da área (Δ) e altura (∇) de pico. Condições: 39°C, pH 6.4, 350 rpm, $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (células, peso seco).

Os resultados ilustrados nas Figuras 4.07 (a) e (b) mostram que a participação da frutose não afeta decisivamente a velocidade da reacção inicial, uma vez que há sobreposição dos pontos experimentais. Desta forma, a velocidade de reacção inicial é dependente da concentração da lactose e, obviamente, do biocatalisador que, neste estudo é investigado a baixa concentração ($7.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A concentração do biocatalisador é reportada na literatura em concentrações mais elevadas, na ordem de 25 a $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Silveira *et al.*, 1999; Erzinger *et al.*, 2003; Malvessi *et al.*, 2006). Desta forma, os resultados apresentados aqui podem ser optimizados posteriormente na definição do modo de operação da cinética de bioconversão. Outro factor importante é o baixo efeito da concentração da frutose no valor da velocidade inicial. A concentração deste substrato, a baixos valores, poderia ser utilizado como instrumento de controle do pH em processos de bioconversão com sistema integrado de separação a ocorrer simultaneamente com a etapa de reacção. Adicionalmente, a eliminação de um componente na mistura final beneficia o processo de separação, em especial para os sistemas de separações binários como a cromatografia líquida associada à tecnologia de leito móvel simulado (LSM). Os resultados com 700 mM da lactose e 350 mM da frutose permitem obter no final da bioconversão uma mistura equimolar dos produtos AL e sorbitol e da lactose em excesso.

A velocidade inicial da reacção, determinada para cada uma das curvas cinéticas apresentadas na Figura 4.07, onde a concentração inicial da frutose era de 350 mM, foi comparada com a concentração inicial da lactose, no gráfico de Lineweaver-Burk ($1/v$ versus $1/[\text{Lactose}]$). A Figura 4.08 ilustra os resultados encontrados, onde o procedimento deveria performar uma reta com o mais elevado coeficiente linear quando comparado às outras retas que seriam esperadas fixando as demais concentrações de frutose escolhidas (550 e 700 mM) para comprovar o mecanismo enzimático do tipo ping-pong. No entanto, os resultados reproduzem uma reta com inclinação que cruza o eixo da abscissa ($1/[\text{Lactose}]$) e impossibilita a compreensão do fenómeno ocorrido. Em virtude das elevadas concentrações da lactose, a tendência de declive dos pontos experimentais que antecede a condição de inibição pelo substrato, pouco explorada nos resultados de Zachariou e Scopes (1986), foi considerada. Desta forma, os resultados a baixas concentrações da lactose, mantendo a concentração inicial da frutose em 350 mM poderiam solucionar o problema. Outro factor que deve ser considerado é a baixa afinidade da GFOR com a lactose, uma vez que o substrato específico de acção desta enzima é a glicose.

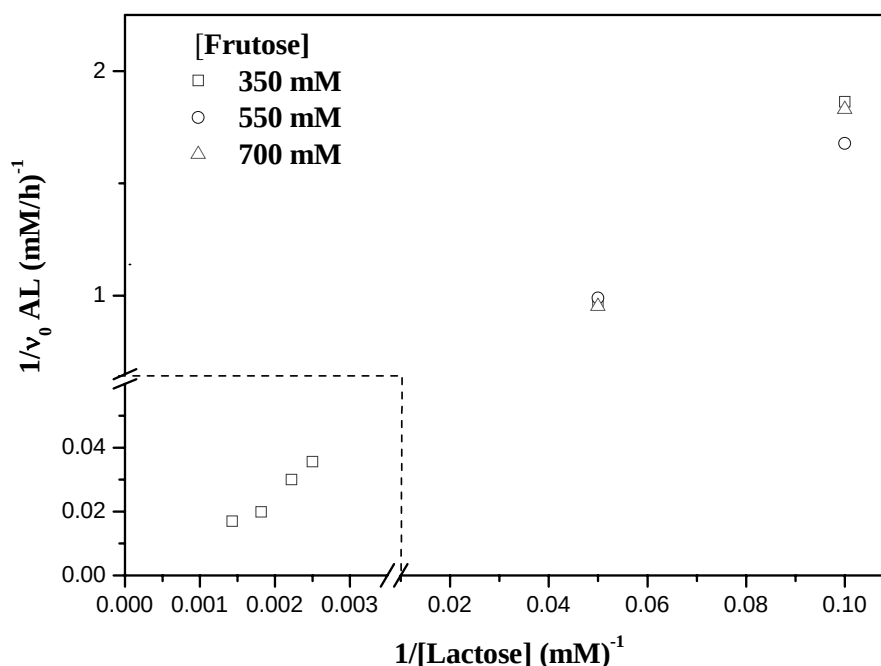


Figura 4.08 - Gráfico de Lineweaver-Burk considerando o modelo cinético do mecanismo ping-pong para o substrato lactose na faixa de altas e baixas concentrações, em fixadas concentrações iniciais de frutose (350, 550 e 700 mM). Componentes quantificados (o) pelo consumo de KOH; (Δ), (∇) pela área e altura, respectivamente, de pico em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 5M), 350 rpm, $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (massa celular, peso seco).

Os ensaios de bioconversão a baixas concentrações foram realizados com concentrações iniciais da lactose em 10 e 20 mM, mantendo as concentrações iniciais de frutose em 350, 550 e 700 mM. Adicionalmente, outras condições de concentração inicial para a lactose (na ordem de 40 mM e 100 mM) também foram avaliadas. A Figura 4.09 mostra os resultados desses ensaios, onde uma sobreposição dos pontos experimentais é verificada quando a concentração da lactose é fixada a baixos valores e a concentração inicial da frutose é aumentada. O comportamento cinético é ligeiramente alterado e os valores da velocidade de reacção inicial no gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 4.08) não apresentam dados conclusivos. Entretanto, a inversão das componentes frutose para a lactose, como substrato em concentração inicial constante, permitiu que uma estimativa por simulação gráfica das formas linearizadas de Lineweaver-Burk, Henes e Eadie- e Hofstte em função da

concentração de frutose aplicada (Figura 4.10). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 4.02.

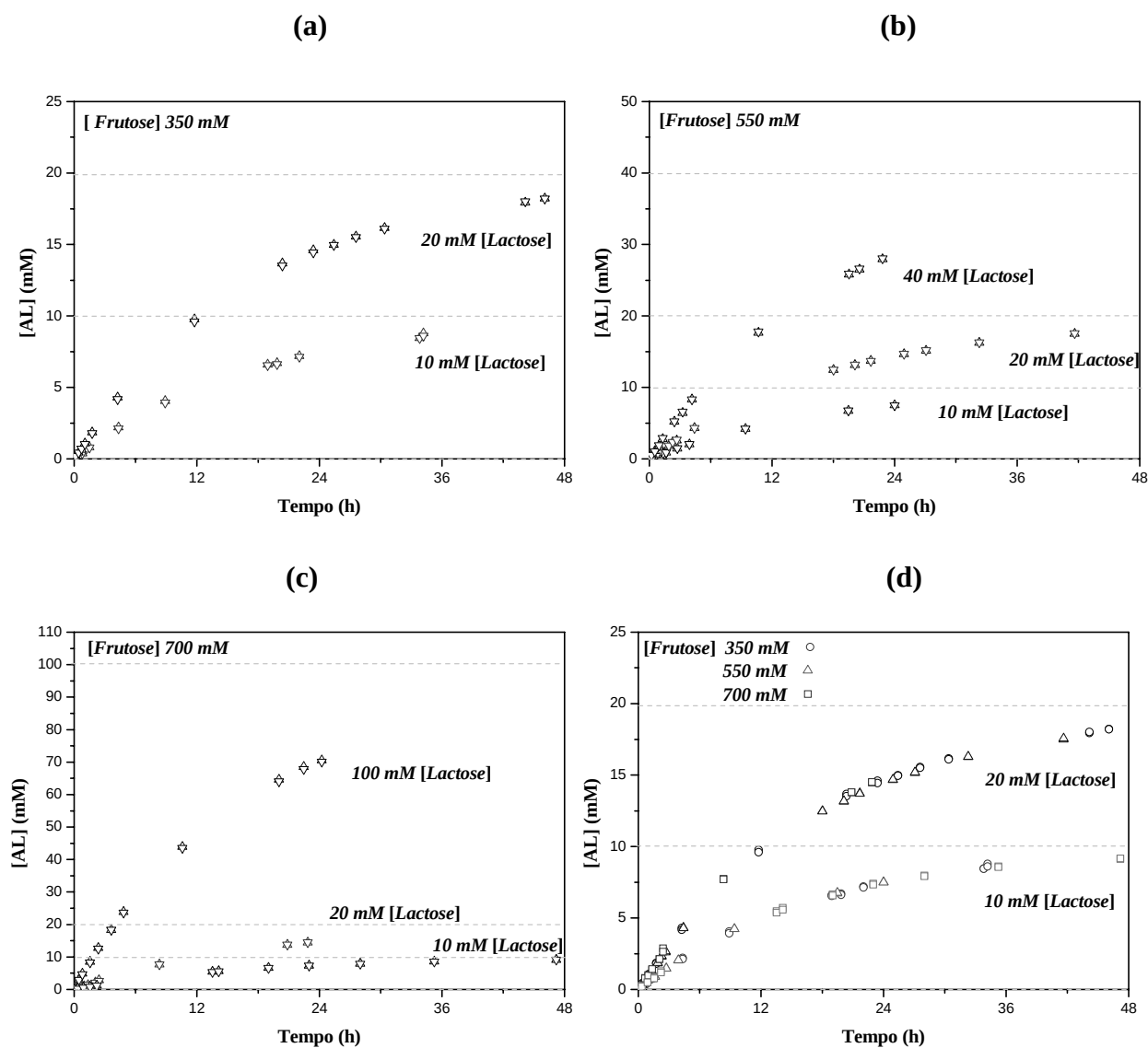


Figura 4.09 - Cinética da GFOR para a produção de AL em sistemas com distintas concentrações iniciais de lactose e frutose. Concentrações iniciais: (a) 350 mM de frutose e 10 e 20 mM de lactose. (b) 550 mM de frutose e 10, 20 e 40 mM de lactose. (c) 700 mM de frutose e 10, 20 e 100 mM de lactose. (d) 350, 550 e 700 mM de frutose e 10 e 20 mM de lactose. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2 a 0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

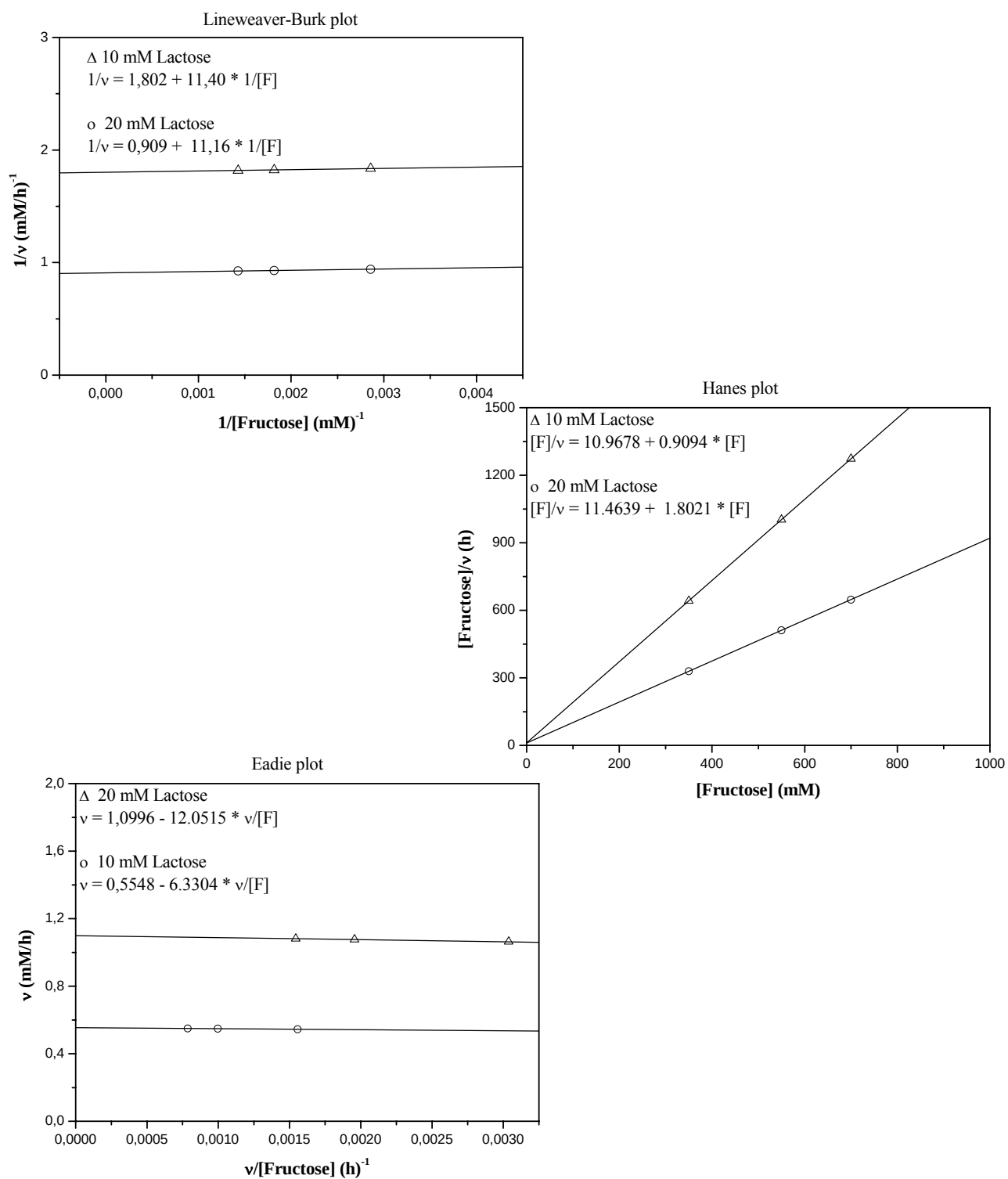


Figura 4.10 - Linearização das velocidades de reacção inicial do AL para os sistemas com lactose à baixa concentração usando as diversas representações gráficas para obtenção de parâmetros cinéticos. Valores de coeficientes angulares e lineares da equação da velocidade de reacção linearizada para o modelo ping-pong (Eq. 19).

Tabela 4.02 – Valores obtidos para os parâmetros cinéticos $v_{\max}$, K_F e K_L da equação da velocidade bi-substrato (ping-pong) para prever a cinéticas de oxidação da lactose, a baixas concentrações, usando a GFOR.

Parâmetros	Valores
$v_{\text{máximo}}$ (mM/h)	6.60E1
K_L (mM)	1.18E3
K_F (mM)	0.73E3

O modelo cinético da equação (Eq. 21), utilizando os parâmetros cinéticos da Tabela 4.02, ajusta os pontos experimentais dos ensaios a baixas concentrações da lactose, conforme mostrado na Figura 4.11. Entretanto, em cinéticas para altas concentrações iniciais da lactose, o ajuste não é verificado (Figura 4.12). Ainda, a Figura 4.12 revela que à elevada concentração inicial da lactose a cinética da reacção enzimática é aumentada devido a uma maior actividade da enzima GFOR nestas faixas de concentrações.

A velocidade de reacção em função da concentração da lactose, mantendo a concentração de frutose em 350 mM, ilustrada na Figura 4.13, mostra um comportamento distinto daquele decorrente de um modelo Michaeliano. Nela pode-se observar uma tendência de curva sigmoidal que é característico de reacções catalisadas por enzimas regulatórias. Neste caso, fenómenos como cooperatividade e propriedades alostéricas fazem com que a equação da velocidade de reacção não obedeça a um modelo baseado na cinética de Michaelis-Menten. A Figura 4.13 também apresenta os resultados obtidos com outras duas concentrações de frutose (350 e 550 mM) a altas concentrações da lactose (700 mM). Para essas concentrações de frutose, os resultados experimentais mostraram uma velocidade inicial inferior àquela encontrada quando a frutose se encontrava em concentração menor (350 mM). As curvas simuladas pela equação bi-substrato (ping-pong) com os parâmetros cinéticos descritos na Tabela 4.02, para os sistemas com frutose nas concentrações de 350, 550 e 700 mM e lactose a 700 mM não se ajustam aos pontos experimentais, indicando a existência de um efeito intrínseco de afinidade da GFOR com este substrato e que pode ser visto como um efeito cooperativo.

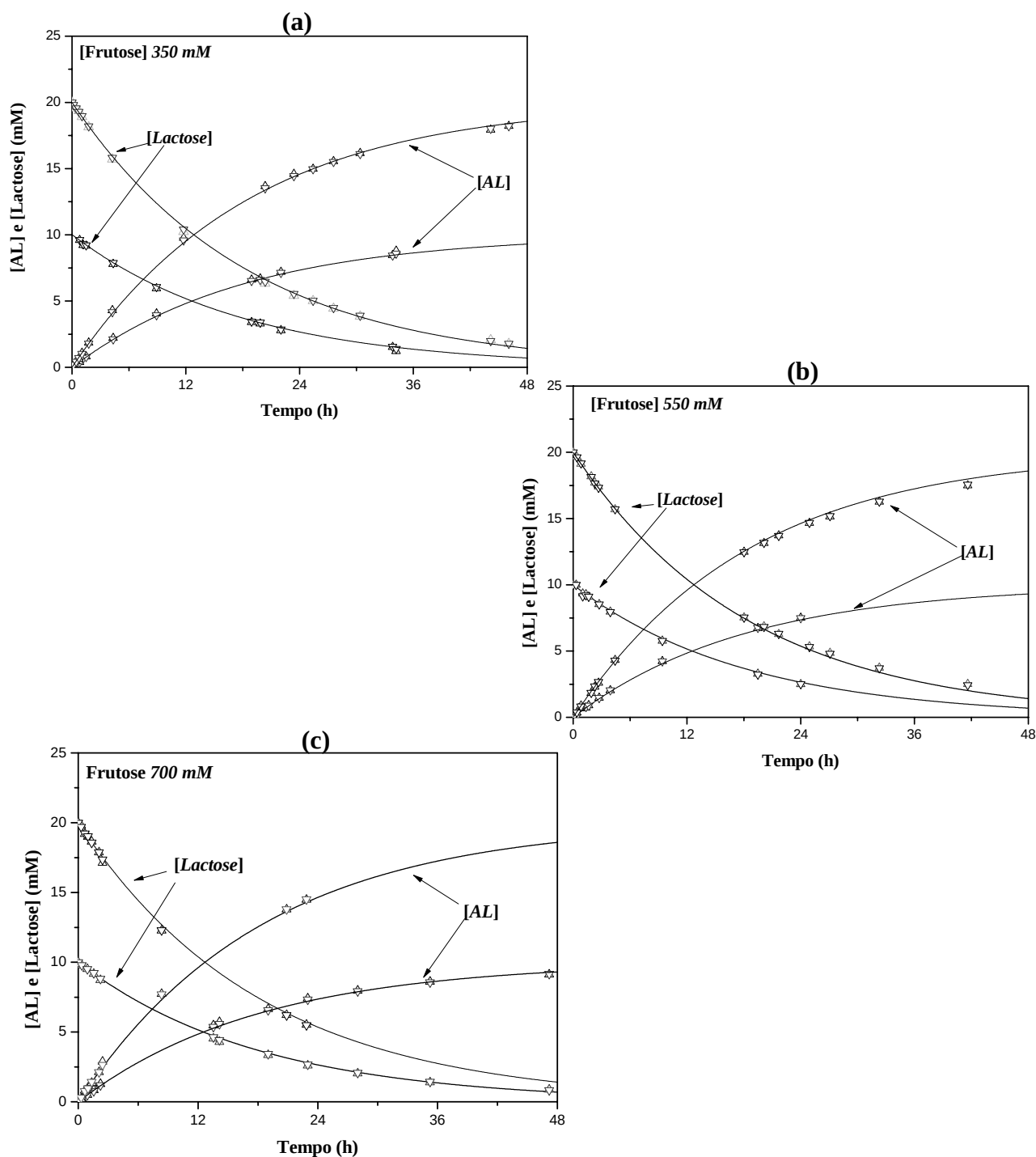


Figura 4.11 – Cinética da GFOR para o consumo da lactose (10 e 20 mM) e produção do AL. Concentrações iniciais de frutose: (a) 350 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através da equação da velocidade de reacção modelo ping-pong. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (▽) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

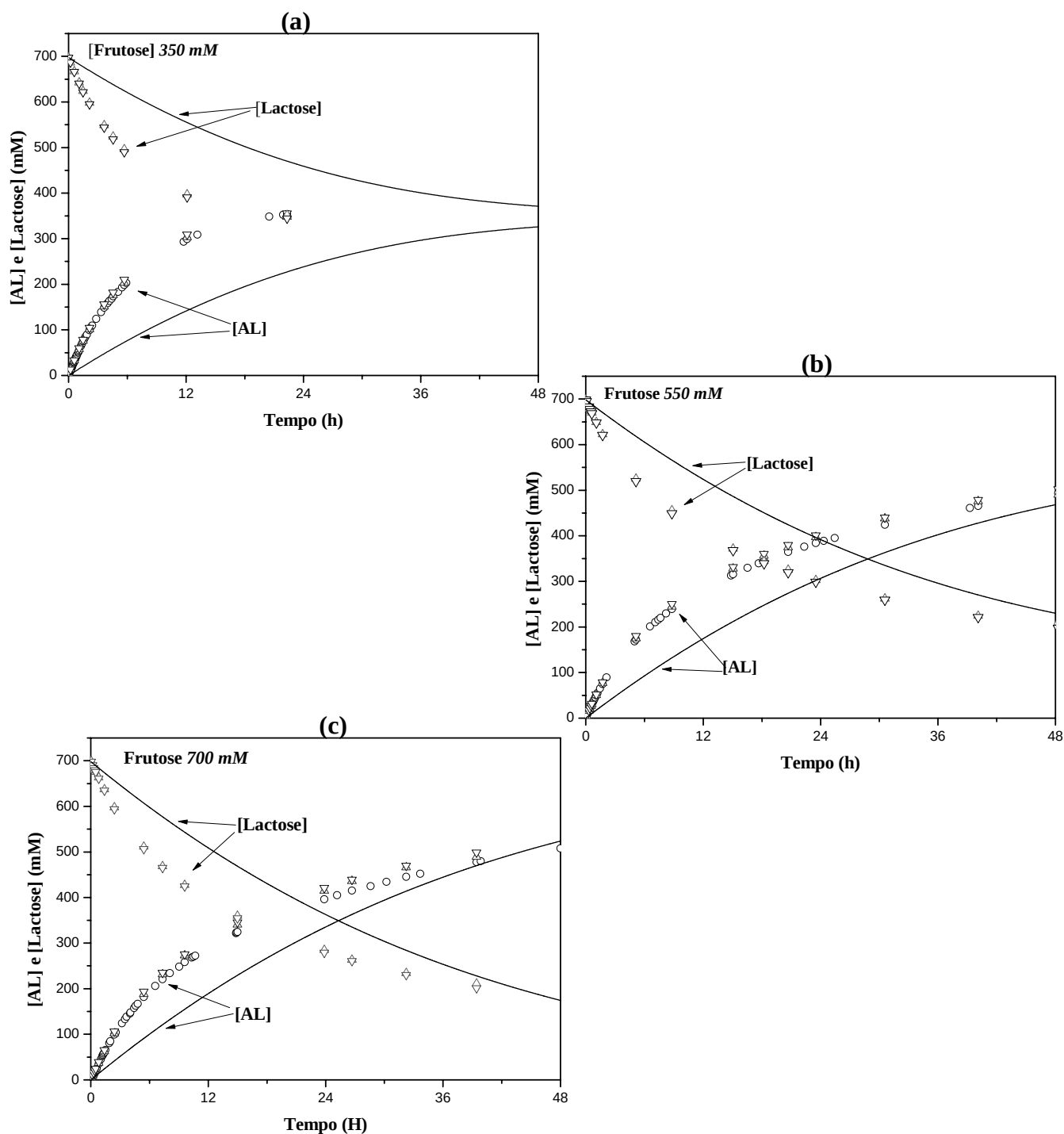


Figura 4.12 – Cinética da GFOR para o consumo da lactose (700 mM) e produção do AL, com distintas concentrações iniciais de frutose: (a) 350 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através da equação da velocidade de reação modelo ping-pong. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

Ensaaios com GFOR para diversos pares de substratos, em diversas composições iniciais mostram distintos comportamentos cinéticos (Carra *et al.*, 2003). Em especial, estes autores determinaram as velocidades iniciais de diversas concentrações equimolares da lactose e frutose (100 a 1200 mM), e também, em sistemas mantendo a concentração de frutose fixa (700 mM) para diversas concentrações da lactose (100 a 1200 mM). Os resultados encontrados são muito semelhantes aos apresentados aqui, onde é possível constatar que a velocidade de reacção não é afetada pela concentração da frutose até uma concentração de 350 mM. Há um consenso entre os resultados aqui apresentados e os reportados por Carra e colaboradores (2003) quanto ao modelo cinético não Micheliano para a reacção de bioconversão da GFOR sobre a lactose e frutose, conforme ilustra a Figura 4.13. Entretanto, o perfil observado por Carra e colaboradores (2003) para o par glicose/frutose, apresenta comportamento cinético Micheliano. O motivo pela qual o par de substratos lactose/frutose altera a actividade da enzima enquanto glicose/frutose não sofre tal efeito, bem como um modelo cinético eficiente e capaz de ajustar os pontos experimentais para quaisquer concentrações da lactose/frutose ainda não foram elucidados.

O modelo de Hill para sistemas reacionais bi-substratos, simulados a partir da equação 4.34 foi investigado para todas as cinéticas (a altas e baixas concentrações de substratos). A melhor condição foi obtida para os ensaios com concentração inicial da frutose constante a 350 mM. A Tabela 4.03 lista os valores dos parâmetros cinéticos deste modelo que satisfazem os ensaios de cinética nesta condição. As curvas simuladas para todos os ensaios a concentração de frutose em 350 mM, utilizando a equação (Eq.34) são ilustradas na Figura 4.14. Observa-se que o modelo consegue representar o comportamento cinético experimental, para a concentração inicial da frutose a 350 mM. No entanto, este modelo não consegue ajustar os ensaios onde a concentração de frutose foi alterada, conforme ilustrado na Figura 4.15, havendo uma antecipação do perfil cinético previsto em relação aos pontos experimentais.

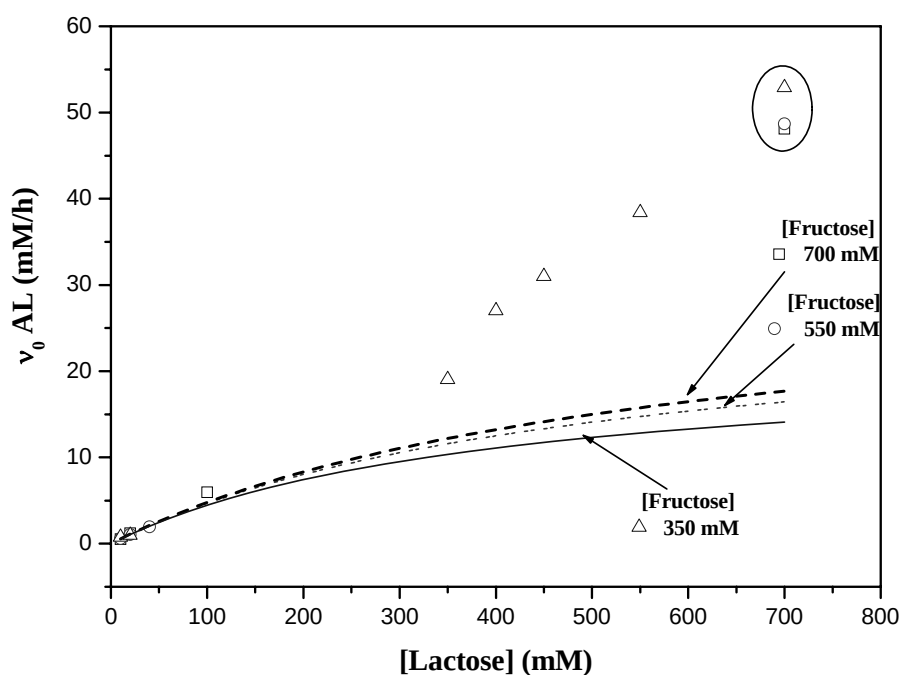


Figura 4.13 – Gráfico da velocidade de reacção em função da concentração da lactose, mantendo a concentração inicial de frutose em 350 mM. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 5M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

Tabela 4.03 – Valores obtidos para os parâmetros cinéticos $v_{\max}$, K_F , K_L e n da equação de velocidade bi-substrato de Hill (ping-pong) para prever a cinética de oxidação da lactose, a baixas concentrações, usando a GFOR.

Parâmetros	Valores
$v_{\text{máximo}}$ (mM/h)	2.76E2
K_L (mM)	1.86E3
K_F (mM)	1.85E2
n	1.6

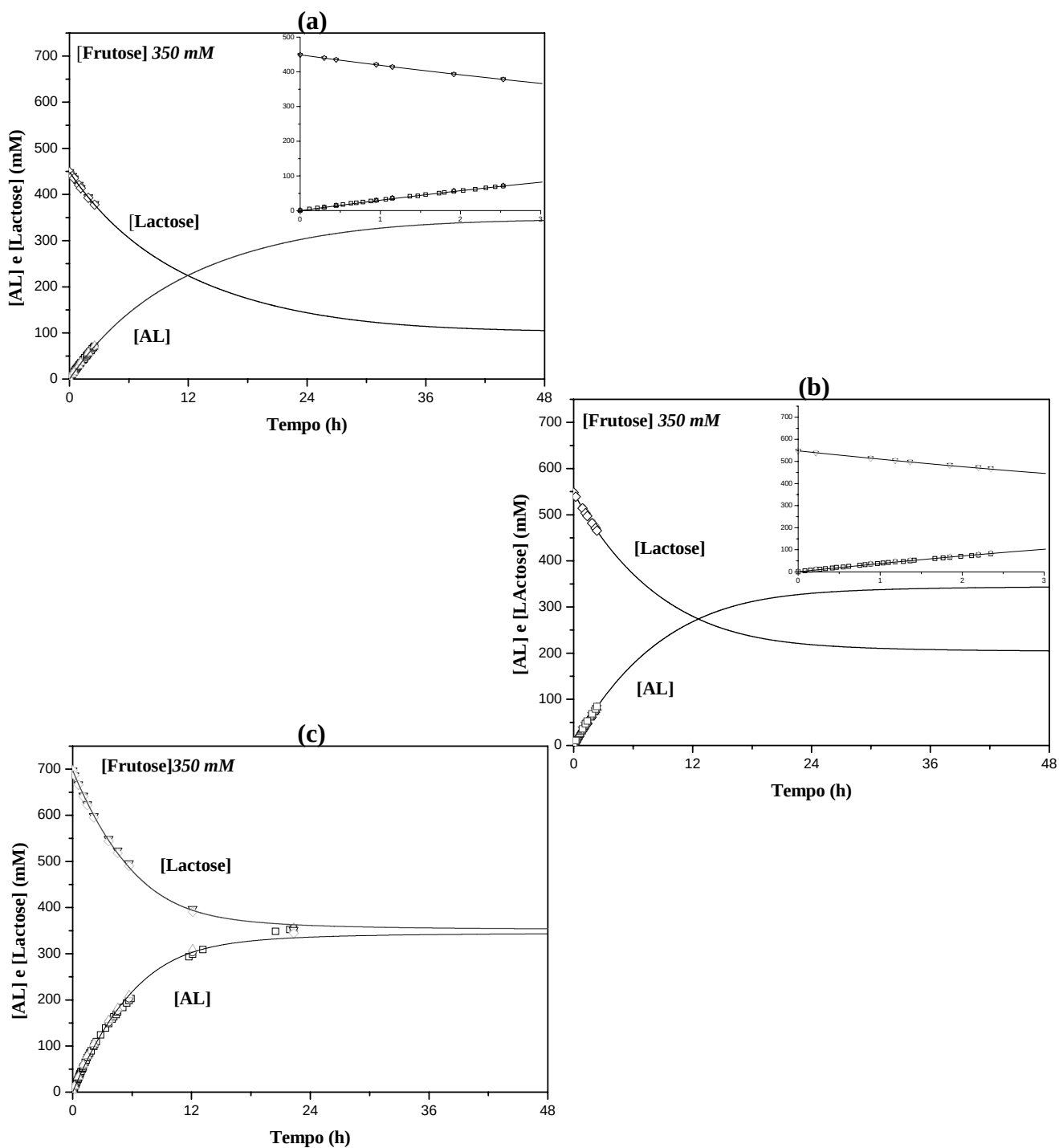


Figura 4.14 - Cinética da GFOR para o consumo da lactose em distintas concentrações iniciais e produção do AL, mantendo a concentração inicial de frutose em 350 mM. Concentração inicial da lactose (a) 450 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através do modelo de Hill. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

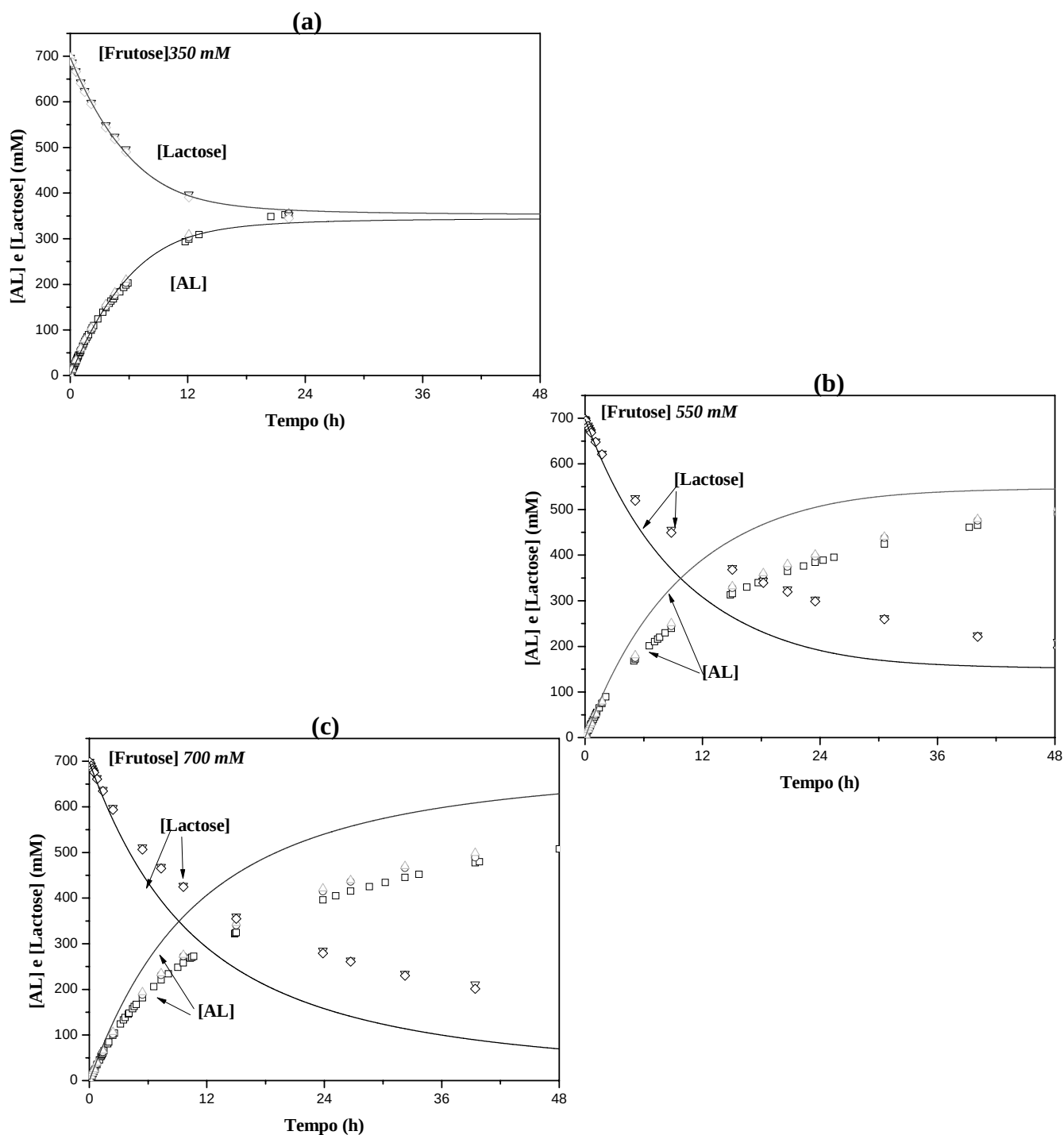


Figura 4.15 - Cinética da GFOR para o consumo da lactose e produção do AL mantendo a concentração inicial de lactose em 700 mM. Concentração inicial de frutose (a) 350 mM, (b) 550 mM e (c) 700 mM. (—) valores previstos através do modelo de Hill. Substâncias quantificadas pela área (Δ) e pela altura (∇) de picos cromatográficos em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 0.2-0.8M), 350 rpm, concentração celular $[X] = 7.19 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

Ensaio com células da *Z. mobilis* imobilizadas em Ca-alginato

Nesta secção são apresentados os resultados das experiências de cinética de bioconversão das enzimas GFOR e GL contidas no interior das células permeabilizadas e reticuladas da *Z. mobilis*, imobilizadas em Ca-alginato. As esferas de Ca-alginato contendo as células foram separadas por granulometria, conforme valores listados na Tabela 4.04. A densidade das partículas foi considerada igual a da densidade da solução de Na-alginato 2% (m/v) com células, ou seja, $1.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. As esferas com diâmetro médio de 1.20 mm e 1.70 mm foram seleccionadas para a avaliação da cinética de produção do AL, com os substratos lactose e frutose nas concentrações de 700 mM e 350 mM, respectivamente. A concentração celular imobilizada foi de $14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ca-alginato para que a concepção de volumes iguais das esferas de Ca-alginato e da fração líquida fosse proporcional a 1:1 e, desta forma, que a concentração do biocatalisador no volume total do reactor fosse igual ao obtido nos estudos de cinética com as células livres, ou seja, $7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Entretanto, esta concepção teve de ser alterada em virtude da necessidade de aumentar a fluidez do meio reacional e, portanto, a proporção foi ajustada para (1:2). Em termos de concentração global do biocatalisador para o sistema imobilizado, este valor foi reduzido de $7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabela 4.04 – Análise granulométrica das esferas de Ca-alginato contendo as células da *Z. mobilis* imobilizadas.

Diâmetro ($\varnothing_p$) (mm)	Diâmetro médio ($\varnothing_m$) (mm)	Massa (g)	Total (%)
$\varnothing_p < 1,00$	-----	1.76	0.84
$1.00 \leq \varnothing_p < 1.41$	1.20	37.4	17.8
$1.41 \leq \varnothing_p < 2.00$	1.70	151	71.9
$\varnothing_p > 2.00$	-----	19.75	9.46

O ensaio com as esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1.70 mm foi preparado pela adição de 51 g das esferas, isentas de água livre, sobre o volume de 100 mL de uma solução de lactose/frutose com concentração inicial 1050/525 mM. No ensaio com esferas de diâmetro médio inferior (1.20 mm), devido à menor quantidade em massa da matriz Ca-

alginate contendo o biocatalisador imobilizado, o volume da solução lactose/frutose foi de 73.3 mL e a adição das esferas foi de 36.6 g (35.9 mL) obtendo-se um volume inicial no reactor, para fins de cálculos, de 109.2 mL e proporção igual a (1 : 2.04). Uma cinética na condição de células livres, com menor concentração do biocatalisador ($4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi realizada para fins de comparação com as cinéticas na condição imobilizada.

O efeito da concentração do biocatalisador nos ensaios com células livres e imobilizadas foi avaliado experimentalmente e através do ajuste da velocidade máxima (Tabela 4.03) do modelo de Hill (Eq. 4.32) para $v_{\text{máx}} = 183.6 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ quando $X = 4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A Figura 4.16 ilustra os resultados dos ensaios com células livres nas concentrações $7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O modelo proposto ajusta os pontos experimentais com boa predição do efeito da redução da concentração do biocatalisador.

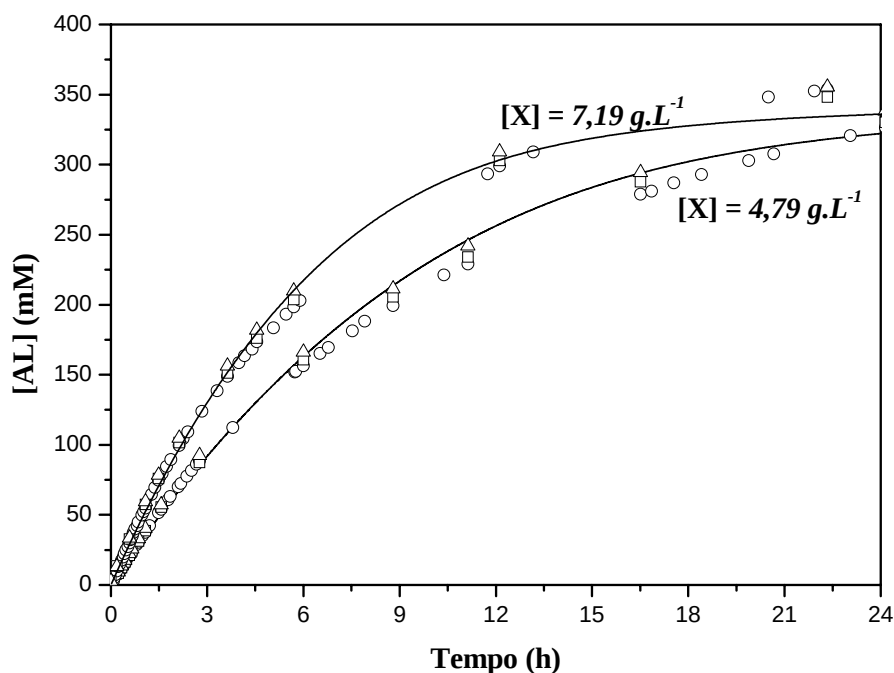


Figura 4.16 – Cinéticas de produção de AL usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* na condição de células livres. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), células ($7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Concentrações determinadas pelo método indireto (○), e em HPLC (□). Valores previstos através da equação de Hill com $[X] = 7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $[X] = 4.79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (—).

A comparação entre os ensaios na condição de células livres e imobilizadas requer uma observação mais detalhada sobre as condições do volume onde ocorre a cinética de bioconversão. Nesta comparação, para o sistema imobilizado, não é considerada resistência à transferência de massa externa. O volume de referência para as medidas de concentração das substâncias, em ambos os sistemas (células livres e imobilizadas), é a fração líquida do volume de controle (volume do reactor). Para os ensaios com células livres, o volume de sólidos (células) foi desprezado e o volume líquido é igual ao volume do reactor. Nos ensaios com células imobilizadas, o volume de sólidos corresponde a 1/3 do volume do reactor, sendo que a proporção do volume de sólidos para líquido é (1:2).

Dentro deste contexto, nos ensaios com células imobilizadas foi considerada a concentração do biocatalisador contida na matriz de Ca-alginato ($14.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para a determinação da velocidade da reacção. Isso determina, de acordo com a equação de Hill, uma $v_{\text{máxima}}|_{\text{Ca-Alginado}} = 9.2 \text{ mM}\cdot\text{L}^{-1}$. Entretanto, a velocidade resultante para a medida da concentração na fase fluída deve ser fatorada pela razão dos volumes de sólido no líquido, ou seja, a $v_{\text{máxima}} = v_{\text{máxima}}|_{\text{Ca-Alginado}} * V_{\text{Ca-alginado}}/V_{\text{Líquido}}$, ou ainda, $9.2 \text{ mM}\cdot\text{L}^{-1} * 35.9/73.3$, obtendo-se, portanto, a $v_{\text{máxima}} = 4.50 \text{ mM}\cdot\text{L}^{-1}$.

A Figura 4.17 ilustra a produção de AL na condição de células imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1,2 mm. As medidas experimentais foram determinadas através dos métodos indireto, que relaciona a estequiometria da reacção de produção do AL em proporção aos moles de KOH gastos no controle do pH durante o processo, e as medidas determinadas em HPLC. Os valores de AL obtidos em ambas as técnicas de quantificação sobrepõem-se satisfatoriamente nesta experiência. Cabe registrar que as medidas em HPLC, para o sistema imobilizado, se referem a concentração das substâncias na fase fluída, enquanto que para o ensaio com células livres é a concentração das substâncias produzidas no total da reacção sem qualquer tipo de resistência a transferência de massa. A curva cinética predita pelo modelo de Hill ajusta os pontos experimentais satisfatoriamente. O sistema imobilizado apresenta uma velocidade de reacção maior do que a obtida na condição de células livres com mesma concentração celular em função do volume do reactor. Desta forma, parece ser notável que a velocidade da reacção para o sistema imobilizado em esferas de Ca-alginato de diâmetro 1.2 mm não demonstra os efeitos significativos à resistência à transferência de massa.

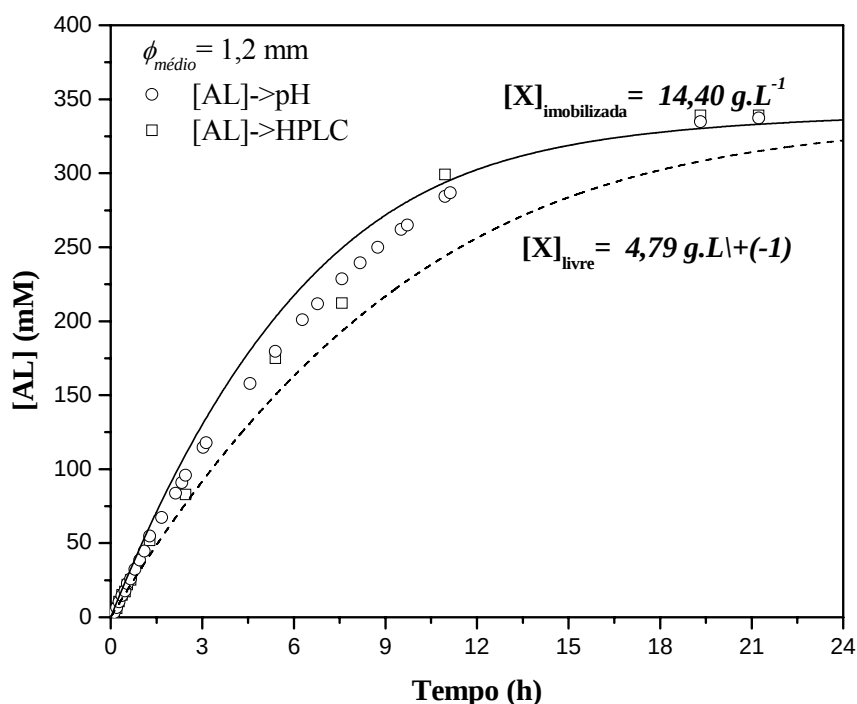


Figura 4.17 – Cinéticas de produção do AL usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* na condição de células imobilizadas em esferas de Ca-alginato (diâmetro médio $\phi_{\text{médio}} = 1.2$ mm). Concentrações iniciais da lactose/frutose (700/350 mM). Concentrações determinadas pelo método indireto (o), e por HPLC ($\square$). $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.4 \text{ g.L}^{-1}$ de Ca-alginato, e $[X]_{\text{livre}} = 4.79 \text{ g.L}^{-1}$ (volume do reactor). (—) Valores previstos através da equação de Hill para $[X]_{\text{imobilizado}}$ e (---) para $[X]_{\text{livre}}$.

Os pontos experimentais ilustrados na Figura 4.17 são comparados com as curvas previstas pelo modelo de Hill para duas condições: quando a concentração do biocatalisador por volume de Ca-alginato é de 14.4 g.L^{-1} (considerando a diluição ocorrida na fase fluída); e quando a concentração do biocatalisador por volume do reactor é de 4.79 g.L^{-1} (considerando a mesma massa de biocatalisador por volume total da reação). A figura mostra claramente que a cinética em condição imobilizada apresenta uma velocidade de reação maior do que a conduzida na condição de células livres, atingindo o equilíbrio em aproximadamente 18 h. Logicamente, este resultado demonstra que o rendimento e a produtividade do processo, na condição de operação em descontínuo, são maiores quando o biocatalisador encontra-se

imobilizado na matriz de Ca-alginato que não oferece resistência a transferência de massa (diâmetro médio ≤ 1.2 mm).

As concentrações da lactose estimadas pelos dois métodos (indireto e em HPLC) para o ensaio com células imobilizadas em esferas de diâmetro médio 1.2 são ilustradas na Figura 4.18, juntamente com a curva prevista pela equação de Hill. A curva de consumo da lactose ajusta os valores da concentração estimada pelo método indireto, sendo que não há sobreposição dos pontos experimentais obtidos pela medida em HPLC. Entretanto, há sobreposição dos pontos experimentais e, também, da curva de ajuste para as concentrações no equilíbrio.

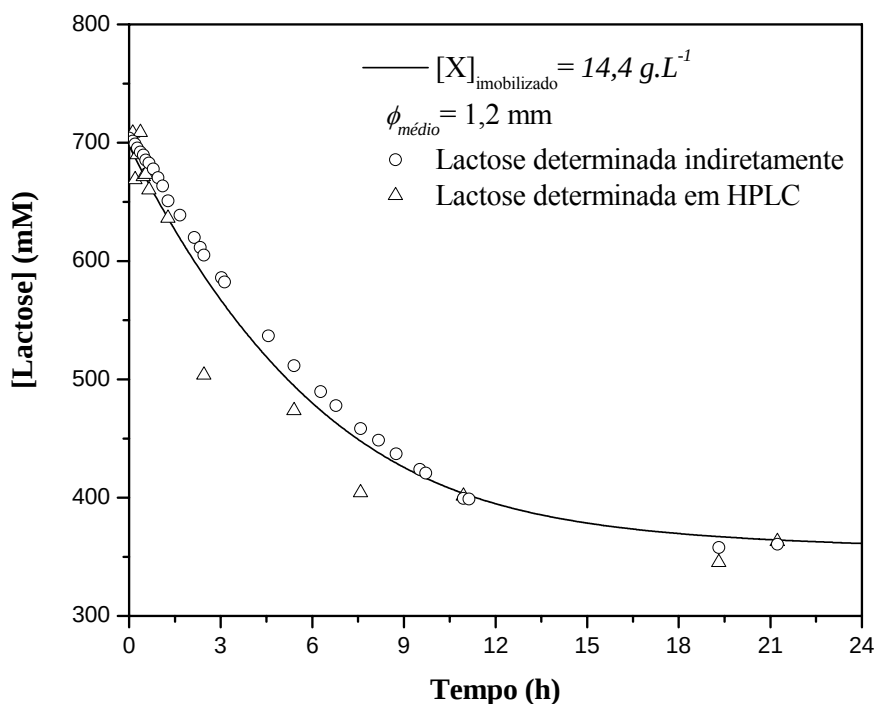


Figura 4.18 – Cinéticas de consumo da lactose usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1,2 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), biocatalisador $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.4 \text{ g.L}^{-1}$. Concentrações determinadas pelo método indireto (○), e por HPLC (△). Curva prevista pelo modelo de Hill com $[X] = 14.4 \text{ g.L}^{-1}$ convertida para volume da fase fluída (—).

Os resultados das medidas de consumo da frutose e formação de sorbitol, em HPLC, e a respectivas curvas do modelo de Hill para estas substâncias são apresentados na Figura 4.19. O modelo ajusta-se satisfatoriamente aos pontos experimentais, observando um consumo completo da frutose em torno de 19 horas e uma concentração de sorbitol de aproximadamente 330 mM.

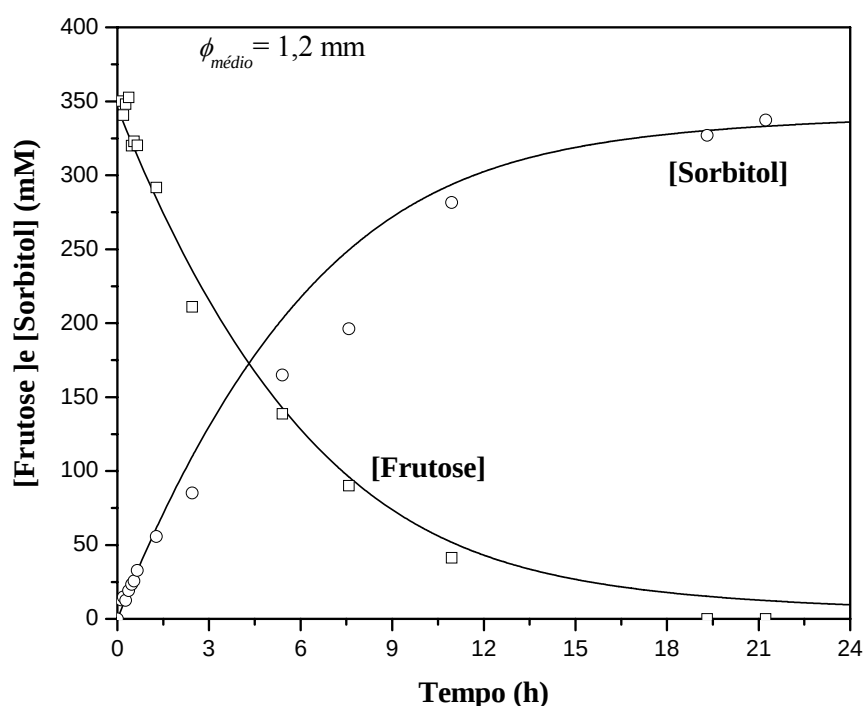


Figura 4.19 – Cinéticas de consumo da frutose e formação do sorbitol usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1.2 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), células totais por volume de reactor (4.79 g·L⁻¹). Concentrações determinadas em HPLC (○) sorbitol (□) frutose. (—) Curva predita pelo modelo de Hill com $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ convertida para volume da fase fluída.

Os resultados do ensaio com o biocatalisador imobilizado em esferas de Ca-alginato com diâmetro médio de 1,7 mm são ilustrados na Figura 4.20. Observa-se através desta figura que as concentrações de AL determinadas pelo método indireto e em HPLC são distintos. A concentração de AL medida em HPLC é inferior a medida pelo método indireto, onde o valor de equilíbrio no final da reacção, determinados experimentalmente, foram 312 mM e 281 mM

para ambos os métodos, respectivamente. Nesse caso, um efeito difusional sobre as medidas parece ocorrer, sendo que a concentração do AL no interior da matriz de Ca-alginato, onde a maior parte da reacção ocorre, deve ser maior e, portanto, o modelo de Hill não pode ser colocado em comparação direta. As concentrações medidas em HPLC (fração líquida) no final da reacção estão muito abaixo da concentração de referência esperado (350 mM). Em igual condição, as concentrações determinadas pelo método indireto não totalizam o balanço de massa correspondente para o meio reacional preparado, indicando uma provável retenção de substrato no interior das esferas de alginato.

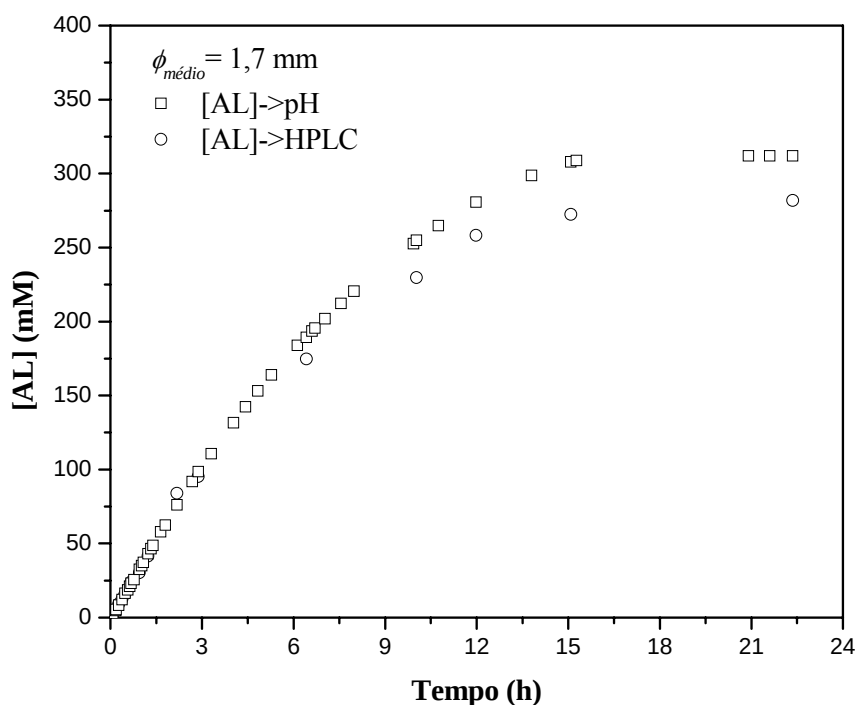


Figura 4.20 – Cinéticas de produção do AL usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1.7 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM), $[X]_{\text{imobilizado}}$ (14.4 g·L⁻¹). Concentrações determinadas pelo método indireto (□), e em HPLC (○).

Outra condição que requer maior atenção está na concentração inicial dos substratos no momento em que o biocatalisador é introduzido no reactor. O efeito da diluição ocasionado pelas esferas de Ca-alginato foram supridas pelo aumento da concentração da mistura lactose/frutose para 1050/525 mM. Ensaios prévios mostram que o equilíbrio da concentração na fase fluída é atingido aos 5 minutos após o contacto das esferas de Ca-alginato e a

velocidade de reacção inicial adquire comportamento linear após este período. Este comportamento se repetiu nos ensaios com células imobilizadas reportadas.

Os resultados em termos de consumo da lactose, para ambos os métodos de quantificação, são mostradas na Figura 4.21. A concentração medida indiretamente demonstra concentrações mais elevadas do que as medidas em HPLC para a fase fluída.

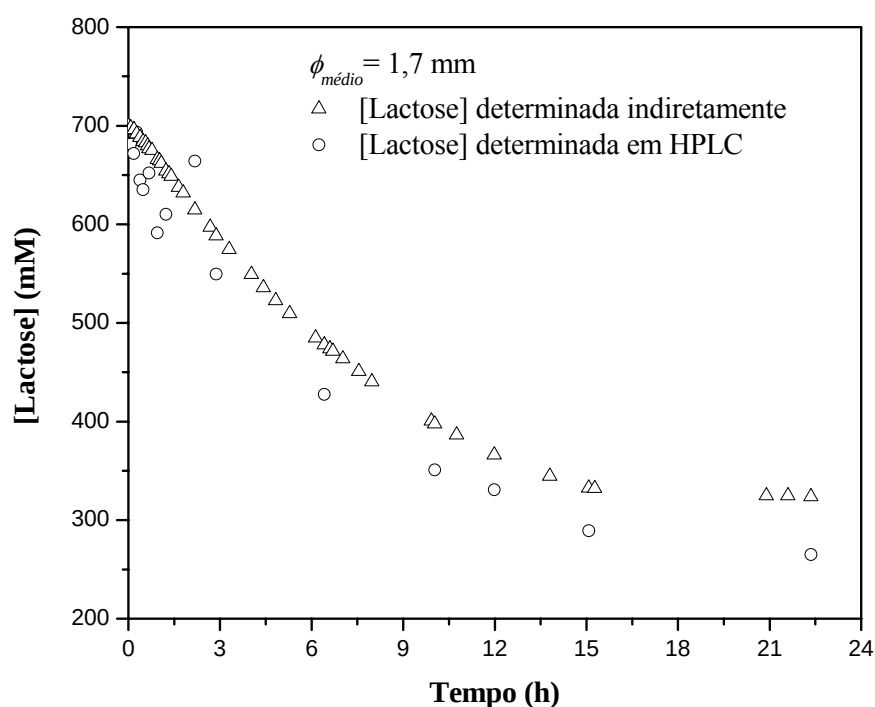


Figura 4.21 – Cinética de consumo da lactose usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio de 1.7 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM). Substâncias quantificadas em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 3.5 M), 350 rpm, concentração celular $[X]_{\text{imobilizado}} = 14.40 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

Em relação aos pontos experimentais de consumo de frutose e formação do sorbitol, a Figura 4.22 ilustra os valores quantificados em HPLC. O consumo total da frutose é observado, e a concentração do sorbitol na fase fluída no equilíbrio é de 250 mM. Essa concentração é muito inferior a encontrada para o AL (281 mM) quantificado em HPLC, evidenciando que um acúmulo do sorbitol e da frutose apresentam-se no interior da matriz de Ca-alginato com diâmetro de 1,7 mm. Em virtude deste facto, a determinação da concentração

de substratos não reagida deve ser determinada para que os efeitos difusionais sejam possíveis de serem quantificados.

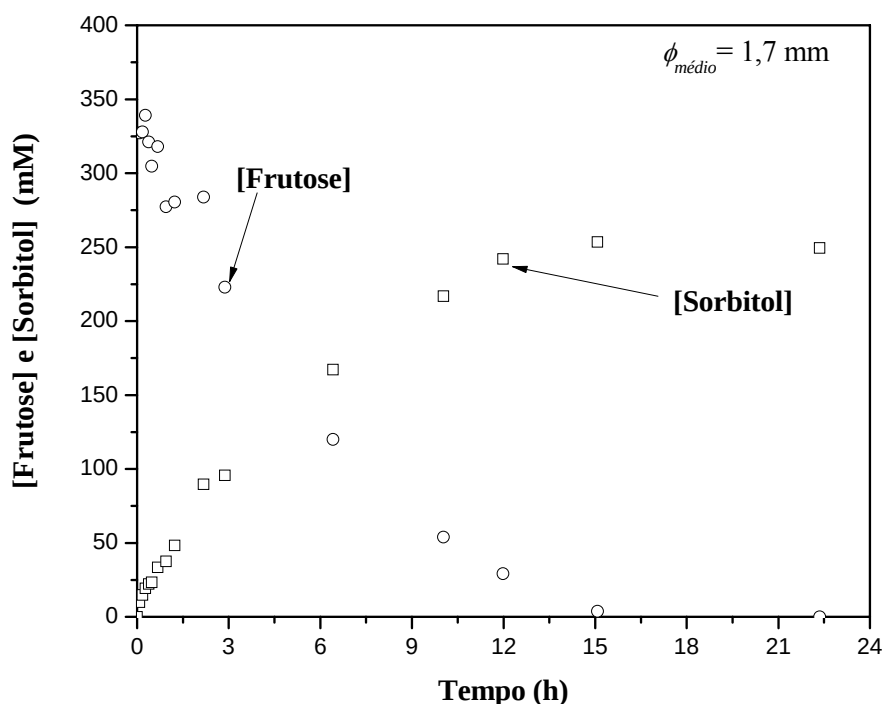


Figura 4.22– Cinética de consumo da frutose e formação do sorbitol usando a GFOR contida em células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio de 1,7 mm. Concentrações iniciais: lactose/frutose (700/350 mM). Substâncias quantificadas em HPLC. Condições: 39°C, pH6.4 (KOH 3,5 M), 350 rpm, concentração celular $[X]_{\text{imobilizado}} = 14,40 \text{ g.L}^{-1}$ (peso seco).

4.5 CONCLUSÕES

A fermentação de glicose para a produção das células da bactéria *Z. mobilis* ATCC29191 em sistema semi-contínuo mostrou resultados satisfatórios em comparação com o reportado na literatura. O efeito limitante da concentração de glicose e etanol, ambos a 50 g.L^{-1} , marca efetivamente o fim do crescimento microbiano. A composição da fonte de vitaminas, representada no meio de cultivo pelo extrato de levedura, influencia decisivamente na obtenção de um coeficiente de conversão de substrato em células (Y_{XS}) mais elevado. Sistemas que associam a remoção do etanol formado seguido de um balanço da concentração

da fonte de nitrogênio se apresentam necessários para o aumento da produção da massa celular, e assim, das enzimas GFOR e GL, para serem utilizadas nos ensaios de bioconversão.

Os resultados de cinética da GFOR mostram que ela pode ser modelada em uma equação do tipo ping-pong para concentrações baixas da lactose (20 a 100 mM). No entanto, a cinética descreve um comportamento cooperativo que não segue a equação de Michaelis-Menten quando a concentração da lactose aumenta para 700 mM (concentração de operação assumida), onde são observadas as maiores velocidades de reação. O modelo de Hill descrito para o mecanismo cinético do tipo ping-pong consegue ajustar os pontos experimentais a altas concentrações da lactose desde que se mantenha a concentração inicial de frutose em 350mM. O modelo consegue, também, prever o efeito da mudança da concentração do biocatalisador e o a cinética na condição do biocatalisador imobilizado, desde que efeitos difusionais sobre a matriz de Ca-alginato sejam desprezíveis (diâmetro médio igual ou inferior a 1,2 mm). Este modelo, no entanto, não consegue prever o comportamento cinético para condições aleatórias da concentração inicial dos substratos.

Alguns modelos alternativos para descrever o mecanismo cinético bi-substrato do tipo ping-pong englobando propriedades cooperativas, como exemplos o de Monod, Wyman and Changeux (MWC), com algumas adaptações propostas por Hanekorn (2006) podem ser avaliados na continuidade dos estudos da cinética com GFOR para a produção de sorbitol e AL. Os resultados experimentais para a descrição do modelo matemático que reproduza a velocidade de reação da GFOR na bioconversão da mistura lactose/frutose em AL/sorbitol mostraram comportamentos característicos de enzimas regulatórias do tipo cooperativo e com efeito heterotrópico. Um factor intrínseco de afinidade da lactose com a GFOR sobre a cinética sugere estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de acoplamento deste substrato no sítio activo da GFOR.

A análise dos dados disponíveis mostra que os parâmetros da equação ping-pong (Eqs. 4.21 e 4.35) são precisos para baixas concentrações com valores de $v_{\max}$ (66 mM.h⁻¹), K_L (1180 mM) e K_F (730 mM). A equação de Hill ajustou-se com os pontos experimentais a altas concentrações da lactose (400 a 700 mM) tendo a frutose fixada em 350 mM. Nos ensaios a 550 mM e 700 mM de frutose, bem como para os ensaios a baixas concentrações da lactose com 350 mM de frutose, o modelo não se ajustou aos pontos experimentais. Os parâmetros da equação de Hill no modelo tipo ping-pong foram $v_{\max}$ (276 mM.h⁻¹), K_L (1860 mM) e K_F (185mM) e $n = 1.6$.

Os resultados mostram que a frutose pode ser utilizada como instrumento de controle do processo de bioconversão da lactose/frutose em AL e sorbitol com a GFOR. Os pontos experimentais com lactose a 700 mM e concentrações de frutose em 350, 550 e 700 mM mostraram que as velocidades de reacção inicial tendem a aumentar com o decréscimo da concentração de frutose. O mesmo não foi observado nos ensaios em que se manteve a concentração inicial de frutose em 350mM tendo a lactose nas concentrações crescentes de 10, 20, 400, 450, 550 e 700 mM. Obviamente que esses dados experimentais devem ser confirmados, no entanto, isso permite especular que o decréscimo da concentração de frutose, até certo ponto, tende a aumentar a velocidade inicial da reacção. Isto favorecerá a etapa posterior de separação com uma concentração muito pequena de frutose, a ponto de ter-se uma mistura ternária com elevada concentração da lactose residual e equimolar concentração dos produtos da bioconversão (AL e sorbitol).

Os ensaios com células imobilizadas em esferas de Ca-alginato com diâmetros médios de 1.2 mm e 1.7 mm se mostraram eficazes para a produção do AL e do sorbitol em reactor de mistura completa. As esferas de menor diâmetro não apresentaram efeitos de resistência difusional consideráveis. As concentrações de AL determinadas pelo método indireto, com base nos moles de KOH gastos no controle do pH da reacção durante o processo, e as medidas em HPLC se mostraram equivalentes. O modelo de Hill, considerando a concentração do biocatalisador igual a dos ensaios com células livres ajustou os pontos com boa aproximação. Os efeitos difusionais foram observados no ensaio com células imobilizadas em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio 1.7 mm.

O processo de bioconversão é definido como otimizado com as concentrações iniciais dos substratos lactose/frutose em 700/350 mM. No final do processo de bioconversão obtém-se uma mistura ternária equimolar (350 mM) composta pelos produtos (AL e sorbitol) e a lactose em excesso. O processo conduzido com o biocatalisador imobilizado em esferas de Ca-alginato, com diâmetro médio igual ou inferior a 1.2 mm, aumenta a velocidade da reacção e promove a obtenção de uma fração líquida mais limpa para ser tratada posteriormente na unidade de separação.

4.6 NOMENCLATURA

$Y_{X/S}$	factor de conversão de substrato em células ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
$Y_{P/S}$	factor de conversão de substrato em produto ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
μ_X	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_P	velocidade específica de formação de etanol (h^{-1})
μ_S	velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})
p	produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
t	tempo (h)
AL	ácido lactobiónico
P	produto (etanol) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
E	enzima (GFOR)
S	sorbitol
L	lactose
Lct	lactono- δ -lactona
F	fructose
k	constante cinética de reacção
A,B	subtratos

LETRAS GREGAS

ρ	rendimento (%)
ν	velocidade ($\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$)
k_M	constante de Michaelis-Menten

SUBSCRITOS

f	final, factor estequiométrico ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
$i, 0$	inicial
$_{max}$	máxima
$_{cte}$	constante

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrow, K. D., J. G. Collins and D. A. Leigh (1984). "Sorbitol Production by *Zymomonas Mobilis*." Applied Microbiology and Biotechnology **20**(4): 225-232.
- Blanch, H. W. and D. S. Clark (1997). Biochemical Engineering. New York, USA, Marcel Dekker, Inc.
- Carra, S., K. Concatto, E. Malvessi and M. M. Silveira (2003). Cinética Da Ação De Glicose-Fructose Oxidorredutase E Glucono- Δ -Lactonase De *Zymomonas Mobilis* Na Presença De Diferentes Carboidratos. XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM 2003. Florianópolis -SC - Brazil.
- Chun, U. H. and P. L. Rogers (1988). "The Simultaneous Production of Sorbitol from Fructose and Gluconic Acid from Glucose Using an Oxidoreductase of *Zymomonas Mobilis*." Applied Microbiology and Biotechnology **29**(1): 19-24.
- Erzinger, G. S., M. M. d. Silveira, J. P. C. L. d. Costa, M. Vitolo and R. Jonas (2003). "Activity of Glucose-Fructose Oxidoreductase in Fresh and Permeabilised Cells of *Zymomonas Mobilis* Grown in Different Glucose Concentrations." Brazilian Journal of Microbiology **34**: 329-333.
- Ferraz, H. C., T. L. M. Alves and C. P. Borges (2001). "Coupling of an Electrodialysis Unit to a Hollow Fiber Bioreactor for Separation of Gluconic Acid from Sorbitol Produced by *Zymomonas Mobilis* Permeabilized Cells." Journal of Membrane Science **191**(1-2): 43-51.
- Hanekorn, A. J. (2006). Generic Kinetic Equations for Modelling Multisubstrate Reactions in Computational Systems Biology, University of Stellenbosch. **Master of Science (Biochemistry)**: 114.
- Hardman, M. J. and R. K. Scopes (1988). "The Kinetics of Glucose Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas-Mobilis*." European Journal of Biochemistry **173**(1): 203-209.
- Hardman, M. J., M. Tsao and R. K. Scopes (1992). "Changes in the Fluorescence of Bound Nucleotide During the Reaction Catalyzed by Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas-Mobilis*." European Journal of Biochemistry **205**(2): 715-720.
- Jen, A. C., M. C. Wake and A. G. Mikos (1996). "Review: Hydrogels for Cell Immobilization." Biotechnology and Bioengineering **50**(4): 357-364.
- Jobses, I. M. L., G. T. C. Egberts, A. Vanbaalen and J. A. Roels (1985). "Mathematical-Modeling of Growth and Substrate Conversion of *Zymomonas-Mobilis* at 30-Degrees-C and 35-Degrees-C." Biotechnology and Bioengineering **27**(7): 984-995.
- Jonas, R. and M. M. Silveira (2004). "Sorbitol Can Be Produced Not Only Chemically but Also Biotechnologically." Applied Biochemistry and Biotechnology **118**(1-3): 321-336.

- Karel, S. F., S. B. Libicki and C. R. Robertson (1985). "The Immobilization of Whole Cells - Engineering Principles." Chemical Engineering Science **40**(8): 1321-1354.
- Kingston, R. L., R. K. Scopes and E. N. Baker (1996). "The Structure of Glucose-Fructose Oxidoreductase from *Zymomonas Mobilis*: An Osmoprotective Periplasmic Enzyme Containing Non-Dissociable NADP." Structure **4**(12): 1413-1428.
- Lee, W. C. and C. T. Huang (2000). "Modeling of Ethanol Fermentation Using *Zymomonas Mobilis* Atcc 10988 Grown on the Media Containing Glucose and Fructose." Biochemical Engineering Journal **4**(3): 217-227.
- Leskovac, V. (2003). Comprehensive Enzyme Kinetics. New York, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS.
- Lott, J. S., D. Halbig, H. M. Baker, M. J. Hardman, G. A. Sprenger and E. N. Baker (1998). "Crystal Structure of a Truncated Mutant of Glucose-Fructose Oxidoreductase Shows That an N-Terminal Arm Controls Tetramer Formation." Journal of Molecular Biology **304**(4): 575-584.
- Malvessi, E. (2008). Produção De Sorbitol E Ácidos Orgânicos Por *Zymomonas Mobilis*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. **Doutoramento**: 235.
- Malvessi, E., K. Concatto, S. Carra and M. M. da Silveira (2006). "Formulation of Medium for Growth and Production of Ethanol and Intracellular Enzymes by *Zymomonas Mobilis*." Brazilian Archives of Biology and Technology **49**: 139-144.
- Monod, J., J. Wyman and J. P. Changeux (1965). "On Nature of Allosteric Transitions - a Plausible Model." Journal of Molecular Biology **12**(1): 88-&.
- Pedruzzi, I., E. Malvessi, V. G. Mata, E. A. B. Silva, M. M. Silveira and A. E. Rodrigues (2007). "Quantification of Lactobionic Acid and Sorbitol from Enzymatic Reaction of Fructose and Lactose by High-Performance Liquid Chromatography." Journal of Chromatography A **1145**(1-2): 128-132.
- Rehr, B., C. Wilhelm and H. Sahm (1991). "Production of Sorbitol and Gluconic Acid by Permeabilized Cells of *Zymomonas-Mobilis*." Applied Microbiology and Biotechnology **35**(2): 144-148.
- Rogers, P. L., K. J. Lee and D. E. Tribe (1979). "Kinetics of Alcohol Production by *Zymomonas-Mobilis* at High Sugar Concentrations." Biotechnology Letters **1**(4): 165-170.
- Satory, M., M. Furlinger, D. Haltrich, K. D. Kulbe, F. Pittner and B. Nidetzky (1997). "Continuous Enzymatic Production of Lactobionic Acid Using Glucose-Fructose Oxidoreductase in an Ultrafiltration Membrane Reactor." Biotechnology Letters **19**(12): 1205-1208.
- Silveira, M. M., E. Wisbeck, I. Hoch and R. Jonas (2001). "Production of Glucose-Fructose Oxidoreductase and Ethanol by *Zymomonas Mobilis* Atcc 29191 in Medium Containing Corn

Steep Liquor as a Source of Vitamins." Applied Microbiology and Biotechnology 55(4): 442-445.

Silveira, M. M., E. Wisbeck, C. Lemmel, G. Erzinger, J. P. L. da Costa, M. Bertasso and R. Jonas (1999). "Bioconversion of Glucose and Fructose to Sorbitol and Gluconic Acid by Untreated Cells of *Zymomonas Mobilis*." Journal of Biotechnology 75(2-3): 99-103.

Swings, J. and J. Deley (1977). "Biology of *Zymomonas*." Bacteriological Reviews 41(1): 1-46.

Viikari, L. (1984a). "Formation of Levan and Sorbitol from Sucrose by *Zymomonas-Mobilis*." Applied Microbiology and Biotechnology 19(4): 252-255.

Viikari, L. (1984b). "Formation of Sorbitol by *Zymomonas-Mobilis*." Applied Microbiology and Biotechnology 20(2): 118-123.

Zachariou, M. and R. K. Scopes (1986). "Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas-Mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production." Journal of Bacteriology 167(3): 863-869.

Este capítulo aborda a separação da mistura quaternária constituída por frutose, lactose, sorbitol e ácido lactobiônico (AL) usando resinas de troca iônica carregadas com diferentes iões (H^+ , K^+ e Ca^{2+}). O interesse nesta separação está em melhorar a produtividade do processo de formação do AL a partir da reação enzimática catalisada pelas enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL). A determinação das isotérmicas de equilíbrio para as quatro substâncias é realizada numa coluna preparativa empacotada com a resina selecionada, a três diferentes temperaturas, pelos métodos de análise frontal e de adsorção-dessorção. Os coeficientes globais de transferência de massa para a adsorção das substâncias, nas temperaturas estudadas, são estimados usando um modelo dinâmico da coluna cromatográfica. A partir de testes de pulso das soluções mono-componente e em mistura, a resina Dowex 50WX4 na forma K^+ é considerada adequada para esta separação. Uma isotérmica de adsorção desfavorável para o AL é descrita pelo modelo anti-Langmuir. As restantes substâncias revelam um equilíbrio de adsorção linear em concentrações até $130g.L^{-1}$. As curvas de ruptura das substâncias obtidas através de ensaios com uma mistura binária e outra quaternária são bem previstas pelo modelo dinâmico utilizando os parâmetros obtidos a partir dos dados de adsorção mono-componente.

* Este capítulo é baseado no artigo "I. Pedruzzi, E.A.Borges da Silva, A.E. Rodrigues, Selection of Resins, Equilibrium and Sorption Kinetics of Lactobionic Acid, Fructose, Lactose and Sorbitol, Sep. Pur. Technol., 63:3, 600-611 (2008)."

5.1 INTRODUÇÃO

Os adsorventes típicos para a separação de carboidratos, empregados em sistemas de cromatografia de escala industrial, são resinas de troca catiónica com matriz de poliestireno (PS) reticulada com divinilbenzeno (DVB) com grupos ácido sulfónico ($-\text{SO}_3\text{H}$) na rede polimérica (Paillat *et al.*, 2000). A aplicação de resinas de troca aniónica também já tem sido investigada, particularmente para a separação de ácidos derivados de açúcares e de oligómeros (Samuelson e Wallenius, 1963; Havlicek e Samuelson, 1973; Larsson e Samuelson, 1977; Beenackers *et al.*, 1986).

O mecanismo e a eficiência da separação dependem de diversas propriedades físicas e químicas da fase estacionária (tamanho de partículas, grau de reticulação polimérica, capacidade, forma iónica), e de sua interação com as moléculas tanto do adsorbato como do eluente utilizado. Alguns mecanismos incluem: complexação, troca iónica, exclusão iónica, fase normal/inversa, interações hidrofóbicas ou hidrofílicas, forças de Van der Waals, entre outros (Angyal *et al.*, 1979; Fischer *et al.*, 1995; Churms, 1996a; 1996b; Churms, 2005).

No campo da separação de carboidratos, uma das resinas catiónicas mais empregadas à escala industrial é a resina PS-DVB na forma Ca^{++} , cujo modo de separação combina os mecanismos de exclusão por tamanho, de troca iónica e de complexação. Estes adsorventes de troca iónica são particularmente úteis para o fracionamento de misturas de glicose e frutose, empregados por diversas empresas de alimentos (Mitsubishi, IWT, Amalgamated, Applexion/Novasep (Paillat *et al.*, 2000)). As moléculas de frutose formam complexos com as iões de cálcio, enquanto o mesmo não ocorre com as moléculas de glicose, resultando em altos fatores de separação. Relativamente às misturas de mono-, di-, tri- e oligo-sacarídeos, o mecanismo de cromatografia por exclusão de tamanho promove o seu fracionamento em ordem decrescente de tamanho molecular, isto é, a eluição inicial da maior molécula na saída da coluna cromatográfica.

A solução composta por um monossacarídeo, um dissacarídeo, um poliálcool e um ácido aldónico não é uma mistura usual. Considerando a produção de ácido lactobiónico usando enzimas das células *Zymomonas mobilis* (e.g., GFOR / GL), a taxa de reação máxima está na fase inicial de reação, resultando numa mistura contendo, portanto, frutose, lactose, sorbitol e AL. A fim de alcançar uma maior produtividade, a reacção enzimática pode ser interrompida após poucas horas de conversão, e então os substratos não reagidos podem ser

reciclados após a sua separação dos produtos. A escolha de um adequado adsorvente não é uma tarefa simples e, ademais, ainda não tem sido reportada na literatura. Como o AL a partir desta mistura reaccional está na sua forma de sal (lactobionato), algumas resinas de troca catiónica devem ser testadas para separar esta mistura quaternária.

A determinação das isotérmicas de adsorção pode ser realizada por métodos estáticos ou dinâmicos. Entre os métodos estáticos, estão incluídos o método descontínuo e a metodologia de adsorção-dessorção. Alguns métodos dinâmicos, também chamados de métodos cromatográficos, são a análise frontal (FA), a eluição por pontos característicos e o método de perturbação. Recentemente, Vente e colaboradores (2005) mostraram algumas comparações entre os resultados obtidos pela análise frontal (perturbação em degrau e em etapas) e pela adsorção-dessorção em colunas empacotadas com resinas de permuta iónica (na forma Na^+). Outras determinações de isotérmicas de equilíbrio de adsorção, empregando os métodos de dessorção estática e de FA têm sido realizados para avaliar a influência de diferentes cátions (Ca^{++} , Na^+ e K^+) carregados nas resinas do tipo gel no desempenho da separação de mono- e di- sacarídeos (Vente *et al.*, 2005). Gramblicka e Polakovic (2007) investigaram a capacidade e a selectividade de quatro resinas catiónicas comerciais sobre a separação da mistura produzida a partir de produção de frutooligossacarídeos.

O objetivo deste capítulo é avaliar a separação da mistura quaternária - lactose, frutose, sorbitol e AL - por cromatografia de troca iónica, onde são realizados testes experimentais em colunas preparativas (cromatografia líquida de baixa pressão). Na primeira parte, a selecção da fase estacionária para esta separação é abordada. Posteriormente, os dados de equilíbrio de adsorção para as substâncias desta mistura quaternária sobre o adsorvente seleccionado são determinados a diferentes temperaturas. Finalmente, os parâmetros de cinética de adsorção são obtidos através de um procedimento de estimação pela resolução de um modelo matemático que assume um escoamento pistão-difusional para descrever a operação dinâmica experimental da coluna cromatográfica. Algumas experiências de curvas de ruptura em colunas de leito fixo para separar os componentes de misturas binárias e quaternárias são realizadas e, então, o modelo matemático empregado para descrever a operação é validado.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 PRODUTOS QUÍMICOS

Os compostos frutose, sorbitol e ácido lactobiônico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, E.U.A.) e a lactose do Panreac (Barcelona, Espanha). O azul de dextrano e o sulfato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O cloreto de potássio e o ácido sulfúrico foram adquiridos da Merck (Damstadt, Alemanha). Todos os produtos químicos são de qualidade analítica. Todas as soluções são preparadas usando água deionizada e filtrada (e desgaseificada).

Três resinas de troca catiónica fortemente ácidas do tipo gel, disponíveis no mercado e obtidas da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), são analisadas nesta tese: Dowex[®] Monosphere 99/Ca-320 na forma de Ca^{++} , Dowex[®] 50WX8-400 (reticulada a 8%) e Dowex[®] 50WX4-400 (reticulada a 4%), ambas na forma H^+ . Estas duas últimas resinas citadas também foram convertidas para a forma de K^+ através da percolação, em excesso, de uma solução de K_2SO_4 0.5M e lavadas com água deionizada. Este processo de permuta iônica é verificado por meio de medidas de pH. As propriedades destas resinas estão listadas na Tabela 5.1.

5.2.2 EQUIPAMENTOS

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Gilson, França) é utilizado para as análises quantitativas dos compostos nas amostras provenientes das experiências com as colunas preparativas. Este sistema está equipado com uma bomba isocrática (modelo 305), um módulo manométrico (modelo 805) e um detector de índice de refração (modelo 131). A coluna de HPLC é mantida em um forno Jetstream II Plus (WO Industrial Eletronics, Áustria) para controlar a sua temperatura. A fase estacionária da coluna analítica consiste de uma resina de troca iônica PS-DVB, fortemente ácida, na forma H^+ (TRANSGENOMIC[®] ICsep ICE-ION-300, 300 mm×7.8 mm, diâmetro de partícula 7µm). Uma coluna preparativa Superformance 150-26 (comprimento máximo de empacotamento igual a 150 mm e diâmetro interno de 26 mm) e os respectivos filtros de dispersão Superformance Merck (modelos F e S) foram adquiridos da Gotec (Muehlthal, Alemanha). As medidas de porosidade – do leito e da partícula – foram realizadas usando um sistema de

HPLC composto por uma bomba quaternária (modelo 1000, Knauer, Alemanha) e um detector de UV (modelo 2500, Knauer, Alemanha).

Tabela 5.01 – Características das resinas de troca iónica e dos empacotamentos de leito fixo.

Propriedade	Dowex® 99Ca/320	Dowex® 50WX8	Dowex® 50WX4
Resina de Troca Iónica *			
Grupo activo na matriz	$-(SO_3)_2^- Ca^{2+}$	$-(SO_3)^- H^+$	$-(SO_3)^- H^+$
DVB (%)	6	8	4
Capacidade total (Eq/L)	> 1.5	> 1.7	> 1.1
Tamanho de partícula	320 µm	37 - 74 µm	37 - 74 µm
Retenção de água (%)	57 - 61 (forma H ⁺)	50 - 58	64 - 72
Leito Empacotado			
Peso do leito de resina (g)	53.4	50.7	50.7
Diâmetro da coluna (cm)	2.6	2.6	2.6
Comprimento do leito (cm)	13.4	11.6	11.4
Temperatura de operação (K)	293	293	293
Caudal (mL·min ⁻¹)	9	4	4
Eluente	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

* dados obtidos do fornecedor.

5.2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

A quantificação dos açúcares e derivados nas amostras foi realizada utilizando o método descrito por Pedruzzi e colaboradores (2007). A porosidade do leito (ϵ) na coluna Superformance foi determinada através do tempo de retenção do azul de dextrano (5 g·L⁻¹; volume de injeção de 20 µL) injectado no sistema de HPLC equipado com o detector de UV. A porosidade da resina foi determinada através da mesma metodologia, mas empregando uma solução de traçador KCl (1g·L⁻¹; volume de injeção de 20 µL) e um detector de índice de refração (IR).

5.2.4 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Considerando a separação pretendida, as experiências nas colunas de cromatografia preparativa foram divididas em duas etapas: avaliação da eficiência de separação utilizando as resinas comerciais mencionadas e, em seguida, a determinação de parâmetros de equilíbrio e de cinética de adsorção. Nestes ensaios experimentais, a coluna Superformance[®] (150-26) foi empacotada com as resinas tipo gel pela técnica do empacotamento em lama e, então, equilibrada com o eluente (água deionizada).

Seleção da Fase Estacionária

Na primeira etapa, a coluna preparativa foi empacotada com cada uma das resinas de troca catiónica a fim de analisar a sua eficácia na separação da mistura quaternária lactose, frutose, sorbitol e AL. Soluções mono-componente de cada soluto da mistura, e também uma solução da mistura quaternária, foram preparadas na concentração de 5 g·L⁻¹. Um determinado volume de análise (20µL) de cada uma destas soluções foi injetado na coluna e as curvas de eluição foram monitoradas pelo detector de IR. A temperatura foi mantida constante em 293K pela circulação de água, usando um banho termostático (Haake D1, Alemanha), através da camisa da coluna cromatográfica. O caudal do eluente durante as corridas experimentais foi de 4 mL·min⁻¹ (exceto para o caso da coluna empacotada com Dowex[®] Monosphere 99/Ca, que foi de 9 mL·min⁻¹). Detalhes sobre as colunas cromatográficas empacotadas são apresentados na Tabela 5.1.

Para avaliar a eficiência de separação das resinas investigadas, o fator de separação (α) e o fator de retenção (k_s) foram determinados pelas seguintes equações (Ettre, 1993):

$$\alpha_{ij} = \frac{k_{si}}{k_{sj}} \quad (5.1)$$

$$k_{si} = \frac{t_{ri} - t_0}{t_0} \quad (5.2)$$

onde t_{ri} é o tempo de retenção da substância i e t_0 é o tempo de residência do traçador.

Equilíbrio e Cinética de Adsorção

Na segunda etapa, as isotérmicas de equilíbrio de adsorção e as curvas de ruptura para todas as substâncias são obtidas empregando a coluna preparativa empacotada com a resina selecionada. As experiências de equilíbrio para cada substância foram realizadas em três temperaturas (293, 313 e 333 K) usando um caudal de eluente igual a 6 mL·min⁻¹. Os métodos de adsorção-dessorção e de análise frontal foram utilizados para determinar as isotérmicas de adsorção mono-componente para a frutose, lactose, sorbitol e AL.

No método de adsorção-dessorção, a coluna empacotada com a resina foi equilibrada com a solução mono-componente de concentração conhecida. As concentrações de alimentação de cada solução foram, aproximadamente, 5, 20, 50, 70 e 130 g·L⁻¹. Quando a saturação do leito era alcançada (inspeccionada pelo sinal do detector), a coluna era retirada do sistema cromatográfico. Posteriormente, o sistema era completamente lavado com o eluente (água) para eliminar quaisquer traços das substâncias analisadas tanto nas tubulações como nas válvulas do sistema de HPLC. Portanto, após a lavagem do sistema, a coluna era reconectada e regenerada com eluente puro. Neste instante, amostras eram coletadas na saída da coluna até que não houvesse alguma variação do sinal do detector, o que significava que a substância havia sido totalmente eluída da coluna. Um balanço de massa na coluna pode ser realizado da seguinte forma,

$$q_i^* = \frac{V_E C_{ie} - \varepsilon V_C C_{io}}{(1 - \varepsilon) V_C} \quad (5.3)$$

onde q_i^* é a concentração adsorvida (g·L⁻¹ resina úmida) da substância i em equilíbrio com a sua concentração na fase líquida, C_{io} é a concentração de alimentação, V_C e ε são o volume e a porosidade do leito da coluna, respectivamente, e V_E e C_{ie} são o volume e a concentração da solução eluída, respectivamente.

Enquanto o método acima usa os dados de regeneração da coluna, a análise frontal (FA) baseia-se em medidas dinâmicas de curvas de rupturas. Para a FA, há duas maneiras de se efetuar o bombeamento das soluções de alimentação para a coluna: (i) método em degrau

ou (ii) método em etapas em série. Neste trabalho, o segundo método foi utilizado. A solução de eluente (água deionizada) que estava sendo bombeado para a coluna preparativa era trocada pela solução de alimentação de concentração conhecida do componente e, então, a curva de ruptura era acompanhada na saída da coluna. Após a saturação, a coluna foi lavada e reequilibrada com eluente puro para estar preparada para uma próxima etapa com uma diferente concentração da solução de alimentação. Este procedimento é feito para cada uma das quatro substâncias, considerando três concentrações de solução de alimentação (20, 70 e 130 g·L⁻¹). A quantidade adsorvida pode ser calculada a partir da área do gráfico da curva de ruptura da substância *i* (área compreendida entre o limite frontal da curva e o eixo das ordenadas), de tal forma que,

$$q_i^* = \frac{Q \int_0^\infty (C_{io} - C_i) dt - \varepsilon V_C C_{io}}{(1 - \varepsilon) V_C} \quad (5.4)$$

onde *Q* é o caudal volumétrico.

A partir dos resultados obtidos em diferentes temperaturas, o calor de adsorção ($-\Delta H_{ads}$) foi determinado. O calor de adsorção é um parâmetro termodinâmico relevante que fornece informações sobre o caráter energético da interação entre as moléculas do adsorbato e os sítios de adsorção das partículas da fase estacionária. A determinação do calor de adsorção de frutose, lactose e sorbitol sobre a resina Dowex[®] 50WX4 (na forma K⁺) foi realizada a partir da dependência das constantes de equilíbrio dos compostos (*K_i*) com a temperatura, numa faixa de temperatura compreendida entre 293 e 333K. A lei de van't Hoff (Eq. 5.5) descreve a relação entre *K* e os parâmetros termodinâmicos,

$$\ln(K) = \frac{-\Delta H_{ads}}{R T} + \frac{\Delta S_{ads}}{R} \quad (5.5)$$

onde *R* é a constante dos gases (kJ·mol⁻¹·K⁻¹) e *T* é a temperatura (K).

Em relação à cinética de adsorção, as curvas de ruptura experimentais foram simuladas utilizando um modelo de fluxo pistão-difusional na fase líquida, e assumindo o modelo de força motriz linear (aproximação *LDF*) para descrever a transferência de massa intraparticular. As equações do modelo são expressas como:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial \bar{q}_i}{\partial t} + v \frac{\partial C_i}{\partial z} - D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} = 0 \quad (\text{fase líquida}) \quad (5.6)$$

$$\frac{\partial \bar{q}_i}{\partial t} = k_{h,i} (q_i^* - \bar{q}_i) \quad (\text{fase estacionária}) \quad (5.7)$$

onde C_i e $\bar{q}_i$ são as concentrações da substância i na fase líquida e na fase estacionária, respectivamente, v é a velocidade intersticial, D_a é o coeficiente de dispersão axial e q_i^* é a concentração adsorvida em equilíbrio com a concentração na fase líquida. As variáveis t e z referem-se ao tempo e a coordenada axial, respectivamente.

É bem estabelecido que a aproximação da força motriz linear (LDF) descreve adequadamente a transferência de massa de sistemas cromatográficos lineares (ou sensivelmente lineares) (Ruthven, 1984). A validade da clássica expressão LDF, assim como as hipóteses associadas, tem sido amplamente discutida para sistemas de isotérmicas de adsorção lineares e não lineares (Yao e Tien, 1992a; 1992b; Rodrigues e Dias, 1998). Nesta aplicação, é assumida uma fase estacionária composta (Yao e Tien, 1992b) de partículas homogêneas (condição geralmente válida para resinas do tipo gel) e um processo de separação isotérmico. A isotérmica de equilíbrio de adsorção é dada por uma função do tipo $q_i^* = f(C_i)$. A cinética de adsorção é representada pelo coeficiente de transferência de massa (k_h), que reflete a condutância da transferência de massa entre a concentração adsorvida na superfície das partículas e a concentração média adsorvida no interior da partícula homogênea. Tanto os coeficientes de transferência de massa como as isotérmicas de adsorção para as substâncias devem ser determinados para serem utilizados nos cálculos das curvas de ruptura de adsorção em leitos fixos e móveis. Considerando uma partícula esférica homogênea, o coeficiente k_h é dado por (Glueckauf, 1955):

$$k_h = \frac{15D_e}{R_p^2} \quad (5.8)$$

onde o parâmetro D_h é a difusividade homogênea e R_p é o raio da partícula de resina.

A porosidade (ϵ_b) da coluna foi obtida através da medida do tempo de retenção de pulsos da solução de azul de dextrano em concentração de $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (volume de injeção de 20 μL), através do leito cromatográfico. A porção de azul de dextrano foi detectada utilizando um detector de UV no comprimento de onda de 280 nm. A dispersão axial pôde ser estimada empregando um procedimento de ajuste das curvas de ruptura experimentais ou calculada utilizando a variância dos picos experimentais obtidos a partir das experiências de pulso com o traçador (Levenspiel, 1972). A porosidade da resina foi determinada utilizando uma solução de traçador de KCl $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

As Eqs.(5.6) e (5.7), com as apropriadas condições iniciais e de contorno de *Danckwerts*, são resolvidas usando o pacote computacional gPROMS, aplicando a subrotina MAXLKHD para o problema de estimatização de parâmetros. O domínio espacial axial é discretizado usando polinômios ortogonais de terceira ordem com mais de cem elementos finitos.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mistura considerada é composta por um ácido orgânico e três carboidratos, os quais contêm grupos ácidos ou básicos, e podem ser separados por cromatografia de troca iônica. É importante mencionar que o AL na mistura proveniente do processo reactivo está sob a forma de sal (lactobionato), uma vez que o pH dessa reação é controlado pela adição de algum álcali forte apropriado. Desta forma, algumas resinas de troca catiónica são consideradas para permitir a separação desta mistura quaternária. Além disso, desde que a água deve ser utilizada para diluir as quantidades iniciais de lactose e frutose para o processo de reação enzimática, então é também conveniente que a água deva ser usada como eluente no processo de separação, eliminando a necessidade de tratamentos adicionais, como seria o caso se outras composições de eluente fossem empregadas.

A retenção em cromatografia líquida é um processo complexo que envolve interações entre a fase móvel e a fase estacionária, geralmente complicadas de descrever com precisão. Em alguns casos, o modo predominante de separação não é evidente e, por muitas vezes, há um mecanismo misto de retenção ocorrendo no processo. As propriedades eletroquímicas e físicas das substâncias, do eluente e da fase estacionária são informações essenciais para compreender a separação em um sistema cromatográfico. Algumas propriedades importantes das substâncias são apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.02 – Propriedades das substâncias.

Compostos	Frutose	Lactose (monohidratada)	Sorbitol	Ácido lactobiónico
Peso Molecular (g mol ⁻¹)	180	360	182	358
Dados Cristalográficos				
a (Å)	8.088 ^{1,†}	7.815 ^{2,‡}	8.677 ^{3,†}	8.7037 ^{4,†}
b (Å)	9.204	21.567	9.311	8.7037
c (Å)	10.034	4.844	9.727	21.055
V (Å ³)	746.96	784.0	785.9	1595.0
Propriedades Electroquímicas				
<i>pK_a</i>	12.0 ^{5,6}	12.2 [†]	13.6 ^{5,6}	3.6 ⁶
Momento dipolo	3.63 ⁸	1.277 ⁷		
Solubilidade em água, (g.cm ⁻³) _{20°C}	0.78 ⁶ <i>Altamente solúvel</i> [†]	0.2 ^{6,†}	0.75 ⁹ <i>Altamente solúvel</i> [†]	<i>Altamente solúvel</i> [†]

O valor de *a*, *b* e *c* define dimensões sobre uma vista estereoscópica da molécula (vectores lattice); *V* é o volume da unidade celular calculada pelos vectores lattice.

[†] Sistema de cristal ortorrômbico; (Dados cristalográficos para o sal de lactobionato de potássio).

[‡] Sistema de cristal monoclinico (ângulo β igual a 106.2°)

[†]De acordo com o Índice Merck.

Momento dipolo_{|water} = 1.8

¹ (Kanters *et al.*, 1977); ² (Beevers e Hansen, 1971); ³ (Park *et al.*, 1971); ⁴ (Wieczorek *et al.*, 1996); ⁵ (Soga e Serwe, 2000); ⁶ (National Library of Medicine, 1993); ⁷ (Shlykov *et al.*, 2007); ⁸ (Mazurkiewicz *et al.*, 2001); ⁹ (Cohen *et al.*, 1993).

As resinas de PS-DVB do tipo gel são de natureza hidrofóbicas, enquanto todas as substâncias são solutos polares, bem como o eluente empregado (a água). Assim, a retenção e a selectividade não devem ser fortemente dependentes das interações hidrofóbicas existentes entre os solutos e a fase estacionária. É conhecido que o contra-íão ligado ao grupo funcional presente na resina de troca catiónica pode afectar o comportamento cromatográfico para os açúcares, os poliólcoois e/ou ácidos orgânicos (Goulding, 1975). Na secção seguinte, um estudo sobre o comportamento cromatográfico de três diferentes resinas de troca catiónica na separação preparativa da mistura contendo frutose, lactose, sorbitol e AL é realizado.

5.3.1 SELECÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA PARA A SEPARAÇÃO QUATERNÁRIA

Resina de troca iónica na forma Ca^{++}

A Figura 5.1 mostra os perfis de eluição de pulsos de solução mono-componente de cada substância (frutose, lactose, sorbitol e AL) injectados na coluna empacotada com a resina Dowex® Monosphere-99/Ca na forma Ca^{++} . A água desionizada foi utilizada como eluente e o caudal foi de $9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (293 K). A altura do leito desta coluna tem um comprimento de 0.134 m. A porosidade e o número de *Peclet*, obtidos a partir das experiências de pulso com traçador e determinado pela teoria de momentos, são 0.38 e 500, respectivamente. As concentrações na amostra de frutose, de sorbitol, de lactose e de AL foram de 200, 200, 80 e $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Para esta fase estacionária, com tamanho de partículas relativamente grandes em relação às outras resinas (ver Tabela 5.1), os picos são bastante alargados, em particular aqueles da frutose e do sorbitol (de maior concentração).

As resinas de troca iónica na forma Ca^{++} são tipicamente utilizadas na separação de açúcares devido à sua capacidade de promover a formação de um complexo de cálcio com as moléculas de alguns tipos de açúcares – mecanismo de complexação – ou por atuar como peneira molecular (modo de separação de exclusão molecular). De acordo com o cromatograma da Figura 5.1, o sorbitol é a substância mais retida nesta fase estacionária, enquanto a frutose é a substância intermediária. Tanto a frutose como o sorbitol são conhecidos por formarem complexos coordenados com o cálcio das resinas catiónicas, mas a estabilidade dos complexos cátion- carboidrato formados é bastante diferente (Tiihonen *et al.*, 2002).

De acordo com Angyal (1974a; 1974b), o arranjo e número de hidroxilas na molécula são factores determinantes na força de formação do complexo e, portanto, na retenção cromatográfica. Outros factores também podem ter influência como a carga e o tamanho do catião iónico, o solvente, a temperatura, entre outros (Angyal, 1989; Rongere *et al.*, 1995). Em geral, os açúcares neutros eluem antes do que o poliálcool, devido principalmente à capacidade dos poliálcoois de formarem complexos tridentados (Caruel *et al.*, 1991; Stefansson e Westerlund, 1996). No caso específico desta separação, D-frutose, que, em solução aquosa, é encontrada preferencialmente na forma de piranose com um anel de seis

membros (68-76% α -piranose e 24-32% α -furanose (deMan, 1999)), tem dois pares equatoriais axiais de grupos OH adjacentes na β -piranose (Goulding, 1975), enquanto a molécula de sorbitol tem três grupos OH consecutivos em uma configuração de três em três (Angyal, 1974a). O arranjo estérico da hidroxila no sorbitol é mais favorável para a formação do complexo Ca^{++} levando a uma maior estabilidade do complexo.

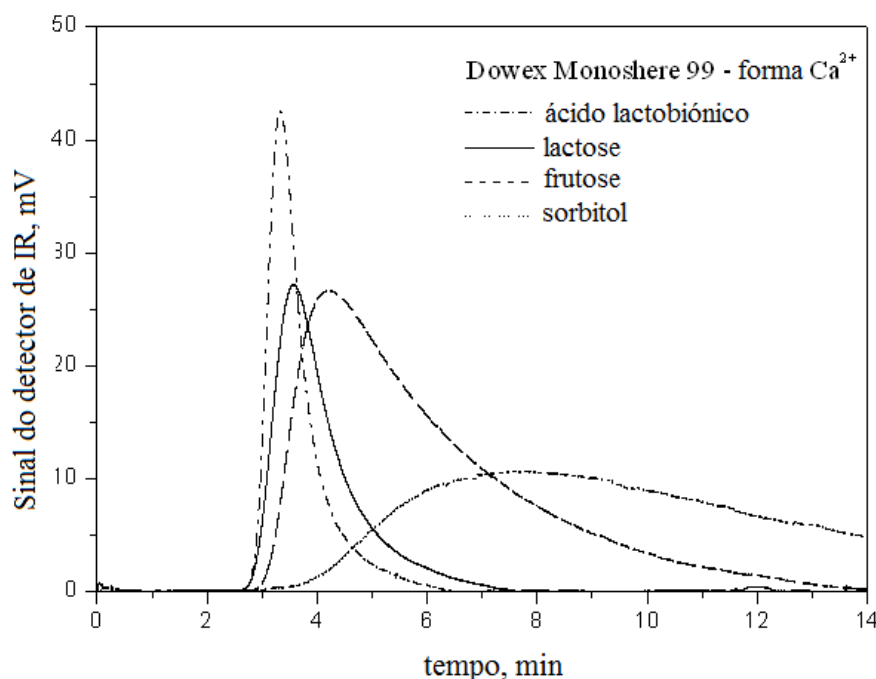


Figura 5.01 – Cromatogramas de pulsos mono-componentes para a frutose, lactose, AL e sorbitol sobre o leito de resina Dowex Monosphere 99 na forma Ca^{2+} (134 mm $\times$ 26 mm I.D.). Eluente: água deionizada. Caudal: 9 mL $\cdot$ min $^{-1}$. Temperatura: 293K.

No entanto, pelo cromatograma apresentado, pode-se concluir que este tipo de resina leva a picos muito dispersivos e não fornece uma boa resolução da mistura (o sorbitol apresenta um pico muito disperso).

Resina de troca de iônica na forma H^+

As Figuras 5.2a-c mostram os perfis de eluição das soluções mono-componente e da solução contendo a mistura quaternária usando a coluna preparativa empacotada com resinas na forma H^+ .

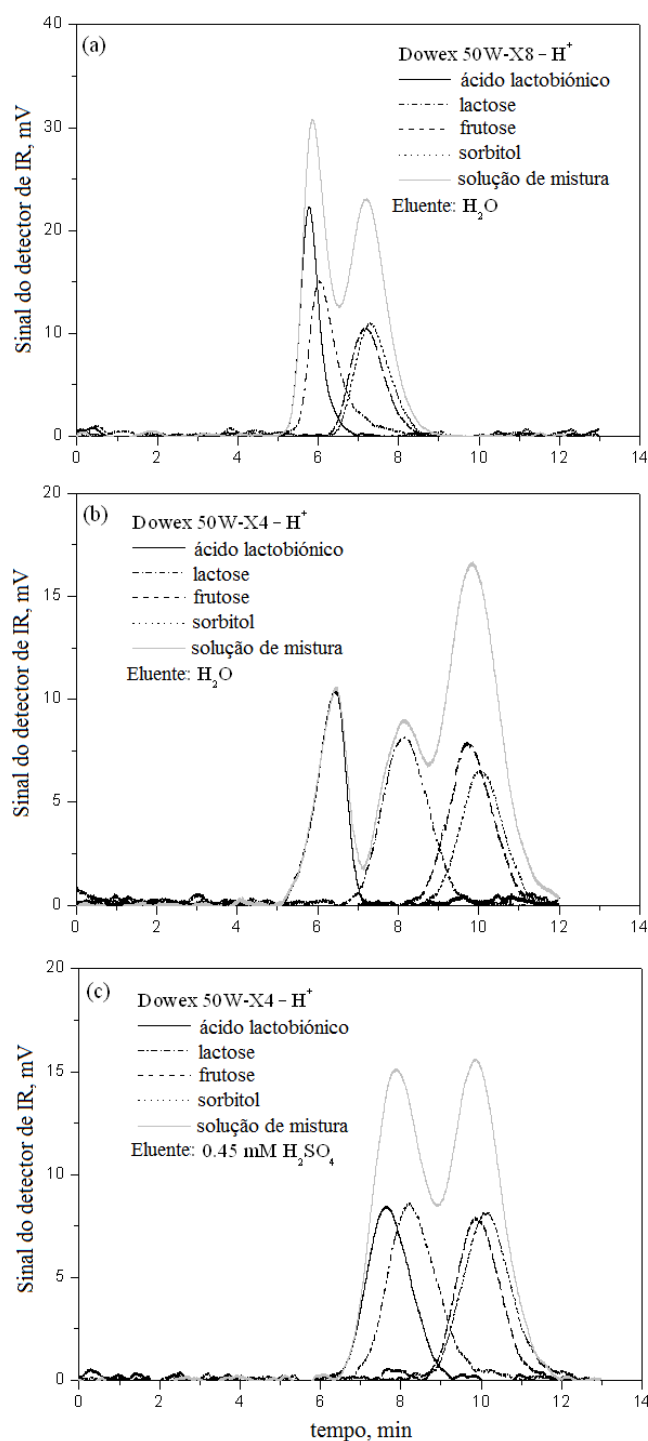


Figura 5.02 – Cromatogramas de pulsos mono-componentes para a frutose, lactose, AL e sorbitol e da mistura quaternária sobre o leito de resina: (a) Dowex 50WX8 H⁺ (114 mm × 26 mm I.D.) e (b) Dowex 50WX4 H⁺ (116 mm × 26 mm I.D.) usando água deionizada como eluente; e (c) Dowex 50WX4 H⁺ usando solução de H₂SO₄ como eluente. Caudal: 4 mL·min⁻¹. Temperatura: 293K.

Geralmente, as resinas de troca catiónica convencionais ligadas com grupos sulfônicos ligados aos iões H^+ utilizam os modos de exclusão iônica e de cromatografia de filtração em gel (GFC) para separar sacarídios, poliálcoois e ácidos orgânicos. Considerando a série homóloga contendo compostos como tri-, di- e mono-sacarídeos, esses carboidratos eluem em ordem decrescente de tamanho molecular. Os poros na resina excluem as moléculas maiores, que eluem primeiro. Então, a ordem de eluição pode ser explicada simplesmente sustentada na estereoquímica da molécula. A separação por exclusão de tamanho baseia-se na dimensão molecular, no tamanho e na forma das moléculas de soluto.

Dois graus diferentes de reticulação são investigados: DVB 8% e DVB 4%. Em comparação com a resina Dowex[®] Monosphere 99/Ca, as resinas Dowex[®] 50W-X8 e -X4 têm diferentes catiões permutáveis (H^+ ao invés de Ca^{++}) e menor tamanho de partícula. Em geral, o desempenho de separação aumenta com o emprego de um menor tamanho de partícula. O tamanho das partículas possui uma grande influência sobre a cinética de difusão: partículas maiores podem tornar a cinética mais lenta e, portanto, acarretar picos cromatográficos mais largos. Evidentemente, há um conflito entre o tamanho das partículas da resina e a queda de pressão na coluna. Para estes testes de pulso, a concentração na amostra das substâncias no volume de injeção (20 μL) é de 5.0 $g \cdot L^{-1}$. Nesta concentração, os picos eluídos são registrados na faixa detectável de sinal do detector de IR, a fim de verificar o desempenho de separação.

Através das experiências de pulso com traçador, o número de *Peclet* médio para as colunas preparativas empacotadas com estas resinas é 700, para ambas as resinas com os tipos de reticulação 4% e 8%. A fração de vazios para 4% e 8% DVB é de 0.36 e 0.35, respectivamente. Nestes testes de pulso com traçador, a faixa de caudal do eluente foi entre 2 e 8 $min \cdot mL^{-1}$ a temperatura ambiente.

O cromatograma da Figura 5.2a é o resultado dos ensaios de pulso usando a resina Dowex[®] 50WX8 na forma H^+ (DVB 8%) como a fase estacionária, enquanto o cromatograma das Figs. 5.2b-c é para a coluna empacotada com resina Dowex[®] 50WX4 na forma H^+ (4% DVB). Pode-se verificar que a eluição dos picos de lactose e de frutose aparecem em ordem decrescente relativo ao tamanho molecular destas substâncias. A Tabela 5.2 mostra os três parâmetros dimensionais (vetores que resultam em um prisma retangular com dimensões a , b e c ; base rectangular ao sistema monoclinico de cristal e um paralelogramo para sistema cristalino ortorrômbico) da estrutura cristalina das substâncias obtidos a partir de análises de raios-X (Beevers e Hansen, 1971; Park *et al.*, 1971; Kanters *et al.*, 1977; Wieczorek *et al.*,

1996). Embora a lactose tenha um peso molecular mais elevado do que a frutose, o seu volume, com base na célula unitária, calculado a partir dos vetores é ligeiramente menor. Neste caso, vale mencionar o conceito de projeção molecular média relatada na literatura (Giddings *et al.*, 1968; Casassa, 1976) como uma dimensão para caracterizar a exclusão. Considerando os três vetores da molécula da lactose, pode-se dizer que esta molécula sofre uma exclusão parcial devido a um fenômeno de entropia configuracional (Giddings *et al.*, 1968). Também é importante considerar que os solutos que são hidratados ou então associados em solução (pontes de hidrogênio) se revelarão como moléculas maiores e eluem antes do que se esperaria.

O pico cromatográfico da frutose (peso molecular de $180 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) elui antes do pico do sorbitol (peso molecular de $182 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), embora ambas as substâncias tenham quase o mesmo peso molecular. Embora a frutose tenha uma estrutura circular, diferente do sorbitol que possui uma estrutura de cadeia linear, os resultados de raios-X mostram uma visão estereoscópica semelhante para estas duas substâncias (Tabela 5.2) (Park *et al.*, 1971; Kanter *et al.*, 1977). Esta é uma situação que revela uma limitação de uma fase estacionária onde predomina a exclusão de tamanho como mecanismo de separação, ou seja, torna-se difícil fracionar moléculas de tamanhos comparáveis. Mesmo que a exclusão por tamanho seja o mecanismo dominante, alguns efeitos secundários podem surgir a partir de diferentes interações (forças eletrostáticas, de partição, etc.). Pode-se especular sobre o arranjo mais favorável dos grupos OH nos polióis (neste caso, sorbitol). Para o caso particular da resina iônica na forma H^+ , não há agentes complexantes, mas interações de pontes de hidrogênio entre a carga parcial positiva dos átomos de hidrogênio no arranjo mencionado dos grupos OH e a carga negativa sobre a matrix da resina ($-\text{SO}_3^-$) podem produzir alguma atração. Isto teria o efeito de aumentar o tempo de retenção do sorbitol em comparação com aquele da frutose.

O grau de reticulação da resina do tipo gel também tem um efeito importante sobre a separação. Vente e colaboradores (2005) reportaram uma comparação entre as constantes de Henry obtidas para a frutose e a glicose sobre a resina de PS-DVB carregada na forma Ca^{++} com diferentes graus de reticulação. O grau de reticulação está relacionado principalmente à retenção de água na resina (e, em consequência, também a sua porosidade, grau de inchamento e propriedades mecânicas). As resinas altamente reticuladas apresentam uma baixa tendência à alteração de seu volume (*swelling*) e também uma cinética de difusão mais

lenta. Na Tabela 5.3 (e comparando as Figs. 5.2a e 5.2b), nota-se que há uma melhoria da separação do AL e da lactose utilizando a resina com menor grau de reticulação. Uma vez que uma menor reticulação significa uma estrutura de poros mais aberta, a resina de 4% DVB pode separar melhor as substâncias de maior peso molecular comparativamente a resina de 8% DVB.

Tabela 5.03 – Valores do factor de retenção (k_s) e do factor de separação (α) para as diferentes resinas.

Resina	Catião	k_s				α		
		AL	L	S	F	L/AL	S/L	F/S
Dowex [®] Monosphere	Ca ²⁺	0.11	0.19	1.57	0.41	1.78	8.25	3.85
Dowex [®] 50WX8	H ⁺	0.05	0.10	0.33	0.31	1.83	3.29	1.06
Dowex [®] 50WX4	H ⁺	0.17	0.49	0.84	0.78	2.83	1.70	1.08
Dowex [®] 50WX4 ¹	H ⁺	0.40	0.50	0.85	0.80	1.26	1.70	1.06
Dowex [®] 50WX8	K ⁺	0.06	0.24	0.48	0.86	3.73	2.02	1.78 ²
Dowex [®] 50WX4	K ⁺	0.06	0.88	1.04	1.32	15.85	1.18	1.27 ²

AL = ácido lactobiônico; L = lactose; S = sorbitol, e F = frutose; t_0 = tempo de residência de compostos não retidos. (para: resina Ca²⁺ t_0 = 3.00min; resina H⁺ t_0 = 5.47 min; resina K⁺ t_0 = 4.66 min).

¹ Eluente ácido: solução de 0.45 mM H₂SO₄. Para outros casos, o eluente é água.

² Para estes casos, o factor de separação é α S/F

A razão entre os fatores de retenção (k) – valores calculados a partir dos tempos de eluição dos picos cromatográficos – da lactose e do AL (ou seja, k_L/k_{LBA}) sobre a resina 8% DVB é 1.83, enquanto sobre a resina 4% DVB é 2.83. No entanto, estas resinas do tipo H⁺ não promovem uma separação satisfatória, dado que os picos de frutose e de sorbitol são eluídos com quase o mesmo tempo de retenção.

O perfil de eluição obtido a partir da injeção da solução da mistura também é mostrado na Figura 5.2. Uma vez que esta mistura foi preparada com a mesma concentração das soluções individuais para cada um das substâncias, a área total do pico cromatográfico da mistura deve ser equivalente à soma das áreas dos picos dos componentes individuais. A partir desta observação, pode-se verificar o efeito da presença de outras substâncias sobre a

adsorção de uma outra em específico. Concentrando-se sobre o pico do AL na Figura 5.2a, pode-se constatar que ele está sobreposto pelo cromatograma da injeção da solução da mistura, o que significa que a presença de outras componentes não influencia a eluição do composto sobre esta fase estacionária. Na Figura 5.2b, onde o pico do AL é eluído como uma banda bem separada antes da lactose, também é possível a visualização e corroboração da afirmativa acima. Lógico que experiências de adsorção com misturas binárias, ternárias ou quaternárias são necessárias para garantir que não há nenhum comportamento competitivo de adsorção dos compostos.

O uso de uma solução eluente ácida (solução 0,45 mM H_2SO_4) para a adsorção mono- componente sobre a resina Dowex[®] 50WX4 na forma H^+ em pH 3.1 é mostrado na Figura 5.2c. É conhecido que o eluente pode ter um efeito considerável sobre o desempenho da separação e, então, pode mudar a interação molecular entre as substâncias e os grupos de troca iônica do material adsorvente (Verhaar e Kuster, 1981). A separação do AL e da lactose foi encontrada ser menos eficaz quando um meio ácido é usado; enquanto os picos de frutose e de sorbitol mantiveram praticamente os seus tempos de retenção. A resina do tipo gel de 4% DVB carregada com contra-íon H^+ é hidrofóbica e as moléculas das substâncias são polares. O grupo funcional fixado nesta resina de carácter fortemente ácido está permanentemente ionizado e sua densidade de carga é independente do pH (Schweitzer, 1997). Em relação aos compostos, os três carboidratos (o poliálcool e os sacarídios) são ácidos muito fracos (seus valores de pK_a variam entre 11 e 13 (ver Tabela 5.2)), assim, são difíceis de se ionizar em meio aquoso (apenas soluções fortemente alcalinas de pH mais elevado do que os seus respectivos valores de pK_a poderiam proporcionar uma carga líquida negativa para os carboidratos).

Assim, não há grupos funcionais com cargas nestes hidratos de carbono neutros considerando as condições de separação empregadas. Por outro lado, o ácido lactobiônico dissocia-se em meio aquoso com um valor de pK_a de 3.6. Neste trabalho, a solução do AL está na forma desprotonada do ácido ($\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_{10}\text{COO}^-$), uma vez que uma base forte é empregada como um agente de neutralização. Portanto, pode-se assumir que a forma desprotonada do AL é separada das outras substâncias neutras com base em um mecanismo de exclusão de *Donnan* nesta fase estacionária. Em soluções de pH inferior, haverá uma alta concentração de H^+ para protonar a base conjugada do AL. Em pH suficientemente baixo, o AL não estará dissociado, ou então fracamente dissociado, e pode difundir-se nos poros da

resina sendo largamente inibido pelos grupos iônicos da fase estacionária. Como resultado, as moléculas do AL gastam mais tempo na fase estacionária e o tempo de retenção aumenta. Esta ocorrência também foi verificada no trabalho de Pedruzzi e colaboradores (2007) quando, usando uma coluna com resina de troca iônica fortemente ácida, o pico cromatográfico do AL é eluído cada vez mais perto do pico da lactose a medida que o pH do eluente diminuiu de 4.33 para 3.1 (ou seja, sobre o valor do pK_a do AL). Como mostrado na Tabela 5.3, os valores do fator de retenção para os carboidratos permanecem inalterados quando o eluente é uma solução ácida.

Resina de troca iônica na forma K^+

As últimas resinas avaliadas são resinas de troca catiónica, Dowex[®] 50WX4 e Dowex[®] 50WX8, sob a forma potássio (K^+). As resinas na forma H^+ foram convertidas para a forma K^+ e os seus respectivos desempenhos na separação de interesse foram avaliados. As curvas de eluição para as diferentes espécies são mostradas na Fig.5.3. Ao empregar a resina iônica na forma K^+ , o sorbitol é eluído antes da fructose, o que difere da ordem de eluição observada quando se utiliza a resina na forma Ca^{++} ou de H^+ (o sorbitol é eluído sempre como o último composto nestas resinas). A resina de troca iônica possuindo K^+ como contra-íon é conhecida por utilizar a exclusão de íons com exclusão de *Donnan* para os solutos como sendo o seu mecanismo primordial de separação. Em geral, os contra-íons monovalentes (tais como K^+ , Na^+) formam apenas complexos fracos com os carboidratos sendo normalmente classificados como catiões não complexantes (Angyal, 1989). Outro modo de separação que contribui para ao comportamento cromatográfico observado é derivado dos efeitos de exclusão por tamanho, onde essas resinas funcionam como peneiras moleculares. Este mecanismo de separação oferece a vantagem de uma maior taxa cinética de adsorção. Na Fig. 5.3, os perfis de eluição da injeção da mistura também são apresentados. Novamente, a presença de todas as substâncias não afeta a eluição do AL. Como se pode constatar, existe uma sobreposição dos picos eluídos de AL a partir do pulso da solução de mono-componente e do pulso da solução de mistura.

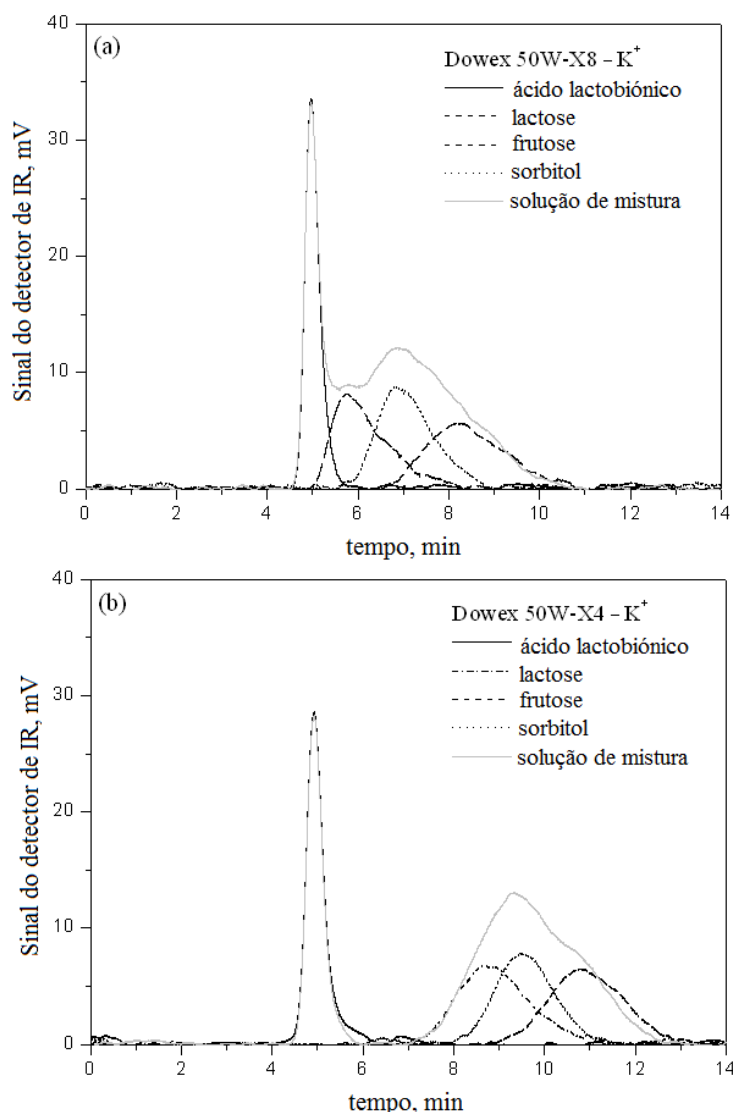


Figura 5.03 – Cromatogramas de pulsos mono-componentes para a frutose, lactose, AL e sorbitol e da mistura quaternária sobre o leito de resina: (a) Dowex 50WX8 K⁺ (114 mm x 26 mm I.D.) e (b) Dowex 50WX4 K⁺ (116 mm x 26 mm I.D.). Eluente: água deionizada. Caudal: 4 mL·min⁻¹. Temperatura: 293K.

Pode-se verificar na Fig. 5.3 que o tempo de retenção dos picos dos componentes eluídos são distintos de forma a permitir uma separação satisfatória. Considerando a resina de 8% DVB, os tempos de retenção são: 4.96 min para o AL, 5.78 min para a lactose, 6.92 min para o sorbitol e 8.68 min para a frutose. Para o caso da resina de 4% DVB, o tempo de retenção do pico do AL é quase o mesmo do que aquele para a resina de 8% DVB (4.92 min),

muito embora seja eluído como um pico bem distinto dos picos das outras três substâncias com os tempos de retenção de: 8.78 min para a lactose, 9.51 min para o sorbitol e 10.82 min para a frutose.

A separação destes compostos sobre as diferentes resinas do tipo gel é avaliada pelo fator de retenção (k_s) e pelo fator de separação (α). Os resultados são apresentados na Tabela 5.3. O traçador de azul de dextrano é tomado como um pico de referência para calcular o tempo de retenção t_0 na Eq. (5.2). Da Tabela 5.3 e Figs. 5.1-5.3, os melhores resultados do fator de retenção e do fator de separação foram encontrados quando empregando a resina do tipo gel na forma K^+ como fase estacionária. Embora ambas as resinas Dowex[®] 50W-X4 e -X8, na forma de K^+ , tenham demonstrado uma boa resolução para a lactose, a frutose, o sorbitol e o AL, a melhor resolução para o AL é encontrada quando a resina de 4% DVB é utilizada. Portanto, a resina Dowex[®] 50WX4 na forma K^+ foi selecionada para esta separação e, então, para posteriores medidas de parâmetros de adsorção.

5.3.2 ISOTÉRMICAS DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

Desde que a resina de troca iônica na forma K^+ (grau de reticulação de 4% DVB) mostrou a melhor resolução na separação da mistura quaternária dentre as resinas do tipo gel investigadas, o equilíbrio de adsorção e os dados cinéticos foram determinados para esta fase estacionária. Dois conjuntos de experimentos foram realizados. No primeiro, o equilíbrio e a cinética de adsorção mono-componente foram medidos. O segundo conjunto de experimentos foi executado para corroborar os parâmetros de adsorção mono-componente na predição da dinâmica da coluna cromatográfica sendo alimentada com misturas de soluções binárias e quaternárias.

As isotérmicas de adsorção mono-componente da lactose, da frutose, do sorbitol e do AL foram determinadas em três diferentes temperaturas (293, 313 e 333K). As concentrações da solução de alimentação para cada uma das substâncias foram de aproximadamente 5, 20, 50, 70 e 130 g·L⁻¹. Água deionizada foi utilizada como eluente e o caudal foi mantido em 6 mL·min⁻¹. A coluna empacotada teve 10.4cm de comprimento e 2.6cm de diâmetro interno. O efeito da temperatura sobre a porosidade do leito (ϵ_b) foi considerada e os valores de ϵ_b foram 0.344, 0.321 e 0.302 à temperatura de 293, 313 e 333 K, respectivamente. Através de experiências com traçador, a fracção de vazios da resina (ϵ_p) também foi obtido em diferentes

temperaturas. Desde a resina Dowex[®] 50WX4 é uma resina do tipo gel, baixos valores de ϵ_p foram encontrados: 0.028, 0.030 e 0.031 à temperatura de 293, 313 e 333 K, respectivamente. Os valores de porosidade do leito não foram utilizados para a determinação de equilíbrio do AL (na forma de sal), pois verificou-se uma diminuição do volume da resina de fase devido ao fenómeno do encolhimento da resina. Este assunto é discutido mais adiante.

A Figura 5.4 mostra as isotérmicas de equilíbrio de adsorção obtidas para as quatro substâncias. Dois métodos foram usados para determinar os dados de equilíbrio de adsorção: método de frontal análise e o método de adsorção-dessorção. Sob as condições experimentais utilizadas, a frutose, o sorbitol e a lactose são linearmente adsorvidos sobre a resina Dowex[®] 50WX4 (forma K⁺). Os valores das constantes de equilíbrio em diferentes temperaturas são listados na Tabela 5.4.

Tabela 5.04 – Constantes de equilíbrio de adsorção para soluções mono-componetes de frutose, lactose e sorbitol sobre a resina Dowex[®] 50WX4 na forma K⁺ (4% DVB) em diferentes temperaturas. Calor de adsorção de compostos.

Compostos	T (K)	K_L	k_h (s ⁻¹)	$(-\Delta H_{ads})$ (kJ · mol ⁻¹)
Lactose	293	0.48	0.292	2.22
	313	0.45	0.381	
	333	0.43	0.782	
Sorbitol	293	0.58	0.405	1.96
	313	0.55	0.984	
	333	0.53	1.967	
Frutose	293	0.67	0.403	1.20
	313	0.66	0.709	
	333	0.63	1.365	

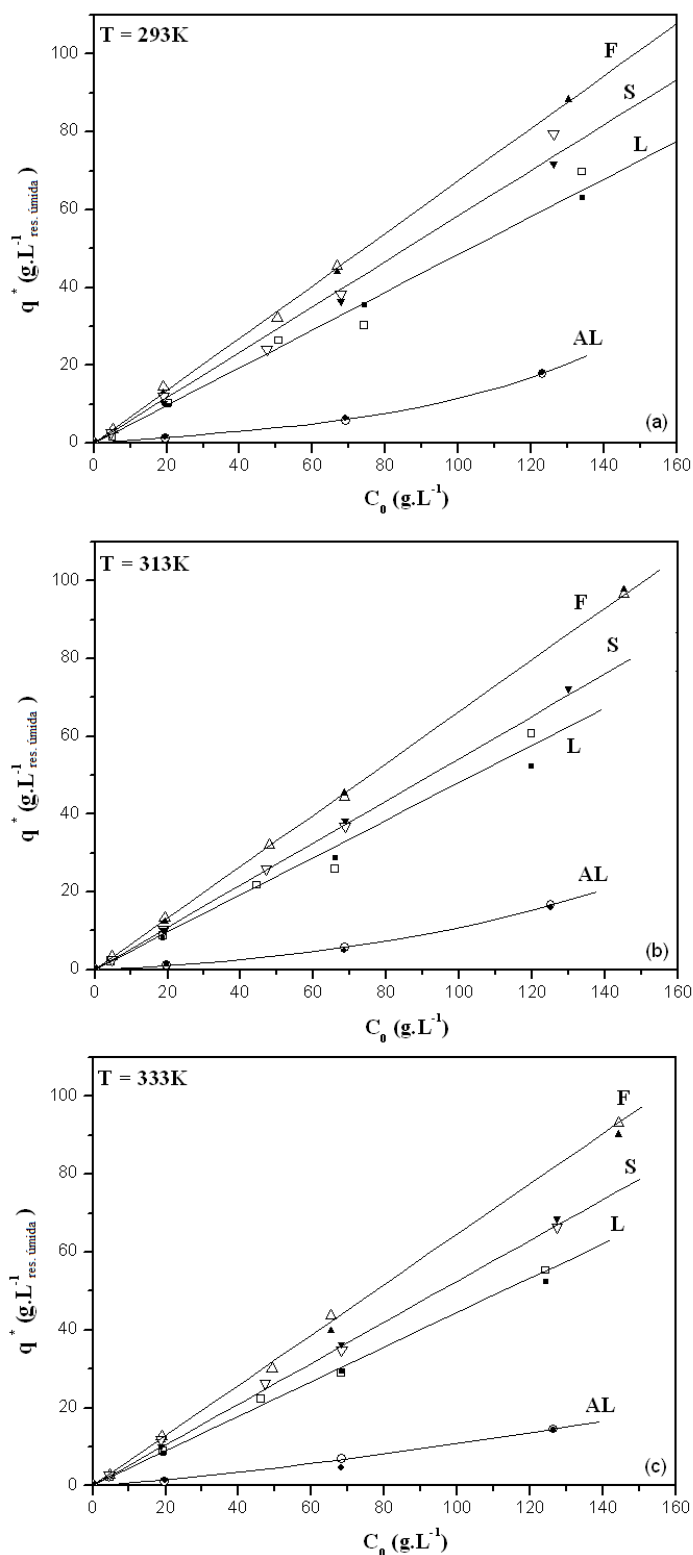


Figura 5.04 – Isotermas de equilíbrio de adsorção de resina Dowex 50WX4 K⁺ (4% DVB) adsorvendo AL, (L) lactose, (S) sorbitol e (F) frutose à (a) 293 K, (b) 313K e (c) 333K. (símbolos) – pontos experimentais, (linhas) – curvas de ajuste. (aberto) método de adsorção-dessorção; (fechado) método de análise frontal.

Os dados experimentais a partir dos métodos dinâmicos mostraram que a quantidade adsorvida na resina (expressa por unidade de volume de resina húmida) diminui quando a temperatura aumenta. Portanto, as constantes de equilíbrio de adsorção (K_i ; i = substância) tornam-se mais baixas. Na Fig. 5.4, pode-se verificar os dados experimentais obtidos por ambos os métodos. Algumas pequenas diferenças são observadas, especialmente em concentrações elevadas e em baixas temperaturas. Uma avaliação mais detalhada sobre os diferentes métodos de determinação de isotérmicas, tendo em vista a adsorção de açúcares, pode ser encontrada em Vente e colaboradores (2005). Aqui, os resultados de equilíbrio adsorção decorrentes da aplicação dos dois métodos dinâmicos são tomados para considerar uma média dos pontos experimentais disponíveis e utilizados para ajustar as isotérmicas de adsorção das substâncias.

Considerando as medidas de equilíbrio (e também de cinética de adsorção, que são mostradas adiante) para o AL, pode-se notar um comportamento desfavorável de adsorção descrito por um modelo anti-Langmuir $q^* = q_s K_{aL} C / (1 - K_{aL} C)$, onde K_{aL} e q_s são parâmetros do modelo de anti-Langmuir. Os parâmetros K_{aL} e q_s do modelo de anti-Langmuir em diferentes temperaturas estão descritos na Tabela 5.5. É importante mencionar que devido o AL estar sendo usado na forma de sal de potássio, ocorre um encolhimento da resina (*shrinking*), afetando a porosidade do leito. Este encolhimento da resina foi apenas apreciável para a maior concentração de sal ($130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a 293 K, quando o comprimento do leito diminuiu cerca de 5% do seu valor inicial. Em 333K, não houve variação significativa do comprimento do leito, mesmo na máxima concentração usada de AL, na forma de sal ($130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Estes factos foram considerados para calcular a quantidade adsorvida na resina e, na Fig. 5.4, os dados experimentais do AL a partir do método FA foram expressos por unidade de volume de resina húmida no comprimento do leito final. Os valores da porosidade de leito obtidos em diferentes graus de encolhimento (quando usando diferentes concentrações de AL (em forma de sal)) em três temperaturas (experimentos com traçador utilizando soluções de AL como eluente) são apresentados na Tabela 5.6. A porosidade do leito também diminui quando o encolhimento torna-se maior e/ou a concentração de AL (forma de sal de potássio) está a aumentar. Para as medidas de adsorção do composto AL, o comprimento inicial do leito era de 9.8 cm.

Tabela 5.05 – Calor de adsorção e parâmetros anti-Langmuir para soluções mono-componentes de ácido lactobiônico sobre a resina Dowex[®] 50WX4 na forma K⁺ (4% DVB) em diferentes temperaturas.

T (K)	K _{aL} (L·g ⁻¹)	q _s (g·L ⁻¹)	(-ΔH _{ads}) (kJ · mol ⁻¹)
293	0.00446	13.7	4.05 ¹
313	0.00479	10.9	
333	0.00451	10.8	

¹ na saturação de q_{AL}=1.15g/L.

Tabela 5.06 – Efeito da temperatura e concentração do ácido lactobiônico sobre a porosidade do leito.

Temperatura (K)	ε _b (20 g·L ⁻¹)	ε _b (70 g·L ⁻¹)	ε _b (130 g·L ⁻¹)
293	0.32	0.36 (2%) ¹	0.39 (5%) ¹
313	0.31	0.34	0.35
333	0.29	0.32	0.34

¹ valor em parênteses corresponde ao grau de encolhimento medido na condição de saturação.

Uma vez que o AL é o producto de interesse principal neste estudo, a sua fraca afinidade com a fase estacionária em comparação aos outros compostos é altamente desejável. Seu volume mostrado na Tabela 5.2 é evidentemente maior do que o volume da lactose. Assim, além de exclusão iônica, o modo de separação por exclusão de tamanhos também pode ser assumido para justificar a baixa adsorção do AL (isto é, o lactobionato de potássio).

A Figura 5.5 mostra o gráfico de *van't Hoff* que permite calcular o calor de adsorção dos compostos. Os valores mais baixos de calor de adsorção (< 50 kJ·mol⁻¹) indicam que está ocorrendo adsorção física ao invés de adsorção química. Desde que todos os valores estimados do calor de adsorção são inferiores a 4.05 kJ·mol⁻¹ (sendo assumido para o AL uma saturação de q_{AL} = 1.15 g·L⁻¹), pode-se considerar que apenas ocorre adsorção física no processo. Isto está de acordo com os mecanismos cromatográficos discutidos quando uma

resina do tipo gel na forma de K^+ é aplicada para a separação, isto é, exclusão de tamanho e exclusão iônica. Os calores de adsorção de lactose, de frutose, de sorbitol e de AL usando a resina Dowex[®] 50WX4 na forma de K^+ são apresentados na Tabela 5.4 e na Tabela 5.5 (para o caso do AL).

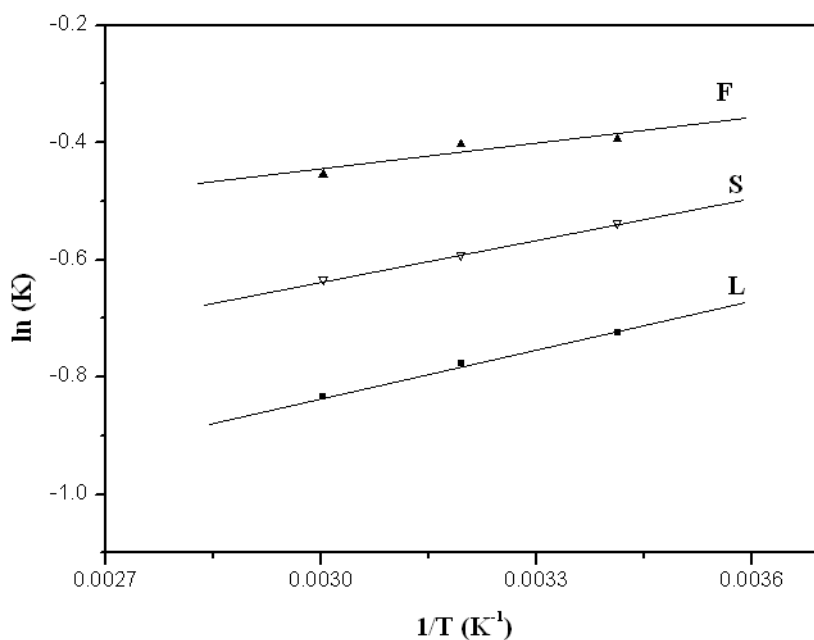


Figura 5.05 – Calor de adsorção para a frutose (F), lactose (L) e sorbitol (S) sobre a resina Dowex 50WX4 (K^+). Gráfico de *van't Hoff*.

5.3.3 CINÉTICA DE ADSORÇÃO

As curvas de ruptura para cada uma das substâncias da mistura foram obtidas pelo método da análise frontal empregando a coluna Superformance empacotada com a resina Dowex[®] 50WX4 na forma K^+ . A Figura 5.6 mostra os perfis de concentração experimental e numérico para as três concentrações de alimentação das substâncias frutose, lactose e sorbitol a 293K. A cinética de transferência de massa é descrita pelo parâmetro global k_h , que está relacionada com a resistência de transferência de massa intraparticular. A estimativa do coeficiente global de transferência de massa para cada composto (em diferentes temperaturas) é realizada através de um procedimento de ajuste, tomando os três conjuntos de dados de

ruptura de forma que a soma dos quadrados residuais entre os valores experimentais e os calculados seja minimizada. Os dados experimentais se adaptam bem ao modelo de cinética de adsorção.

A Tabela 5.4 apresenta os valores de k_h para a adsorção de frutose, lactose e sorbitol sobre a resina Dowex[®] em três temperaturas. Este parâmetro cinético aumenta quando a temperatura aumenta de 293K para 333K. Esta resina de partículas pequenas, uniformes e homogêneas revela um alto desempenho cinético, ou seja, a taxa de difusão é bastante elevada, como se pode concluir a partir dos valores estimados para os coeficientes de transferência de massa (k_h). A frente de transferência de massa do sorbitol foi a mais rápida cinética (implicando curvas de ruptura mais abruptas).

No que diz respeito as curvas de ruptura do AL, observa-se que a constante de tempo difusional é bastante baixa, isto é, não há gradiente de concentração no interior da partícula e, portanto, a hipótese de equilíbrio local pode ser levada em consideração. Uma vez que o adsorvente (a resina homogênea) responde instantaneamente, a variável $\bar{q}$ se aproxima q^* na Eq. (5.6). Desta forma, o modelo de equilíbrio local, incluindo a dispersão axial, foi utilizado para prever as curvas de ruptura do AL adsorvendo sobre a resina Dowex[®] 50WX4.

A Figura 5.7 mostra as curvas de ruptura do AL sobre a resina Dowex[®] em três temperaturas. O modelo da equação da isotérmica de equilíbrio de adsorção afecta a forma da curva de ruptura simulada. Como os dados de equilíbrio do AL revelam uma adsorção desfavorável, descrita pelo modelo de anti-Langmuir, as frentes de concentração têm um comportamento dispersivo. Neste caso, a derivada (dq^*/dC) aumenta continuamente com o aumento da concentração. Os perfis de concentração adimensional em função do tempo para as três diferentes concentrações de alimentação do AL (20, 70 e 130 g·L⁻¹) estão revelando claramente um perfil mais dispersivo quando a concentração de alimentação é maior. Claro que, se forem comparados os perfis de concentração do AL para as três temperaturas, a ruptura do composto no leito de resina será mais rápida na condição de uma maior temperatura de operação. Na Figura 5.7, pode-se também verificar a capacidade do modelo de equilíbrio para predizer o histórico de concentração do AL, sem os fenómenos dispersivos em concentrações maiores (linhas cinzas grossas na Fig 5.7).

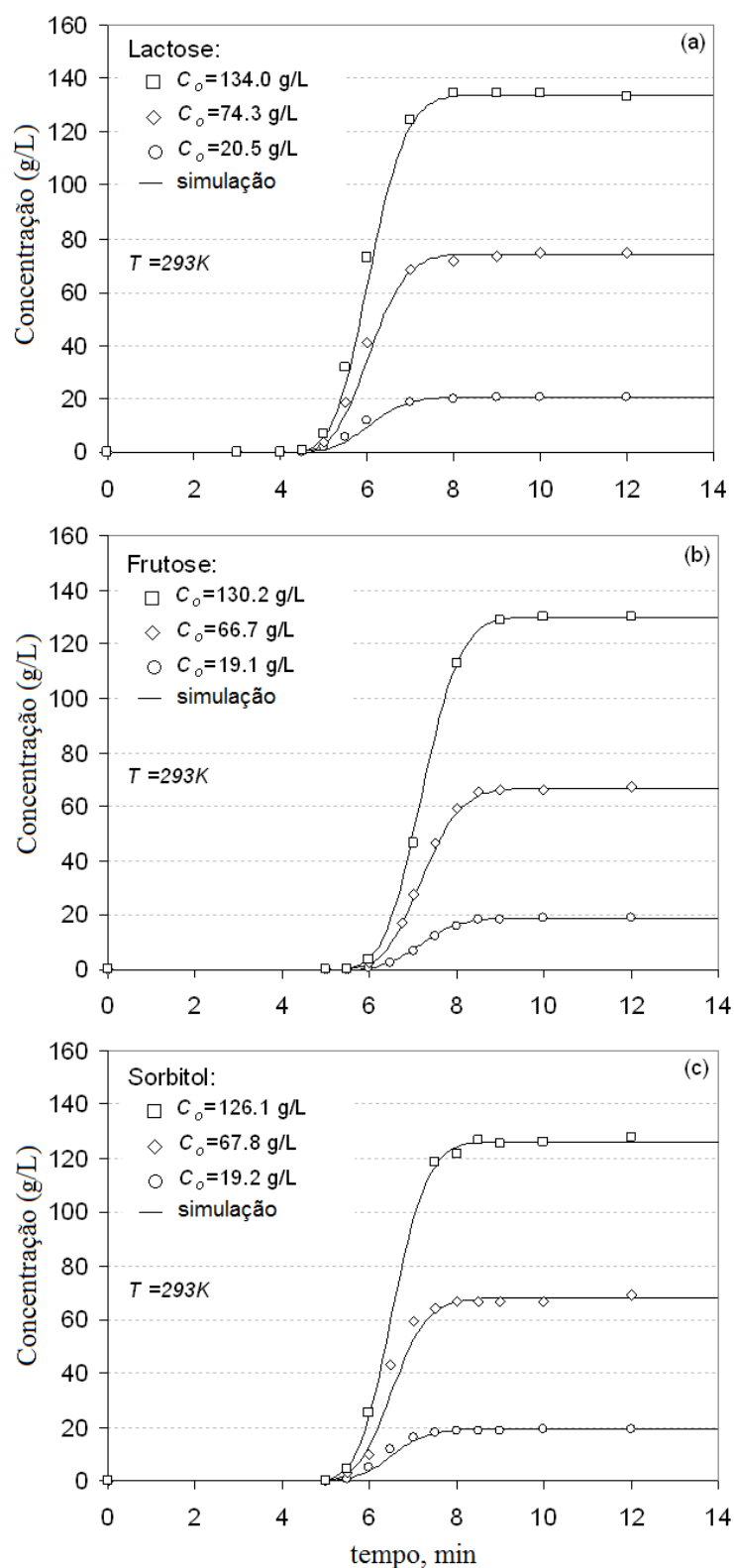


Figura 5.06 – Perfis experimentais e numéricos de concentração de (a) lactose, (b) frutose, (c) sorbitol adsorvendo sobre a resina Dowex 50WX4 K^+ (4% DVB; 50 μ m) em 293K. Caudal: 6 mL $\cdot$ min $^{-1}$ (104 mm x 26 mm I.D.); (símbolos) – pontos experimentais, (linhas) – curvas de ajuste.

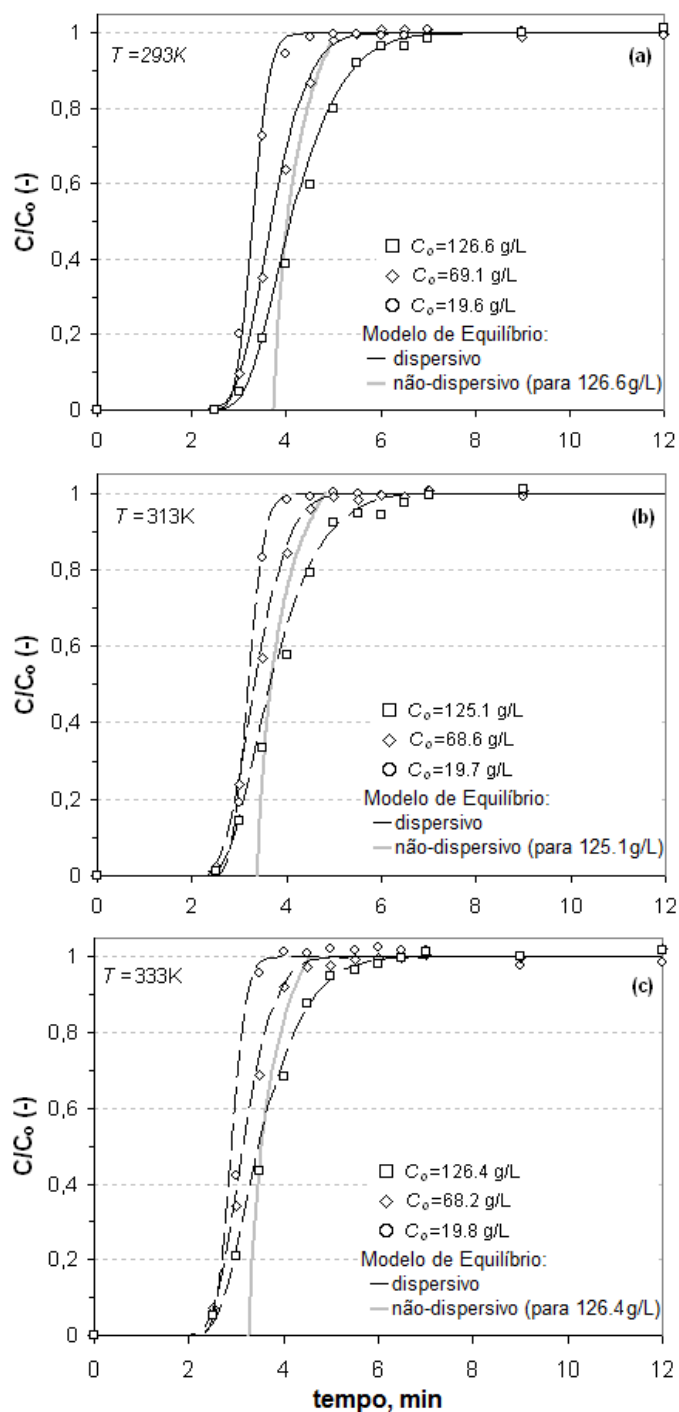


Figura 5.07 – Perfis experimentais e numéricos de concentração adimensional de AL adsorvendo sobre a resina Dowex 50WX4 K^+ (4% DVB; 50 μ m) em (a) 293K, (b) 313K e (c) 333K. Caudal: 6 mL $\cdot$ min $^{-1}$. (símbolos) – pontos experimentais, (linhas) – curvas de ajuste. (—) modelo de equilíbrio dispersivo; (—) modelo de equilíbrio não-dispersivo para mais alta concentração de alimentação em cada temperatura.

Neste caso, a expressão analítica para o tempo de ruptura pode ser deduzida facilmente, e o caráter de equilíbrio desfavorável implica na existência de frentes dispersivas. Na realidade, a dispersão axial está ocorrendo na coluna cromatográfica, cujo número de *Peclet* foi obtido pelo ajuste de dados experimentais e seu valor foi igual a 100. Deve-se salientar que este mais baixo valor de *Peclet* é devido ao encolhimento do leito que não é explicitamente contabilizado no modelo.

5.3.4 ADSORÇÃO DE MISTURAS MULTI-COMPONENTE

A fim de verificar os parâmetros de adsorção determinados para soluções mono-componentes e da capacidade do modelo em prever a operação dinâmica da coluna preparativa, os resultados numéricos gerados pelo modelo matemático foram comparados com dados experimentais para misturas binárias e quaternárias usando a resina seleccionada.

As Figuras 5.8 e 5.9 mostram as curvas de ruptura experimentais de uma mistura de lactose e AL e de uma mistura quaternária, respectivamente, a 293K. A composição da mistura quaternária é baseada em dados do processo reactivo publicados por Malvessi e colaboradores (2002) (no caso em estudo: 0,7 M de cada substrato; $37.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de células de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191; $T = 312\text{K}$; $\text{pH} = 3.9$). Supõe-se que a reacção enzimática é interrompida após duas ou três horas de conversão, quando a taxa de reacção começa a diminuir. Neste momento, cerca de 0.2 M de ambos os substratos são consumidos. Consequentemente, uma composição de mistura de cerca de 0.5M para cada substrato (ou seja, $239 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose e $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de frutose) e cerca de 0.2 M para cada produto (ou seja, $72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AL e $36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sorbitol) pode ser assumida. A fim de evitar quaisquer problemas de entupimento nos tubos e uma queda de pressão excessiva no sistema, a concentração total dos compostos na mistura foi limitada a cerca de $180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Assim, para definir as composições para as misturas binária e quaternária, tanto o limite de concentração total e a proporção substrato/produto mencionada foram levadas em consideração.

As curvas de ruptura experimentais (representadas por símbolos) mostrados nas Figs.5.8 e 5.9 podem ser descritas pelo modelo (linhas sólidas), tanto para mistura de alimentação binária como para a quaternária. No entanto, os valores dos parâmetros de adsorção foram determinados em experimentos de adsorção mono-componente.

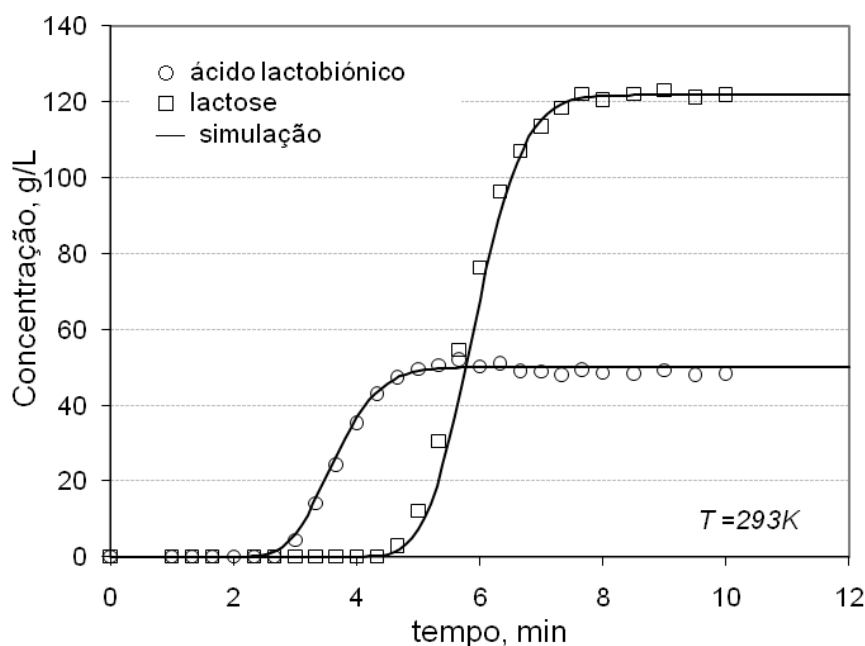


Figura 5.08 – Dados experimentais e resultados calculados para a separação da mistura de lactose/AL sobre a resina Dowex[®] 50W-X4 K⁺. Condições de alimentação: (□) lactose, $C_o=121.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (○) AL, $C_o = 50.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; eluente, H₂O em $6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; comprimento do leito, 9.85 cm (293K).

Devido ao encolhimento da resina, tal como descrito anteriormente, ocorre uma variação da porosidade do leito (ver Tabela 5.6). É importante salientar que este fenómeno foi maior do que seria esperado considerando os valores encontrados a partir das experiências com soluções mono-componente. Para o caso da mistura de lactose e AL ($C_{oL}=121.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{oAL}=50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), o comprimento do leito diminuiu 5% do seu valor inicial ($L_0=9.85 \text{ cm}$) com a saturação do leito. Este grau de encolhimento só foi obtido com $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AL (solução mono-componente) de acordo com as condições apresentadas na Tabela 5.6. Portanto, seria apropriado relacionar o grau de encolhimento do leito de resina com a variação dos parâmetros característicos do leito, tais como a porosidade ou o comprimento.

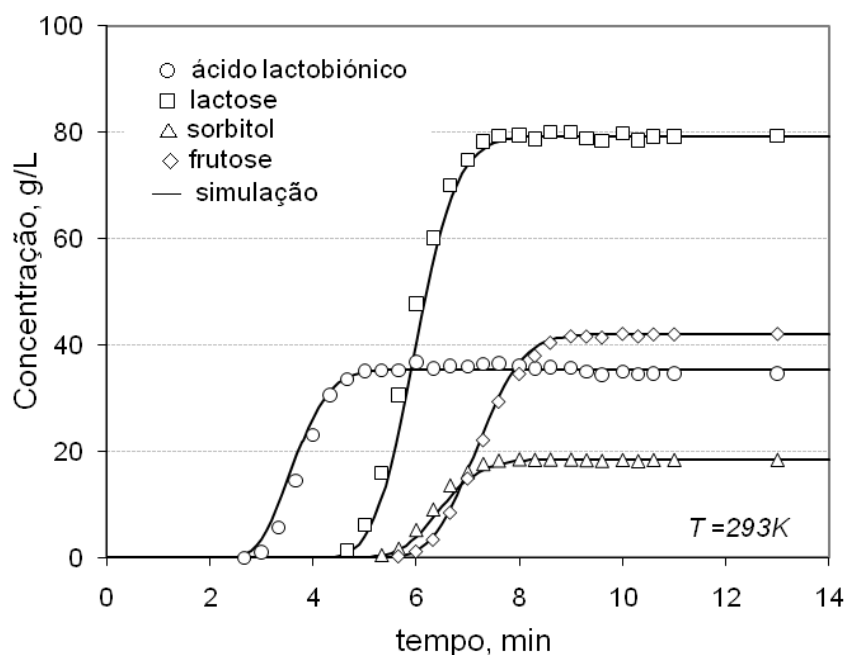


Figura 5.09 – Dados experimentais e resultados calculados para a separação da mistura quaternária sobre a resina Dowex[®] 50W-X4 K⁺. Condições de alimentação: (○) AL, $C_o=35.4\text{g/L}$; (□) lactose, $C_o=79.2\text{g/L}$; (△) sorbitol, $C_o=18.4\text{g/L}$; (◇) frutose, $C_o=42.0\text{g/L}$; eluente, H₂O a 6mL/min; comprimento do leito, 9.85 cm (293K).

Finalmente, com base no conhecimento de dados de equilíbrio e cinética de adsorção, torna-se possível desenvolver um modelo mais detalhado para projetar sistemas cromatográficos capazes de realizar a separação desta mistura quaternária bem como para prever o comportamento dinâmico de adsorção em leitos fixos e móveis. Neste trabalho, uma adequada fase estacionária foi selecionada para a separação quaternária – a resina Dowex[®] 50WX4 na forma K⁺, e os parâmetros de adsorção obtidos demonstram-se úteis para prever o comportamento dinâmico de colunas preparativas, usando água como eluente, nesta separação.

5.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, três resinas comerciais do tipo gel com diferentes características – tamanho de partícula e grau de reticulação – e com diferentes contra-íons fixados nos grupos

sulfônicos – Ca^{++} , H^+ e K^+ – foram avaliadas para a separação da mistura contendo frutose, lactose, sorbitol e AL.

A resina de troca iônica de reticulação de 4% DVB na forma K^+ mostrou o melhor desempenho para essa separação quaternária nas condições experimentais utilizadas. Os valores de calor de adsorção das substâncias sugerem uma adsorção física, tal como se pode esperar tipo de uma resina tipo gel na forma K^+ atuando através de mecanismos de separação de exclusão iônica e exclusão por tamanho.

Os dados de equilíbrio para soluções mono-componente das substâncias foram medidos por análise frontal (método em série com etapas) e pela aplicação do método de adsorção-dessorção na coluna preparativa empacotada com a resina Dowex[®] 50WX4 na forma K^+ . Três temperaturas foram investigadas nos ensaios de adsorção: 293, 313 e 333 K. Os dados de equilíbrio do AL sobre a resina de troca iônica na forma K^+ têm revelado uma curva de adsorção desfavorável. Para as demais substâncias, as isotérmicas de equilíbrio linear foram obtidas na faixa de concentração investigada (até $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A cinética de adsorção foi representada por um coeficiente global de transferência de massa (k_h) que considera o efeito da resistência de transferência de massa intraparticular em um modelo de força motriz linear (modelo LDF). O valor deste coeficiente foi estimado a partir do melhor ajuste de curvas numéricas aos dados experimentais para as substâncias adsorvidas na resina Dowex[®] 50WX4 K^+ nas três temperaturas. Os maiores valores para este parâmetro cinético foram encontrados para as mais altas temperaturas de operação. Entre as substâncias com isotérmicas lineares, o sorbitol apresentou a mais rápida cinética de difusão. Quanto ao AL, um modelo de equilíbrio dispersivo local pôde ser usado para prever as curvas de ruptura do AL adsorvendo neste tipo de resina.

Finalmente, as experiências de adsorção em leito fixo com misturas de alimentação binária e quaternária foram bem descritas pelo modelo matemático usando dados de equilíbrio e cinéticos para soluções mono-componente. Estes resultados são importantes para estudos futuros de projecto de tecnologias cromatográficas adequadas (adsorção em leitos fixos e móveis), que eventualmente serão aplicados como processos de recuperação e purificação da mistura decorrente do processo de produção do AL e do sorbitol utilizando as enzimas GFOR/GL.

5.5 NOMENCLATURA

C = concentração da fase líquida ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

C_e = concentração da solução eluída ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

C_0 = concentração de alimentação ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

D_a = coeficiente de dispersão axial ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

D_c = diâmetro da coluna (m)

D_h = difusividade homogênea ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

$-\Delta H_{ads}$ = calor de adsorção ($\text{kJ} \cdot \text{gmol}^{-1}$)

k_s = factor de retenção (-)

K = constante de equilíbrio de adsorção linear (-)

$K_{aL}; q_s$ = parâmetros do modelo anti-Langmuir ($\text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}; \text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

k_h = coeficiente de transferência de massa (s^{-1})

Pe = número de *Peclet* (-)

$\bar{q}_i$ = concentração média na fase adsorvente ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

q_i^* = concentração na fase adsorvente em equilíbrio com a concentração na fase líquida ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

Q = caudal volumétrico ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)

R = constante dos gases ideais ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

R_p = raio da partícula de resina (m)

t = variável tempo (s)

t_r = tempo de residência (s)

$\bar{t}$ = tempo estequiométrico (s)

T = temperatura (K)

V_C = volume da coluna (m^3)

V_E = volume de solução eluída (m^3)

v = velocidade intersticial do líquido ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

z = coordenada axial (m)

LETRAS GREGAS

α = factor de separação (-)

ε_b = porosidade do leito (-)

ε_p = porosidade da partícula (-)

SUBSCRITOS

F = frutose

i = substância química

L = lactose

AL = ácido lactobiônico

S = sorbitol

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angyal, S. J. (1974a). "Complexing of Polyols with Cations." Tetrahedron **30**(12): 1695-1702.

Angyal, S. J. (1989). "Complexes of Metal-Cations with Carbohydrates in Solution." Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry **47**: 1-43.

Angyal, S. J., G. S. Bethell and R. J. Beveridge (1979). "Complexes of Carbohydrates with Metal Cation .10. Separation of Sugars and of Polyols on Cation-Exchange Resins in the Calcium Form." Carbohydrate Research **73**(AUG): 9-18.

Angyal, S. J., D. Greeves and J. A. Mills (1974b). "Complexes of Carbohydrates with Metal Cations .3. Conformations of Alditols in Aqueous-Solution." Australian Journal of Chemistry **27**(7): 1447-1456.

Beenackers, J., B. F. M. Kuster and H. S. Vanderbaan (1986). "Adsorption of Carbohydrates on Anion-Exchangers." Applied Catalysis **23**(1): 183-197.

Beevers, C. A. and H. N. Hansen (1971). "The Structure of Alfa-Lactose Monohydrate." Acta Cryst. B **27**(7): 1323-1325.

Caruel, H., L. Rigal and A. Gaset (1991). "Carbohydrate Separation by Ligand-Exchange Liquid-Chromatography - Correlation between the Formation of Sugar Cation Complexes and the Elution Order." Journal of Chromatography **558**(1): 89-104.

Casassa, E. F. (1976). "Comments on Exclusion of Polymer-Chains from Small Pores and Its Relation to Gel-Permeation Chromatography." Macromolecules **9**(1): 182-185.

Churms, S. C. (1996a). "Recent Progress in Carbohydrate Separation by High-Performance Liquid Chromatography Based on Hydrophilic Interaction." Journal of Chromatography A **720**(1-2): 75-91.

Churms, S. C. (1996b). "Recent Progress in Carbohydrate Separation by High-Performance Liquid Chromatography Based on Size Exclusion." Journal of Chromatography A **720**(1-2): 151-166.

Churms, S. C. (2005). Carbohydrates | Sugars – Chromatographic Methods , 2005, Pages 414-427. Encyclopedia of Analytical Science-Second Edition. P. J. Worsfold, A. Townshend and C. F. Poole. United Kindon, Elsevier Academic Press: 414-427.

Cohen, S., Y. Marcus, Y. Migron, S. Dikstein and A. Shafran (1993). "Water Sorption, Binding and Solubility of Polyols." Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions **89**(17): 3271-3275.

deMan, J. M. (1999). Principles of Food Chemistry. Guelph, Ontario, Aspen Publishers, Inc.

Ettre, L. S. (1993). "Nomenclature for Chromatography." Pure and Applied Chemistry **65**(4): 819-872.

Fischer, K., H. P. Bipp, D. Bieniek and A. Kettrup (1995). "Determination of Monomeric Sugar and Carboxylic-Acids by Ion-Exclusion Chromatography." Journal of Chromatography A **706**(1-2): 361-373.

Giddings, J. C., E. Kucera, C. P. Russell and M. N. Myers (1968). "Statistical Theory for Equilibrium Distribution of Rigid Molecules in Inert Porous Networks . Exclusion Chromatography." Journal of Physical Chemistry **72**(13): 4397-&.

Glueckauf, E. (1955). "Theory of Chromatography .10. Formulae for Diffusion into Spheres and Their Application to Chromatography." Transactions of the Faraday Society **51**(11): 1540-1551.

Goulding, R. W. (1975). "Liquid-Chromatography of Sugars and Related Polyhydric Alcohols on Cation Exchangers - Effect of Cation Variation." Journal of Chromatography **103**(2): 229-239.

Gramblicka, M. and M. Polakovic (2007). "Adsorption Equilibria of Glucose, Fructose, Sucrose, and Fructooligosaccharides on Cation Exchange Resins." Journal of Chemical and Engineering Data **52**(2): 345-350.

Havlicek, J. and O. Samuelson (1973). "Separation of Oligomeric Aldonic Acids by Anion-Exchange Chromatography." Journal of Chromatography **83**(AUG29): 45-57.

Kanters, J. A., G. Roelofsen, B. P. Alblas and I. Meinders (1977). "The Crystal and Molecular Structure of Beta-D-Fructose, with Emphasis on Anomeric Effect and Hydrogen-Bond Interactions." Acta Cryst. B **33**(3): 665-672.

Larsson, K. and O. Samuelson (1977). "Simultaneous Separation of Oligomeric Sugars and Oligomers with a Terminal Aldonic Acid Group on Anion-Exchange Resins." Journal of Chromatography **134**(1): 195-198.

Levenspiel, O. (1972). Chemical Reaction Engineering. New York (USA) John Wiley and Sons.

Malvessi, E., K. Concatto and M. M. Silveira (2002). Biotransformação De Frutose E Lactose Em Sorbitol E Ácido Lactobiônico Por Células De Zymomonas Mobilis. Proceeding of 5º Brazillian seminary of Enzymatic Technology – Enzitec, Brasília (DF), Brasil.

Mazurkiewicz, J., K. Rebilas and P. Tomasik (2001). "Viscosity of Solutions of Dextrans with Selected Sweeteners." European Food Research and Technology **213**(6): 470-473.

National Library of Medicine, U. S. (1993). " Chemidplus Advanced." Retrieved 16th June 2008, from <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>.

Paillat, D., M. Cotillon and M. Theoleyre (2000). Technology of Chromatographic Separation in Glucose Syrup Processes. Proceedings of 7th Symposium of AvH Association, Reims, France.

Park, Y. J., G. A. Jeffrey and W. C. Hamilton (1971). "Determination of the Crystal Structure of the α Form of D-Glucitol by Neutron and X-Ray Diffraction." Acta Crystallographica Section B **27**(12): 2393-2401.

Pedruzzi, I., E. Malvessi, V. G. Mata, E. A. B. Silva, M. M. Silveira and A. E. Rodrigues (2007). "Quantification of Lactobionic Acid and Sorbitol from Enzymatic Reaction of Fructose and Lactose by High-Performance Liquid Chromatography." Journal of Chromatography A **1145**(1-2): 128-132.

Rodrigues, A. E. and M. M. Dias (1998). "Linear Driving Force Approximation in Cyclic Adsorption Processes: Simple Results from System Dynamics Based on Frequency Response Analysis." Chemical Engineering and Processing **37**(6): 489-502.

Rongere, P., N. Morel-desrosiers and J. P. Morel (1995). "Interactions between Cations and Sugars .8. Gibbs Energies, Enthalpies and Entropies of Association of Divalent and Trivalent Metal-Cations with Xylitol and Glucitol in Water at 298.15 K." Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions **91**(17): 2771-2777.

Ruthven, D. M. (1984). Principles of Adsorption and Adsorption Processes New York, John Wiley & Sons, Inc.

Samuelson, O. and O. Wallenius (1963). "Anion Exchange Separations of Aldobionic and Aldonic Acids." Journal of Chromatography **12**(2): 236-&.

Schweitzer, P. A. (1997). Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers New York, NY, McGraw-Hill Companies, Inc.

Shlykov, S. N., A. V. Serov, V. V. Sadovoy and A. G. Khramtsov (2007). Modelling of Lactose and Its Derivatives Molecule Structures. International Dairy Federation Symposium "Lactose and its Derivatives", Moscow.

Soga, T. and M. Serwe (2000). "Determination of Carbohydrates in Food Samples by Capillary Electrophoresis with Indirect Uv Detection." Food Chemistry **69**(3): 339-344.

Stefansson, M. and D. Westerlund (1996). "Ligand-Exchange Chromatography of Carbohydrates and Glycoconjugates." Journal of Chromatography A **720**(1-2): 127-136.

Tiihonen, J., I. Markkanen and E. Paatero (2002). "Complex Stability of Sugars and Sugar Alcohols with Na⁺, Ca²⁺, and La³⁺ in Chromatographic Separations Using Poly(Styrene-Co-Divinylbenzene) Resins and Aqueous Organic Eluents." Chemical Engineering Communications **189**(7): 995-1008.

Vente, J. A., H. Bosch, A. B. de Haan and P. J. T. Bussmann (2005). "Evaluation of Sugar Sorption Isotherm Measurement by Frontal Analysis under Industrial Processing Conditions." Journal of Chromatography A **1066**(1-2): 71-79.

Verhaar, L. A. T. and B. F. M. Kuster (1981). "Improved Column Efficiency in Chromatographic Analysis of Sugars on Cation-Exchange Resins by Use of Water-Triethylamine Eluents." Journal of Chromatography **210**(2): 279-290.

Wieczorek, M. W., J. Blaszczyk and B. W. Król (1996). "Effects of Cation Interactions on Sugar Anion Conformation in Complexes of Lactobionate and Gluconate with Calcium, Sodium or Potassium." Acta Cryst. C **52**(5): 1193-1198.

Yao, C. C. and C. Tien (1992a). "Approximation of Intraparticle Mass-Transfer in Adsorption Processes .1. Linear-Systems." Chemical Engineering Science **47**(2): 457-464.

Yao, C. C. and C. Tien (1992b). "Approximation of Intraparticle Mass-Transfer in Adsorption Processes .2. Nonlinear-Systems." Chemical Engineering Science **47**(2): 465-473.

TECNOLOGIA DE LEITO MÓVEL SIMULADO

APLICADA À BIOPRODUÇÃO DE

ÁCIDO LACTOBIÓNICO

Este capítulo apresenta uma análise sobre a aplicabilidade da tecnologia de Leito Móvel Simulado (LMS), incluindo distintas configurações de unidades cromatográficas, na separação da mistura contendo ácido lactobiónico (AL) e sorbitol obtida a partir da catálise enzimática com as enzimas glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) e glucono- δ -lactonase (GL) sobre os substratos lactose e frutose. Com uma acção conjunta destas duas enzimas, a obtenção das mais altas produtividades é alcançada com velocidades de reacção próximas à máxima. A composição de substratos que gera maior velocidade de reacção, estabelecido no Capítulo 4, pode ser condicionada ao consumo completo da frutose e a obtenção de uma mistura ternária. Por outro lado, a reacção pode ser interrompida quando a taxa começa a ficar abaixo de padrões pré-determinados, havendo a formação de uma mistura quaternária para ser separada. Nesta investigação, serão exploradas algumas alternativas de arranjo, em série, de unidades de separação cromatográficas, como a coluna cromatográfica de leito fixo, o LMS e o pseudo-LMS. Os modelos matemáticos usados para descrever o comportamento e o desempenho das unidades na separação são apresentados. O conceito de volume de separação para definir as condições de operação das unidades de LMS é empregado. A secção é encerrada com as conclusões mais importantes a respeito das estratégias de separação propostas.

6.1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de Leito Móvel Simulado (LMS) consiste de um processo de separação contínuo envolvendo essencialmente duas diferentes fases: uma fluida (o eluente) e outra sólida (a fase estacionária), que constitui o meio de separação. Na unidade de LMS, há o escoamento da fase fluida em contracorrente com a fase estacionária, a qual se encontra empacotada em múltiplas colunas associadas em série. O movimento do sólido é conseguido pela permutação, em intervalos de tempo regulares (t^* , tempo de permutação), das correntes de entrada (alimentação e eluente) e saída (refinado e extracto) na direcção do escoamento da fase fluida, conforme ilustrado na Figura 6.1. O conceito de operação em uma unidade de LMS é baseado sobre os princípios da cromatografia de eluição, mas conta com mais alta produtividade e menor requerimento de solvente que a tradicional cromatografia descontínua.

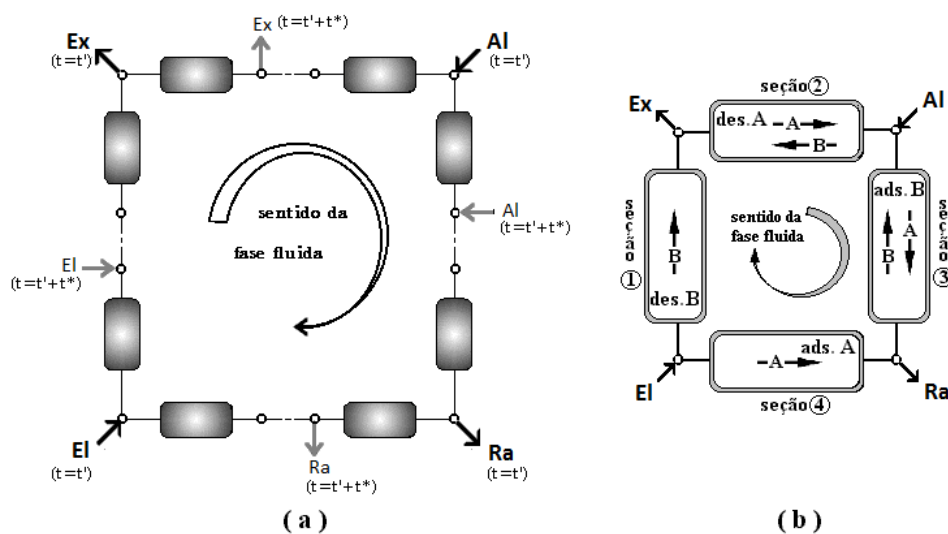


Figura 6.01 - Unidade de Leito Móvel Simulado; (a) esquema representativo da permutação das correntes de entrada e saída na unidade (t^* - tempo de permutação das correntes), (b) princípio de separação da mistura dos componentes A (menos adsorvido) e B (mais adsorvido) nas quatro secções da unidade (ads. – adsorve, des. – dessorve).

Desde que foi patenteada, a unidade de LMS encontrou importantes aplicações na indústria petroquímica e na indústria de alimentos (Processos SORBEX – UOP) (Broughton e Gerhold, 1961; Broughton *et al.*, 1970). Isto é devido a sua alta eficiência nas separações consideradas difíceis, ou seja, de baixos factores de separação (*e.g.*, separação de isómeros, enantiómeros, etc.), com a obtenção de altos rendimentos e elevadas purezas, de fácil *scale-up* e razoáveis taxas de produção (em comparação aos processos concorrentes).

Nestes últimos anos, é incontestável e notável o crescente interesse desta tecnologia quer pelas indústrias quer pelas instituições de pesquisa e desenvolvimento. No início do século XXI, se tem reportado mais de 100 plantas industriais construídas considerando as aplicações ligadas a petroquímica e de alimentos (Nicoud e Majors, 2000). Somente a companhia UOP tem licenciado, a nível mundial, mais de 130 unidades SORBEX desde a sua primeira unidade comercial em larga escala: a unidade Molex em 1964 (UOP, 2006). A partir da década de 90, iniciou-se uma grande exploração desta tecnologia nas áreas de farmácia e de química fina, para obtenção em larga escala de enantiómeros puros a partir de substâncias racémicas (Nicoud *et al.*, 1993; Guest, 1997; Mazzotti *et al.*, 1997; Pais *et al.*, 1997a; Pais *et al.*, 1997b; Juza *et al.*, 1998; Pais *et al.*, 1998; Zabkova *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010). O potencial da tecnologia foi reconhecido, e incentivou fortemente diversas empresas no mundo a investigar fases estacionárias quirais com elevado poder de resolução de misturas racémicas ou, até mesmo, na montagem e comercialização de unidades de LMS. Empresas nas áreas de química fina e farmacêutica, como *Chiral Technologies*, *Carbogen*, *Sigma-Aldrich*, *Novasep*, *Novartis*, *Bayer*, *Pharmacia*, estão empenhadas na investigação e no desenvolvimento de processos de separação através da tecnologia de LMS. Adicionalmente, *AMPAC Fine Chemicals* (EUA), *Universal Pharma Technologies* (EUA), *UCB Pharma* (Bélgica), *Daicel Chemical* (Japão), *Finorga* (França), *SAFC Pharma* (Irlanda e Suíça) são exemplos de companhias operando unidade de LMS em larga escala. Deve ser mencionado que existem poucos fornecedores de unidades de LMS, seja em escala laboratorial, piloto ou industrial, no mercado internacional (*NOVASEP*, *Knauer*, *UOP*, *UPT*). Pode-se ainda mencionar a tecnologia SepTor, desenvolvida pela *SepTor Technologies* (do Grupo Outotec), que é fornecedora mundial do tipo "carrossel" de sistemas de LMS para a troca iónica e cromatografia contínua.

Existe um grande empenho científico focado sobre a teoria e a prática da tecnologia de LMS. Diversos centros de pesquisa e desenvolvimento, como exemplos o Laboratório

Associado LSRE/LCM (Portugal), Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (Nancy, França), ETH Swiss Federal Institute of Technology Zurich (Institute of Process Engineering, Suíça), School of Chemical Engineering (Purdue University, EUA), TU Dortmund, têm se dedicado a explorar todo o potencial que esta tecnologia tem a oferecer. Isto inclui tanto a aplicação exclusiva em processos de separação como em processos de separação acoplados à reacção (unidades de Leito Móvel Simulado Reactivo (Azevedo e Rodrigues, 2001; Lode *et al.*, 2001; Minceva e Rodrigues, 2005; Minceva *et al.*, 2005; Silva e Rodrigues, 2005; Borges da Silva *et al.*, 2006)), permitindo mais avanços e melhoramentos nas tecnologias de produção. Com vistas sobre estas apostas, ponderou-se investigar o uso da tecnologia de LMS no bioprocesso relacionado ao aproveitamento e à valorização da matéria-prima lactose através da sua conversão ao AL, uma substância de alto valor agregado e de reconhecido interesse industrial.

Especificamente, este processo biotecnológico refere-se a produção de AL, e paralelamente a do sorbitol, através da oxidação da lactose e a redução da frutose pelas endoenzimas glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glucono- δ -lactonase (GL) da bactéria *Zymomonas mobilis* (Satory *et al.*, 1997). O uso da lactose tem constituído um desafio para engenheiros químicos, uma vez que se acumula em grandes quantidades no mundo. Isto decorre da recente utilização do lactosoro, um produto secundário da fabricação de queijos a pouco tempo visto como uma fonte de poluição e desperdiçada em grande quantidade em Portugal e no mundo, como fonte de matérias-primas. Entre suas aplicações está o seu uso basicamente na fabricação de ácido láctico e de ração para animais. A lactose, o soro desmineralizado, o soro em pó, a lactose hidrolisada e proteínas são as suas componentes principais. A lactose como fonte de matéria-prima para a síntese de novos produtos de maior valor acrescentado, e de aplicação comercial, tal como o AL é extremamente desejável.

A produção do AL e do sorbitol pelas enzimas GFOR/GL requer elevadas concentrações dos substratos para se manter as máximas velocidades de produção. As vantagens da operação simultânea de bio-reacção e separação dos produtos são bem conhecidas (reacção em mais alta concentração de substrato, redução de efeitos inibitórios, maiores produtividades da bio-reacção, economia em processos subsequentes, etc.). Há dois principais procedimentos que podem ser aplicados de forma a permitir a simultânea reacção/bio-reacção e separação de produtos: a separação de produto *in situ*, e, a separação considerando uma corrente externa de recirculação no reactor. A separação das substâncias e

a recuperação dos produtos e dos substratos pode ser obtida pelo processo de adsorção usando uma fase adsorvente apropriada.

Este processo de bioprodução do AL e sorbitol, onde se requer a recuperação dos produtos e a recirculação dos substratos para o reactor, enquadra-se no caso de uma mistura multi-componente de açúcares e derivados. Algumas configurações de unidades de LMS têm sido propostas para permitir a separação de misturas multi-componentes. Comercialmente, separações ternárias têm sido realizadas por meio da associação em cascata de duas unidades de LMS usando conexões directas ou indirectas (Wankat, 2001; Kim *et al.*, 2003; Kim e Wankat, 2004). Outra alternativa para separações ternárias usando a técnica de LMS é o regime de operação denominado de pseudo-LMS, sendo este baseado no conceito da tecnologia JO – *Japan Organo* –, patenteada pela companhia *Organo Corporation* (Ando *et al.*, 1990; Takayuki *et al.*, 1993). A separação em uma unidade pseudo-LMS, ilustrada na Figura 6.02, é um processo cíclico de duas etapas: (1) ora o sistema opera como uma coluna de leito fixo; e (2) ora o sistema opera seguindo a tecnologia de LMS. O projecto e a optimização de uma unidade pseudo-LMS é substancialmente mais complexo que uma unidade de LMS clássica, desde que o número de variáveis de operação para estabelecer o apropriado funcionamento da unidade é maior. O princípio de operação, formulação matemática, metodologias de projecto e análise de desempenho de unidades pseudo-LMS têm sido investigados (Mata e Rodrigues, 2001; Borges da Silva e Rodrigues, 2006; Kurup *et al.*, 2006; Borges da Silva e Rodrigues, 2008). Para uma separação quaternária, Borges da Silva e Rodrigues (2006) tem proposto uma extensão da clássica unidade pseudo-LMS de 4 secções para 5 secções.

Considerando a proposta de separação da mistura de lactose (L), frutose (F), ácido lactobiónico (AL) e sorbitol (S), estudos preliminares mostraram que a resina na forma K^+ (tamanho de partícula de 55 micron; reticulação de 4% DVB) propicia devidamente esta separação quaternária cuja ordem de afinidades é $AL < lactose < sorbitol < frutose$, ou seja, $produto < substrato < produto < substrato$ (Pedruzzi *et al.*, 2008). No capítulo 5, foi verificado que a resina de troca iónica na forma Ca^{++} também possibilita esta separação com a seguinte sequência de afinidades: $lactose < AL < frutose < sorbitol$, ocorrendo novamente uma alternância entre substrato e produto. Isto se mostrará relevante na definição de arranjo em cascata de unidades de separação. É importante mencionar que a escolha da fase estacionária deve levar em conta o sal do AL que está a ser produzido no reactor e que, logicamente,

depende do álcali usado para manter o pH da reacção constante durante sua produção. As limitações de solubilidade do $\text{Ca}(\text{OH})_2$, e também os fenómenos de complexação com açúcares, fazem da solução de KOH uma opção mais indicada para ser utilizada no controle do pH da reacção, o que produz o sal de lactobionato de potássio.

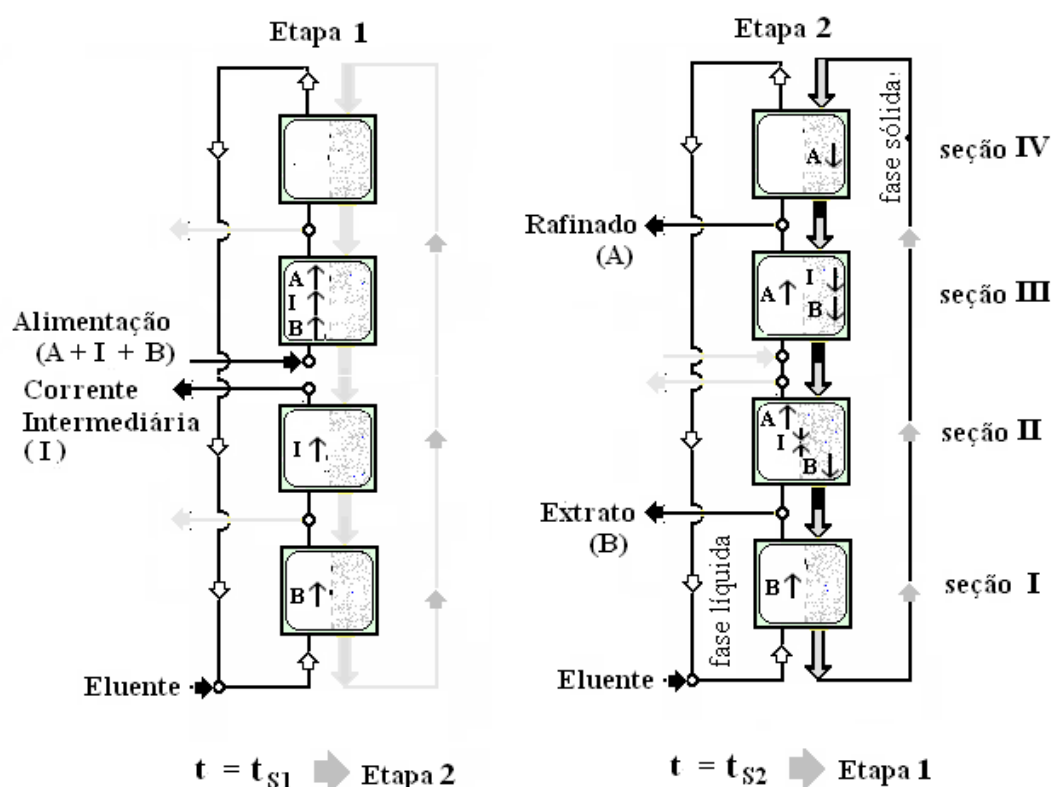


Figura 6.02 – Esquema das etapas de operação do sistema JO, sendo a operação da unidade de LMS na segunda etapa (sem alimentação) representada conforme uma unidade de Leito Móvel Verdadeiro equivalente. Ordem de afinidades dos componentes A, B e I com a fase adsorvente: $A < I < B$.

Portanto, é abrangido a investigação de unidades de separação com tecnologia de LMS para ser usada em combinação com os sistemas de bio-reacção do processo de produção de AL e sorbitol. O resultado de promover a simultânea bio-reacção e separação de produtos deve favorecer o processo à medida que possibilitará que a reacção seja conduzida com alta concentração de substrato e melhoramentos na velocidade de bio-reacção. Ponderando sobre

as informações a cerca do processo de separação, podem ser investigados diferentes métodos para a separação pretendida:

- ✓ unidades de LMS em série carregada com resina na forma K^+ ;
- ✓ unidades de LMS em série carregada com resinas na forma K^+ e Ca^{++} ;
- ✓ cromatografia em modo descontínuo associada a uma unidade de LMS;
- ✓ unidade de LMS, ou cromatografia em modo descontínuo, e uma unidade de pseudo-LMS de 4.

No capítulo, a investigação envolve estudos de simulação de unidades de separação, com a elaboração de algoritmos computacionais para definir apropriadas condições de operação e predição de desempenho da unidade, ou arranjo de unidades, no processo. Os parâmetros da separação com a resina na forma Ca^{++} são incluídos no capítulo para possibilitar uma otimização das unidades de LMS na configuração em cascata.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 ESTRATÉGIAS PARA A SEPARAÇÃO QUATERNÁRIA

O LMS é uma tecnologia de separação que utiliza os princípios dos sistemas contínuos contracorrente, no qual possibilita maximizar as taxas de transferência de massa e melhorar a utilização da fase estacionária. Através de uma unidade de LMS consegue-se obter produtos de elevada pureza a partir de misturas de difícil separação. Apesar desta unidade se firmar como um dos equipamentos mais avançados em processos de separação, tal equipamento apresenta-se limitado a duas correntes de saída (extracto e refinado), permitindo apenas a separação de misturas em duas fracções. Caso a mistura seja composta por mais de dois componentes, uma das correntes de saída sempre conterà um conjunto de componentes, enquanto na outra pode ser recuperado um componente purificado. Sendo uma mistura de três componentes, em uma das correntes de saída deverá ser recuperado uma das substâncias com o grau de pureza desejado, enquanto as duas substâncias restantes estarão sendo colectadas na outra corrente de saída. Se a mistura for composta de quatro componentes, ou recupera-se um dos componentes em uma das correntes de saída e o restante deles na outra, ou então, caso for

de interesse, separa-se a mistura em duas fracções com dois componentes cada. Outro problema poderia estar relacionado com a ordem de afinidades das substâncias em uma mistura sobre o adsorvente, caso a substância de interesse fosse aquela de afinidade intermediária.

Para o caso em estudo, seria ideal uma fase estacionária adsorvente que promovesse a separação dos dois produtos em uma das correntes (para uma purificação posterior) e as outras substâncias – os substratos – na outra corrente de recuperação (para seu reciclo ao reactor enzimático), conforme apresenta a Figura 6.3. Através de testes preliminares foi verificado que a ordem de afinidade das substâncias na fase estacionária seleccionada (DOWEX 50W-X4), quer na forma potássio quer na forma cálcio, para os produtos e os substratos, aparecem alternados não possibilitando a situação ideal para a separação. Portanto, uma das alternativas possíveis é a operação de duas unidades de LMS em cascata, sendo a primeira empregada para recuperar o AL e a segunda para separar os restantes dos componentes. Uma vez que o AL estará na forma de lactobianato de potássio, a primeira unidade de LMS deve empregar como fase estacionária a resina na forma potássio. O lactobianato é encaminhado para a corrente de refinado, enquanto os outros componentes são recuperados no extracto. Em sequência, esta mistura de três componentes deve ser introduzida na segunda unidade de LMS que carregada com a resina na forma cálcio, permite a separação de sorbitol (produto remanescente) dos outros dois substratos (lactose e frutose), estes últimos colectados na corrente de refinado. Portanto, a fim de estudar a aplicabilidade da tecnologia de LMS e suas variantes como a unidade pseudo-LMS sobre esta separação quaternária, parâmetros de adsorção das substâncias nas fases estacionárias consideradas devem ser encontrados. As isotermas de equilíbrio de sorbitol, frutose, lactose e AL adsorvendo na resina Dowex 50W-X4 carregada com ião potássio têm sido publicadas em três diferentes temperaturas: 293K, 313K e 333K (Pedruzzi *et al.*, 2008). À seguir, a determinação de parâmetros de adsorção para esta resina sob a forma cálcio é apresentada.

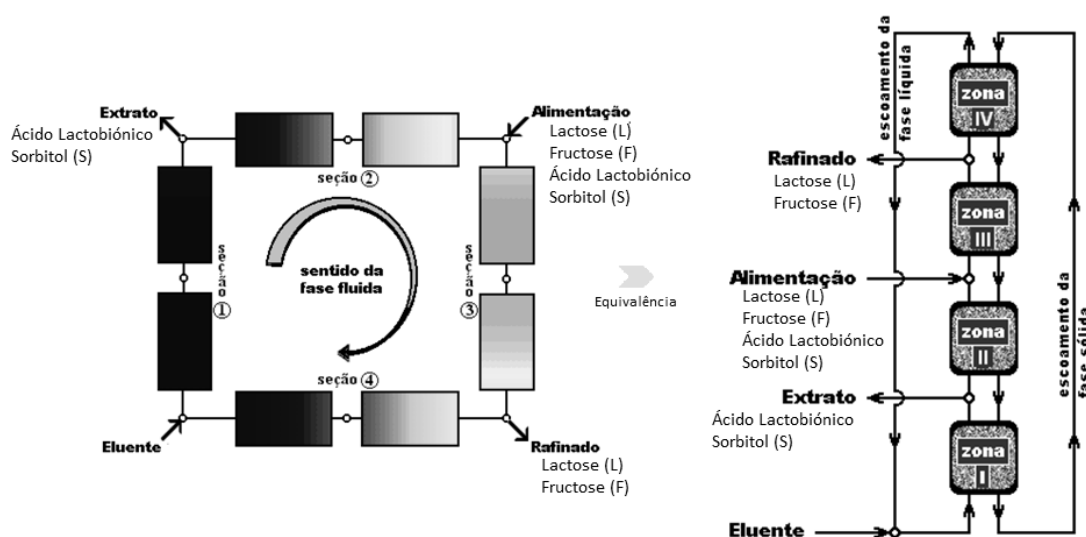


Figura 6.03 – Unidade de Leito Móvel Simulado, e equivalente unidade de Leito Móvel Verdadeiro, para a separação de substratos de produtos da reacção de oxidação da lactose através das enzimas GFOR/GL.

6.2.2 PARÂMETROS DE ADSORÇÃO DOS COMPONENTES NA RESINA

DOWEX 50W-X4 - Ca^{++}

Uma das informações mais relevantes a se determinar quando se trata da separação de substâncias pelo processo de adsorção é a isotérmica de equilíbrio de adsorção das substâncias envolvidas. Entre os métodos existentes para tal proposta estão os seguintes métodos cromatográficos: análise frontal, análise frontal pelo ponto característico, eluição pelo ponto característico e método de pulsos cromatográficos (Guiochon, 1994). Os parâmetros de equilíbrio de adsorção das substâncias frutose, lactose e sorbitol foram determinados empregando o método de pulsos em uma coluna de leito fixo. O AL não é considerado nesta avaliação em virtude de que a resina na forma Ca^{++} visa ser utilizada numa etapa posterior a separação do mesmo. O aparato utilizado para a obtenção das medidas foi o mesmo aplicado no Capítulo 5, com uma unidade de HPLC e coluna preparativa Superformance 150-26 (comprimento máximo de empacotamento igual a 150 mm e diâmetro interno de 26 mm) e os respectivos filtros de dispersão Superformance Merck (modelos F e S), adquiridos da Gotec (Muehlthal, Alemanha). Água deionizada é usada como eluente e o adsorvente é a resina de

troca iónica Dowex 50W-X4 na forma cálcio (reticulação de 4% DVB; tamanho de partícula médio de 55µm).

Para a verificação da homogeneidade do empacotamento e a determinação da porosidade do leito, pulsos do traçador azul de dextrano, que é excluído dos poros das partículas, são injectados na coluna para diversos caudais e o comportamento do pico dos pulsos é analisado na saída da coluna. A forma de cada pico obtido pode ser descrita por equações de balanço diferencial mássico no estado não-estacionário, as quais podem ser analiticamente resolvidas no campo de *Laplace*. As soluções podem ser relacionadas aos momentos estatísticos dos pulsos definidos como,

$$m_{ni} = \int_0^{\infty} t^n \cdot C_i(z, t) dt \quad n=1, 2, 3, \dots \quad (6.01)$$

Assim, o primeiro momento absoluto normalizado é dado por,

$$m_{ni}(z) = \frac{m_{1i} \int_0^{\infty} t \cdot C_i(z, t) dt}{m_{0i} \int_0^{\infty} C_i(z, t) dt} \quad (6.02)$$

que pode ser relacionado aos parâmetros de empacotamento, como

$$\mu_{1i}(z) = \mu_{1i}(z=0) + \frac{L \cdot (1 + \xi_i)}{v} \quad (6.03)$$

onde

$$\xi_i = \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} K_i \quad (6.04)$$

Desta forma, o coeficiente angular da reta obtida graficamente entre o primeiro momento da coluna em função da razão do volume da coluna pelo caudal volumétrico empregado para eluição das substâncias pode fornecer o valor da constante de equilíbrio linear da substância. Para um traçador que não é adsorvido na resina, obtém-se:

$$\mu_1(z) = \mu_1(z=0) + \varepsilon \frac{L}{v_s} \quad (6.05)$$

onde v_s é a velocidade superficial e então a porosidade interparticular pode ser determinada.

Pulsos de 500 μL de cada uma das substâncias, nas concentrações de $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, em caudais variados de 4 a $13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, foram efectuados na coluna. A altura do leito empacotado com a resina foi de 8.4 cm. O módulo de detecção do índice de refração é conectado na saída da coluna e o sinal electrónico (mV) medido é equivalente ao perfil de concentração das substâncias com o tempo. Através desta resposta, o tempo estequiométrico das substâncias pode ser facilmente determinado. O coeficiente angular da relação linear obtida para entre o primeiro momento do pulso de cada substância em função da razão entre o volume da coluna pelo caudal volumétrico empregado fornece o valor da constante de *Henry* da substância.

6.2.3 ARRANJO E CONFIGURAÇÕES DE UNIDADES DE SEPARAÇÃO PARA O PROCESSO

Tendo em conta os parâmetros de adsorção dos componentes da mistura e as fases estacionárias disponíveis para a separação pretendida, algumas configurações e arranjos de unidades, incluindo unidades de LMS, colunas cromatográficas de leito fixo, e unidades de pseudo-LMS podem ser sugeridas para permitir a separação quaternária. Pode-se considerar as seguintes alternativas:

6.2.3.1 - Sistema 1- Três unidades de LMS em cascata

A resina de troca catiónica carregada na forma potássio, com reticulação de 4% DVB e tamanho de $55 \mu\text{m}$, é adequada para a separação da mistura frutose, lactose, sorbitol e AL (na forma de sal de potássio). Portanto, no sistema 1, apenas uma fase estacionária composta da resina na forma potássio seria necessária. Três unidades de LMS de quatro secções poderiam ser arranjadas em cascata, conforme é mostrado na Figura 6.4, de forma que:

- ✓ na primeira unidade de LMS, AL seria recuperado na corrente de refinado e uma mistura ternária seria colectada no extracto (e, por conseguinte, iria servir para alimentar a segunda unidade de LMS);

- ✓ na segunda unidade de LMS, lactose seria recuperado no refinado (e deverá ser reciclada para o sistema de reacção) e uma mistura binária (frutose e sorbitol) seria recolhida na corrente de extracto (e, por conseguinte, iria servir para alimentar a terceira unidade de LMS);
- ✓ finalmente, na terceira unidade de LMS: frutose (na corrente de extracto) e sorbitol (na corrente de refinado) seriam separados, a primeira substância poderia ser reciclada ao reactor enzimático.

Uma vez que esta opção para o processo de separação envolve três unidades de LMS, o alto custo de investimento para esta operação torna este sistema inviável.

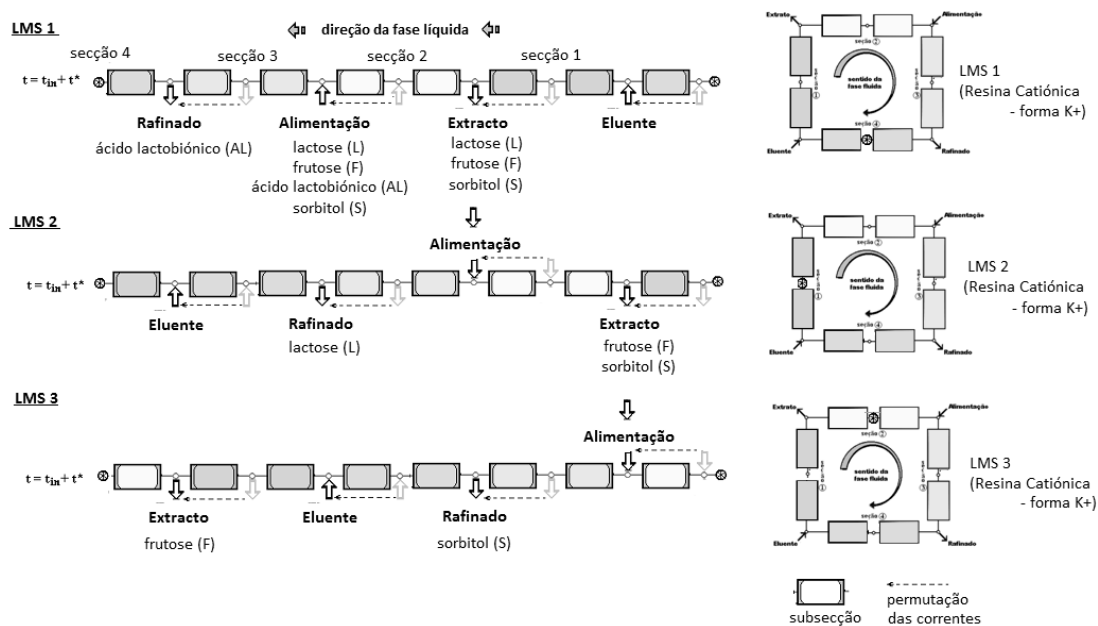


Figura 6.04 – Arranjo de três unidades de LMS, empacotadas com a resina sob a forma potássio, para a separação da mistura composta de lactose, frutose, AL e sorbitol (substratos e produtos da oxidação de lactose usando as enzimas GFOR/GL).

6.2.3.2 - Sistema 2 - Duas unidades de LMS em cascata

Uma solução ideal para o presente processo seria recuperar ambos os substratos da reacção enzimática em uma mesma corrente de colecta da unidade, e desta forma tornar o reciclo dos reagentes ao sistema reactivo mais simples e de menor custo. Como mencionado para o sistema 1, uma primeira unidade de LMS pode ser empacotada com a resina de troca iónica sob a forma de potássio de tal modo que o AL poderia ser separado do sorbitol e dos substratos (frutose e lactose). De acordo com a ordem de afinidades dos componentes, se a resina iónica sob a forma de cálcio for utilizada como fase adsorvente na segunda unidade de LMS, em série, uma vez que o sorbitol é o componente mais fortemente adsorvido nesta resina, esta substância poderia ser recolhida na corrente de extracto, enquanto a lactose e a frutose seriam recuperadas na saída do refinado, conforme mostra a Figura 6.5.

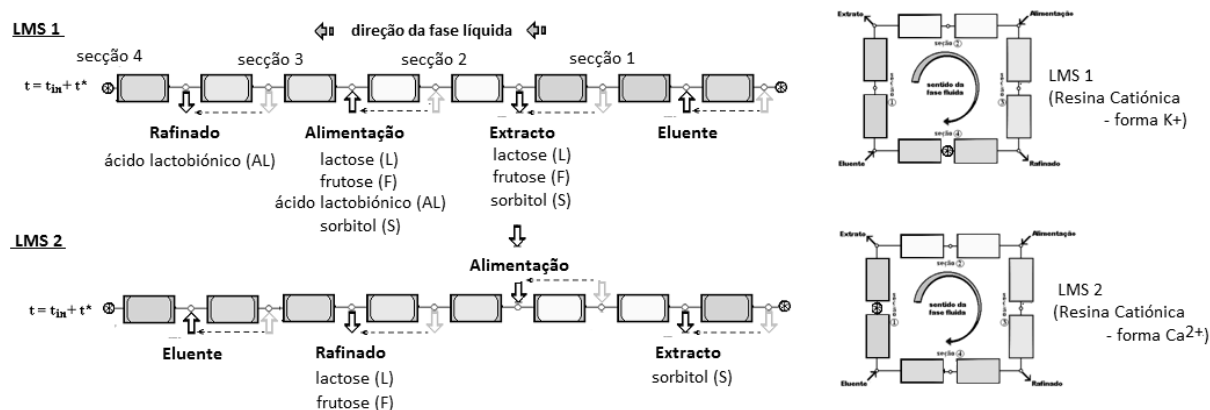


Figura 6.05 – Arranjo de duas unidades de LMS (LMS 1 - resina sob a forma potássio; LMS 2 - resina sob a forma cálcio), para a separação da mistura composta de lactose, frutose, AL e sorbitol (substratos e produtos da oxidação de lactose usando as enzimas GFOR/GL).

6.2.3.3 - Sistema 3 - Coluna cromatográfica de leito fixo e uma unidade de LMS

Devido a fraca afinidade do componente AL com a resina em forma de potássio, o uso de uma unidade de LMS para realizar a separação deste ácido orgânico do restante dos componentes da mistura poderia ser visto como descabido. Ao invés de uma unidade de LMS,

se pode sugerir uma coluna de cromatografia de leito fixo para a recuperação do AL a partir da mistura quaternária. Após esta operação descontínua, uma unidade de LMS seria alimentada com a mistura ternária (sorbitol, lactose e frutose) que estaria acumulada num tanque de armazenagem, conforme apresentado na Figura 6.6. Neste caso, a resina de troca iónica em forma de cálcio é usada como adsorvente nas colunas da unidade de LMS. Naturalmente, o desempenho desta alternativa deve ser verificado de acordo com a produtividade, a recuperação, o consumo de eluente e pureza final das substâncias recolhidos.

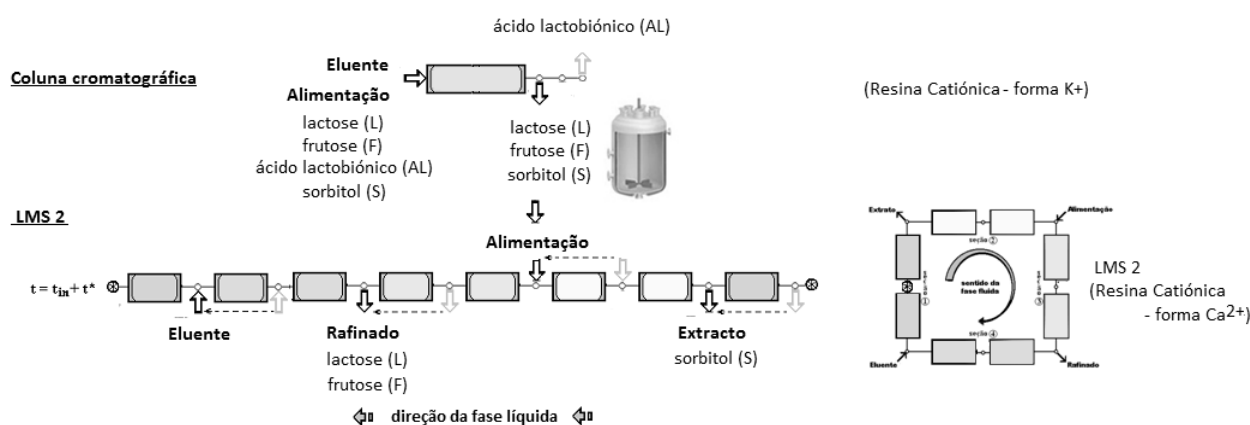


Figura 6.06 – Arranjo de uma coluna cromatográfica (leito de resina sob a forma potássio) e uma unidade de LMS (resina sob a forma cálcio), para a separação da mistura composta de lactose, frutose, AL e sorbitol (substratos e produtos da oxidação de lactose usando as enzimas GFOR/GL).

6.2.3.4 - Sistema 4 - Tecnologia de pseudo-LMS

Considerando a tecnologia de pseudo-LMS, se pode sugerir duas alternativas:

- ✓ usar o sistema 3, mas, ao invés de uma unidade de LMS, uma unidade de pseudo-LMS de 4 secções, composta por colunas empacotadas com a resina em forma de potássio, é aplicada na separação ternária; ou
- ✓ usar apenas uma unidade de pseudo-LMS com 5 secções, onde as colunas são empacotadas com resina em forma de potássio para efectuar a separação quaternária (Figura 6.7).

Estas duas opções devem ser analisadas numericamente a fim de conhecer o seu respectivo desempenho na separação, em comparação com os outros sistemas.

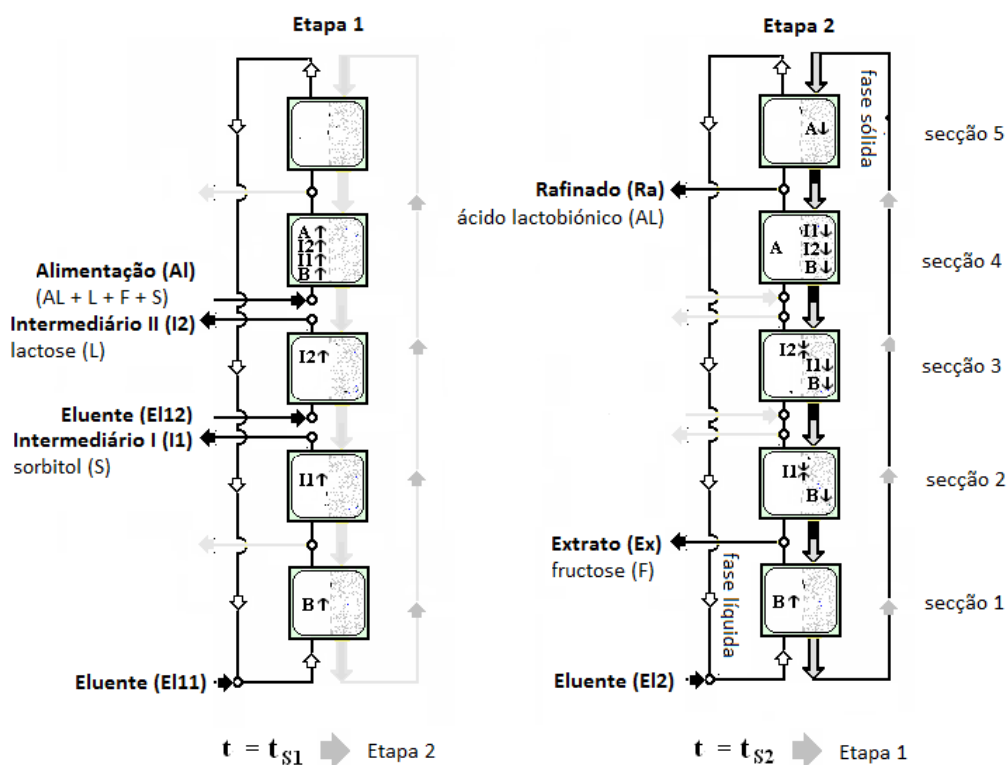


Figura 6.07 – Esquema das etapas de operação para a unidade de pseudo-LMS na separação quaternária de AL, lactose, sorbitol e frutose. (A operação da unidade de LMS na etapa 2 é representada por uma operação equivalente em uma unidade de LMV).

6.3 DESCRIÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS DAS UNIDADES DE SEPARAÇÃO

6.3.1 UNIDADE DE LMS

O modelo matemático, utilizado para simular a operação de uma unidade de LMS nas separações, considera a real mudança dos pontos de admissão e de colecta das substâncias. Para a fase líquida, utiliza-se o modelo de fluxo pistão difusional, isto é, levando em conta a dispersão axial,

$$\frac{\partial C_{ik}}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \cdot \frac{\partial q_{ik}}{\partial t} + v_k \cdot \frac{\partial C_{ik}}{\partial z} - D_{ak} \cdot \frac{\partial^2 C_{ik}}{\partial z^2} = 0 \quad (6.06)$$

onde C_{ik} é a concentração do componente i na fase líquida na coluna k e q_{ik} é a concentração média na fase adsorvente do componente i na coluna k da unidade; t é a variável tempo, z é a coordenada axial, ε é a porosidade do leito, v_k é a velocidade do líquida na coluna k e D_{ak} é o coeficiente de dispersão axial na coluna k .

Para a fase adsorvente, considera-se a hipótese de equilíbrio instantâneo, com o transporte de massa sendo descrito por um mecanismo de força motriz linear,

$$\frac{\partial q_{ik}}{\partial t} = k_{Ti} \cdot (q_{ik}^* - q_{ik}) \quad (6.07)$$

onde q_{ik}^* é a concentração do componente i na fase adsorvente na coluna k em equilíbrio com a concentração na fase líquida e k_{Ti} é o coeficiente de transferência de massa intraparticular do componente i .

Na Eq. (6.06) e Eq. (6.07), os índices k e i referem-se às colunas de leito fixo do LMS, e aos componentes, respectivamente. Portanto, para cada coluna, tem-se um balanço mássico para a fase líquida e sólida, para cada componente presente.

As condições iniciais e de contorno são,

$$t = 0 : C_{ik} = q_{ik} = 0 \quad (6.08)$$

$$z = 0, t > 0 : C_{ik,o} = C_{ik} - \frac{D_{ak}}{v_k} \cdot \frac{\partial C_{ik}}{\partial z} \Big|_{z=0} \quad (6.09)$$

$$z = L_C, t > 0 : \frac{\partial C_{ik}}{\partial z} \Big|_{z=L_C} = 0 \quad (6.10)$$

onde $C_{ik,o}$ é a concentração de entrada do componente i na coluna k e L_C é o comprimento de cada coluna de leito fixo da unidade.

As condições de contorno dependem da secção que a coluna de leito fixo se encontra no sistema, visto que ocorre o salto das correntes de entrada e saída. Os balanços de massa nos nós da unidade de LMS identificam as secções consideradas, em um intervalo de tempo, e devem ser utilizados na condição de contorno dada pela Eq. (6.09), de acordo com a localização da coluna (k) considerada.

- ✓ Para colunas dentro de uma secção e para os nós de extracto e refinado:

$$C_{ik+1,0} = C_{ik} \quad (6.11)$$

- ✓ Para o nó do eluente:

$$C_{ik+1,0} = (v_4 / v_1) \cdot C_{ik} \quad (6.12)$$

- ✓ Para o nó de alimentação:

$$C_{ik+1,0} = (v_F / v_3) \cdot C_{iF} + (v_2 / v_3) \cdot C_{ik} \quad (6.13)$$

Isto caracteriza a dependência temporal das condições de contorno no sistema. As variáveis v_1 , v_2 , v_3 e v_4 são as velocidades da fase líquida nas secções 1, 2, 3 e 4 do LMS, e C_{iF} e v_F são a concentração da substância i e a velocidade na corrente de alimentação na unidade, respectivamente.

As equações de Eq.(6.06) a Eq.(6.10) podem ser igualmente empregadas para simular o comportamento de uma unidade cromatográfica de leito fixo em um processo descontínuo de separação. Nesta ocasião, o índice k poderia ser omitido nestas equações. Além disso, na Eq.(6.09), a concentração de entrada do componente i na coluna seria tomada como a concentração de alimentação do componente i .

6.3.2 UNIDADE DE PSEUDO-LMS

A unidade de pseudo-LMS opera utilizando muito da concepção da tecnologia de LMS. A configuração da unidade operando desta maneira permite, além da recuperação de componentes de maior e menor afinidade com a fase adsorvente, a recuperação de um

componente de afinidade intermediária, podendo ser de alguma vantagem para separações multi-componentes. Um processo realizado no sistema de pseudo-LMS é um processo cíclico composto de duas etapas: (i) Etapa 1, onde se tem praticamente a operação de uma coluna cromatográfica de leito fixo por onde sai o componente com força de adsorção intermediária com a fase sólida; (ii) e a Etapa 2, onde a tecnologia de LMS está presente em uma maior extensão. Para explicar como é a configuração e o funcionamento de um sistema baseado na tecnologia de pseudo-LMS, considere um conjunto de colunas preparativas conectadas em série, tal como em uma unidade de LMS de circuito aberto. Em cada etapa, este conjunto de colunas são assim configuradas:

✓ Etapa 1

Uma corrente de alimentação introduz os componentes a serem separados na unidade. A diferente afinidade dos componentes com a fase adsorvente provoca a separação cromatográfica conforme em uma única coluna cromatográfica. Em algum ponto desta coluna é também introduzida uma corrente de eluente, a qual auxiliará na eluição do componente de afinidade intermediária na corrente de saída da unidade nesta etapa 1 (ver Figura 6.8).

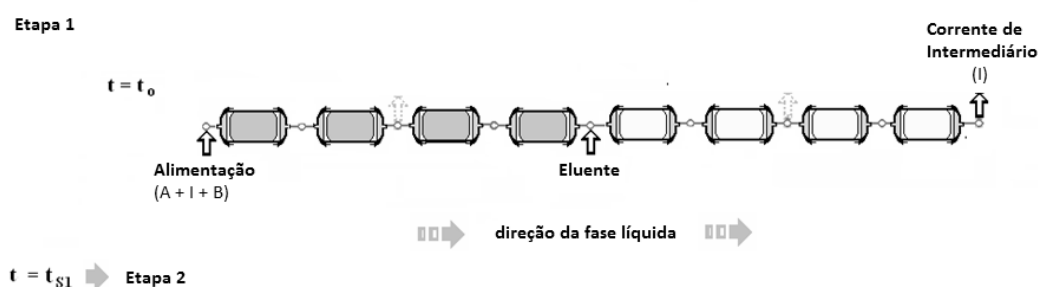


Figura 6.08 – Esquema da unidade baseada no sistema pseudo-LMS operando na etapa 1.

✓ Etapa 2

O sistema passa a ser em circuito fechado e a fase adsorvente ganha movimento pela permutação das correntes externas, que nesta etapa são: a corrente de extracto – por onde é

colectada a substância de maior afinidade com o sólido –, a corrente de refinado – por onde é colectada a substância de menor afinidade com o sólido –, e a corrente de eluente. Não há corrente de alimentação nesta fase do processo. O sistema, portanto, opera exactamente como uma unidade de LMS sem alimentação (ver Figura 6.9).

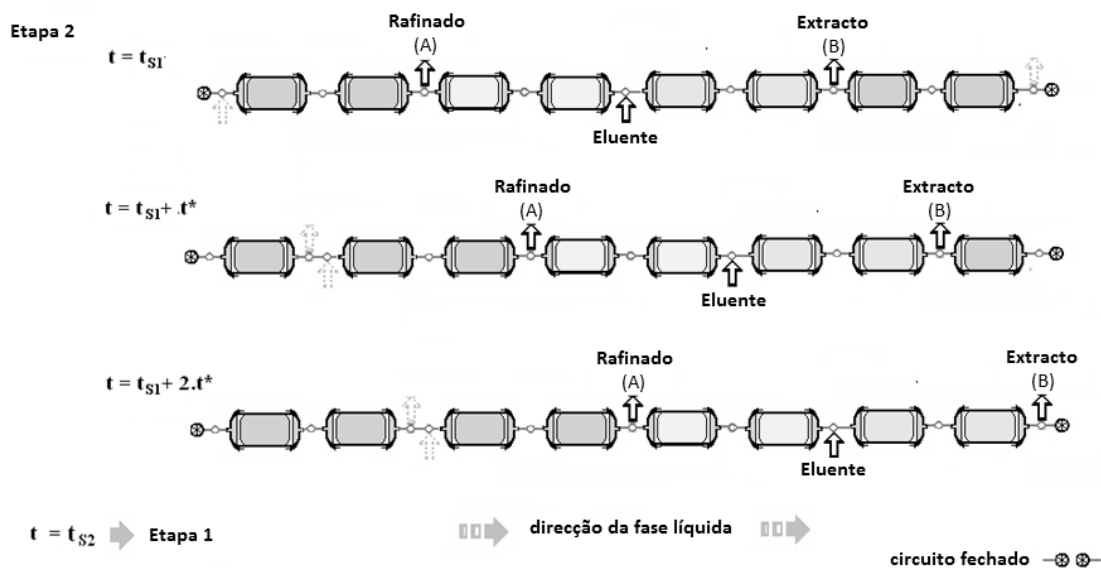


Figura 6.09 – Esquema da unidade baseada no sistema pseudo-LMS operando na etapa 2.

O modelo matemático para simular o comportamento de uma unidade operando segundo a tecnologia de pseudo-LMS utiliza balanços mássicos de conservação das substâncias tanto na fase líquida como na fase adsorvente. Tal como para a unidade de LMS, se utiliza o modelo de fluxo pistão com dispersão axial para fase líquida, enquanto para a fase adsorvente, constituída de partículas de estrutura homogénea, se aplica a aproximação de força motriz linear. Para quando o sistema opera segundo uma unidade cromatográfica de leito fixo, tem-se:

– balanço de massa na fase líquida para o componente i na coluna k ,

$$\frac{\partial(C_{ik})}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \left[\frac{\partial(\bar{q}_{ik})}{\partial t} \right] + v_k \frac{\partial(C_{ik})}{\partial z} - D_a \frac{\partial^2(C_{ik})}{\partial z^2} = 0 \quad (6.14)$$

– balanço de massa para a fase adsorvente (modelo de força motriz linear),

$$\frac{\partial(\bar{q}_{ik})}{\partial t} = K_{Ti}(q_i^* - \bar{q}_{ik}) \quad (6.15)$$

Condições iniciais:

$$t = 0 \text{ (ciclo 1):} \quad C_{ik} = \bar{q}_{ik} = 0 \quad (6.16)$$

$$t = t_{S2} \text{ (ciclo } k\text{):} \quad C_{ik} = C_{ik} \text{ (ciclo } j-1, \text{ etapa 2)} \quad \bar{q}_{ik} = \bar{q}_{ik} \text{ (ciclo } j-1, \text{ etapa 2)} \quad (6.17)$$

Condições de contorno nas colunas da unidade durante a etapa 1:

$$z = 0 \text{ (} t > 0\text{):}$$

$$v_k C_{ik,o} = v_k C_{ik} \Big|_{z=0^+} - D_a \frac{\partial(C_{ik})}{\partial z} \Big|_{z=0^+} \quad (6.18)$$

$$z = L_C \text{ (} t > 0\text{)}$$

$$\frac{\partial(C_{ik})}{\partial z} \Big|_{z=L_C} = 0 \quad (6.19)$$

As condições de contorno dependem da localização das colunas no sistema de pseudo-LMS e os balanços de massa nos nós devem ser considerados:

– para as colunas dentro de uma secção do sistema,

$$C_{ik+1,o} = C_{ik,L} \quad (6.20)$$

– para o nó de eluente,

$$C_{ik+1,o} = \frac{v_3}{v_1} C_{ik,L} \quad (6.21)$$

– para o nó de alimentação,

$$C_{ik,o} = C_{iFe} \quad (6.22)$$

Para quando o sistema opera segundo uma unidade de LMS, o modelo é baseado sobre a descrição de uma unidade de leito móvel verdadeiro, que é equivalente a uma real unidade de LMS (quando observadas as relações de equivalência geométricas e de fluxo), logo:

– balanço de massa na fase líquida para o componente i na coluna k ,

$$\frac{\partial(C_{ik})}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \left[\frac{\partial(\bar{q}_{ik})}{\partial t} - u_s \frac{\partial(\bar{q}_{ik})}{\partial z} \right] + v_k \frac{\partial(C_{ik})}{\partial z} - D_a \frac{\partial^2(C_{ik})}{\partial z^2} = 0 \quad (6.23)$$

– balanço de massa para a fase adsorvente (modelo de força motriz linear),

$$\frac{\partial(\bar{q}_{ik})}{\partial t} = u_s \frac{\partial(\bar{q}_{ik})}{\partial z} + k_{TM} (q_i^* - \bar{q}_{ik}) \quad (6.24)$$

Condições iniciais ($t = 0$):

$$t = 0 \text{ (ciclo 2):} \quad C_{ik} = C_{ik}(\text{ciclo 1, etapa 1}) \quad \bar{q}_{ik} = \bar{q}_{ik}(\text{ciclo 1, etapa 1}) \quad (6.25)$$

$$t = t_{SI} \text{ (ciclo j):} \quad C_{ik} = C_{ik}(\text{ciclo j, etapa 1}) \quad \bar{q}_{ik} = \bar{q}_{ik}(\text{cycle j, etapa 1}) \quad (6.26)$$

Condições de contorno nas colunas da unidade durante a etapa 2:

$$z = 0 \text{ (} t > 0 \text{):}$$

$$v_k C_{ik,o} = v_k C_{ik} \Big|_{z=0^+} - D_a \frac{\partial(C_{ik})}{\partial z} \Big|_{z=0^+} \quad (6.27)$$

$$\frac{\partial(q_{ik})}{\partial z} \Big|_{z=0} = 0 \quad (6.28)$$

$$z = L_C \text{ (} t > 0 \text{):}$$

$$\frac{\partial(C_{ik})}{\partial z} \Big|_{z=L_C} = 0 \quad (6.29)$$

– para as colunas dentro de uma secção e para o nó das correntes de extracto e de refinado:

$$C_{ik+1,o} = C_{ik} \quad (6.30)$$

– para o nó da corrente de eluente:

$$C_{ik+1,o} = \frac{v_3}{v_1} C_{ik} \quad (6.31)$$

6.3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A RESOLUÇÃO NUMÉRICA DOS MODELOS MATEMÁTICOS

As equações de conservação são discretizadas pelo Método de Volumes Finitos, juntamente com as condições de contorno, e implementadas em algoritmo computacional, na linguagem FORTRAN, para simulação do comportamento e desempenho das unidades. As necessárias funções de interpolação para a discretização utilizam o esquema *WUDS*, largamente empregado na solução de problemas envolvendo escoamento de fluidos (Raithby, 1976). A aplicação das condições de contorno é feita através do uso de pontos fictícios. A formulação é definida como totalmente implícita dando origem a um sistema algébrico de equações que é resolvido pelo método de resolução TDMA (*Tri-Diagonal Matrix Algorithm*) (Maliska, 1995).

Nas simulações realizadas, as malhas computacionais de refinamento nas colunas são iguais ou maiores que 100 volumes de controle na direcção axial. A razão da diferença entre o novo valor da variável e seu valor da iteração prévia pelo novo valor da variável da última iteração é da ordem de menor que 0. 1%.

O estado estacionário de uma unidade operando com tecnologia de pseudo-LMS, a exemplo de como ocorre em unidades de LMS, é um estado estacionário cíclico, já que também ocorre a dependência temporal das condições de contorno empregadas no sistema. O estado cíclico estacionário da unidade de LMS e pseudo-LMS é definido ser alcançado quando a soma dos seguintes erros relativos são menores que 1%:

- diferença entre as concentrações médias dos componentes nas correntes de colecta da iteração actual e da iteração prévia pelo valor da variável na iteração actual,

$$e_c = \sum_m \sum_i \frac{|\bar{C}_{i,m}^c - \bar{C}_{i,m}^{c-1}|}{\bar{C}_{i,m}^c} \quad (\text{m} = \text{corrente de saída; } i = \text{componente}) \quad (6.32)$$

- balanço mássico global de conservação das substâncias nas unidades,

$$e_b = \frac{\sum_m \sum_i \bar{C}_{i,m} (Q_m t_{Sp})}{\sum_i C_{i,Fe}^o (Q_{Fe} t_{S1})} \quad (6.33)$$

(LMS: m=Ra, Ex com p=1; pseudo-LMS: p=1 para m=In; p=2 para m=Ra, Ex)

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 PARÂMETROS DE EQUILÍBRIO – RESINA DOWEX 50W-X4 NA FORMA Ca^{++}

Para determinar a porosidade interparticular na coluna, pulsos do traçador azul de dextrana, em concentração de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, foram injectados na coluna. O valor encontrado para a porosidade interparticular para a coluna de separação empacotada com a resina Dowex 50W-X4 na forma Ca^{2+} foi de 0.402. A Figura 6.10 mostra a relação entre o tempo estequiométrico do componente em função da razão volume do leito e caudal de eluente. Os resultados das constantes de adsorção para o sistema operado nas formas K^+ e Ca^{++} são listados na Tabela 6.1.

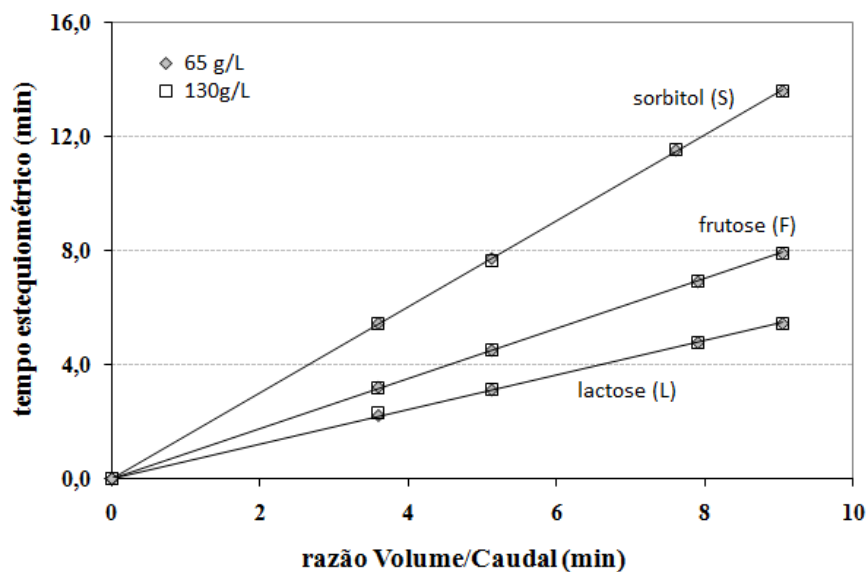


Figura 6.10 – Tempo estequiométrico do componente em função da razão volume do leito e caudal de eluente. Pulsos injectados em duas concentrações das substâncias: 130g/L e 65g/L. Adsorvente: resina DOWEX 50W-X4 na forma Ca^{+2} ; eluente: água destilada e deionizada. Temperatura: 293K.

Tabela 6.01 - Constantes de adsorção linear e de transferência de massa das substâncias lactose, sorbitol e lactose. Colunas empacotadas com resina DOWEX 50W-X4 na forma potássio e na forma cálcio (293K).

Substâncias	DOWEX 50W-X4			
	na forma K ⁺		na forma Ca ²⁺	
	K^a	$k (s^{-1})^b$	K^c	$k (s^{-1})^d$
Lactose	0.48	0.292	0.34	0.407
Sorbitol	0.58	0.405	1.85	0.127
Frutose	0.67	0.403	0.79	0.340

^a pelo método da análise frontal e método de adsorção-dessorção;

^b pelo procedimento de ajuste usando curvas de ruptura;

^c pelo método de pulsos;

^d por estimativa a partir da equação do coeficiente global de transferência de massa considerando um modelo de partícula homogênea ($k_i = \frac{15 \varepsilon_p D_{mi}}{r_p^2 \tau K_i}$).

6.4.2 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS - DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO

Para obter produtos puros a partir de uma unidade de LMS, as substâncias devem migrar ou com a fase líquida ou com a fase estacionária (dependendo da substância e da secção considerada) para as correntes de colecta. O correcto funcionamento da unidade de LMS está fundamentalmente ligado a adequada selecção de suas condições operacionais: caudais nas secções (Q_j , j = secções da unidade) e tempo de permutação (t^*). O projecto completo de uma unidade envolve a selecção tanto de parâmetros geométricos (dimensões das colunas, por exemplo) como das referidas condições operacionais, incluindo parâmetros como número de colunas e sua configuração.

Para sistemas envolvendo isothermas de adsorção lineares, a aplicação da teoria do equilíbrio conduz a uma família de inequações envolvendo os caudais das quatro seções da unidade, o tempo de permutação (ou o caudal da fase estacionária (Q_s)) e as constantes lineares de isoterma de adsorção (Storti *et al.*, 1993). Através destas inequações, uma região ou um volume de separação pode ser construído. A região triangular, baseada na teoria do equilíbrio, da completa separação no plano dos parâmetros m_2 e m_3 , definidos conforme a Eq.

(6.34), estabelece um área onde a separação das substâncias seria possível sem considerar a resistência à transferência de massa ou a dispersão axial. É bem conhecido que as resistências à transferência de massa dentro da unidade pode influenciar na região de separação onde uma completa separação é esperada ocorrer (Azevedo e Rodrigues, 1999). No desenvolvimento do conceito de volume de separação $m_1 \times m_2 \times m_3$ estabelecido no trabalho de Azevedo (2001), as resistências à transferência de massa são levadas em conta para delimitar um volume para o qual se pode encontrar condições de operação que acarretem uma elevada pureza dos produtos.

$$m_j = \frac{Q_j^{LMV}}{Q_s} = \frac{Q_j^{LMS} t^* - \varepsilon V_C}{(1 - \varepsilon) V_C} \quad (6.34)$$

Neste contexto, discute-se a operação dos sistemas 2 e 3. Para que cada uma das quatro secções da unidade de LMS execute adequadamente suas respectivas funções (adsorção e dessorção das substâncias) levando a uma separação eficiente, a selecção do caudal líquido em cada secção, e também do tempo de permutação, é essencial. A fim de recuperar os componentes mais fortemente retidos na corrente de extracto e aqueles menos retidos na saída de refinado, um conjunto de restrições, que pode ser escrito matematicamente em termos de fluxo líquido dos componentes em cada secção da unidade (conforme a Eq.(6.35)), deve ser satisfeito. Portanto, pode-se escrever:

$$\gamma_{ij}^* = \left(\frac{t^* v_j}{L_C} - 1 \right) \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \frac{C_i^j}{q_i^j} \quad (i = \text{componente}; j = \text{secção}) \quad (6.35)$$

e, então, haverá as seguintes restrições de fluxo líquido para cada componente da mistura em cada secção da unidade de LMS:

1) Para o sistema 2, considerando a unidade de,

a) LMS 1

$$\gamma_{AL1}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{L1}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{F1}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{S1}^* > 1 \text{ (dessorção de todas as substâncias)} \quad (6.36)$$

$$\gamma_{AL2}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{L2}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{F2}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{S2}^* < 1 \text{ (dessorção de AL; adsorção de L, F e S)} \quad (6.37)$$

$$\gamma_{AL3}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{L3}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{F3}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{S3}^* < 1 \text{ (dessorção de AL; adsorção de L, F e S)} \quad (6.38)$$

$$\gamma_{AL4}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{L4}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{F4}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{S4}^* < 1 \text{ (adsorção de todas as substâncias)} \quad (6.39)$$

b) LMS 2

$$\gamma_{L1}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{F1}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{S1}^* > 1 \text{ (dessorção de todas as substâncias)} \quad (6.40)$$

$$\gamma_{L2}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{F2}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{S2}^* < 1 \text{ (dessorção de L e F; adsorção de S)} \quad (6.41)$$

$$\gamma_{L3}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{F3}^* > 1 \quad ; \quad \gamma_{S3}^* < 1 \text{ (dessorção de L e F; adsorção de S)} \quad (6.42)$$

$$\gamma_{L4}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{F4}^* < 1 \quad ; \quad \gamma_{S4}^* < 1 \text{ (adsorção de todas as substâncias)} \quad (6.43)$$

2) Para o sistema 3, considerando a unidade de LMS: (as restrições são iguais aquelas apresentadas da Eq.(6.40) a (6.43)).

Tabela 6.02 – Restrições de fluxo para operação dos sistemas sugeridos com unidades de LMS.

Sistema 2 (LMS 1 + LMS 2)				
LMS 1	Secção 1	Secção 2	Secção 3	Secção 4
γ_{AL}^*	>1	>1	>1	<1
$\gamma_L^*; \gamma_F^*; \gamma_S^*$	>1	<1	<1	<1
LMS 2	Secção 1	Secção 2	Secção 3	Secção 4
$\gamma_L^*; \gamma_F^*$	>1	>1	>1	<1
γ_S^*	>1	<1	<1	<1
Sistema 3 (Leito Fixo + LMS)				
LMS	Secção 1	Secção 2	Secção 3	Secção 4
$\gamma_L^*; \gamma_F^*$	>1	>1	>1	<1
γ_S^*	>1	<1	<1	<1

O objectivo, para além de explorar a tecnologia de LMS e testar sua aplicabilidade em um processo integrado com a produção enzimática de AL, é fazer uma comparação quantitativa do desempenho alcançado na separação quaternária originada no referido processo, usando os arranjos dos sistemas alternativos sugeridos. Nesta avaliação, algumas propriedades e características das colunas da unidade de LMS são fixadas.

6.4.2.1 Sistema 2

Neste sistema, a corrente de extracto da primeira unidade de LMS é conectada a corrente de alimentação da segunda unidade de LMS ($Q_{Ex}^{LMS1} = Q_{Al}^{LMS2}$), de tal forma que não há acúmulos no processo. Assim, usando a Eq.(6.34):

$$\frac{t_{LMS1}^*}{t_{LMS2}^*} = \frac{m_{1,LMS1} - m_{2,LMS1} \cdot (1 - \varepsilon_{LMS1}) \cdot V_{LMS1}}{m_{3,LMS2} - m_{2,LMS2} \cdot (1 - \varepsilon_{LMS2}) \cdot V_{LMS2}} \quad (6.44)$$

onde os subscritos LMS1 e LMS2 servem para referenciar os parâmetros da primeira e da segunda, respectivamente, unidades de LMS.

Deve-se lembrar que, neste sistema, as duas unidades estão empacotadas com diferentes fases estacionárias. Na determinação das condições de operação das unidades, algumas limitações de carácter prático sobre o processo de separação cromatográfica são levadas em conta e passam a ser descritas:

- ✓ o limite máximo de queda de pressão nas unidades;
- ✓ as colunas cromatográficas tem um diâmetro de 0.026m, mas o comprimento do empacotamento nas colunas das duas unidades é diferente.

Nota: Para a unidade de LMS 1, oito colunas são empacotadas com a resina de troca iónica na forma potássio ($L_C = 0.15\text{m}$); para a unidade de LMS 2, oito colunas com um comprimento de empacotamento de 0.30m da resina de troca iónica na forma cálcio são consideradas.

Estes parâmetros geométricos são seleccionados baseados nas características das colunas empregadas no levantamento experimental dos parâmetros de adsorção das substâncias. Além disso, um menor volume de fase estacionária é empregado na primeira unidade de LMS em virtude de se tratar de um processo com alto factor de separação.

Uma vez que as unidades são conectadas em linha, não existindo acúmulo no processo, e assumindo um limite máximo de queda de pressão (ΔP_{max}) de 55 bar para as colunas, tanto da unidade de LMS 1 como da unidade de LMS 2, a equação de *Karman-Kozeny*, dada pela Eq. (6.45), pode ser usada para calcular o máximo caudal aplicado ao sistema de arranjo em cascata.

$$\frac{\Delta P}{L} = 150\mu \frac{(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3} d_p^2 v \quad (6.45)$$

onde μ é a viscosidade da solução e a variável d_p representa o diâmetro da partículas.

Considerando as especificações do fornecedor da resina iónica empregada (DOWEX 50W-X4) é recomenda uma velocidade de operação máxima para regeneração de $60 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ para não provocar danos nas partículas de resina (aproximadamente $\Delta P_{max} = 100 \text{ bar}$ usando

as características das colunas usadas). Portanto, deve-se encontrar qual das unidades – LMS 1 ou LMS 2 – operará com o maior caudal neste processo. Sendo aplicada a equação Eq.(6.34) à secção 1 de ambas as unidades, a razão dos caudais na secção 1 pode fornecer a seguinte relação,

$$\frac{Q_{1,LMS2}}{Q_{1,LMS1}} = \left(\frac{m_{1,LMS2} + \frac{\varepsilon_{LMS2}}{(1 - \varepsilon_{LMS2})}}{m_{1,LMS1} + \frac{\varepsilon_{LMS1}}{(1 - \varepsilon_{LMS1})}} \right) \cdot \frac{m_{1,LMS1} - m_{2,LMS1}}{m_{3,LMS2} - m_{2,LMS2}} \quad (6.46)$$

Naqueles casos onde o termo da igualdade é maior que a unidade, o caudal da secção 1 da unidade de LMS 2 é a maior e pode ser fixada como função da máxima queda de pressão no sistema (o inverso também se aplica). Uma simples análise sobre a Eq.(6.46), tendo em conta os valores limites dos parâmetros $m_{j,LMS}$ baseados nos princípios da teoria de equilíbrio (isto é, as constantes lineares de equilíbrio de adsorção para os processos de separação envolvidos na unidade de LMS 1 e LMS 2) e as características do sistema – conforme definidas na Tabela 6.3 –, revela que o valor de $m_{2,LMS1}$ é o único parâmetro que pode levar a uma situação onde o caudal da secção 1 da unidade de LMS 1 seria maior do que o caudal da secção 1 da unidade de LMS 2. Desta forma, tendo definido o caudal da secção 1, quer na unidade de LMS 1 quer na unidade de LMS 2, o volume de separação $m_1 \times m_2 \times m_3$ pode ser construído uma vez que se defina um valor para o parâmetro m_4 que satisfaça os critérios de restrição de fluxo mostrados na Tabela 6.2.

Tabela 6.03 – Características das colunas das unidades de LMS no sistema 1.

Propriedades	LMS1	LMS2
<i>Fase adsorvente</i>	DOWEX 50WX4 K ⁺	DOWEX 50WX4 Ca ²⁺
Comprimento (L_C)	0.15 m	0.30 m
Diâmetro (D_C)	0.026 m	0.026 m
Nº de Colunas (configuração)	8 (2-2-2-2)	8 (2-2-2-2)
Número de <i>Peclet</i> (N_{Pe})	700	700
Porosidade (ε)	0.344	0.402

Nesta avaliação, os parâmetros m_4 das unidades de LMS 1 e LMS 2 são assumidos iguais a 0.046 e 0.28, respectivamente. Considerando as limitações de transferência de massa

no processo de separação, algumas análises numéricas preliminares demonstraram que a secção 1 da unidade de LMS 2 apresentará o mais alto caudal em todo o arranjo do sistema 1 e, então, o caudal da secção 1, calculado pela Eq.(6.45), é fixado em $107.52 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ($Q_{1,LMS2}$). O tempo de permutação deve ser seleccionado para construir o volume de separação da unidade de LMS 2. Esta condição operacional pode ser estimada baseada sobre um limite mínimo estabelecido pelo tempo de retenção da substância mais fortemente retido na fase adsorvente na condição do caudal da secção 1 da unidade – Eq.(6.47). Nesta operação, o tempo de permutação da unidade de LMS 2 é assumido igual a 2.72 min (tempo de retenção do sorbitol em $Q_{1,LMS2}$ é de 2.21 min). Após definir o tempo de permutação, é possível prever (usando a teoria do equilíbrio, onde $0.795 < m_{2,LMS2} < m_{3,LMS2} < 1.854$) um caudal de alimentação máximo possível de $37.47 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Este valor também deve corresponder ao máximo caudal de extracto da unidade de LMS 1 – Eq.(6.48). Assim, em um plano de região triangular definido para um determinado $m_{1,LMS1}$, uma relação aparece entre $m_{2,LMS1}$ e o tempo de permutação t_{LMS1}^* . Com isso, para cada valor diferente de $m_{2,LMS1}$ um novo valor de t_{LMS1}^* será calculado de forma a manter o caudal de extracto constante.

$$t_{R,S} = \frac{\varepsilon_{LMS2} V_{LMS2}}{Q_{1,LMS1}} = \left(1 + \frac{(1 - \varepsilon_{LMS2})}{\varepsilon_{LMS2}} K_s \right) \quad (6.47)$$

$$Q_{A1,LMS2} = Q_{Ex,LMS1} = \frac{m_{1,LMS1} - m_{2,LMS1}}{t_{LMS1}^*} - (1 - \varepsilon_{LMS1}) \cdot V_{LMS1} \quad (6.48)$$

A composição da mistura quaternária a ser alimentada na unidade de LMS 1 é baseada nos resultados de cinética enzimática obtidos no Capítulo 4. A cinética seleccionada é aquela onde a solução contendo 700 mM de lactose e 350 mM de frutose é usada como substrato para a reacção enzimática (células mobilizadas de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191; 39°C; pH 6.4; 350 rpm; concentração celular de $7.19 \text{ g}_{\text{cel.seca}} \cdot \text{L}^{-1}$). Se a reacção enzimática é interrompida após seis horas de conversão, quando a taxa de reacção sofre uma diminuição mais acentuada, cerca de 200 mM de ambos os substratos são consumidos. Consequentemente, uma composição de mistura de cerca de 500 mM de lactose ($171.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 150 mM de frutose ($27 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e cerca de 200 mM para cada produto (ou seja, $71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de AL e

36.4 g·L⁻¹ de sorbitol) pode ser assumida. Para evitar o uso de extrapolação de dados nas isotermas de equilíbrio de adsorção (caso da lactose), resolveu-se limitar a concentração total das substâncias na mistura aproximadamente a 180 g·L⁻¹. Logo, mantendo-se a proporção substrato/produto com o limite de concentração total, a composição de mistura de alimentação fica composta de 100.7 g·L⁻¹ lactose, 42 g·L⁻¹ AL, 21.4 g·L⁻¹ sorbitol e 16 g·L⁻¹ frutose.

Uma vez conhecido o caudal máximo da secção 1 ($Q_{1,LMS2} = 107.52 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), o tempo de permutação ($t_{LMS2}^* = 2.72 \text{ min}$) e o parâmetro $m_{4,LMS2}$ da unidade de LMS 2, a Figura 11 pode ser construída considerando as características das colunas da unidade de LMS 2 no sistema 1 (Tabela 6.3), e os dados de adsorção dos componentes da mistura (Tabela 6.2). A composição da mistura de alimentação desta unidade é de 100.7 g·L⁻¹ lactose, 21.4 g·L⁻¹ sorbitol e 16 g·L⁻¹ frutose (o AL será recuperado na unidade de LMS 1, e o grau de diluição do componente i ($= C_{X,i}/C_{Al,i}$, onde $i = L, S \text{ e } F$; $X = Ra, Ex$) pode ser utilizado como parâmetro de desempenho na avaliação do processo de separação na unidade de LMS 1). Podem ser consideradas as seguintes variáveis de desempenho de uma unidade de LMS,

- Produtividade (Pr_X) (g·L⁻¹·h⁻¹),

$$Pr_X = \frac{Q_X \frac{\int_0^{t^*} C_{X,i} dt}{t^*}}{N_{col} (1 - \varepsilon) V_C} \quad (6.49)$$

- Consumo de Eluente (cEl_X) (L·g⁻¹),

$$cEl_X = \frac{(Q_{X,Al} + Q_{El})}{Q_X \frac{\int_0^{t^*} C_{X,i} dt}{t^*}} \quad (6.50)$$

- Recuperação (Re_X) (%),

$$Re_X = \frac{Q_X \frac{\int_0^{t^*} C_{X,i} dt}{t^*}}{Q_{Al} C_{Al,i}} \quad (6.51)$$

- Pureza (Pu_X) (%),

$$Pu_X = \frac{\frac{\int_0^{t^*} C_{X,i} dt}{t^*}}{\sum_i \frac{\int_0^{t^*} C_{X,i} dt}{t^*}} \cdot 100 \quad (6.52)$$

A Figura 6.11a corresponde ao plano de separação m_{2LMS2} versus m_{3LMS2} (pureza superior a 99.9% em ambas as corrente de recuperação), com diferentes valores de m_{1LMS2} sendo fixados os valores de m_{4LMS2} e t^* , da unidade de LMS 2 para separar os componentes frutose e lactose, colectados na corrente de refinado, do componente sorbitol, que é recuperado na corrente de extracto. As limitações de transferência de massa das substâncias entre as fases líquida e estacionária neste processo adsorptivo, computadas através dos coeficientes globais de transferência de massa de cada substância, levam a uma redução da região triangular dada pela Teoria do Equilíbrio.

Os resultados da Figura 6.11a podem ser representados através do volume de separação $m_{1LMS2} \times m_{2LMS2} \times m_{3LMS2}$ – Figura 6.11b. Para o tempo de permutação em questão ($t^*_{LMS2} = 2.72\text{min}$), valores de m_{1LMS2} superiores a 2.4 acarretariam em caudais acima do máximo permitido considerando a maior queda de pressão possível na unidade; enquanto a aplicação de valores de m_{1LMS2} menores que 2.1 não possibilitam a recuperação de correntes de colecta com pureza superior ou igual a 99.9%. A maior produtividade e, por conseguinte, a maior razão $Q_{Al,LMS2}/Q_{El,LMS2}$ são alcançadas para o conjunto ($m_{1,LMS2} = 2.4$; $m_{2,LMS2} = 0.86$; $m_{3,LMS2} = 1.63$; $m_{4,LMS2} = 0.28$) com $t^* = 2.72 \text{ min}$ ($Pr_{LMS2} = 292.54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}$; $Q_{Al,LMS2}/Q_{El,LMS2} = 0.363$), dentre a gama de valores dos parâmetros m investigado. Neste ponto, as substâncias da corrente de refinado, para serem seguidamente reciclados ao reactor enzimático, são colectados com o menor grau de diluição ($=1.75$).

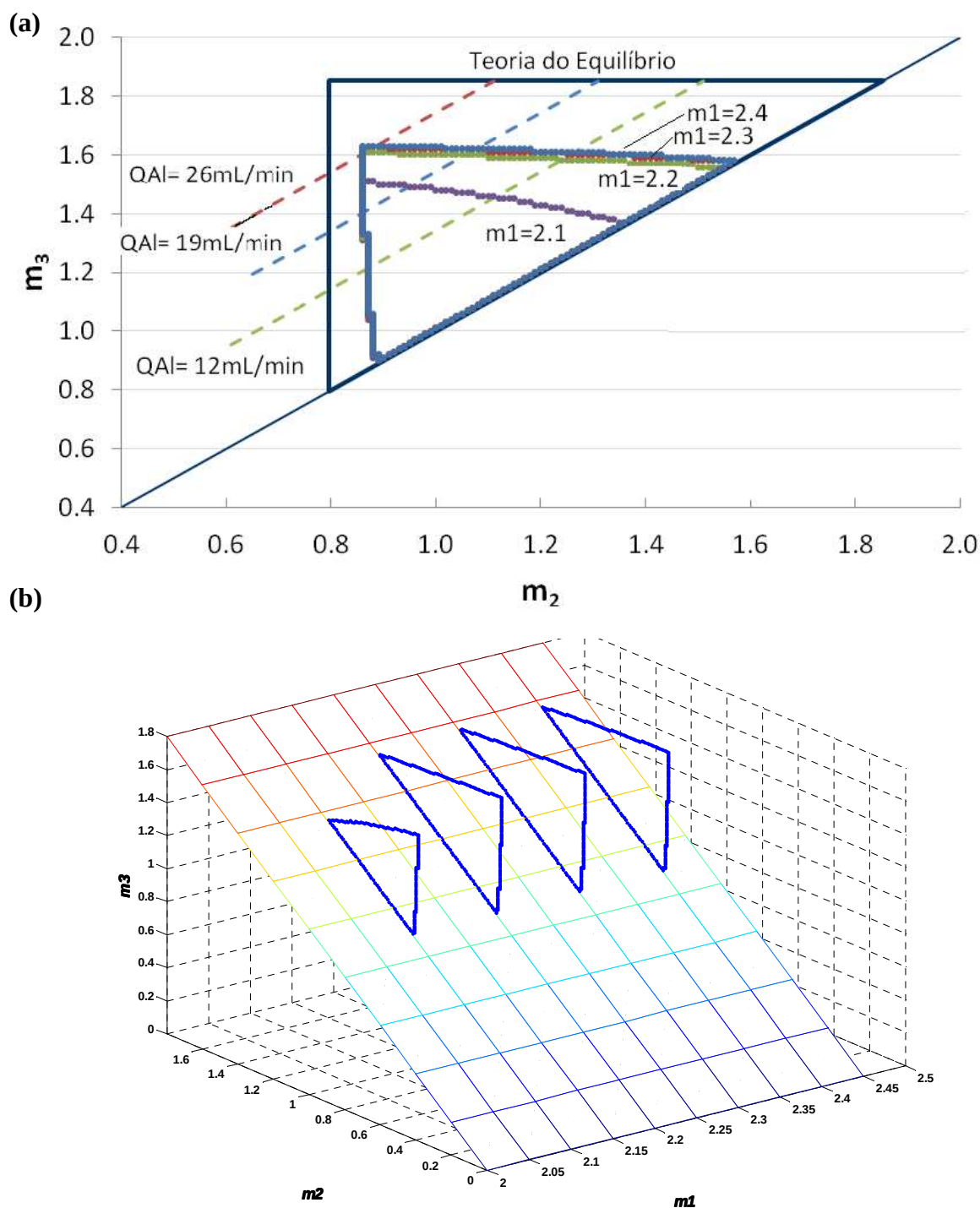


Figura 6.11 – (a) Plano de separação $m_{2,LMS2}$ versus $m_{3,LMS2}$ (pureza superior a 99.9%) para valores de $m_{1,LMS2}$ iguais a 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 ($t^*_{LMS2}=2.72\text{min}$; $m_{4,LMS2}=0.28$), da unidade de LMS 2 na separação de frutose e lactose (refinado) do sorbitol (extracto); (b) Volume de separação $m_{1,LMS2} \times m_{2,LMS2} \times m_{3,LMS2}$ ($t^*_{LMS2}=2.72\text{min}$; $m_{4,LMS2}=0.28$) da unidade de LMS 2.

Na Figura 6.11a, três linhas de operação que correspondem as condições de alimentação da unidade de LMS 2 de 12, 19 e 26 mL·min⁻¹ podem ser observadas. Caso se pretendesse operar com uma maior produtividade, a unidade de LMS 2 deveria ser alimentada com um caudal de 26 mL·min⁻¹. Isto significa que as condições de operação para a unidade de LMS 1 deveriam ser seleccionadas de tal forma que o caudal de extracto da referida unidade fosse igualmente 26 mL·min⁻¹. O mesmo vale para as outras condições de alimentação (linhas paralelas na Figura 6.11a) da unidade de LMS 2. É importante ressaltar que ao eleger a $Q_{Al,LMS2} = 26 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para a operação, esta não seria uma condição dita robusta uma vez que está muito próxima ao vértice da região de separação a 99.9%, e que qualquer instabilidade no sistema poderia levar a contaminações nas correntes de colecta; diferentemente do que ocorre para as outras duas condições de alimentação indicadas.

Com o valor de $Q_{Ex,LMS1}$, e usando a Eq. (6.34), as condições de operação para a unidade de LMS 1 podem ser calculadas em um domínio de $m_{2,LMS1}$ e $m_{3,LMS1}$ para um determinado valor de $m_{1,LMS1}$. Conforme mencionado anteriormente, assumindo um valor de $m_{1,LMS1}$, existirá uma relação entre $m_{2,LMS1}$ e o tempo de permutação t_{LMS1}^* de tal forma que para cada valor diferente de $m_{2,LMS1}$ um novo valor de t_{LMS1}^* será obtido de modo a manter o caudal de extracto constante – Eq.(6.48). O resultado pode ser representado conforme está na Figura 6.13a e b, que não deve ser confundido com uma típica área de separação dos componentes. Diferentemente de uma região de separação m_2 versus m_3 , que é construída baseada em um valor fixado de tempo de permutação, na Figura 6.13 cada linha vertical no plano de $m_2 \times m_3$ (composta de uma família de pontos) representa um conjunto de condições de operação com um tempo de permutação distinto e que permite a recuperação das substâncias com uma pureza acima de 99.9% em ambas as correntes de colecta. Esta observação também é válida para os resultados apresentados na Figura 6.14, no espaço tridimensional $m_1 \times m_2 \times m_3$, para as três diferentes condições de alimentação da unidade de LMS 2 em série com a unidade de LMS 1: 12, 19 e 26 mL·min⁻¹ (assumindo $m_{4,LMS1} = 0.046$).

A variação do valor do parâmetro m_4 , mantendo o valor de t^* fixado, altera o caudal de reciclo da unidade e, portanto, pode permitir uma economia de eluente ao assumir menores valores (tendo em atenção o valor mínimo para garantir o reciclo do eluente puro). Neste caso, um ligeiro aumento na razão de $Q_{Al,LMS2}/Q_{El,LMS2}$, igual a 0.368, pode ser conseguido para o conjunto ($m_{1,LMS2} = 2.4$; $m_{2,LMS2} = 0.86$; $m_{3,LMS2} = 1.63$; $m_{4,LMS2} = 0.31$); muito embora o grau de diluição da corrente de refinado diminua para 1.71, e uma leve queda na produtividade

($=292.41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) é verificada. Usando estas condições operacionais no processo de separação da unidade de LMS 2 ($Q_{EI} = 73.14 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{AI} = 26.95 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ra} = 46.19 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ex} = 53.89 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Re} = 34.37 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $t_{LMS2}^* = 2.72\text{min}$), o perfil de concentração média das substâncias nas secções da unidade de LMS 2, no estado cíclico estacionário, é apresentado na Figura 6.12.

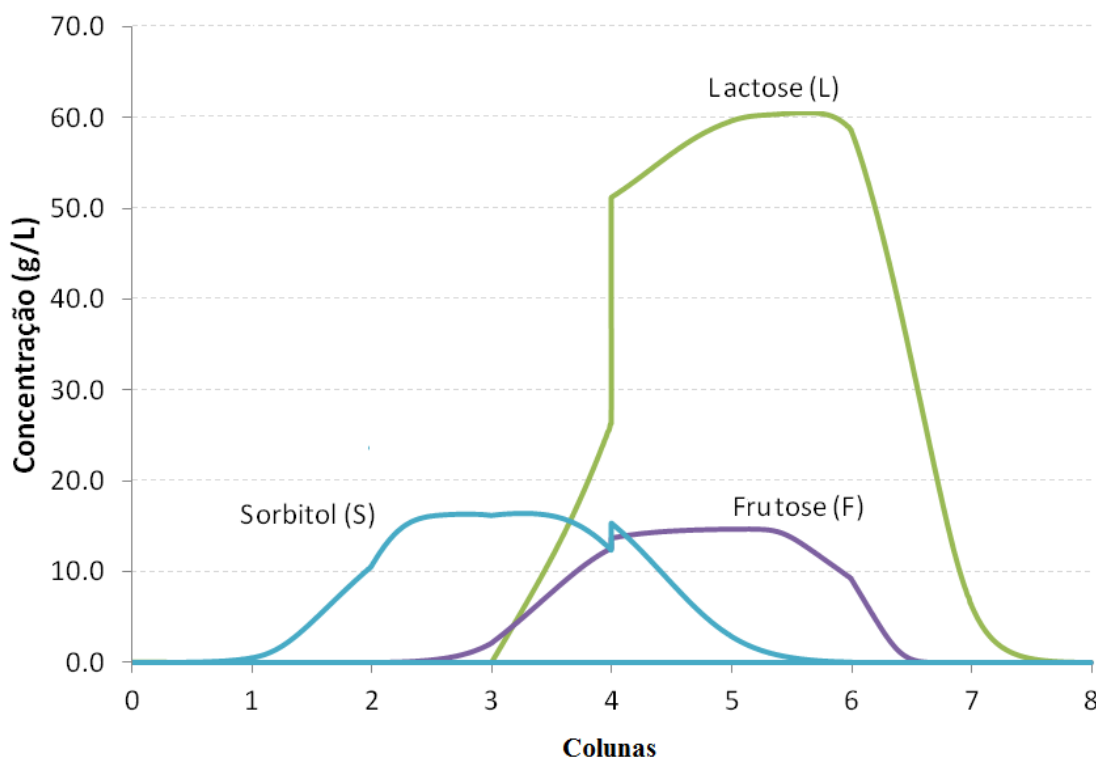


Figura 6.12 - Perfis de concentração média nas secções da unidade de LMS 2, no estado cíclico estacionário, na separação da mistura ternária (lactose, frutose e sorbitol) decorrente da corrente de extracto da unidade de LMS 1 ($Q_{EI} = 73.1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{AI} = 26.95 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ra} = 46.19 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ex} = 53.89 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Re} = 34.37 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $t_{LMS2}^* = 2.72\text{min}$). Propriedades na Tabela 6.3. Sorbitol recuperado no Extracto.

Apesar do conjunto de pontos poder ser agrupado sugerindo um volume que promove a separação com purezas de $>99.9\%$, este não deve ser confundido com o volume de separação no espaço $m_1 \times m_2 \times m_3$ quando o tempo de permutação permanece constante. De qualquer modo, verifica-se que o conjunto de condições operacionais para a operação da unidade de LMS1, que possibilitam a separação de AL das demais substâncias – frutose,

sorbitol e lactose – com alta pureza nas correntes de saída, torna-se menor a medida que há um requerimento sobre maiores caudais de extrato na unidade.

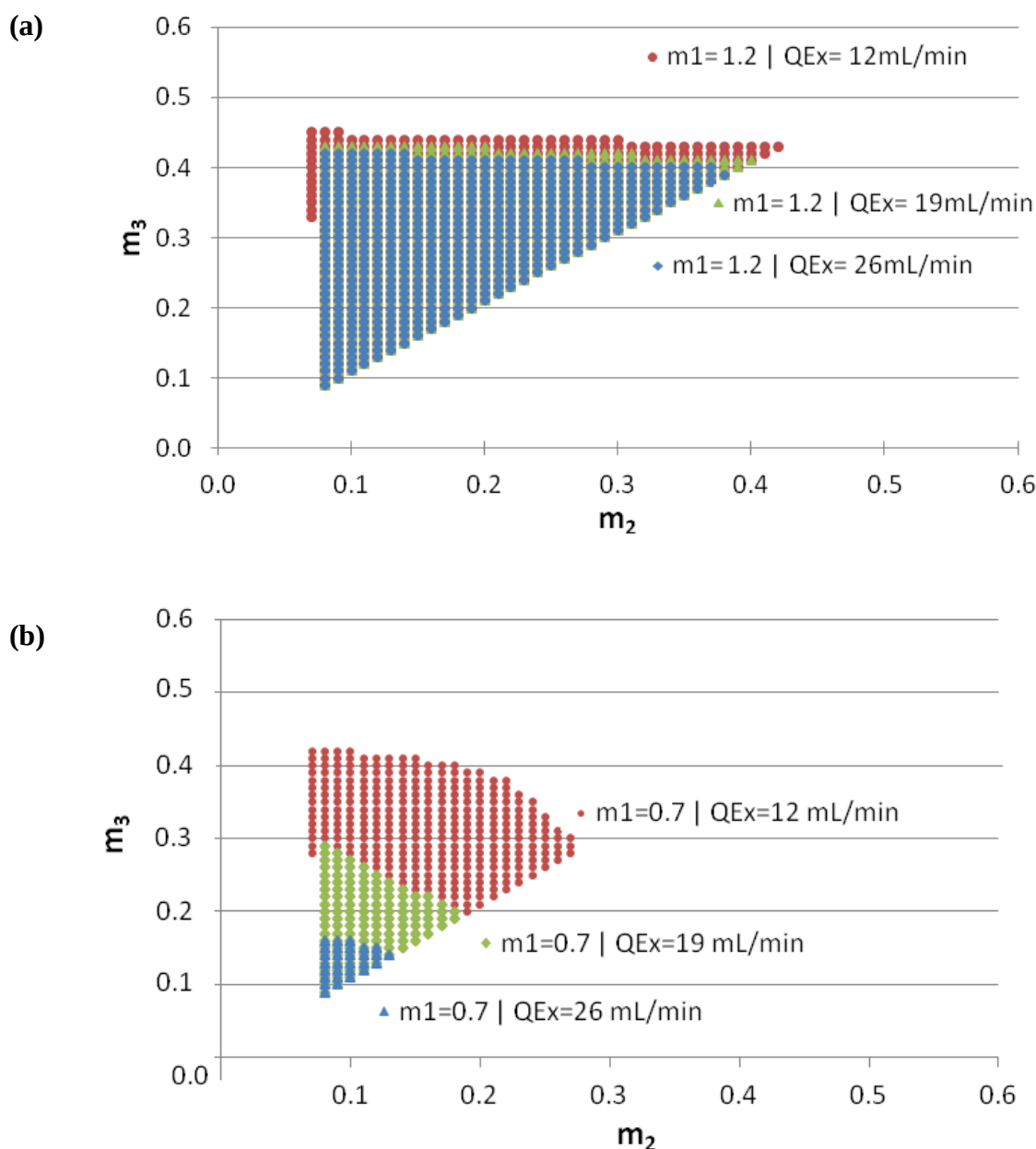


Figura 6.13 – Condições de operação no plano $m_{2,LMS1}$ versus $m_{3,LMS1}$ com distintos tempos de permutação para cada valor do parâmetro $m_{2,LMS1}$, permitindo a separação de AL de (F+S+L) com pureza $>99.9\%$ nas correntes de colecta. Comparação de três caudais de extracto na unidade de LMS 1: 12, 19 e 26 mL/min. (a) $m_{1,LMS1} = 1.2$; (b) $m_{1,LMS1} = 0.7$.

A Figura 6.13a apresenta resultados quando um valor de $m_{1,LMS1}$ igual a 1.2 é assumido, enquanto a Figura 6.13b apresenta linhas de separação para um valor de $m_{1,LMS1}$ de 0.7 sendo este o limite mínimo obtido para se recuperar as substâncias com uma pureza superior a 99.9%. A comparação entre os resultados das duas figuras no que se refere ao valor de $m_{1,LMS1}$ (para um mesma condição de $Q_{Ex,LMS1}$) revela que um valor maior para este parâmetro permite um domínio mais amplo de condições de operação que acarretam em pureza $> 99.9\%$. Neste caso, o parâmetro $m_{2,LMS1}$ pode assumir valores maiores uma vez que o aumento sentido no tempo de permutação, calculado pela Eq. (6.48), não causa contaminação das correntes de colecta das substâncias.

Em ambas as Figuras 6.13a e 6.13b também são mostradas as condições de operação para quando um determinado caudal de extracto é requerido para alimentar a unidade de LMS 2 (em um modo de operação que não permite acúmulo entre as duas unidades separativas). É verificado que a aplicação ou o requerimento de maiores caudais de extracto na unidade de LMS 2 reduz o domínio de condições de operação que promovem uma recuperação de substâncias com 99.9% de pureza. A explicação segue o raciocínio anterior, isto é, ao diminuir o caudal de $Q_{Ex,LMS1}$, para um fixado valor de $m_{1,LMS1}$ e $m_{2,LMS1}$, ocorrerá um incremento no valor do tempo de permutação (que resulta em um maior deslocamento de todas as frentes de concentração no sentido da fase líquida) cujo aumento pode ocasionar a contaminação da corrente de refinado, principalmente (ao confrontarmos uma mesma condição de $m_{3,LMS1}$).

Considerando a operação da unidade de LMS 1 e os resultados apresentados na Figura 6.14, a Tabela 6.4 mostra o conjunto de parâmetros do espaço tridimensional $m_{1,LMS1} \times m_{2,LMS1} \times m_{3,LMS1}$ ($m_{4,LMS1}=0.046$) que leva a maior produtividade e ao menor consumo de eluente na separação com um determinado requerimento de caudal na corrente de extracto. Apesar da maior produtividade conseguida para a unidade operando com um valor de $Q_{Ex} = 26\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, esta condição acarreta em uma maior diluição dos produtos colectados nesta corrente de saída.

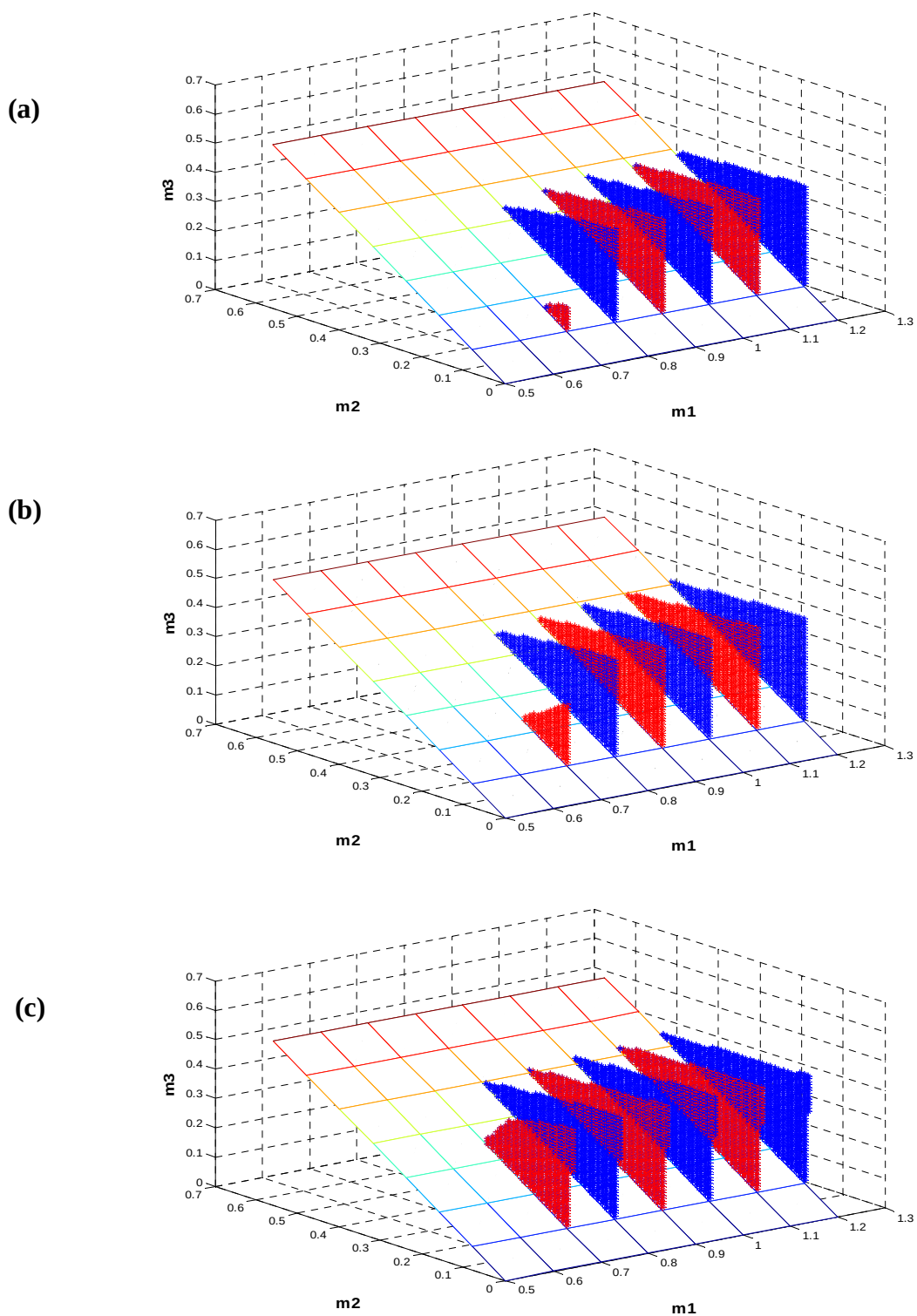


Figura 6.14 – Condições de operação no espaço $m_{1,LMS1} \times m_{2,LMS1} \times m_{3,LMS1}$ com distintos tempos de permutação para cada valor do parâmetro $m_{1,LMS1}$ e $m_{2,LMS1}$, permitindo a separação de AL de (F+S+L) com pureza $>99.9\%$ nas correntes de colecta. Caudais de extracto na saída da unidade de LMS1: (a) $26 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, (b) $19 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e (c) $12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tabela 6.04 – Variáveis de desempenho para os parâmetros $m_{1,LMS1}$, $m_{2,LMS1}$ e $m_{3,LMS1}$ ($m_{4,LMS1}=0.046$) com maior produtividade e menor consumo de eluente na separação de AL da fracção (F+L+S) para diferentes caudais de extracto.

Q_{Ex} (mL·min ⁻¹)	m_1	m_2	m_3	t^*	Pr		$Cons.El.$		Q_{AL}/Q_{El}	Grau Dil.	
				(min)	(g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)		(L·g ⁻¹)			AL	L+S+F
					AL	L+S+F	AL	L+S+F			
12	0.7	0.07	0.42	2.74	39.3	131.8	0.069	0.021	0.54	1.09	1.81
19	0.8	0.08	0.41	1.98	52.3	172.2	0.078	0.023	0.44	1.10	2.19
26	0.8	0.08	0.40	1.45	69.4	228.5	0.080	0.024	0.42	1.11	2.25

Na análise realizada até agora sobre o sistema de duas unidades de LMS em cascata (duas fases estacionárias diferentes), tem sido considerado que não há acúmulo e que a corrente de extracto da unidade de LMS 1 deve alimentar a unidade de LMS 2. Para estabelecer a composição da corrente de alimentação da unidade de LMS 2 foi admitida a mesma concentração das substâncias na entrada da unidade de LMS 1. Uma vez que se trata de um caso linear de adsorção das substâncias sobre a fase estacionária, pode-se afirmar que caso seja mantida a proporção das substâncias na composição da solução de alimentação, os gráficos de $m_{2,LMS1} \times m_{3,LMS1}$ e $m_{1,LMS1} \times m_{2,LMS1} \times m_{3,LMS1}$ deverão ser iguais àqueles discutidos. No caso da conexão directa entre as duas unidades de LMS, a estratégia de obtenção das condições de operação no sistema para as duas unidades poderia ser conforme o fluxograma da Figura 6.15, tomando como condições restritivas as purezas das substâncias nas correntes de colecta das duas unidades.

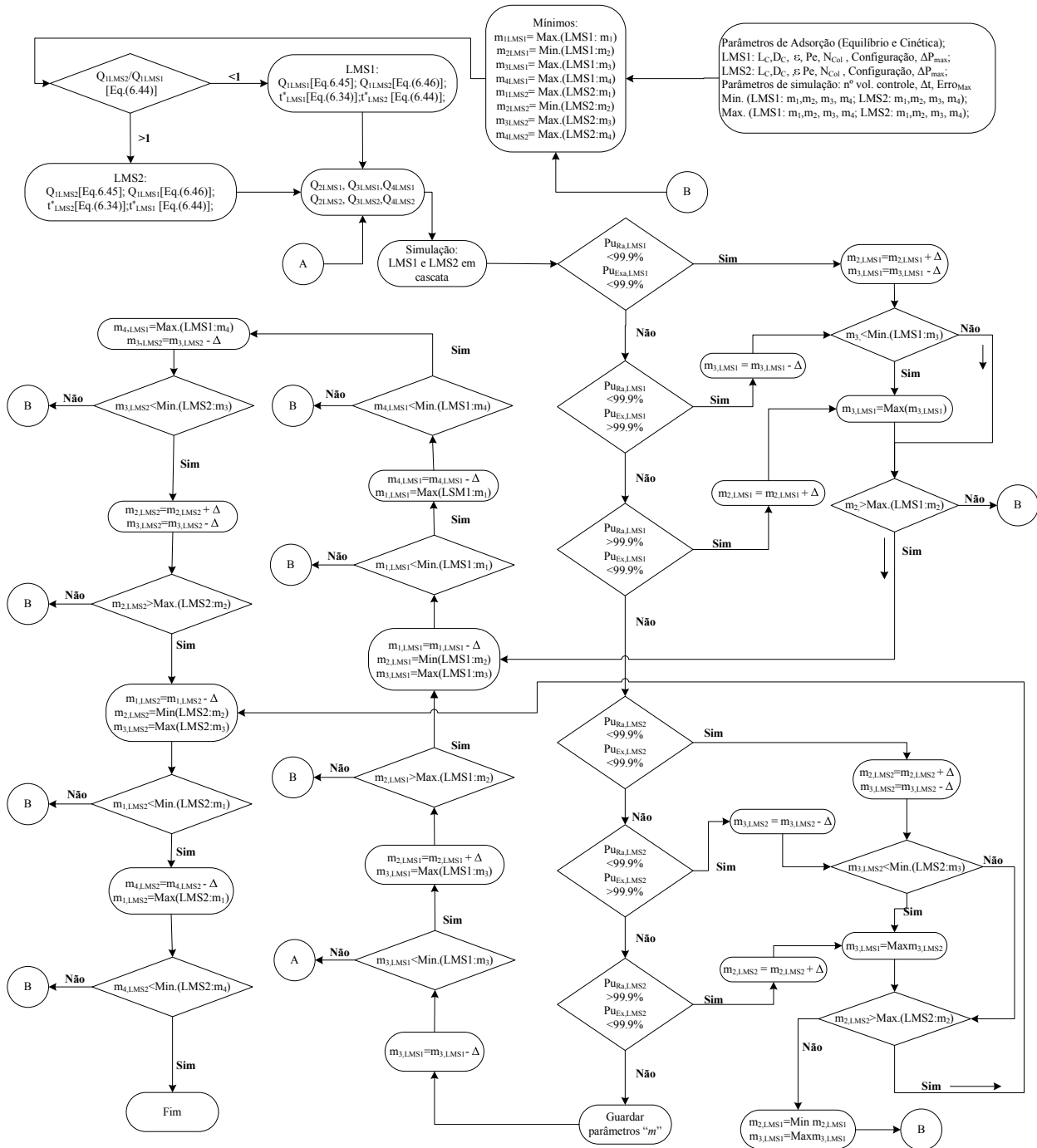


Figura 6.15 – Fluxograma da estratégia de obtenção das condições de operação no sistema de conexão directa entre as duas unidades de LMS. Condições restritivas baseadas nas purezas nas correntes de colecta das duas unidades.

Os parâmetros de entrada para a metodologia proposta no fluxograma dizem respeito à: propriedades das colunas das duas unidades de LMS (características geométricas e de empacotamento; limite de queda de pressão nas colunas; número de colunas e configuração nas unidades); parâmetros de equilíbrio e cinética de adsorção; máximo e mínimo valor da razão entre os fluxos de líquido e de sólido (parâmetros m); que podem ser estabelecidos através da teoria de equilíbrio e parâmetros de simulação (número de volumes de controle, passo de tempo de integração e erro máximo permitido para o balanço mássico global de conservação das substâncias na unidade). Usando o conjunto de equações já apresentado anteriormente, é possível determinar as condições de operação para as duas unidades de LMS operarem em cascata com conexão directa, isto é, na ausência de operações unitárias entre as duas unidades. A Tabela 6.5 apresenta os pares (m_2, m_3) para as duas unidades, assim como os respectivos tempos de permutação calculados, os quais possibilitam as melhores condições baseadas em diferentes funções objectivo (produtividade, consumo de eluente para recuperação das substâncias, grau de diluição em determinada corrente de recuperação), para o caso de se manter as condições nas secções 1 e 4 de ambas as unidades de forma que m_1 e m_4 da unidade de LMS 1 sejam 0.7 e 0.046, respectivamente, e da unidade de LMS2 sejam 2.4 e 0.28, respectivamente.

Segundos os dados da Tabela 6.5, dependendo da função objectivo que se deseja maximizar, ou minimizar para os casos de consumo de eluente ou de grau de diluição dos compostos nas correntes de recuperação, diferentes conjuntos de parâmetros devem ser seleccionados. O conjunto de parâmetros da condição de operação 1 (C.Op.1) resulta o melhor desempenho em termos de produtividade na separação, considerando as duas unidades de LMS. É também sob estas condições, que a unidade de LMS 2 opera com um menor consumo de eluente. Nas condições de C.Op.2, as fracções colectadas na corrente de extracto tem o menor grau de diluição, assim como na corrente de refinado da unidade de LMS 1, e ainda agrega um menor consumo de eluente na unidade de LMS 1, no entanto os valores de produtividade decrescem em torno de 70% (o tempo de permutação na unidade de LMS 1 é bastante largo) em comparação a condição de C.Op.1. A condição 3 possibilita a recuperação de produtos com menor grau de diluição na unidade de LMS 1 mantendo altas as produtividades enquanto que a condição 4 leva ao mais concentrado produto de refinado no LMS1 com o melhor desempenho possível em termos de produtividade na unidade LMS 2.

Tabela 6.05 – Condições de operação e variáveis de desempenho para o sistema de duas unidades de LMS em cascata (Tabela 6.3). Metodologia do fluxograma da Figura 6.15.

C.Op.	<i>LMS1</i>	<i>LMS2</i>	<i>t</i> [*] _{<i>LMS1</i>} (min)	<i>t</i> [*] _{<i>LMS2</i>} (min)	<i>Pr</i> (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)		<i>Pr</i> (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	
	(0.7; <i>m</i> ₂ ; <i>m</i> ₃ ; 0.046)	(2.4; <i>m</i> ₂ ; <i>m</i> ₃ ; 0.28)			<i>LMS 1</i>		<i>LMS 2</i>	
					AL	L+S+F	L+F	S
1	0.07; 0.39	0.96; 1.41	2.090	2.722	47.13	158.16	73.30	13.43
2	0.07; 0.46	0.97;1.07	9.405	2.722	12.82	42.75	19.82	3.64
3	0.07; 0.40	0.97; 1.40	2.187	2.722	46.47	155.84	72.23	13.23
4	0.07; 0.46	0.96; 1.07	8.550	2.722	14.10	47.02	21.80	4.00

C.Op.	<i>Cons.El.</i> (L·g ⁻¹)				Concentração média (g·L ⁻¹), na corrente de saída			
	<i>LMS 1</i>		<i>LMS 2</i>		<i>LMS 1</i>		<i>LMS 2</i>	
	AL	L+S+F	L+F	S	AL	L+S+F	L+F	S
1	0.0742	0.3644	0.8195	0.5273	38.17	69.96	23.54	10.86
2	0.0649	0.3197	2.5981	1.6812	38.84	85.10	9.11	13.23
3	0.0726	0.3569	0.8507	0.5475	38.28	72.14	23.40	11.19
4	0.0649	0.3197	2.3733	1.5353	38.84	85.08	10.01	13.23

* O consumo de eluente na corrente com mais de um componente é apresentado como a soma total da variável de desempenho *c.El* de cada componente.

Uma outra forma de se abordar o problema seria considerar o sistema em cascata permitindo que as duas unidades pudessem operar na condição de máximo caudal na secção 1 (segundo seus respectivos limites máximos de queda de pressão). Deve ser mencionado, que a máxima produtividade não é necessariamente encontrada na condição de máxima queda de pressão no sistema. Além disso, uma alta queda de pressão pode aumentar o custo de investimento de uma unidade de separação (bombas, controladores, válvulas, etc). Nesta estratégia é necessário levar em conta o máximo caudal de alimentação admitido na unidade

de LMS 2 e, portanto, o caudal de extracto obtido na operação da unidade de LMS 1 sob a condição de máxima queda de pressão na secção 1. Para que não ocorra acúmulo entre as operações da unidade de LMS 1 e de LMS 2, o excesso de efluente colectado na corrente de extracto da unidade de LMS 1 deverá ser evaporado em uma taxa ajustada ao caudal de alimentação da segunda unidade. Seguindo o procedimento anteriormente adoptado para a unidade de LMS 2, quando foram estabelecidas as suas condições de operação assumindo a máxima queda de pressão permitida, pode-se definir um valor para o tempo de permutação para a unidade de LMS 1 de 1.0 min (tempo de retenção de frutose, composto de maior afinidade com a fase estacionária, no máximo caudal permitido na secção 1 desta unidade é de 0.65min). O conjunto de parâmetros m que fornecem o melhor desempenho em termos de produtividade, consumo de eluente (razão Q_{Al}/Q_{El}) e grau de diluição dos compostos na corrente de extracto (para redução de gastos em etapas intermediárias, como a evaporação ou concentração com membranas) é ($m_{1,LMS1} = 0.8$; $m_{2,LMS1} = 0.07$; $m_{3,LMS1} = 0.37$; $m_{4,LMS1} = 0.055$) com t^*_{LMS1} igual a 1.0min. Os respectivos valores são $309.96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, $0.025 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$ (0.403), e 2.44. A Figura 6.16 apresenta os perfis de concentração média dos compostos nas secções da unidade de LMS 1 utilizando as referidas condições de operação ($Q_{El,LMS1} = 38.92 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Al,LMS1} = 15.67 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ra,LMS1} = 16.45 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Ex,LMS1} = 38.14 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; $Q_{Re,LMS1} = 30.00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

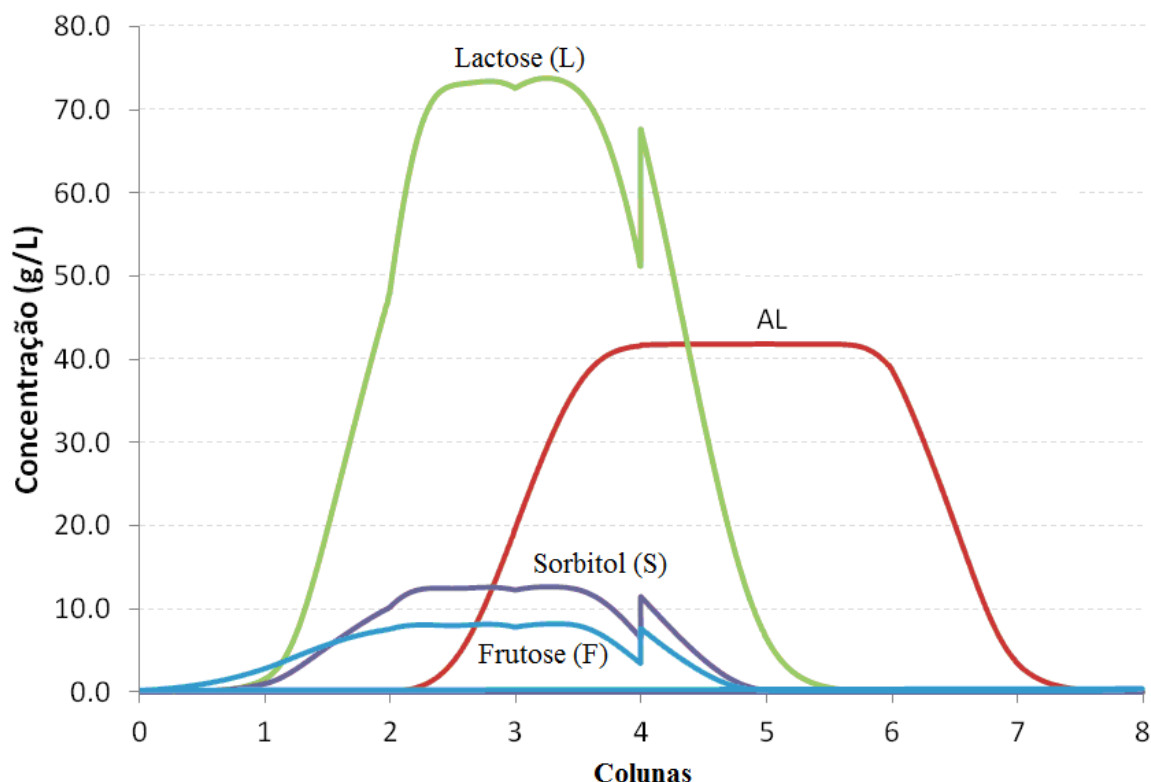


Figura 6.16 – Perfis de concentração média nas secções da unidade de LMS 1, no estado cíclico estacionário, na separação de ácido lactobiónico da fracção composta por lactose, frutose e sorbitol, mistura decorrente do processo de oxidação de lactose usando GFOR/GL ($Q_{EILMS1} = 38.92 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $Q_{AILMS1} = 15.67 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $Q_{RaLMS1} = 16.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $Q_{ExLMS1} = 38.14 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $Q_{ReLMS1} = 30.00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $t^*_{LMS1} = 1.0 \text{ min}$). Propriedades na Tabela 6.3. AL recuperado no refinado.

6.4.2.2 Sistema 3

Como verificado anteriormente, a afinidade do AL (na forma de lactobianato de potássio) com a fase estacionária é consideravelmente menor que a afinidade demonstrada pelas outras substâncias da mistura quaternária, de tal forma que uma coluna cromatográfica poderia ser empregada para realizar a sua recuperação. Diferentemente do sistema 2, esta operação leva a um processo descontínuo para a separação de AL dos demais componentes (L+F+S), cujo princípio é ilustrado na Figura 6.17. A mistura é injectada durante um período de tempo (t_{inj}) na unidade e, posteriormente, é eluída com um determinado caudal (Q_{Elu}) de

forma a permitir a separação das substâncias ao final do comprimento da coluna cromatográfica. Nesta condição são explorados os mecanismos de interação entre as substâncias, o eluente e a fase estacionária (modos de separação).

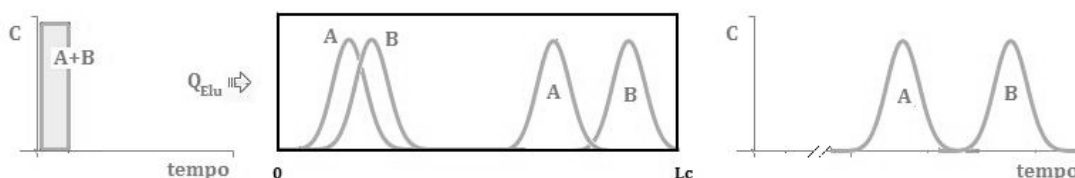


Figura 6.17 - Princípio de operação no processo cromatográfico de eluição.

Os esquemas apresentados para o sistema 2 e 3 podem ser confrontados fazendo a comparação entre o desempenho da primeira unidade de LMS do sistema 2 e o desempenho apresentado pela coluna cromatográfica, uma vez que a segunda unidade de LMS do sistema 2 permanece no arranjo sugerido para o sistema 3. Alguns trabalhos sobre a comparação entre os processos descontínuos e os processos contínuos usando a tecnologia de LMS têm sido publicados (Heuer *et al.*, 1997; Strube *et al.*, 1998; Jupke *et al.*, 2002). É amplamente conhecido que a produtividade de processos em LMS é superior àquela obtida pela cromatografia de eluição, além das substâncias serem recuperadas com menor grau de diluição. No entanto, muitas questões relacionadas com a decisão de escolher um ou outro modo de operação ainda aparecem quando se reflecte sobre outros aspectos associados ao processo global de separação (flexibilidade do sistema, investimento inicial, custos de operação, custos de adsorvente e eluente, etc). A definição do processo mais vantajoso dependerá sempre de um estudo bastante aprofundado das diversas variáveis que poderiam ser relevantes em um processo específico, recorrendo a ferramentas de simulação numérica e optimização. Neste trabalho, um procedimento de optimização sobre a operação de uma coluna cromatográfica aplicada na separação quaternária considerada é realizado. Os seus parâmetros de desempenho optimizados podem ser usados para comparar e, portanto, conhecer as discrepâncias entre o uso destas duas tecnologias no que diz respeito ao desempenho de separação.

Os parâmetros a serem optimizados em um processo cromatográfico realizado em coluna são: parâmetros geométricos (comprimento, L_D e diâmetro, D_D), tempo de injeção

(t_{inj}), tempos de colecta das fracções e caudal de eluição. Em geral, na optimização de um processo descontínuo, o comprometimento entre a máxima produtividade, a alta recuperação e a elevada pureza das substâncias é o maior desafio, uma vez que os máximos valores de uma destas variáveis de desempenho são alcançados em detrimento das outras. A coluna cromatográfica avaliada neste sistema é definida como sendo a unidade de LMS 1, em circuito aberto, mantendo as características listadas na Tabela 6.3 (obviamente, a configuração da unidade de LMS não tem aplicação neste caso). Desta forma, o volume de adsorvente e as colunas empregadas em ambas as operações permanecem. As concentrações das substâncias na alimentação são aquelas definidas anteriormente para o sistema 2: 100.7 g·L⁻¹ lactose, 42 g·L⁻¹ AL, 21.4 g·L⁻¹ sorbitol e 16 g·L⁻¹ frutose.

Os parâmetros de desempenho na separação do componente i através do processo descontínuo são definidos conforme a seguir:

- Productividade (Pr_D):

$$Pr_{D,i} = Q_{Elu} \frac{\int_{t_0}^{t_f} C_i(t) dt}{t_{ciclo} V_{ads}} \quad (6.53)$$

- Consumo de eluente (CEL_D):

$$CEL_{D,i} = \frac{t_{ciclo}}{\int_{t_0}^{t_f} C_i(t) dt} \quad (6.54)$$

- Pureza (Pu_D):

$$Pu_{D,i} = \frac{\int_{t_0}^{t_f} C_i(t) dt}{\sum_i \int_{t_0}^{t_f} C_i(t) dt} \quad (6.55)$$

- Recuperação (Re_D):

$$Re_{D,i} = \frac{Q_{Elu} \int_{t_0}^{t_f} C_i(t) dt}{V_{inj} C_{Al,i}} \quad (6.56)$$

onde C_i é a concentração da substância i , V_{inj} é o volume de injeção durante o carregamento da coluna, $C_{Al,i}$ é a concentração da substância i na solução de alimentação, t_{ciclo} é o tempo de um ciclo do processo descontínuo, t_f e t_0 são o tempo inicial e final, respectivamente, de colecta da substância i .

A função objectivo (F_{obj}) empregada nesta metodologia de optimização é a maximização da soma da produtividade das duas fracções colectadas (fracção 1: AL; fracção 2: L+S+F),

$$F_{obj} = \text{maximize } Pr_{D,AL} + Pr_{D,L+F+S} \quad (6.57)$$

Em todos os casos, as duas fracções colectadas estão sujeitas a seguinte restrição de pureza,

$$Pu_{D,i} - Pu_{D,i}^{requerida} \geq 0 \quad (6.58)$$

onde a variável $Pu_{D,i}^{requerida}$ refere-se a pureza requerida na recuperação do componente i .

Esta variável é definida como 99.9% para as duas fracções a serem colectadas. No caso da colecta da fracção composta pelos três componentes, a pureza é sempre determinada assumindo a soma da massa dos três componentes naquela fracção. A recuperação das substâncias nas referidas fracções é também garantida assumindo que o tempo para a colecta de cada fracção está condicionado pelo valor da concentração da substância no início ($>10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e no fim ($<10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) da colecta. O processo de separação na coluna cromatográfica é optimizado no que diz respeito as variáveis tempo de ciclo (t_{ciclo}) e tempo de injeção (t_{inj}), sendo este problema resolvido com o auxílio da subrotina de optimização IPOPT 3.5.4 (Kawajiri e Biegler, 2006a; Kawajiri e Biegler, 2006b).

A Figura 6.18 apresenta os valores optimizados de t_{ciclo} e t_{inj} em função do caudal de eluição aplicado ao processo de separação em coluna. É verificado que ocorre um determinado valor de caudal de eluição onde a produtividade alcança um valor máximo. Em maiores caudais de eluição, apesar da razão (Q_{Elu}/t_{ciclo}) ser monotonicamente crescente, a massa injectada na coluna (e recuperada ao final do ciclo) torna-se muito menor, provocando um decréscimo significativo na produtividade. Sob condições de baixos caudais de eluição, a carga de alimentação na injeção pode assumir maior valor, entretanto o tempo de ciclo é aumentado significativamente e, conseqüentemente, obtendo-se uma produtividade reduzida.

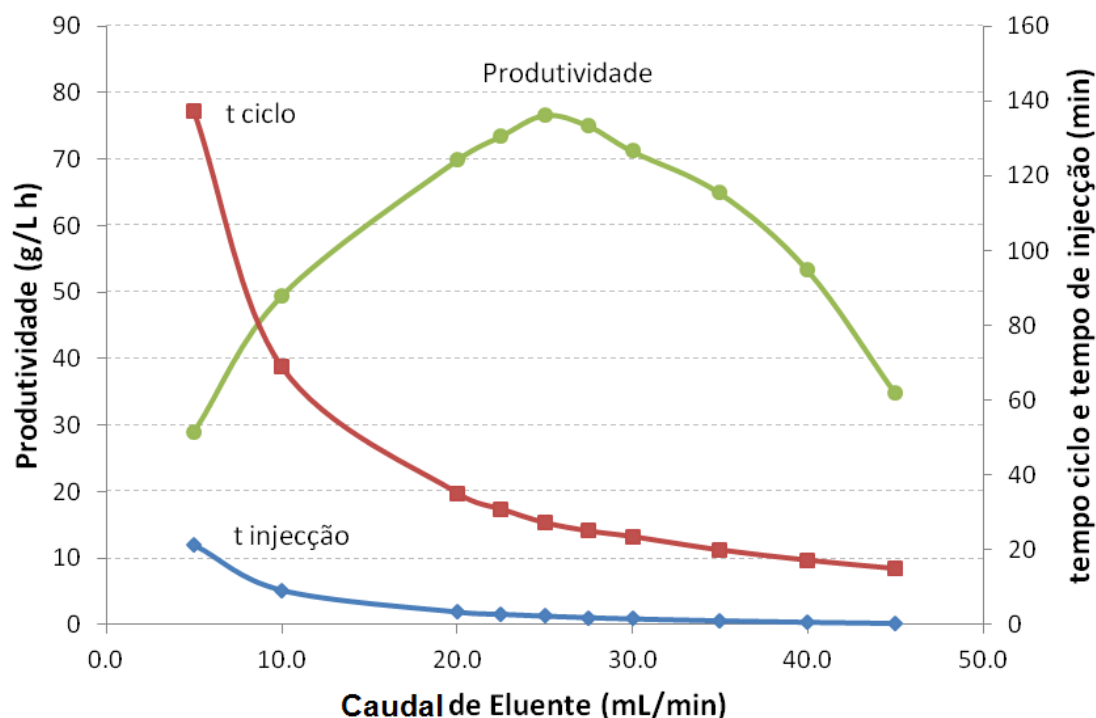


Figura 6.18 – Produtividade total máxima para valores otimizados de t_{ciclo} e t_{inj} em função do caudal de eluição no processo descontínuo de separação de ácido lactobionico da fracção contendo lactose, frutose e sorbitol. Características da coluna: $L_D=1.2$ m; $D_D=0.026$ m; $\varepsilon=0.34$; $Pe=700$.

A Figura 6.19a apresenta o perfil de concentração das substâncias da mistura quaternária ao longo da coluna cromatográfica nas seguintes condições: $t_{ciclo} = 27.23$ min, $t_{inj} = 2.27$ min e $Q_{Elu} = 25.0$ mL·min⁻¹. A Figura 6.19b mostra o perfil de concentração da primeira fracção, relativa a recuperação do AL, no intervalo de tempo de colecta do primeiro ciclo do processo; enquanto a Figura 6.19c ilustra a colecta da fracção composta pela mistura de lactose, sorbitol e frutose que, mais tarde, será empregada para alimentar a unidade de LMS 2. O esquema da Figura 6.19d mostra que enquanto a colecta da segunda fracção ainda está ocorrendo, a coluna já está sendo carregado com uma nova injeção da solução de alimentação. Esta estratégia é utilizada para maximizar a produtividade, com a redução do tempo de ciclo do processo descontínuo.

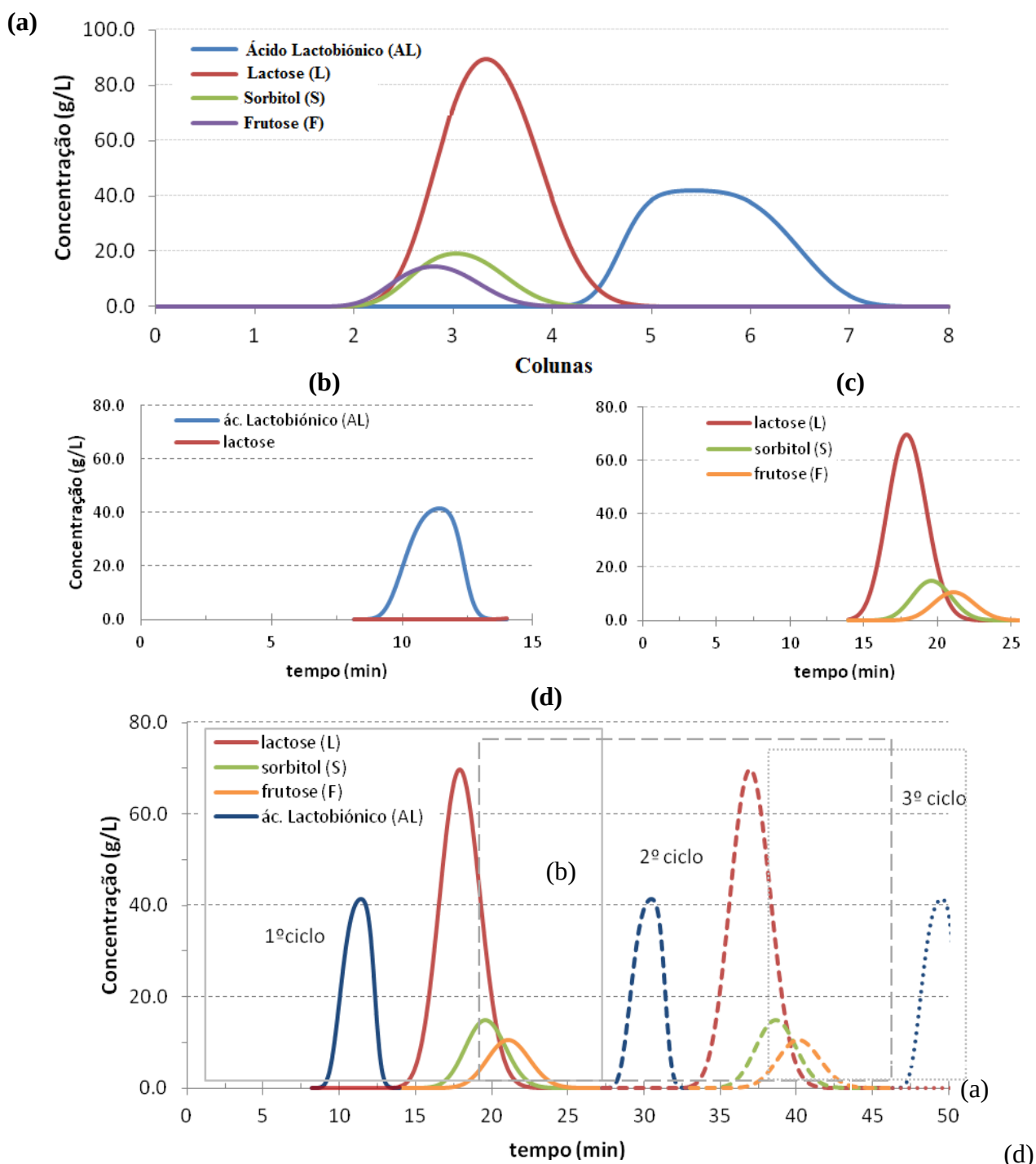


Figura 6.19 – (a) Perfil de concentração das substâncias da mistura quaternária ao longo da coluna cromatográfica (8 colunas da unidade de LMS 1) no tempo igual a 8.17min; (b) e (c) Perfil de concentração da primeira e segunda fracção, respectivamente, no intervalo de tempo de colecta no primeiro ciclo do processo. (d) Ciclos de operação da colunas cromatográfica nas condições: $t_{ciclo} = 27.23\text{min}$, $t_{inj} = 2.27\text{ min}$ e $Q_{Elu} = 25.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Tabela 6.6 apresenta uma comparação entre os parâmetros de operação e de desempenho obtidos para a separação de AL da fracção composta de lactose, frutose e sorbitol realizada na unidade de LMS 1 do sistema 2 e na coluna cromatográfica do sistema 3. Deve ser considerada a relação entre a carga de alimentação admitida, de forma contínua, em uma unidade de LMS e aquela introduzida, de forma descontínua, em um ciclo da coluna cromatográfica, de forma que:

$$Q_{LMS1} C_{Al,i} = Q_{coluna} \frac{t_{inj}}{t_{ciclo}} C_{Al,i} \quad (6.59)$$

Ao comparar o desempenho obtido pela coluna cromatográfica, em condições óptimas, com o desempenho da unidade de LMS 1 operando nas melhores condições operacionais obtidas no item 6.4.2.1, comprova-se a superioridade da tecnologia de LMS de tal forma que:

- ✓ a sua produtividade é cinco vezes superior a do processo descontínuo;
- ✓ os componentes recuperados estão 2.4 vezes mais concentrados;
- ✓ o consumo de eluente é, aproximadamente, três vezes menor para recuperar o AL e duas vezes para recuperar a fracção dos demais componentes;

A menor recuperação observada para o AL deve-se ao fato que na determinação dos parâmetros m da unidade de LMS 1 foi aplicada a restrição sobre a pureza das correntes de colecta (acima de 99.9%), e nenhuma restrição foi dirigida sobre a recuperação das substâncias nas correntes.

Por outro lado, quando a unidade de LMS 1 opera com a mesma carga de alimentação fornecida para a coluna cromatográfica, as melhores condições de operação (C.Op. 2) conduzem a uma menor produtividade que o sistema descontínuo, cerca de 1.4 vezes menor. Esta constatação também tem sido verificada por Strube (1998) na avaliação da separação de glicose e frutose. Os resultados numéricos revelaram que se o processo descontínuo não opera sobre o princípio de bandas de concentração conectadas na colecta das diferentes fracções, esta diferença não ocorre e as produtividades são praticamente iguais. Apesar da diferença notada sobre a produtividade, o desempenho da unidade de LMS no que

diz respeito ao gasto de eluente e grau de diluição dos componentes ainda permanece superior sobre as condições de operação mostradas para C.Op.2.

Tabela 6.06 – Parâmetros de operação e de desempenho para a separação de AL da fracção (lactose+frutose+sorbitol) na unidade de LMS 1 (sistema 2) e na coluna cromatográfica (sistema 3).

Características		Col. Cromatog. (sistema 3)	Unidade de LMS 1 (sistema 2)	
			C.Op. 1	C.Op. 2
L (m) x D (m)		1.2 x 0.026	0.15 x 0.026	0.15 x 0.026
Nº colunas		1	8 (2/2/2/2)	8 (2/2/2/2)
Q_{Elu} (mL/min)		25.0	*	*
t_{inj} (min)		2.27	*	*
t_{ciclo} (min)		27.23	*	*
Q_{Al} (mL/min)		*	15.67	2.08
Q_{El} (mL/min)		*	38.92	4.56
Q_{Ex} (mL/min)		*	38.14	4.24
Q_{Ra} (mL/min)		*	16.45	2.40
t^* (min)		*	1.0	7.5
Variáveis de desempenho				
Pureza (%)	AL	99.9	99.9	99.9
	L+S+F	100	99.9	99.9
Recuperação (%)	AL	99.5	97.8	99.9
	L+S+F	99.5	99.9	99.8
Produtiv. (g/L h)	AL	17.89	91.92	12.58
	L+S+F	58.76	309.96	41.35
Cons. Eluente (L/g)	AL	0.286	0.085	0.076
	L+S+F	0.061	0.025	0.023
Grau de Diluição	AL	2.57	1.08	1.15
	L+S+F	5.79	2.44	2.04

6.4.2.3 Sistema 4

O arranjo sugerido para sistema 4 explora o potencial da tecnologia de pseudo-LMS para separar a mistura de lactose, frutose e sorbitol que decorre da primeira unidade de separação quer seja uma unidade de LMS ou uma coluna cromatográfica do processo descontínuo. A diferença ao se aplicar a unidade pseudo-LMS ao invés da unidade de LMS está no fato de possibilitar a separação das três substâncias em três distintas correntes de colecta, uma vez que a tecnologia de pseudo-LMS contempla a recuperação de um componente de afinidade intermediária com a fase estacionária. Nesta avaliação, as características da unidade de LMS 2 do sistema 2 (Tabela 6.3) são tomadas para definir a unidade de pseudo-LMS.

As correntes de entrada e saída, sem considerar a etapa de operação em vigor, dividem a unidade em quatro secções (muito embora, durante a etapa 1, há somente duas secções, com dois diferentes caudais ($Q_{1,S1} = Q_{2,S1}$ e $Q_{3,S1} = Q_{4,S1}$), e, durante a etapa 2, existem três secções com os caudais $Q_{1,S2}$, $Q_{2,S2} = Q_{3,S2}$ e $Q_{4,S2}$ (ver Figuras 6.8 e 6.9). Cada secção tem uma ou mais colunas e, neste caso, haverá duas colunas por secção na unidade. Durante a etapa 1, a secção 3 é alimentada com a mistura ternária (L+F+S), cujos componentes são transportados pelo eluente na direcção da fase líquida. O caudal aplicado na alimentação ($Q_{Al,p-LMS} = Q_{3,S1}$) e o tempo de carga (t_{S1} , tempo da etapa 1) deve garantir que o componente de afinidade intermediária, a frutose, não alcance a secção 4. As secções 3, 4, 1 e 2 estão conectadas em série como em uma coluna cromatográfica, de tal forma que a sua saída corresponde a corrente de colecta do componente intermediário (final da secção 2). Entre as secções 4 e 1, há uma corrente de eluente que auxiliará na eluição das substâncias mais adsorvidos nas secções 1 e 2.

Após o tempo da etapa 1 (t_{S1}), a unidade já tem sido carregada e o componente intermediário colectado, e então a etapa 2 se inicia, quando os componentes menos e mais adsorvidos, lactose e sorbitol, respectivamente, são recuperados. Na etapa 2, a fase adsorvente move-se em contracorrente com a fase líquida e isto é realizado usando a tecnologia de LMS, isto é, pela permutação das correntes de entrada e saída da unidade em intervalos de tempos regulares na direcção da fase fluida. Na Figura 6.2, a operação é representada em uma unidade de LMS equivalente a uma unidade de LMS. A corrente de alimentação é removida do sistema. Uma corrente de refinado aparece entre as secções 3 e 4 e uma corrente de extracto é introduzida entre as secções 1 e 2. A correcta determinação do tempo de

permutação (t_{p-LMS}^*), ou pseudo-caudal de fase estacionária (Q_S), e dos caudais nas três secções é crucial para direccionar a lactose para a corrente de refinado e o sorbitol para a corrente de extracto. No final da etapa 2, a frutose, como componente intermediário, deve ser posicionada principalmente na secção 2 para ser recuperada durante a etapa 1. A secção 1 possibilita a regeneração do adsorvente e a secção 4 garante a reciclagem do eluente.

A fim de se alcançar um bom desempenho da unidade de pseudo-LMS na separação ternária, alguns critérios com base na propagação de substâncias precisam ser satisfeitos. Se uma condição de alimentação é fornecida (caudal e concentração inicial dos componentes) para uma unidade com determinadas propriedades geométricas e de empacotamento, variáveis operacionais como tempo de operação das etapas, caudais nas secções, tempo de permutação (no caso da etapa 2) precisam ser determinados de forma a obedecer os critérios de performance requeridos. Na Tabela 6.7, estão descritas as equações para determinação das condições de operação de uma unidade de pseudo-LMS, seguindo o procedimento desenvolvido em Borges da Silva e Rodrigues (2008). A condição ideal de funcionamento fornecendo alta pureza dos componentes recuperados, maior produtividade e menor consumo de eluente está relacionada com os correctos fluxos de migração das substâncias no sentido da fase líquida ou sólida. A separação necessária é alcançada se cada componente migra através de cada secção para a saída do respectivo produto. Considerando uma condição ideal para a operação contra-corrente nas colunas da unidade, balanços de massa para cada componentes usando a hipótese de equilíbrio local podem ser dados por (Borges da Silva e Rodrigues, 2008),

$$x_{L,2/3,S2} = p_A L_C - x_{L,3,S1} = \frac{t_{S2}}{\varepsilon A_C \phi_L} (Q_{2/3,S2} - Q_S K_L) \quad (\text{com } p_A \geq \frac{x_{L,3,S1}}{L_C}) \quad (6.60)$$

$$x_{F,2/3,S2} = -(x_{F,3,S1} + p_I L_C) = \frac{t_{S2}}{\varepsilon A_C \phi_F} (Q_{2/3,S2} - Q_S K_F) \quad (\text{com } 0 < p_I < n_{c,2}) \quad (6.61)$$

$$x_{S,2/3,S2} = -(x_{S,3,S1} + p_B L_C) = \frac{t_{S2}}{\varepsilon A_C \phi_S} (Q_{2/3,S2} - Q_S K_S) \quad (\text{com } p_B > 0) \quad (6.62)$$

onde $\phi_i = 1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} K_i$. A variável $x_{i,j,Sn}$ é a distância percorrida pelo componente i na secção j durante etapa n ($= 1, 2$), $Q_{j,S2}$ e Q_S ($= (1-\varepsilon)A_C u_s$, onde u_s é a velocidade de sólido) são o caudal de líquido na secção j da unidade e o caudal de sólido, respectivamente, na etapa 2.

Os parâmetros p_i estão associados com o posicionamento das ondas de concentração dos componentes no final de uma etapa de um ciclo da unidade de pseudo-LMS, e são a chave para uma separação bem-sucedida, assumindo valores diferentes para cada componente. Na Tabela 6.7, são mostradas duas estratégias para determinar os caudais de líquido na secção 2 e 3 e de sólido. A estratégia 1 é para ser usada para uma mistura ternária quando o menor factor de separação está entre o componente intermediário e o componente mais fortemente adsorvido; enquanto a estratégia 2 é para quando a mais “difícil” separação ocorre entre o componente intermediário e o componente mais fracamente adsorvido.

Para determinar o valor óptimo das variáveis operacionais de projecto da unidade de pseudo-LMS, primeiramente uma estimativa inicial destas variáveis deve ser fornecida, podendo ser baseada na teoria de equilíbrio, conforme metodologia proposta na Tabela 6.7. A predição do comportamento e desempenho da unidade é realizada através da solução do modelo matemático descrito anteriormente no item 6.3.2, que leva em conta as não-idealidades do sistema (dispersão axial e resistência à transferência de massa). A subrotina de optimização busca a solução para as variáveis a serem optimizadas, condicionadas a função objectivo escolhida e a restrições impostas sobre uma ou mais variáveis de desempenho.

Tabela 6.07 – Estratégias de determinação das condições de operação de uma unidade de pseudo-LMS para uma separação ternária com isotermas lineares. (Borges da Silva e Rodrigues, 2008).

Etapa 1	
$t_{s1} = \bar{t}_L - 2 \left(\frac{2\bar{t}_L^2}{Pe} + \frac{2}{k_L} (\bar{t}_L - p_{ts1} \frac{\varepsilon L_C A_C}{Q_f}) \right)^{1/2} \quad (0 < p_{ts1} < n_{Se3})$	
$Q_{1,S1} = p_{QS1} \varepsilon \frac{L_C A_C}{t_{s1}} \left(1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} K_L \right) \quad (0 < p_{QS1} < n_{Se2})$	
$Q_{Al} = Q_{3,S1} = Q_{4,S1}; \quad Q_{El1} + Q_{Al} = Q_{1,S1} = Q_{2,S1}$	
Etapa 2	
Estratégia 1	Estratégia 2
$Q_{2,S2} = \frac{\varepsilon A_C}{t_{s2}} \left(\frac{K_S}{K_S - K_F} \right) \left[\phi_F x_{F,2/3,S2} - \phi_S \frac{K_F}{K_S} x_{S,2/3,S2} \right]$	$Q_{2,S2} = \frac{\varepsilon A_C}{t_{s2}} \left(\frac{K_F}{K_F - K_L} \right) \left[\phi_L x_{L,2/3,S2} - \phi_F \frac{K_L}{K_F} x_{F,2/3,S2} \right]$
$Q_S = \frac{\varepsilon A_C}{t_{s2}} \left(\frac{1}{K_S - K_F} \right) \left[\phi_F x_{F,2/3,S2} - \phi_S x_{S,2/3,S2} \right]$	$Q_S = \frac{\varepsilon A_C}{t_{s2}} \left(\frac{1}{K_S - K_L} \right) \left[\phi_L x_{L,2/3,S2} - \phi_F x_{F,2/3,S2} \right]$
$Q_{1,S2} = \beta_1 Q_S K_S - \frac{t_{s1}}{t_{s2}} Q_{Int}$	$(with \beta_1 > 1 \text{ and } \beta_1 > \frac{t_{s1} Q_{Int}}{t_{s2} Q_S K_S})$
$Q_{4,S2} = \beta_4 Q_S K_L - \frac{t_{s1}}{t_{s2}} Q_f$	$(with \frac{t_{s1} Q_f}{t_{s2} Q_S K_L} < \beta_4 < 1)$

* O parâmetro β representa uma ‘margem de segurança’ (Zhong e Guiochon, 1996).

O desempenho de uma unidade de pseudo-LMS para a separação da mistura ternária pode ser avaliado pela:

a) Pureza (Pu) dos componentes em suas respectivas correntes de colecta:

$$Pu_{i,m} = \frac{\bar{C}_{i,m}}{\sum_{s=A,I,B} \bar{C}_{s,m}} \quad (i,m = L,Ra; F,Int; S,Ex) \quad (6.63)$$

b) Produtividade (Pr) dos componentes

$$Pr_{i,m} = \frac{Q_m \bar{C}_{i,m}}{V_s} \frac{t_{Sn}}{t_{S1} + t_{S2}} \quad (n=1 \text{ com } i,m = L,Ra; S,Ex // n=2 \text{ com } i,m = F,Int) \quad (6.64)$$

c) Consumo de Eluente (EC):

$$EC_{i,m} = \frac{Q_{El1}t_{S1} + Q_{El2}t_{S2}}{Q_m \bar{C}_{i,m} t_{Sn}} \quad (n=1 \text{ com } i,m = L,Ra; S,Ex // n=2 \text{ com } i,m = F,Int) \quad (6.65)$$

onde $\bar{C}_{i,m}$ é a concentração média do componente i na respectiva corrente de recuperação m .

Neste procedimento, a função objectivo é dada pela produtividade total (Pr_T) da unidade, que é definida como a soma da produtividade em cada uma das correntes de recuperação, associada com a soma do inverso do consumo de eluente calculado para a recuperação de cada componente, de forma que

$$F_{obj} = \max imize \cdot \left[Pr_T + \frac{1}{EC_{L,Ra}} + \frac{1}{EC_{F,in}} + \frac{1}{EC_{S,Ex}} \right] \quad (6.66)$$

onde

$$Pr_T = \sum_{i,m,n} Pr_{i,m,n} \quad (6.67)$$

A restrição é imposta sobre os valores de pureza alcançados nas correntes de colecta da unidade, tal que

$$Pu_{i,m,n} - Pu_{i,m,n}^{requerida} \geq 0 \quad (6.68)$$

onde a variável $Pu_{i,m,n}^{requerida}$ refere-se a pureza requerida na recuperação do componente i na corrente m da etapa n , sendo esta variável definida como 99% para todos os componentes.

O conjunto de parâmetros de projecto diz respeito à: características do sistema (comprimento e diâmetro das colunas, número total de colunas e sua configuração, queda de

pressão máxima, porosidade, dispersão axial), parâmetros de cinética e equilíbrio de adsorção, composição da mistura de alimentação e condições operacionais. As condições operacionais são:

-Para a etapa 1: $t_{S1}, Q_{EI1}, Q_{AI} (Q_{1/2,S1}; Q_{3/4,S1})$

$$[p_{tS1}(Q_{3/4,S1}; Q_{2/3,S2}); p_{QS1}(t_{S1}; Q_{1/2,S1}; Q_{2/3,S2})]$$

-Para a etapa 2: $t_{S2}, Q_{EI2}; Q_{Ex}; Q_{Ra} (Q_{1,S2}; Q_{2/3,S2}; Q_{4,S2})$

$$[p_A; p_B (Q_{1,S2}; Q_{2/3,S2}; Q_{4,S2}; Q_S); p_C (Q_{1,S2}; Q_{2/3,S2}; Q_{5,S2}; Q_S); \beta_1(Q_{1,S2}); \beta_4(Q_{4,S2})]$$

A Tabela 6.8 apresenta os valores otimizados de t_{S1} e t_{S2} considerando a definição das demais condições operacionais. A definição dos parâmetros “ p ” (da etapa 1 e da etapa 2), que são empregados para o cálculo das condições operacionais listadas na referida tabela, é realizada através de regras de orientação apresentadas no trabalho de Borges da Silva e Rodrigues (2006; 2008). Os parâmetros de desempenho da unidade de pseudo-LMS de 4 secções para separar os três componentes são apresentados na Tabela 6.9.

A Figura 6.20 apresenta os perfis de concentração para as três espécies nas secções da unidade de pseudo-LMS, ao final dos intervalos de tempo das duas etapas de operação, depois de alcançado o estado cíclico estacionário. Durante toda a etapa 1 – a etapa de carga – pode ser verificado que a unidade é continuamente alimentada com a mistura a ser separada. Funcionando como uma coluna de leito fixo nesta primeira etapa do ciclo, o sistema faz com que todas as espécies sejam deslocadas no sentido da fase fluida, tornando possível a coleta da fructose na corrente intermediária. Durante a etapa 2, o sistema opera como uma unidade de LMS sem corrente de alimentação, e portanto os componentes sorbitol (S) e lactose (L) migram em direcção as suas respectivas correntes de enriquecimento. Há uma propagação da fructose, substância intermediária, em direcção a secção 2 que deve se localizar, ao final de t_{S2} , em uma determinada posição desta secção. Neste caso, as condições operacionais foram selecionadas de forma a fructose se posicionar na primeira subsecção anterior a secção 3 ($pI=1.0$).

Tabela 6.08 – Condições operacionais usadas na separação da mistura ternária composta de lactose, frutose e sorbitol na unidade de pseudo-LMS.

Etapa 1		Etapa 2	
Variáveis Otimizadas			
t_{S1}	4.193min	t_{S2}	92.733min
Parâmetros Operacionais de Entrada			
Q_{Al}	25.00 mL·min ⁻¹	Q_{Ra}	1.70 mL·min ⁻¹
Q_{El1}	39.30 mL·min ⁻¹	Q_{Ex}	5.36 mL·min ⁻¹
		Q_{El2}	7.06 mL·min ⁻¹
$Q_{1/2,S1}$	64.30 mL·min ⁻¹	$Q_{1,S2}$	7.80 mL·min ⁻¹
$Q_{3/4,S1}$	25.00 mL·min ⁻¹	$Q_{2/3,S2}$	2.44 mL·min ⁻¹
		$Q_{4,S2}$	0.73 mL·min ⁻¹
$C_{Al,L}$	100.7 g·L ⁻¹		
$C_{Al,F}$	16.0 g·L ⁻¹	Q_S	5.51 mL·min ⁻¹
$C_{Al,S}$	21.4 g·L ⁻¹		

* Configuração – 2/2/2/2

Tabela 6.09 – Parâmetros de desempenho para diferentes condições de alimentação na separação da mistura ternária em um sistema JO.

Componente	Pureza (%)	Recuperação (%)	Produtividade (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Cons. Eluente (L·g ⁻¹)
Lactose	100.0	99.7	8.551	0.078
Frutose	99.9	100.0	1.363	0.488
Sorbitol	99.9	100.0	1.841	0.361

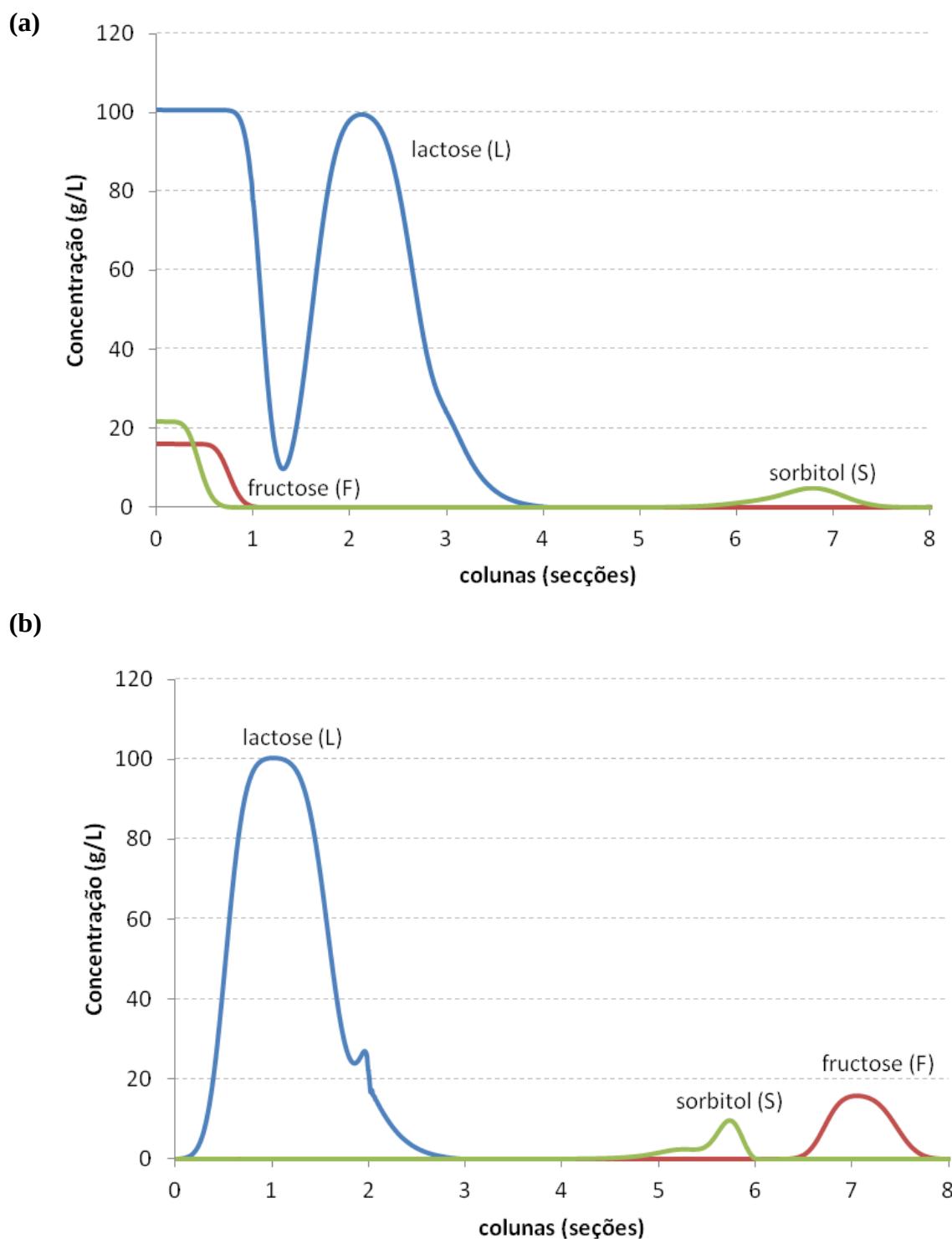


Figura 6.20 – Perfis de concentração dos componentes na separação ternária na unidade de pseudo-LMS (estado cíclico estacionário); (—) lactose (L); (·····) frutose (F) e (----) sorbitol (S). Tempo de operação: (a) no final da etapa 1; (b) no final da etapa 2. Condições de operação: Tabela 6.8.

A comparação entre desempenho obtido pela segunda unidade de LMS do sistema 2 com aquele obtido pela unidade de pseudo-LMS não poderia ser efectuada directamente, uma vez que esta última possibilita a recuperação dos três componentes em correntes de saída distintas. Considerando a hipótese, discutida no Capítulo 4, de se permitir que o substrato frutose seja totalmente consumido no processo de oxidação da lactose, a mistura resultante seria composta de AL, sorbitol e lactose não convertida. Como os níveis de concentração de lactose são mantidos altos em relação a frutose, a lactose nunca seria consumida por completo até o consumo total da frutose. Esta condição abre uma janela de possibilidades para o aproveitamento mais lógico do potencial da tecnologia de pseudo-LMS, quando apenas uma unidade de separação seria necessária para recuperar os componentes da mistura gerada no processo reactivo. Através de uma única unidade de pseudo-LMS, compostas de colunas empacotadas com a resina DOWEX na forma K^+ , seria possível a recuperação de AL (na corrente de refinado), de lactose (na corrente intermediária) e de sorbitol (na corrente de extracto). Muito embora, esta opção teria sua produtividade sempre penalizada pelo maior tempo de um ciclo reactivo para o consumo completo da frutose. A sua viabilidade em comparação as outras alternativas só poderia ser atestada definindo as variáveis mais relevantes no processo global de produção e separação do AL, e então a comparação destas variáveis de desempenho com a operação optimizada de cada um dos arranjos.

6.5 CONCLUSÕES

Este capítulo abordou a separação por adsorção da mistura contendo AL e sorbitol, lactose e frutose, em sistemas de cromatografia associados a tecnologia de LMS. O mecanismo de adsorção destas substâncias sobre as diversas formas iónicas da fase estacionária, apresentadas no Capítulo 5, foi explorado através de arranjos com fases estacionárias na forma K^+ e Ca^{++} . As isotérmicas de adsorção das substâncias para a fase estacionária na forma Ca^{++} foram determinadas e mostram uma ordem de afinidade contrária entre os produtos e substratos da mistura em comparação com a aquela obtida na forma K^+ . Alguns arranjos cromatográficos com essas duas fases estacionárias foram sugeridos e investigados seu comportamento e seu desempenho, mantendo iguais as dimensões geométricas das colunas para a separação. Este facto se mostra importante uma vez que as diversas configurações estudadas são tratadas de forma a obter uma melhor condição no sistema separativo.

Uma coluna cromatográfica operada de forma descontínua, carregada com a fase estacionária na forma K^+ , conseguiria separar os componentes desta mistura quaternária, muito embora, por melhor dimensionada e optimizadas suas condições de operação, é sabido levar a um grande consumo de eluente e conseqüente grau de diluição elevado das substâncias recuperadas. De forma análoga, é esperado que a tecnologia de LMS apresente vantagens sobre a cromatografia de eluição, no que diz respeito às variáveis de desempenho do processo. Geralmente, uma maior produtividade, um baixo factor de diluição, um menor consumo de eluente, são determinantes para se alcançar uma separação com menor custo.

Os sistemas propostos para o estudo foram: (1) três unidades de LMS em série, carregadas com resina na forma K^+ ; (2) duas unidades LMS sendo que a primeira unidade é carregada com a resina na forma K^+ e a segunda unidade com a resina na forma Ca^{++} ; (3) um coluna de cromatografia operada em modo descontínuo com resina na forma K^+ e associada a uma unidade de LMS com resina na forma Ca^{++} ; e (4) uma unidade pseudo-LMS de quatro secções conectado após a primeira unidade dos sistemas descritos anteriormente. As conclusões gerais de cada sistema são descritas nos parágrafos seguintes.

Sistema 1 – A associação de três unidades de LMS para a separação contendo apenas a fase estacionária na forma K^+ , para a separação da mistura quaternária parece ser inapropriada considerando os altos custos de cada unidade de LMS para a separação.

Sistema 2 – A associação em série de duas unidades de LMS carregadas com fases estacionárias diferentes possibilita a recuperação dos produtos puros em duas correntes, e uma outra contendo a fração da mistura dos substratos. Para a directa conexão em série, o caudal do extracto do LMS1 é a corrente de alimentação da unidade de LMS2. Foi demonstrado que a restrição de fluxo das zonas 1 das unidades de separação podem restringir o aproveitamento máximo do sistema uma vez que se inviabiliza uma das unidades operar em sua máxima capacidade. O conjunto de condições de operação mais apropriado para a separação dependerá sempre da variável de desempenho, quer dizer, a função objetivo, que se deseja maximizar ou minimizar. Há sempre que se definir as restrições associadas à eficiência de separação pretendida. No capítulo são apresentados alguns valores para os parâmetros m , usando a solução dos modelos matemáticos, que exprimem as condições óptimas para uma

determinada condição específica de desempenho. De qualquer forma, a aplicabilidade deste sistema no processo de separação da mistura parece ser indicada.

Sistema 3 – Neste sistema a cromatografia de eluição é empregada para separar a mistura quaternária em duas frações onde o AL é coletado directamente e a mistura das demais substâncias é direcionada para a unidade de LMS. Este arranjo foi avaliado devido ao elevado factor de separação para o AL quando a fase estacionária seleccionada está na forma K^+ . Tendo em consideração as características da coluna e das isotérmicas das substâncias, as seguintes condições óptimas na coluna cromatográfica para a separação do AL são: $t_{ciclo} = 27.23$ min, $t_{inj} = 2.27$ min e $Q_{Elu} = 25.0$ mL·min⁻¹. Os resultados de desempenho da coluna optimizada podem ser então comparados com aqueles obtidos na unidade de LMS 1 do Sistema 2, onde comprova-se a superioridade da tecnologia de LMS. Muito embora a produtividade alcançada com uma coluna poderia superar aquela da unidade de LMS se uma mesma carga de alimentação fosse aplicada.

Sistema 4 – O uso de uma unidade de pseudo-LMS de quatro secções foi investigado na separação da mistura ternária proveniente da primeira unidade descrita para cada um dos sistemas de separação anteriormente. A unidade separa os substratos lactose e frutose, e, o sorbitol (produto remanecente da corrente de extrato da primeira unidade separativa), em três correntes de elevada pureza. A separação dos substratos em correntes distintas possibilita uma melhor flexibilidade para a formulação do meio a ser alimentado no reactor enzimático.

A unidade de pseudo-LMS se mostra mais interessante para a condição onde a reacção de bioconversão é levada ao completo consumo da frutose. A obtenção do AL na corrente de refinado e do sorbitol na corrente do extrato, ambos, no segundo estágio do processo, poderia ser obtida com a unidade carregada com resina na forma K^+ . Nesta condição, apenas uma unidade de separação operada na forma pseudo-LMS de quatro secções seria suficiente para promover a separação dos produtos e do substrato remanecente.

Entretanto, outras importantes considerações se fazem necessárias para a decisão do arranjo ideal, por exemplo, um estudo económico envolvendo a questão do custo das fases móvel e estacionária empregadas, sendo que a função objetivo definida para o sistema repercute sobre o maior ou menor volume de uso destas fases.

6.6 NOMENCLATURA.

C	concentração na fase líquida ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_o	concentração inicial de entrada na fase líquida ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$\bar{C}$	concentração média na fase líquida ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
D_{ak}	coeficiente de dispersão axial na coluna k ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
d_p	diâmetro da partícula (m)
k_T	coeficiente de transferência de massa intraparticular
L_C	comprimento da coluna de leito fixo (m)
L_D	comprimento da coluna cromatográfica no processo descontínuo (m)
m	razão entre caudais da fase líquida e da fase sólida na teoria equilíbrio, (também usado para representar genericamente as correntes de saída)
$\bar{q}$	concentração média na fase adsorvente ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
q^*	concentração no adsorvente em equilíbrio com a concentração na fase líquida ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Q_S	caudal da fase sólida ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
Q	caudal da fase líquida ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
t	tempo (min)
t^*	tempo de permutação (min)
v	velocidade intersticial ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)
z	coordenada axial (m)
Ra	corrente de refinado ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
Ex	corrente de extracto ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
Pr	produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
cEL	consumo eluente ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$)
Pu	pureza (%)
Re	recuperação (%)
t_{ciclo}	tempo de ciclo (min)
t_{inj}	tempo de injeção (min)
t_{S1}	tempo da etapa 1 na unidade de pseudo-LMS (min)
t_{S2}	tempo da etapa 2 na unidade de pseudo-LMS (min)

V_{inj}	volume de injeção (mL)
D_h	difusividade homogênea ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
Pe	número de <i>Peclet</i> (-)

Subscritos

k	referente a coluna de leito fixo em uma unidade (LMS, pseudo-LMS)
i	referente a um componente em uma mistura
in	inicial
fn	final
LMS1	referente a primeira unidade de LMS
LMS2	referente a segunda unidade de LMS
F	frutose
L	lactose
AL	ácido lactobiônico
Al	corrente de alimentação
S	sorbitol
Ra	corrente de refinado
Ex	corrente de extracto
El	corrente de eluente

Letras gregas

ε	porosidade do leito,
α	factor de separação (-)
ε_b	porosidade do leito (-)
ε_p	porosidade da partícula (-)
μ	viscosidade da solução
γ^*	representação de restrições de fluxo líquido para um componente nas secções da unidade de LMS

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ando, M. ,M. Tanimura e M. Tamura (1990). Method of chromatographic separation. U.S. . **U.S. Patent 4,970,002.**

Azevedo, D. C. S. (2001). Separation/Reaction in Simulated Moving Bed. Porto, Portugal, University of Porto. **PhD Thesis.**

Azevedo, D. C. S. e A. E. Rodrigues (1999). " Design of a Simulated Moving Bed in the Presence of Mass-transfer Resistances." A.I.Ch.E. Journal **45**(5): 956-966.

Azevedo, D. C. S. e A. E. Rodrigues (2001). "Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for the inversion of sucrose and glucose-fructose separation." Chemical Engineering Journal **82**(1-3): 95-107.

Borges da Silva, E. A. ,A. A. U. de Souza ,A. E. Rodrigues e S. de Souza (2006). "Glucose isomerization in simulated moving bed reactor by Glucose isomerase." Brazilian Archives of Biology and Technology **49**(3): 491-502.

Borges da Silva, E. A. e A. E. Rodrigues (2006). "Design of chromatographic multicomponent separation by a pseudo-simulated moving bed." Aiche Journal **52**(11): 3794-3812.

Borges da Silva, E. A. e A. E. Rodrigues (2008). "Design methodology and performance analysis of a pseudo-simulated moving bed for ternary separation." Separation Science and Technology **43**(3): 533-566.

Broughton, D. B. e C. G. Gerhold (1961). Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets. **U.S.Patent No 2,985,589.**

Broughton, D. B. ,R. W. Neuzil ,J. M. Pharis e C. S. Brearley (1970). "Parex Process for Recovering Paraxylene." Chemical Engineering Progress **66**(9): 70-&.

Gomes, P. S. ,M. Zabkova ,M. Zabka ,M. Minceva e A. E. Rodrigues (2010). "Separation of Chiral Mixtures in Real SMB Units: The FlexSMB-LSRE (R)." Aiche Journal **56**(1): 125-142.

Guest, D. W. (1997). "Evaluation of simulated moving bed chromatography pharmaceutical process development." Journal of Chromatography A **760**(1): 159-162.

Guiochon, G. (1994). "Preparative Chromatography (Including 10th International-Symposium on Preparative Chromatography, Arlington, Va, June 14-16, 1993) - Foreword." Journal of Chromatography A **658**(2): 147-147.

Heuer, C. ,H. Kniep ,T. Falk e A. SeidelMorgenstern (1997). "Comparison of various process engineering concepts of preparative liquid chromatography." Chemie Ingenieur Technik **69**(11): 1535-+.

- Jupke, A. ,A. Epping e H. Schmidt-Traub (2002). "Optimal design of batch and simulation moving bed chromatographic separation processes." Journal of Chromatography A **944**(1-2): 93-117.
- Juza, M. ,O. Di Giovanni ,G. Biressi ,V. Schurig ,M. Mazzotti e M. Morbidelli (1998). "Continuous enantiomer separation of the Volatile inhalation anesthetic enflurane with a gas chromatographic simulated moving bed unit." Journal of Chromatography A **813**(2): 333-347.
- Kawajiri, Y. e L. T. Biegler (2006a). "Optimization strategies for simulated moving bed and PowerFeed processes." Aiche Journal **52**(4): 1343-1350.
- Kawajiri, Y. e L. T. Biegler (2006b). "Large scale nonlinear optimization for asymmetric operation and design of Simulated Moving Beds." Journal of Chromatography A **1133**(1-2): 226-240.
- Kim, J. K. e P. C. Wankat (2004). "Designs of simulated-moving-bed cascades for quaternary separations." Industrial & Engineering Chemistry Research **43**(4): 1071-1080.
- Kim, J. K. ,Y. F. Zang e P. C. Wankat (2003). "Single-cascade simulated moving bed systems for the separation of ternary mixtures." Industrial & Engineering Chemistry Research **42**(20): 4849-4860.
- Kurup, A. S. ,K. Hidajat e A. K. Ray (2006). "Optimal operation of a pseudo-SMB process for ternary separation under non-ideal conditions." Separation and Purification Technology **51**(3): 387-403.
- Lode, F. ,M. Mazzotti e M. Morbidelli (2001). "A new reaction-separation unit: The simulated moving bed reactor." Chimia **55**(10): 883-886.
- Maliska, C. R. (1995). Transferência de Calor e Mecânica dos Fluidos Computacional. Rio de Janeiro.
- Mata, V. G. e A. E. Rodrigues (2001). "Separation of ternary mixtures by pseudo-simulated moving bed chromatography." Journal of Chromatography A **939**(1-2): 23-40.
- Mazzotti, M. ,G. Storti e M. Morbidelli (1997). "Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations." Journal of Chromatography A **769**(1): 3-24.
- Minceva, M. e A. E. Rodrigues (2005). "Simulated moving-bed reactor: Reactive-separation regions." Aiche Journal **51**(10): 2737-2751.
- Minceva, M. ,V. M. T. Silva e A. E. Rodrigues (2005). "Analytical solution for reactive simulated moving bed in the presence of mass transfer resistance." Industrial & Engineering Chemistry Research **44**(14): 5246-5255.
- Nicoud, R. M. ,G. Fuchs ,P. Adam ,M. Bailly ,E. Kusters ,F. D. Antia ,R. Reuille e E. Schmid (1993). "PREPARATIVE-SCALE ENANTIOSEPARATION OF A CHIRAL EPOXIDE -

COMPARISON OF LIQUID-CHROMATOGRAPHY AND SIMULATED MOVING-BED ADSORPTION TECHNOLOGY." Chirality **5**(4): 267-271.

Nicoud, R. M. e R. E. Majors (2000). " Simulated moving bed chromatography for preparative separations." LC-GC Europe **18**(7): 887-891.

Pais, L. S. ,J. M. Loureiro e A. E. Rodrigues (1997a). "Separation of 1,1'-bi-2-naphthol enantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed." Chemical Engineering Science **52**(2): 245-257.

Pais, L. S. ,J. M. Loureiro e A. E. Rodrigues (1997b). "Modeling, simulation and operation of a simulated moving bed for continuous chromatographic separation of 1,1'-bi-2-naphthol enantiomers." Journal of Chromatography A **769**(1): 25-35.

Pais, L. S. ,J. M. Loureiro e A. E. Rodrigues (1998). "Separation of enantiomers of a chiral epoxide by simulated moving bed chromatography." Journal of Chromatography A **827**(2): 215-233.

Pedruzzi, I. ,E. A. B. da Silva e A. E. Rodrigues (2008). "Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol." Separation and Purification Technology **63**(3): 600-611.

Raithby, G. D. (1976). Prediction of Dispersion by Surface Discharge. Burlington, Ontario, Canada.

Satory, M. ,M. Furlinger ,D. Haltrich ,K. D. Kulbe ,F. Pittner e B. Nidetzky (1997). "Continuous enzymatic production of lactobionic acid using glucose-fructose oxidoreductase in an ultrafiltration membrane reactor." Biotechnology Letters **19**(12): 1205-1208.

Silva, V. M. e A. E. Rodrigues (2005). Industrial Process for Acetals Production in a Simulated Moving Bed Reactor. **WO05113476 A1**

Storti, G. ,M. Mazzotti ,M. Morbidelli e S. Carra (1993). "Robust Design of Binary Countercurrent Adsorption Separation Processes." Aiche Journal **39**(3): 471-492.

Strube, J. ,S. Haumreisser ,H. Schmidt-Traub ,M. Schulte e R. Ditz (1998). "Comparison of batch elution and continuous simulated moving bed chromatography." Organic Process Research & Development **2**(5): 305-319.

Takayuki, M. ,S. Tohru ,M. Fumihiko e H. Masaharu (1993). Process for fractional separation of multi-component fluid mixture L. JAPAN ORGANO CO. USA. **US5198120 (A)** 12.

UOP, L. (2006). UOP LLC. Understanding the SorbexTM Process. Endereço eletrônico: www.uop.com. Acesso: setembro/2009.

Wankat, P. C. (2001). "Simulated moving bed cascades for ternary separations." Industrial & Engineering Chemistry Research **40**(26): 6185-6193.

Zabkova, M. ,M. Zabka e A. E. Rodrigues (2009). "Separation of Racemic Chiral Drugs Using Immobilized CHIRALPAK IA: Methodology for Preparative Scale Development." Separation Science and Technology **44**(2): 275-303.

Zhong, G. M. e G. Guiochon (1996). "Analytical solution for the linear ideal model of simulated moving bed chromatography." Chemical Engineering Science **51**(18): 4307-4319.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este estudo abordou a temática da produção e separação cromatográfica do sorbitol e ácido lactobiônico (AL) formados na reacção de bioconversão da mistura lactose e frutose, catalisada pelas enzimas GFOR e GL, contidas em células da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC29191. As diversas etapas inerentes ao tema subdividiram-se em duas linhas principais de investigação: de bioprocesso e de separação. O fechamento do estudo foi convergido para a avaliação das técnicas avançadas de separação cromatográfica (tecnologia de leito móvel simulado –LMS- e o conceito de pseudo-LMS) e a obtenção dos produtos purificados. A etapa de bioprocesso incluiu os procedimentos à síntese das enzimas, através da produção e tratamentos subsequentes das células da *Z. mobilis*, a definição de um modelo cinético para a reacção de bioconversão e a condução do processo reacional nos modos de operação em células livres e imobilizadas. O estudo da separação das substâncias presentes no processo de bioconversão (lactose, frutose, AL e sorbitol) incluiu o estabelecimento de uma metodologia de quantificação rápida e eficiente em cromatografia líquida, a seleção de resinas e a determinação das condições de equilíbrio e cinética de adsorção e, finalmente, a separação por cromatografia líquida com a tecnologia de leito móvel simulado (LMS) e suas configurações derivadas avaliadas como instrumentos para a obtenção dos produtos AL e sorbitol puros. Alguns aspectos mereceram maior atenção e são destacados nos parágrafos a seguir, incluindo as principais conclusões obtidas de cada etapa.

O método analítico para a quantificação das substâncias lactose, frutose, sorbitol e AL marcou o início deste estudo no que tange ao processo de separação por cromatografia empregando resina de troca iónica e eluente aquoso levemente acidificado. O efeito da

alteração do pH do eluente sobre a conformação estrutural do AL e o efeito da temperatura sobre a separação da frutose e sorbitol contribuíram para a compreensão dos mecanismos de adsorção existentes entre as substâncias e a resina. O resultado deste estudo permitiu a obtenção de uma técnica analítica rápida e eficiente que emprega eluente simples e que não requer nenhum pré-tratamento da amostra.

O processo de síntese das enzimas GFOR e GL, desenvolvido através do cultivo das células da bactéria *Z. mobilis* na fermentação da glicose em modo semi-contínuo foi pouco produtivo para a obtenção do biocatalisador com elevada atividade destas enzimas. A produtividade em células mostrou-se sensível à composição da fonte de vitaminas do meio de cultivo além da concentração elevada de etanol no início do processo, afetando fortemente a fase de crescimento. A concentração mínima limite para crescimento e o limiar da concentração inibidora do etanol para o crescimento, ambos a $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, foram observados.

A cinética de bioconversão da lactose e frutose para a produção do AL e sorbitol pelas enzimas GFOR e GL revelou um comportamento intrínscio sendo que a razão para tal comportamento ainda não foi elucidada. A participação da frutose na reacção se mostra condicionada a um efeito que, para uma certa gama de concentrações, contribui para o ciclo das reacções de oxi-redução da GFOR e aparenta não afectar decisivamente a velocidade da reacção. Nesse sentido, a frutose pode ser vista como um instrumento de controle neste processo de bioconversão. A condição optimizada do reacção de bioconversão para a produção do AL e sorbitol estabelece, dentre as condições que foram investigadas, uma composição inicial de lactose e frutose nas concentrações de 700 mM e 350 mM, respectivamente. A conversão total da frutose em sorbitol, gerando uma mistura ternária equimolar no final do processo é obtida. Neste estudo, a concentração de biocatalisador ($7.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) é inferior a publicada na literatura sendo que melhores resultados são esperados para este processo em maior concentração celular.

A cinética da GFOR pode ser modelada em uma equação do tipo ping-pong para concentrações baixas da lactose (20 a 100 mM). No entanto, a cinética descreve um comportamento cooperativo que não segue a equação de Michaelis-Mentem quando a concentração da lactose aumenta até 700 mM (concentração de operação assumida), onde são alcançadas as maiores velocidades de reacção. O modelo de Hill descrito para o mecanismo cinético do tipo ping-pong ajustou os pontos experimentais a altas concentrações da lactose

(400 a 700 mM) sendo a frutose fixada em 350 mM. O modelo consegue prever o comportamento para distintas concentrações do biocatalisador.

A cinética com biocatalisador imobilizado em esferas de Ca-alginato de diâmetro médio da matriz igual a 1,2 mm apresentou os melhores resultados em termos de rendimento e produtividade de bioconversão. O modelo de Hill mostrou bom ajuste dos pontos experimentais para esta condição, onde foi admitido, portanto, não haver nenhum efeito adverso nas propriedades da enzima e à resistência a transferência de massa. O ensaio cinético com a matriz de Ca-alginato de diâmetro medio 1.7 mm mostrou que a concentração do AL na fração líquida é menor do que a esperada pela estequiometria da reacção. A concentração da frutose na fração líquida é nula muito embora a concentração do sorbitol não corresponda ao valor estequiométrico da reacção. Isto pode ser justificado por um acúmulo de massa no interior das partículas tanto dos substratos como dos produtos, ou ainda, uma fração dos substratos pode estar inacessível as enzimas. A fração líquida resultante do processo imobilizado é límpida e é provável que apenas uma etapa de filtração, e eventual diluição, seriam necessárias antes da etapa de separação.

Para a seleção da fase estacionária a ser empacotada nas colunas de cromatografia preparativa se avaliaram três resinas comerciais do tipo gel com diferentes tamanhos de partícula, grau de reticulação e, também, com diferentes contra-íões fixados nos grupos sulfônicos (Ca^{++} , H^+ e K^+). A resina de troca iônica de reticulada (4% PS-DVB), na forma K^+ , mostrou o melhor desempenho para a separação quaternária nas condições experimentais utilizadas. A resina com contra-íão Ca^{++} apresentou uma ordem de afinidade contrária entre os produtos e substratos quando comparada com os resultados da resina na forma K^+ . Os dados de equilíbrio do AL sobre a resina de troca iônica na forma K^+ têm revelado uma isotérmica desfavorável. Para as demais substâncias, isotérmicas de equilíbrio lineares foram obtidas na faixa de concentração investigada (até $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A cinética de adsorção na resina na forma K^+ foi representada por um coeficiente global de transferência de massa (k_h) que considera o efeito da resistência de transferência de massa intraparticular em um modelo de força motriz linear (modelo LDF). Entre as substâncias com isotérmicas lineares, o sorbitol apresentou a mais rápida cinética de difusão. Quanto ao AL, um modelo de equilíbrio dispersivo local pôde ser usado para predizer as curvas de ruptura do AL adsorvendo neste tipo de resina. Para a resina na forma Ca^{++} , a frutose foi o componente mais retido.

Os arranjos cromatográficos com duas fases estacionárias nas formas K^+ e Ca^{++} foram investigados para a separação da mistura quaternária, sendo avaliado seu comportamento e seu desempenho na condição de iguais dimensões geométricas das colunas para a separação. Este facto se mostra importante uma vez que as diversas configurações estudadas são tratadas de forma a obter uma melhor condição no sistema separativo.

Entre os arranjos propostos para a separação quaternária, a associação em série de duas unidades de LMS com diferentes fases estacionárias e, ainda, a unidade de pseudo-LMS de quatro secções se apresentam promissoras. A associação em série com duas unidades de LMS possibilita a recuperação dos produtos puros em duas correntes, e uma outra contendo a fração da mistura dos substratos. O conjunto de condições de operação mais apropriado para a separação dependerá sempre da variável de desempenho que se deseja maximizar ou minimizar, respeitando a definição das restrições associadas a eficiência de separação pretendida. No capítulo 6 são apresentados alguns valores para os parâmetros “ m ”, usando a solução dos modelos matemáticos, que exprimem as condições óptimas para uma determinada condição específica de desempenho.

O uso de uma unidade de pseudo-LMS de quatro secções como segunda unidade de separação permite obter as componentes da mistura ternária resultante do primeiro sistema de separação em três correntes distintas de elevada pureza. A separação dos substratos em correntes distintas possibilita uma melhor flexibilidade para a formulação do meio a ser alimentado no reactor enzimático. Esta unidade, ainda, se mostra mais interessante para a condição onde a reacção de bioconversão é levada ao completo consumo da frutose. A obtenção do AL na corrente de refinado e do sorbitol na corrente do extrato, ambos, no segundo estágio do processo, poderia ser obtida com a unidade carregada com resina na forma K^+ . Nesta condição, apenas uma unidade de separação operada na forma pseudo-LMS de 4 secções seria suficiente para promover a separação dos produtos e do substrato remanecente.

Durante o desenvolvimento das atividades inerentes ao estudo alguns temas se mostram particulares com potencial para serem investigados em complemento aos objetivos propostos. Nos parágrafos seguintes, alguns deles são sugeridos para futuras investigações.

Os resultados experimentais da velocidade de reacção de bioconversão da mistura lactose/frutose com GFOR/GL dão indícios de se tratar de uma cinética com mecanismos regulatórios do tipo cooperativo e com efeito heterotrópico. Alguns modelos alternativos para

descrever o mecanismo cinético bi-substrato do tipo ping-pong, englobando propriedades cooperativas, como por exemplo o modelo de Monod, Wyman e Changeux (MWC) e variantes poderiam ser avaliados na continuidade dos estudos de cinética.

A reacção de bioconversão mantendo o biocatalisador imobilizado melhora o rendimento do processo, desde que os efeitos de resistência à transferência de massa sejam desprezíveis. Técnicas de imobilização em matriz de Ca-alginato que permitam a obtenção de uma maior fração de esferas com diâmetros médios satisfatórios para a condução do processo sem resistências difusionais se mostra necessária. Adicionalmente, o estudo empregando outras matrizes como k-carrageenam e PVA, que são reportadas na literatura como eficientes para a imobilização da *Z. mobilis* poderiam ser investigadas. A determinação da atividade específica das enzimas GFOR/GL nesse processo de bioconversão em sistema livre e imobilizado se mostra interessantes para a comparação das eficiências com as demais enzimas capazes de produzir o AL.

A condução do processo de bioconversão com separação simultânea requer um aprofundamento mais detalhado sobre as condições da cinética de bioconversão. A possibilidade de utilizar a frutose como um instrumento de controle da reacção poderia ser extrapolada para uma condição com ausência de controle do pH da reacção, onde AL seria produzido na sua forma ácida. Outros sistemas de separação associados a unidade de reacção que empreguem membranas selectivas para o AL ou sorbitol mostram-se interessantes e poderiam ser avaliados.

A comparação dos arranjos das unidades cromatográficas e a definição daquele que seria o mais indicado para a separação proposta envolve a complexa tarefa de definir um conjunto de critérios de desempenho a serem alcançados. Adicionalmente, seria ainda necessário acrescentar uma análise económica elementar dos custos envolvidos para cada arranjo em particular. No capítulo 6 desta tese, mostrou-se a aplicabilidade dos sistemas sugeridos e pouca atenção foi dada a comparação de facto dos sistemas. Como sugestão, seria sempre interessante a selecção de uma condição de desempenho específica envolvendo uma análise de custos elementar que permitisse concluir o potencial de cada unidade dimensionada.

O estudo experimental da separação em uma unidade de LMS piloto poderia corroborar os modelos matemáticos empregados para descrever os comportamentos das unidades separativas que são utilizados na metodologia de otimização das unidades dos sistemas.